รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2561

1. ชุดโครงการวิจัย

2. โครงการวิจัย **การประเมินคุณค่าและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมพืช**

3. ชื่อการทดลอง การใช้เทคนิค NIR ในการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนในเมล็ด เพื่อประเมินคุณค่าเชื้อพันธุ์ถั่วเหลืองในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (Predictation of Isoflavone Content in Seeds by NIR Technique for Evaluate Soybean Germplasm in Genebank)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง พิทยา วงษ์ช้าง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน ปาริฉัตร สังข์สะอาด อนุวัฒน์ รัตนชัย อ้อยทิน ผลพานิช

5. บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีโปรตีนและน้ำมันสูงมีการใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น เป็นอาหารของมนุษย์ทั้งในรูปของการบริโภคโดยตรง ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และในถั่วเหลืองยังมีสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยเฉพาะสารไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซึ่งเป็น พฤกษเคมี (phytochemical) ที่มีความโดดเด่น โดยมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ aglycones และ glucoside โดยไอโซฟลาโซนในรูป glucoside อยู่ในรูปอนุพันธ์ 2 ชนิดคือ malonyl และ acetyl ไอโซฟลาโวนเป็นสารโภชนเภสัชมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเป็นไฟโตเอสโทรเจนลดปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับอาการหลังการหมดประจำเดือน ป้องกันการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก โรคหัวใจและหลอดเลือด อีกทั้งช่วยรักษาความชุ่มชื้น ยืดหยุ่น และลดความเหี่ยวย่นของผิวหนัง

ปัจจุบันธนาคารเชื้อพันธุ์พืชไม่มีข้อมูลสารไอโซฟลาโวนของถั่วเหลืองในแต่ละตัวอย่างพันธุ์ และเชื่อว่าในแต่ละตัวอย่างพันธุ์มีปริมาณของสารไอโซฟลาโวนที่แตกต่างกัน ซึ่งถือว่าเป็นฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย หากมีฐานข้อมูลในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชแล้วจะทำให้มีความสะดวกในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และเป็นประโยชน์ในทางการค้า ในการทดลองหาปริมาณสารไอโซฟลาโวนใช้วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และใช้เทคนิค NIR ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ไม่ทำลายตัวอย่างโดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยตัวอย่าง เป็นวิธีการที่ให้ผลที่ดีและรวดเร็ว หลักการคือการสร้างสมการจากค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์และค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมินต่ำก็สามารถนำสมการนี้ใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ในการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในถั่วเหลือง จำนวน 200 ตัวอย่าง โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR ได้สเปกตรัมของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และได้ค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวนจากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างสมการและปรับสมการสำหรับประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวนได้สมการ 7 สมการ และเมื่อทำการทวนสอบสมการ โดยนำตัวอย่างเมล็ดถั่ว

เหลือง จำนวน 10 ตัวอย่าง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR ทำนายค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด เปรียบเทียบกับค่าการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสมการสำหรับการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด กับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้เทคนิค NIR ทำนายปริมาณสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลืองได้

Abstract

Soybean has a high protein and oil contents in seed which has a useful for human foods and foods industry. The important ingredient in soybean that was a isoflavone which was call as a phytochemical, its has two form they were aglycones and glucoside, glucoside consist of two derivative malonyl and acetyl. Isoflavone was a nutrition that were medicinal effects as a antioxidants and phytoestrogen to decrease menopausal symptoms, prevent cause of the disease such as breast cancer, prostate cancer, cardiovascular disease and also maintain moisture, elasticity and reduce skin wrinkles.

In present Genebank was lack of isoflavone content data in soybean and believe that isoflavone content in each variety were different that were an important data to serve for plant breeder and commercial use in the future. The methods to use in the experiment to found isoflavone content in soybean seed were analysis from the laboratory and NIR technique, which was an undestructive seed by using light absorption that was rapid method. The experiment use the correlation of measure between laboratory analysis and NIR technique to created an equation, which were select high correlation (R^2) and low standard error of prediction (SEP) and use an equation for predicted isoflavone content instead analysis from laboratory. In the experiment, 200 accessions of soybean were extract to found isoflavone content which were Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein and total isoflavone by using two methods to compare the isoflavones content and get the measures to form 7 equations. Validate the measures by using 10 accessions unknown of soybean to compare the measures from methods, the result shown that can be using NIR technique to predict isoflavones content in soybean.

