รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลเกษตร
2. **โครงการวิจัย** การประเมินคุณภาพเมล็ดและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยใช้เทคนิคเนียร์-อินฟราเรดสเปกโตรสโครปี (Near Infrared Spectroscopy)

   กิจกรรมที่ 1 การประเมินคุณภาพเมล็ดโดยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** การประเมินปริมาณสารพฤกษเคมีในถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Evaluation of Phytochemical Contents in Soybean by Using Near Infrared Spectroscopy
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นายนฤเทพ เวชภิบาล	สังกัด กวป.
ผู้ร่วมงาน	นางสาวจารุวรรณ บางแวก	สังกัด กวป.

5. **บทคัดย่อ**

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญต่อมนุษย์และสัตว์ เพราะร่างกายสามารถเปลี่ยนอนุพันธ์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก กรดไฟติก มาใช้ประโยชน์ได้ วิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกแบบดั้งเดิมด้วยเครื่อง UV Spectroscopy เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย เครื่องมือราคาสูง ใช้บุคลากรที่ต้องมีความชำนาญ และใช้เวลานาน เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (NIRS) จึงเป็นอีกวิธีในการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก เพราะเป็นเทคนิคที่ประเมินได้รวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่างและน่าเชื่อถือ-โดยทำการสุ่มเลือกตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง มาวัดสเปกตรัมเพื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ด้วยเครื่อง NIRSystems 6500 ช่วงคลื่น 400-2500 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติ ด้วยวิธี UV Spectroscopy ระหว่างเดือน ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 ณ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ จากผลการทดลอง พบว่าในเมล็ดถั่วเหลืองจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกโดยเฉลี่ยเท่ากับ 7.94 mg GAE/g DW และ 3.24 g/100g DW ตามลำดับ นำค่าที่ได้มาสร้างสมการทำนาย ด้วยเทคนิค PLSR โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) สารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลือง เท่ากับ 0.86 และ 0.77 ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในกลุ่ม calibration (SEC) ของเมล็ดถั่วเหลืองเท่ากับ 7.29 mg GAE/g DW และ 9.41 g/100g DW ตามลำดับ และ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในกลุ่ม validation (SEP) ของเมล็ดถั่วเหลือง เท่ากับ 11.32 mg GAE/g DW และ 14.03 g/100g DW ตามลำดับ จากผลการทดสอบพบว่า สมการสำหรับการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลืองนั้น สามารถนำไปใช้ใน

กรมวิชาการเกษตร

การประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในช่วง 0.53-15.14 mg GAE/g DW และกรดไฟติก อยู่ในช่วง 0.41-6.84 g/100g โดยใช้เทคนิค NIRS ได้ ได้อย่างถูกต้อง และในเมล็ดถั่วเหลือง

Abstract

Soybean is one of the most important plant proteins sources consumed by humans and animals. It has also been claimed that health benefits can be derived from the antioxidant activities of soybean as alternative source of bioactive compounds, like phenolic compounds and phytic acid. Classical methods such as UV spectroscopy, used to determine phenolic compounds and phytic acid in soybean show disadvantages of expensive instrumentation, the need of specially trained personnel or long analysis time. Near Infrared Spectroscopic is an alternative method for the analysis of phenolic compounds and phytic acid in soybean grain because there is no need of sample preparation rapid non-destruction and reliable techniques. Soybean samples were randomized and measured the spectrum by NIRSystems 6500 in wavelength region from 400 nm to 2500 nm. Phenolic compounds and phytic acid in sample were determined by UV spectroscopy method and carried out from October 2018 to September 2020 at Postharvest and Processing Research and Development Division, Bangkok. The average contents of phenolic compounds and phytic acid in soybean grains were 7.94 mg GAE/g DW and 3.24 g/100g DW, respectively. Partial least squares regression (PLSR) was used to develop the calibration equation for prediction. The correlation coefficient (R) of phenolic compounds and phytic acid in soybean grains were 0.86 and 0.77, respectively. The standard error of calibration (SEC) of phenolic compounds and phytic acid in soybean grain were 7.29 mg GAE/g DW and 9.41 g/100g DW, respectively. The standard error of prediction (SEP) of phenolic compounds and phytic acid in soybean grain were 11.32 mg GAE/g DW and 14.03 g/100g DW, respectively. The results exhibited that the calibration equations from research had good values of R which were representing a good correlation between reference values and NIRS predicted values. Hence, these results suggested that NIRS technique could be practical used for assessment of phenolic compounds (0.53-15.14 mg GAE/g DW) and phytic acid (0.41-6.84 g/100g) in soybean grains.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

6. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโภชนาการที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่สำคัญ เช่น คาร์โบไฮเดรท โปรตีน ไขมัน รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน แคโรทีนอยด์ ไอโซฟลาโวน สารประกอบฟีนอลิก (Miller *et al.*, 2000) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำหน้าที่ประสานกันเป็นระบบเพื่อไม่ให้ตัวต้านออกซิเดชันกลายเป็นอนุมูลอิสระและเพิ่มจำนวนต่อไป (จริงแท้, 2550) อีกทั้งพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในถั่วเหลืองยังช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ มะเร็ง และเบาหวานได้ (Denisov *et al.*, 2005) ดังนั้นหากมีการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงด้วยวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว แม่นยำ ย่อมเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Król-Grzymała *et al.,* 2020)

กรดไฟติกพบในถั่วเหลือง เมล็ดถั่วเหลืองดิบไม่สามารถนำมาใช้บริโภคเพราะมีสารขัดขวางทางโภชนาการ (antinutritional substance) กรดไฟติกเป็นหนึ่งในสารนี้ กรดไฟติกสามารถจับตัวกับแร่ธาตุสังกะสี แมงกานีส ทองแดง แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และโปรตีน เป็นสาเหตุทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนกับกรดไฟติก (protein-phytic acid complexes) เมื่อไฟเตทจับตัวกับโปรตีน กรดไฟติกจะไปชักนำให้การละลายน้ำและการทำงานของโปรตีนลดลง อีกทั้งส่งผลให้การดูดซึมและการใช้ประโยชน์แร่ธาตุเหล่านี้ลดลง แต่อย่างไรก็ตามสารนี้สามารถทำลายได้ด้วยความร้อน ซึ่งการทอดและการคั่วสามารถลดปริมาณกรดไฟติกได้มากกว่าการต้มนึ่ง หรือลวก นอกจากนี้หากกรดไฟติกไปรวมกับแคลเซียมเป็นเกลือจะไม่ละลายน้ำ และย่อยสลายได้ยาก ทำให้การดูดซึมแคลเซียมของร่างกายลดลง ในภาวะที่ร่างกายได้รับแคลเซียมจากอาหารลดลงเพียงเล็กน้อยพาราธัยรอยด์ฮอร์โมนจะส่งสัญญาณให้ไตสกัดกั้นแคลเซียมที่จะขับออกทางปัสสาวะเอาไว้ ในขณะเดียวกันจะปล่อยวิตามินดีที่สะสมในตับออกมาใช้ ถ้าร่างกายยังคงได้รับแคลเซียมจากอาหารน้อยมาก วิตามินดีจะไปยืมเอาแคลเซียมจากกระดูกมาใช้ เพื่อให้การทำงานของกล้ามเนื้อและประสาทเป็นไปอย่างปกติ ซึ่งจะทำให้มีอาการปรากฏตามมา คือ เป็นตะคริวและชา การผิดปกติของการสร้างกระดูก โรคกระดูกพรุน การผิดปกติที่ประสาทจะไวผิดปกติในการตอบรับสื่อกระตุ้น ทำให้ไม่สามารถควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อ เกิดอาการชัก มีอาการกำมือเอาปลายนิ้วทุกนิ้วเข้าหากัน (สิริพันธุ์, 2555) กรดไฟทิกยังทำให้การดูดซึมของธาตุเหล็กในร่างกายลดลง โดยกรดไฟทิกจะรวมกับธาตุเหล็กเป็นเกลือที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อร่างกายขาดเหล็กจะทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง คนที่เป็นโลหิตจางเนื่องจากขาดเหล็กจะมีจำนวนเม็ดเลือดแดงในเลือดลดลง ทำให้ออกซิเจนถูกพาไปยังเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆได้น้อย ทำให้ร่างกายออกซิไดส์สารอาหารให้เป็นพลังได้น้อยลง ทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย อาการของภาวะโลหิตจางอย่างอื่น เช่น ปวดศีรษะ วิงเวียนศีรษะและหน้ามืดคล้ายจะเป็นลม (นิธิยา, 2556) แม้ว่ากรดไฟติกอาจส่งผลเสียต่อร่างกายของมนุษย์ แต่มีการรายงานว่ากรดไฟติกส่งผลดีต่อร่ายกายบางประการ ได้แก่ เป็นสารต้านมะเร็งและลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยการลดอัตราการย่อยแป้ง (Rusydi and Azrina, 2012 และ พอฤทัย, 2556)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ปัจจุบันการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในตัวอย่างถั่วเหลืองยังคงใช้วิธีการทางเคมีภายในห้องปฏิบัติการ (conventional method) ซึ่งพบว่าวิธีดังกล่าวจะต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ผู้วิเคราะห์ต้องใช้ความรู้และประสบการณ์สูง ขั้นตอนวิเคราะห์ยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน ตั้งแต่ขั้นตอนการบด การทำปฏิกิริยาทางเคมี และการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometer) วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวทำให้ต้องทำลายตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อวิเคราะห์ค่าทางเคมี ดังนั้นการหาวิธีวิเคราะห์ที่ช่วยลดขั้นตอนในการประเมินค่าทางเคมีที่มีความถูกต้องจึงได้รับการพิจารณา ซึ่งเทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) จึงเป็นอีกวิธีที่เริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายในการประเมินองค์ประกอบทางเคมีของพืช เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ รวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง ไม่ต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะสูง มีความคุ้มค่า และน่าเชื่อถือในผลวิเคราะห์ จึงเป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการสร้างสมการเพื่อการประเมินระหว่างค่า spectra ที่ได้จากการให้แสง Near Infrared ผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์ และค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ นำสมการที่ได้มาทำนายค่าของวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์ต่อไป Han *et al.* (2017) ใช้เทคนิค NIRS ประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.949 ทำให้วิธีการประเมินด้วยเทคนิค NIRS ช่วยในขั้นตอนการคัดเลือกเบื้องต้นในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ที่อาจมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนตัวอย่างที่จะนำมาใช้ประเมิน Zhang *et al.* (2008) ประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในเมล็ดข้าวด้วยวิธี NIRS พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถประเมินสารประกอบฟีนอลิกได้ โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.849 แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการประเมินปริมาณฟลาโวนอยด์ ($r^2 < 0.4$) นอกจากนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกเกี่ยวข้องกับและมีการายงานว่า Ranjana and Mishra (2015) ใช้เทคนิค FT-NIRS ในการประเมินปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียว พบว่าเมื่อทำการปรับปรุงสมการด้วยวิธี 1st derivative ร่วมกับ vector normalisation แล้ว จะทำให้ค่า r^2 เท่ากับ 0.97 โดยช่วงที่เกี่ยวข้องกับพีคของกลุ่มพันธะ O-H ที่สัมพันธ์กับปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียว คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 1,638 1,857 2,222 และ 2,380 nm. วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือการนำเทคนิค Near Infrared Spectroscopy มาใช้ประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นแนวทางเลือกในการประเมินปริมาณสารพฤกษเคมีได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ

ลิขสิทธิ์การวิจัย

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ
2. เครื่อง Near Infrared Spectroscopy รุ่น NIRSystems 6500 ยี่ห้อ FOSS ประเทศเดนมาร์ก
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Evolution™ 201 ยี่ห้อ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องบดแห้ง รุ่น Cyclotec TM 1093 ยี่ห้อ Foss ประเทศสวีเดน
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง
6. เครื่อง Sonicator bath
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
8. สารเคมี ได้แก่ สารมาตรฐานฟีนอลิก สารมาตรฐานกรดไฟติก Folin-Ciocalteu เมทานอล เอทานอล โซเดียมคาร์บอเนต
9. โปรแกรม The Unscrambler version 9.7 ประเทศนอร์เวย์

วิธีการ

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผล โดยนำตัวอย่างถั่วเหลืองมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrometer ที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร เพื่อให้ได้เส้นสเปกตรัม แล้วเปรียบเทียบกับค่าการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก จากนั้นนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) จากโปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler® version 9.7 เพื่อให้ได้สมการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดได้อย่างแม่นยำ

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ทำ standard curve ของสารมาตรฐานฟีนอลิก และกรดไฟติก และทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ (method validation) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก ห้องปฏิบัติการกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

2. รวบรวมตัวอย่างถั่วเหลืองจำนวน 125 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชลพบุรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง (จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และสุโขทัย) และแหล่งจำหน่ายสินค้า (ตลาดร้านค้าปลีก ซูเปอร์มาร์เก็ต ห้างสรรพสินค้า)

3. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrometer ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm ห้องปฏิบัติการกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

4. วิเคราะห์ปริมาณสารปรกอบฟีนอลิก วิธีที่ใช้คือ Folin-Ciocalteu's reagent ดัดแปลงตามวิธีของ Han *et al*. (2017) นำตัวอย่างถั่วเหลืองบดละเอียดที่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร หนัก 200 มิลลิกรัม มาสกัดในสารละลายเมธานอลความเข้มข้น 80% ปริมาณ 4 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันและนำไปแช่ในเครื่องล้างความถี่สูง (sonicator bath, 40 kHz, 120W) นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนของเหลวใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมา 500 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร เขย่าสาร ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาทีเพื่อรอให้สารทำปฏิกิริยา เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้น และวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติก ดัดแปลงตามวิธีของ Haung *et al*. (1983) และ Reichwald *et al*. (2008) โดยชั่งตัวอย่างถั่วเหลืองบดละเอียด 100 มิลลิกรัม เติมสารละลายกรดไฮดรอคลอลิกความเข้มข้น 0.2N ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้แป้งตกตะกอน ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรองชนิดไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอริก (ferric solution) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดที่ใส่ตัวอย่างให้แน่น และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที ระหว่างการต้มช่วง 5 นาทีแรกจะต้องตรวจสอบฝาหลอดว่ายังปิดสนิท หลังจากสิ้นสุดการต้มตัวอย่าง ให้นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารส่วนใสตัวอย่างมาใส่ในหลอดทดลองใหม่ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 2,2'-Bipyridine ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรสโคปี ความยาวคลื่น 519 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ใช้ sodium phytate ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐาน

5. นำ spectra ต้นแบบ (original spectra) ที่ได้หรืออาจทำการแปลงผลข้อมูลเพื่อลดผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ noise หรือ errors จากการวัดที่ปรากฏใน spectrum ไปสร้างแบบจำลองทาง คณิตศาสตร์ด้วยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) จากโปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler® version 9.7

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

7. นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาวิธีที่ดีที่สุด ตรวจสอบความแม่นยำของสมการที่สร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบค่า SEP และ Bias เพื่อประเมินโดยใช้ข้อมูลในส่วนที่ไม่ได้ใช้ในการทำสมการ