คำนำ

ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชที่สำคัญและเป็นพืชอาหารเก่าแก่พืชหนึ่งของโลก ชาวจีนรู้จักใช้ประโยชน์พืชนี้มานานกว่า 4,700 ปีมาแล้ว ประโยชน์ของถั่วเหลืองมีมากมายหลายประการ เช่น ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ทั้งในรูป

ของการบริโภคโดยตรง ใช้ปรุงแต่งอาหารในรูปแบบต่างๆ หรือใช้ในอุตสาหกรรม นอกนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทั้งนี้เพราะถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีโปรตีนและน้ำมันสูงมาก เมล็ดมีโปรตีนตั้งแต่ 35 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำมัน 15 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ (กรมพัฒนาที่ดิน, มปป) ถั่วเหลืองมีสารสำคัญต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากมายโดยเฉพาะ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) นั้นเป็นสารที่พบมากในถั่วเหลือง และเป็นสารตัวหนึ่งที่โดดเด่นและน่าสนใจ ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจะอยู่ในธรรมชาติเป็น 2 รูปแบบ คือ aglycones และ glucoside โดยไอโซฟลาโซนในรูป glucoside สามารถอยู่ในรูปอนุพันธ์ 2 ชนิดคือ malonyl และ acetyl สารดังกล่าวข้างต้นจะพบในถั่วเหลืองในปริมาณที่แตกต่างกัน (วันดีและคณะ, มปป) สารไอโซฟลาโวนเป็นพฤกษเคมี (phytochemical) ที่มีสรรพคุณต่อสุขภาพเป็นสารโภชนเภสัชมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และเป็นไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) ซึ่งทำงานคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen, 17b-estradiol E2 Isoflavones) เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ทำให้ไดแอดเซอินสามารถจับกับโปรตีนตัวรับของเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในร่างกายได้ สามารถใช้สารนี้ลดปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับอาการหลังการหมดประจำเดือน (menopausal symptoms) หรืออาจมีผลป้องกันหรือปรับเปลี่ยนภาวะความผิดปกติของร่างกายหรือการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็งบางชนิด โรคหัวใจและหลอดเลือด (Shimoni, E. 2003) อีกทั้งยังช่วยรักษาความชุ่มชื้น ยืดหยุ่น และลดความเหี่ยวย่นของผิวหนัง มีการวิจัยพบอีกด้วยว่า ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองช่วยลดและป้องกันโรคมะเร็งเต้านม และส่วนในเพศชายช่วยป้องกันและยับยั้งโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก แม้ว่ากลไกในการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัดแต่นักวิจัยพบว่าผู้ชายที่รับประทานผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองยิ่งมากเท่าไร การเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมากยิ่งพบน้อยลง (Good health, 2006)

ปัจจุบันในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชยังไม่มีข้อมูลของสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช และเชื่อว่าปริมาณของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์นั้นมีปริมาณที่ไม่เท่ากันซึ่งถือว่าเป็นฐานข้อมูลเชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย หากมีฐานข้อมูลเหล่านี้ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชแล้วจะทำให้เกิดความสะดวกในการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ของนักปรับปรุงพันธุ์รวมถึงการคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำไปใช้ในทางการค้าได้ในอนาคต ในการหาปริมาณสารดังกล่าวจะใช้วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และใช้เทคนิค NIR (Near Infrared) ซึ่งเป็นการใช้เครื่องมือวิเคราะห์โมเลกุลที่ไม่ทำลายตัวอย่าง โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างเป็นวิธีการที่ให้ผลที่ดีและรวดเร็ว หลักการของ NIR Spectroscopy คือ (หน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, มปป) การสร้างสมการจากค่าสหสัมพันธ์ (R, R2) ระหว่างค่าการดูดซับแสง Near Infrared ที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนหนึ่ง และค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) ต่ำ ก็นำสมการนี้ใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป (อนุวัฒน์และคณะ, มปป)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช และศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จำนวนไม่น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง MPA FT-NIR Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 800 – 2500 นาโนเมตร ที่ศูนย์วิจัยและปฏิบัติการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

2. วิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Cherdshewasart *et al.*, 2007) ศูนย์วิจัยและปฏิบัติการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน

3. นำ spectra ต้นแบบ (original spectra) ที่ได้สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) จากโปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler ของบริษัท Camo Oslo ของประเทศนอร์เวย์

4. ทำการคัดเลือกสมการโดยพิจารณาค่า Correlation Coefficient (R) สูง ค่า Standard Error of Calibration (SEC) ต่ำ และค่า Standard Error of Prediction (SEP) ต่ำ

5. ตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของสมการที่สร้างขึ้น โดยนำสมการไปประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับค่าการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

6. นำสมการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวนในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

เวลาและสถานที่ ศูนย์วิจัยและปฏิบัติการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ระยะดำเนินการ ตุลาคม 2559-กันยายน 2561

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบการวิเคราะห์ ปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในถั่วเหลือง จำนวน 160 ตัวอย่าง นำถั่วเหลืองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง MPA FT-NIR Spectrophotometer ได้สเปกตรัมของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในห้องปฏิบัติการ

2. ปี 2561 ได้เพิ่มจำนวนตัวอย่าง 40 ตัวอย่าง รวมจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้สเปกตรัมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง รวมจำนวน 200 ตัวอย่าง สร้างสมการและปรับสมการสำหรับประเมินปริมาณปริมาณสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค NIRS รวมจำนวน 7 สมการ

3. ได้สเปกตรัมของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง รวมจำนวน 200 ตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1170 1367 1754 1943 และ 2471 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่นเหล่านี้เป็น peak ที่มีความเกี่ยวข้องกับสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (ภาพที่ 1)

จากการสร้างสมการและปรับสมการจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 200 ตัวอย่าง ทำ calibration ด้วยวิธี PLS regression โดยการใช้ spectra เริ่มต้น (original) แบบ Full cross validation กับค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร พบว่าสมการจาก original spectra ของสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone มีดังนี้

1. Daidzin มีค่าสหสัมพันธ์ (R) ระหว่างการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการกับค่าการทำนาย เท่ากับ 0.91 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนาย Standard Error of Prediction (SEP) เท่ากับ 9.75 ppm ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่ม Standard Error of Calibration (SEC) เท่ากับ 7.33 ppm มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (F) = 8 ปัจจัย ค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่ากับ 23.89 ppm และสมการประเมินปริมาณ Daidzin ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 17.92– 103.43 ppm มีค่าเฉลี่ย 55.54 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในการประเมินปริมาณ Daidzin ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1520 1980 2000 2100 2242 2294 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสารไอโซฟลาโวน ที่ 1980 nm เป็นค่าของโปรตีน ที่ 2000 และ 2100 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2242 และ 2294 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน

2. Daidzein ค่าสหสัมพันธ์ (R) = 0.90, SEP = 0.79 ppm, SEC = 0.45 ppm, F = 10 ปัจจัย, SD = 1.89 ppm และสมการประเมินปริมาณ Daidzein ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 2.77–9.75 ppm มีค่าเฉลี่ย 5.33 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Daidzein ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1520 1580 1900 1980 2000 2100 2242 2294 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1980 nm เป็นค่าของโปรตีน ที่ 1580 1900 2000 และ 2100 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2242 และ 2294 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน

3. Glycitin ค่าสหสัมพันธ์ (R) =0.92, SEP = 5.81 ppm, SEC = 3.52 ppm, F = 9 ปัจจัย, SD = 15.27 ppm และสมการประเมินปริมาณ Glycitin ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 18.36–75.56 ppm มีค่าเฉลี่ย 40.22 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Glycitin ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1440 1520 1900 1940 2000 2100 2242 2276 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1940 nm เป็นค่าของน้ำ ที่ 1440 1900 2000 2100 และ 2276 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2242 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน

4. Glycitein ค่าสหสัมพันธ์ (R) =0.91, SEP = 0.25 ppm, SEC = 0.17 ppm, F = 9 ปัจจัย, SD = 0.64 ppm และสมการประเมินปริมาณ Glycitein ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ตั้งแต่ 1.03–3.62 ppm มีค่าเฉลี่ย

2.38 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Glycitein ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1440 1520 1580 1900 2000 2180 2276 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1440 1580 1900 2000 และ 2276 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2180 nm เป็นค่าของโปรตีน