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

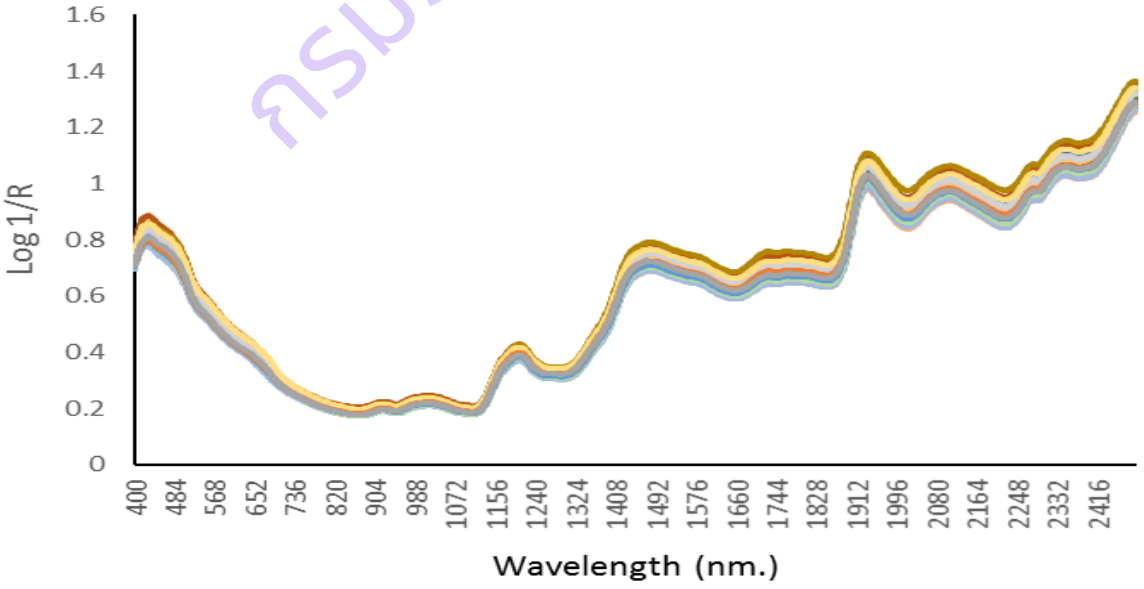
8. ผลการทดลองและวิจารณ์.

คุณสมบัติของตัวอย่างในการทำสมการ

ตัวอย่างถั่วเหลืองที่อยู่ในรูปเมล็ด (grain) ที่นำมาใช้ในการทำสมการเพื่อประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก จะมีปริมาณในระดับต่าง ๆ โดยพบว่า ในเมล็ดถั่วเหลืองจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช่วง 0.53-15.14 mg GAE/g DW และกรดไฟติก อยู่ในช่วง 0.41-6.84 g/100g (Table 1) จากการวัดค่าการดูดซับแสงของสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก ในย่าน NIR (400-2500 นาโนเมตร) โดยใช้เครื่อง NIR spectrometer พบว่า เมล็ด ถั่วเหลืองสามารถดูดซับแสงสูงที่ความยาวคลื่น 1415 1454 1512 1894 และ 1986 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดซับแสงของโมเลกุลสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก (Williams and Norris, 2001) (Figure 1)

Table 1 The characteristics of samples used in model construction for phenolic compounds and phytic acid contents in soybean grain.

Items	Phenolic Compounds	Phytic acid
Min-Max	0.53-15.14	0.41-7.58
Mean	7.94	3.24
SD	6.25	4.28
Number	125	85
Unit	mg GAE/g DW	g/100g DW



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1 The original NIR spectra of soybean grain samples in wavelength region 400 – 2500 nm.

การสร้างสมการเพื่อประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในถั่วเหลืองด้วยเทคนิค NIRS

จากการนำเทคนิค NIRS มาใช้เพื่อสร้างสมการด้วยวิธี PLSR แบบ Full cross validation โดยใช้หลักสะท้อนแสงที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลืองด้วยวิธีทางเคมีในห้องปฏิบัติการ และค่าการดูดกลืนแสง (400-2500 นาโนเมตร) ค่าทางสถิติที่แสดงถึงความถูกต้องแม่นยำของสมการต่าง ๆ พิจารณาจากค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (R) สูงใกล้เคียง 1 นั้น จากการสร้างสมการเพื่อประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ใช้ความยาวคลื่นช่วง 400-2500 นาโนเมตร มีค่า R เท่ากับ 0.86 ค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) เท่ากับ 7.29 mg GAE/g DW ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (SEP) เท่ากับ 11.32 mg GAE/g DW และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) จำนวน 7 ปัจจัย ส่วนการสร้างสมการเพื่อประเมินปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลือง โดยใช้ความยาวคลื่นช่วง 400-2500 นาโนเมตร มีค่า R SEC SEP และ F เท่ากับ 0.77 9.41 14.03 และ 8 g/100g DW ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Results of PLSR calibration for contents of phenolic compounds and phytic acid contents in soybean grains

Qualities	Wavelength (nm)	R	SEC	SEP	Bias	F
Phenolic Compounds	400-2500	0.86	7.29	11.32	0035	7
Phytic acid	400-2500	0.77	9.41	14.03	0.11	8

R: Coefficient of correlation, SEC: Standard error of calibration, SEP: Standard error of prediction; Bias: The average difference between actual value and NIRS value, F: The number of factors used in the calibration equation

ความถูกต้องในการใช้สมการประเมิน

เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (R) ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 ชุดที่มีต่อกัน พบว่าสมการที่ได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง และให้ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่ม calibration และกลุ่ม validation ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างค่าอ้างอิง และค่าที่ทำนายได้ มีความผิดพลาด (Standard error of prediction; SEP) ต่ำกว่าค่าการวิเคราะห์ (SD) (Figure 2) ทำให้สามารถนำสมการจำนวน 2 สมการไปใช้ในการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลืองได้ พบว่า สมการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดถั่วเหลืองสามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองได้ถูกต้อง และสมการประเมินปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลืองเหมาะสมสำหรับการคัดเลือก หรือประมาณค่าแบบคร่าว ๆ (screening and approximate work) (Williams and Norris, 2001) แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีความหลากหลายมากขึ้นเพื่อเพิ่มค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (R) ของเมล็ดให้ใกล้เคียง 1 เพื่อเป็นการ

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาสมการให้สามารถนำไปใช้ในการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลืองได้ถูกต้อง