5. Genistin ค่าสหสัมพันธ์ (R) =0.92, SEP = 12.90 ppm, SEC = 7.65 ppm, F = 10 ปัจจัย, SD = 33.11 ppm และสมการประเมินปริมาณ Genistin ในเมล็ดถั่วเหลือง ตั้งแต่ 17.64–139.57 ppm มีค่าเฉลี่ย 65.27 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Genistin ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1510 1520 1900 2000 2080 2180 2276 2380 และ 2461 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 2080 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1900 2000 2276 และ 2461 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 1510 และ 2180 nm เป็นค่าของโปรตีน

6. Genistein ค่าสหสัมพันธ์ (R) = 0.89, SEP = 0.33 ppm, SEC = 0.17 ppm, F = 10 ปัจจัย, SD = 0.76 ppm และสมการประเมินปริมาณ Genistein ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ตั้งแต่ 2.20–4.96 ppm มีค่าเฉลี่ย 3.49 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Genistein ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 1410 1450 1520 1580 1900 2000 2080 2180 2252 และ 2461 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 1410 1520 และ 2080 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 1450 1580 1900 2000 2252 และ 2461 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 2180 nm เป็นค่าของโปรตีน

7. Total isoflavone ค่าสหสัมพันธ์ (R) = 0.92, SEP = 27.86 ppm, SEC = 21.62 ppm, F = 8 ปัจจัย, SD = 72.35 ppm และสมการประเมินปริมาณ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ตั้งแต่ 58.87–326.56 ppm มีค่าเฉลี่ย 161.82 ppm ค่า regression coefficient ของเมล็ดถั่วเหลือง ในการประเมินปริมาณ Total isoflavone ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า regression coefficient ที่ 970 1410 1520 1980 2100 2242 2294 และ 2380 nm ซึ่งตำแหน่งความยาวคลื่นที่ 970 1410 1520 และ 2380 nm เป็นค่าของ phenyl group ที่ 2100 nm เป็นค่าของแป้งสตาร์ช ที่ 1980 nm เป็นค่าของโปรตีน ที่ 2242 และ 2294 nm เป็นค่าของกรดอะมิโน (Table 1 และ 2) และ (Figure 2)

จากการหาความสัมพันธ์จากการทำนายค่าสารไอโซฟลาโวน Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วย NIR และค่าที่วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มีค่า 0.90 0.82 0.86 0.84 0.86 0.80 และ 0.85 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) จากการสร้างสมการจากจำนวนตัวอย่าง 200 ตัวอย่าง ถึงแม้ว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจจะสูงขึ้น หากมีการทดลองต่อไปควรเพิ่มตัวอย่างที่มีค่าสารไอโซฟลาโวนที่หลากหลายมากขึ้น เช่น Daidzin 75-85 ppm Daidzein 8-10 ppm Glycitin 50-60 ppm Glycitein 1-2 ppm Genistin 75-150 ppm Genistein 4.5-5 ppm และ Total isoflavone 200-300 ppm

ขั้นตอนการทำ validation หลังจากได้สมการ calibration แล้ว ทำการทวนสอบว่าสมการที่สร้างขึ้นมาสามารถนำมาทำนายข้อมูลชุดอื่นได้ ซึ่งการทดสอบสมการประเมินค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่ว

เหลือง โดยนำตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 10 ตัวอย่าง ไปสแกนด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrophotometer และทำนาย (predicted) ค่าปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีความถูกต้องมากน้อยแค่ไหน (Standard Error of Prediction ; SEP) ค่าเฉลี่ยของการทำนายกับค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างกันหรือไม่ (bias) ค่าสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบว่าสมการ calibration ที่สร้างขึ้นมามีความถูกต้องสามารถนำไปใช้งานได้คือ ค่า SEP และ bias ควรมีค่าน้อยๆ ถึงจะแสดงว่าสมการ calibration มีความเหมาะสมที่จะนำเครื่อง NIR มาใช้ในการทำนายคุณลักษณะที่ต้องการหา รวมทั้งค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

การคำนวณค่า SEP และค่า bias ของปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่ทำนายได้กับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งมีค่า SEP = 1.74 0.35 1.12 0.19 1.75 0.14 และ 4.13 ppm ตามลำดับ ค่า bias = 0.67 -0.01 -0.08 -0.06 -1.10 -0.01 และ 0.68 ppm ตามลำดับ ค่า bias มีค่าเป็นลบแสดงว่า ค่าที่ทำนายได้มีค่ามากกว่าค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 3-9) และนำสถิติ t-test ใช้ทดสอบความแตกต่างหรือเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวิธีการ 2 วิธี พบว่า สมการสำหรับการประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง กับค่าวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ดังนั้นจึงสามารถนำสมการไปใช้ประเมินปริมาณสารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ได้แก่ Daidzin Daidzein Glycitin Glycitein Genistin Genistein และ Total isoflavone ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้

สรุปผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Williams, P. and K. Norris. 2001. *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. Inc.: St Paul, Minesota. 312 p.