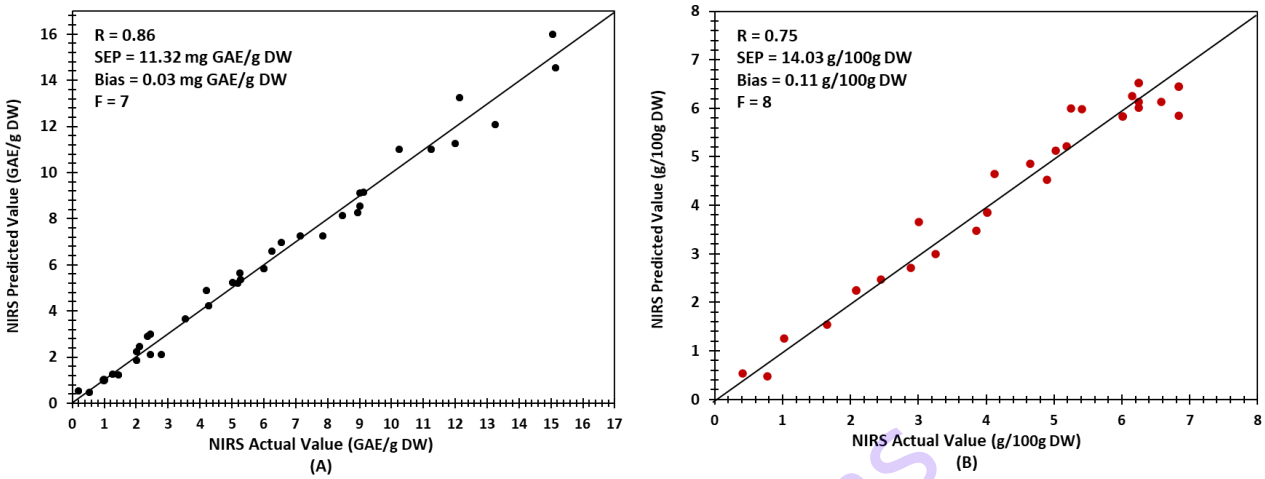


Figure 2 The relationship between phenolic compounds (A) and phytate (B) contents and each predicted content in soybean grain.

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปีสามารถใช้ประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดถั่วเหลืองในช่วง 0.53-15.14 mg GAE/g DW และกรดไฟติก อยู่ในช่วง 0.41-6.84 g/100g ได้อย่างถูกต้อง และให้ค่าการประเมินที่ถูกต้องในระยะเวลาสั้น โดยความยาวคลื่นที่ใช้ในเทคนิค NIRS เพื่อการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในถั่วเหลืองอยู่ในช่วง 400 - 2500 นาโนเมตร ใช้หลักการสะท้อนแสง (reflection)

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นักวิจัย นักวิชาการ และผู้ประกอบการ สามารถนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (NIRS) ไปใช้ประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกในถั่วเหลือง เช่น ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติกสูง ซึ่งเทคนิค NIRS เป็นวิธีการที่ใช้ระยะเวลาในการประเมินสารหลายๆ ชนิดในตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว และที่ไม่ทำลายตัวอย่าง

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวพืชไร่ ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

จริงแท้ ศิริพานิช. 2550. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวายของพืช. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. 453 หน้า.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2556. หลักโภชนศาสตร์. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์. 512 หน้า.

พอฤทัย ช้างมีบุญ. 2556. อิทธิพลของกระบวนการงอกและการอบแห้งด้วยเทคนิคฟลูอิไดเซชันต่อ คุณภาพของถั่วเหลืองเริ่มงอก. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สิริพันธุ์ จุลกรังคะ. 2555. โภชนาศาสตร์เบื้องต้น. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 314 หน้า

Delwiche, S.R., W. Mekwatanakarn and C.Y. Wang. 2008. Soluble solids and simple sugars measurement in intact mango using near infrared spectroscopy. Hort Technology 18 (3): 410-416.

Han, Z., S. Cai, X. Zhang, Q. Qian, Y. Huang, F. Dai and G. Zhang. 2017. Development of predictive models for total phenolics and free p-coumaric acid contents in barley grain by near-infrared spectroscopy. Food Chem. 2017 Jul 15;227:342-348. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.063. Epub 2017 Jan 16. PMID: 28274442.

Król-Grzymała, A. and R. Amarowicz. 2020. Phenolic Compounds of Soybean Seeds from Two European Countries and Their Antioxidant Properties. Molecules. 2020;25(9):2075. Published 2020 Apr 29. doi:10.3390/molecules25092075

Ranjana, P. and H.N. Mishra. 2015. Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy for rapid and simple determination of phytic acid content in green gram seeds (*Vigna radiata*), Food Chemistry, Volume 172, 2015, Pages 880-884, ISSN 0308-8146, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.049.

Rusydi, M.R. and A., Azrina. 2012. Effect of germination on total phenolic, tannin and phytic acid contents in soy bean and peanut. International Food Research Journal. 19. 673-677.

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

Zhang C., Y. Shen, J. Chen, P. Xiao and J. Bao. 2008. Nondestructive Prediction of Total Phenolics, Flavonoid Contents, and Antioxidant Capacity of Rice Grain Using Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008 *56* (18), 8268-8272 DOI: 10.1021/jf801830z

13. ภาคผนวก

-