ตารางที่ 1 Partial Least Square calibration result for isoflavones values of 200 samples soybean seed.

Isoflavones	Sample	Math methods	Wavelength region (nm)	F	R	SEC	SEP	SD	Bias	N
Daidzin	seed	Original	800-2500	8	0.91	7.33	9.75	23.89	-0.0316	82

Daidzein	seed	Original	800-2500	10	0.90	0.45	0.79	1.89	-0.0186	72
Glycitin	seed	Original	800-2500	9	0.92	3.52	5.81	15.27	-0.0760	76
Glycitein	seed	Original	800-2500	9	0.91	0.17	0.25	0.64	0.0019	92
Genistin	seed	Original	800-2500	10	0.92	7.65	12.90	33.11	-0.0118	78
Genistein	seed	Original	800-2500	10	0.89	0.17	0.33	0.76	0.0010	66
Total isoflavone	seed	Original	800-2500	8	0.92	21.62	27.86	72.35	0.091	88

R: Multiple correlation coefficients
F: The number of factors used in the calibration equation
SEC: Standard error of calibration, SEP: Standard error of prediction
SD: Standard Deviation of actual value
Bias: The average of difference between actual value and NIR value, N: Number of samples

ตารางที่ 2 The characteristics of samples used in model for isoflavones values of 200 samples soybean seed.

Isoflavones	Sample	Min-Max	Mean	SD	Unit
Daidzin	seed	17.92-103.43	55.54	23.89	ppm
Daidzein	seed	2.77-9.75	5.33	1.89	ppm
Glycitin	seed	18.36-75.56	40.22	15.27	ppm
Glycitein	seed	1.03-3.62	2.38	0.64	ppm
Genistin	seed	17.64-139.57	65.27	33.11	ppm
Genistein	seed	2.20-4.96	3.49	0.76	ppm
Total isoflavone	seed	58.87-326.56	161.82	72.35	ppm

ตารางที่ 3 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Daidzin value in soybean seed.

Samples	Method to determine Daidzin		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	103.43	101.57	1.86	3.47
2	83.95	82.51	1.44	2.06
3	50.20	52.74	-2.54	6.45
4	34.82	33.03	1.78	3.18
5	88.53	87.93	0.60	0.37
6	49.31	47.94	1.37	1.87
7	26.86	28.70	-1.83	3.36
8	62.86	60.24	2.62	6.89
9	102.10	102.35	-0.25	0.06
10	71.52	69.87	1.65	2.73
Total	673.59	666.88	6.71	30.43
Average	67.36	66.69	0.67	3.04

ตารางที่ 4 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Daidzein value in soybean seed.

Samples	Method to determine Daidzein		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	6.25	6.14	0.11	0.01
2	2.79	2.43	0.36	0.13
3	4.14	4.73	-0.60	0.36
4	8.31	8.00	0.31	0.10
5	9.75	9.45	0.30	0.09
6	7.54	7.86	-0.32	0.10
7	6.90	6.42	0.48	0.23
8	4.30	4.58	-0.28	0.08
9	4.30	4.59	-0.29	0.08
10	6.36	6.60	-0.24	0.06
Total	60.65	60.80	-0.14	1.24
Average	6.07	6.08	-0.01	0.12

ตารางที่ 5 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Glycitin value in soybean seed.

Samples	Method to determine Glycitin		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	62.05	62.82	-0.77	0.59
2	75.56	76.40	-0.84	0.70
3	43.28	44.91	-1.63	2.66
4	46.00	45.06	0.95	0.90
5	18.36	18.23	0.14	0.02
6	32.16	32.55	-0.39	0.15
7	43.30	42.09	1.22	1.48
8	39.06	38.46	0.60	0.36
9	39.06	40.76	-1.70	2.88
10	71.52	69.87	1.65	2.73
Total	470.37	471.14	-0.77	12.46
Average	47.04	47.11	-0.08	1.25

ตารางที่ 6 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Glycitein value in soybean seed.

Samples	Method to determine Glycitein		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	1.03	1.20	-0.17	0.03
2	1.85	1.53	0.32	0.10
3	2.93	2.82	0.11	0.01
4	2.02	2.22	-0.19	0.04
5	2.98	2.84	0.14	0.02
6	1.50	1.65	-0.15	0.02
7	2.32	2.41	-0.08	0.01
8	2.45	2.63	-0.18	0.03
9	1.68	1.75	-0.07	0.01
10	2.62	2.91	-0.29	0.08
Total	21.39	21.96	-0.57	0.35
Average	2.14	2.20	-0.06	0.03

ตารางที่ 7 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Genistin value in soybean seed.

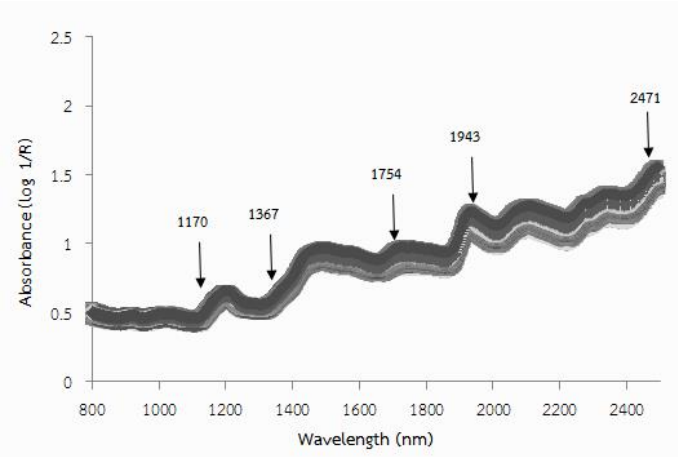
Samples	Method to determine Genistin		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	42.84	43.90	-1.06	1.13
2	58.70	60.65	-1.95	3.80
3	51.13	52.68	-1.55	2.39
4	88.60	87.68	0.92	0.85
5	28.15	27.05	1.10	1.21
6	95.80	97.61	-1.81	3.27
7	53.03	55.27	-2.24	5.01
8	115.28	118.49	-3.21	10.30
9	46.82	48.39	-1.57	2.45
10	28.86	28.47	0.38	0.15
Total	609.21	620.19	-10.98	30.56
Average	60.92	62.02	-1.10	3.06

ตารางที่ 8 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Genistein value in soybean seed.

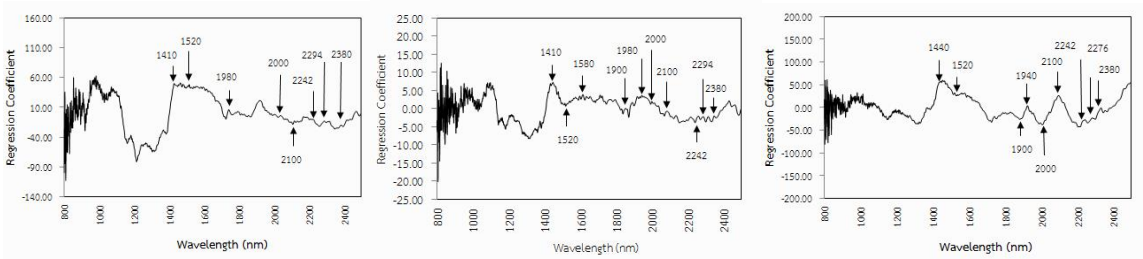
Samples	Method to determine Genistein		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	3.83	3.66	0.17	0.03
2	4.47	4.54	-0.07	0.01
3	4.86	4.99	-0.13	0.02
4	3.28	3.40	-0.13	0.02
5	3.60	3.51	0.08	0.01
6	2.20	2.34	-0.14	0.02
7	3.30	3.05	0.25	0.06
8	4.40	4.50	-0.10	0.01
9	4.40	4.31	0.09	0.01
10	3.49	3.66	-0.17	0.03
Total	37.83	37.97	-0.14	0.21
Average	3.78	3.80	-0.01	0.02

Table 9 Comparison of predicted and actual values when used NIR model to evaluate Total isoflavone value in soybean seed.

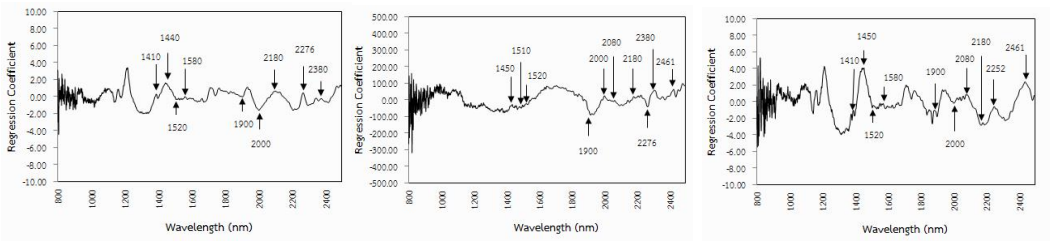
Samples	Method to determine Total isoflavone		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	(x-y)	$(x-y)^2$
	X	Y		
1	96.17	93.76	2.41	5.83
2	152.01	148.97	3.04	9.26
3	303.16	299.21	3.94	15.55
4	75.46	73.56	1.90	3.61
5	280.27	288.36	-8.09	65.46
6	74.15	70.61	3.54	12.55
7	214.26	209.74	4.52	20.44
8	143.60	146.36	-2.76	7.59
9	134.90	131.97	2.93	8.59
10	152.01	156.64	-4.63	21.43
Total	1625.97	1619.15	6.82	170.31
Average	162.60	161.92	0.68	17.03



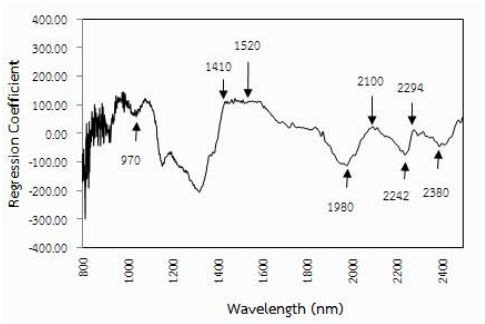
ภาพที่ 1 The original NIR spectra of soybean seed of 800-2500 nm.



(a) (b) (c)

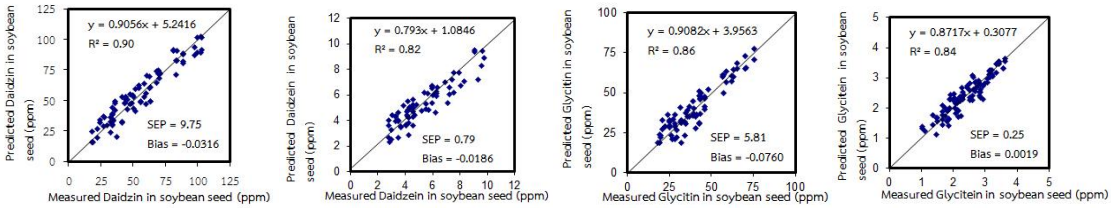


(d) (e) (f)

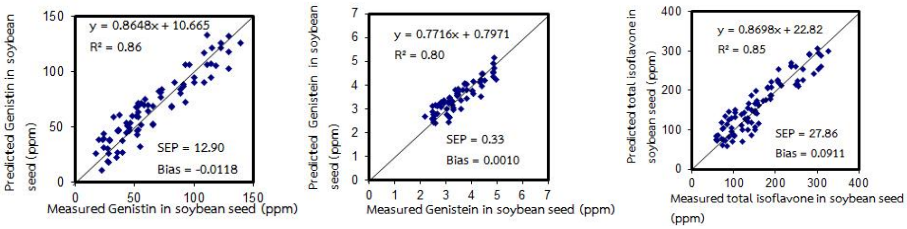


(g)

ภาพที่ 2 Regression coefficient plots to evaluate Daidzin (a), Daidzein (b), Glycitin (c), Glycitein (d), Genistin (e), Genistein (f), and Total isoflavone (g) in soybean grains.



(a) (b) (c) (d)



(e) (f) (g)

ภาพที่ 3 Scatter plots of actual Daidzin (a), Daidzein (b), Glycitin (c), Glycitein (d), Genistin (e), Genistein (f), and Total isoflavone (g) value in soybean seed (ppm) vs. NIR predicted isoflavone values