

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลเกษตร
2. โครงการวิจัย : การประเมินคุณภาพเมล็ดและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy)
กิจกรรม : การประเมินคุณภาพเมล็ดโดยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) :
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): การประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Evaluation of Anthocyanin Content in Corn by Near Infrared Spectroscopy

4. คณะผู้ดำเนินงาน

- หัวหน้าการทดลอง : นางสาวอรรรณ จิตต์ธรรม กวป.
ผู้ร่วมงาน : นางสาวจรรรณ บางแวก กวป.
: นายนฤเทพ เวชภิบาล กวป.

5. บทคัดย่อ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่อุดมไปด้วยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะข้าวโพดสีม่วงที่เป็นแหล่งสำคัญของแอนโทไซยานิน โดยแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบฟีนอลิก เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในปัจจุบันการตรวจหาปริมาณแอนโทไซยานินจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ใช้เวลานาน และใช้สารเคมีหลายชนิด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อประเมินปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวโพดโดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) ทำการทดลองที่ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ในปี 2561-2563 โดยรวบรวมเมล็ดข้าวโพดที่มีปริมาณแอนโทไซยานินต่างกัน จำนวน 115 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrophotometer (NIRS) และประเมินปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ หาคความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ดข้าวโพดกับปริมาณแอนโทไซยานินและสมการถดถอยเชิงสมการเส้นด้วยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler ผลการทดลองพบว่าสมการประเมินปริมาณแอนโทไซยานินในตัวอย่างเมล็ดและแป้งข้าวโพดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ($R=0.94-0.97$) และมีความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (Standard errors of prediction; SEP) ของปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu), pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu), peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TA) เท่ากับ 27.99 ไมโครกรัม/กรัม 23.12

ไมโครกรัม/กรัม 14.57 ไมโครกรัม/กรัม และ 11.23 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างเมล็ด และ 28.22 ไมโครกรัม/กรัม 22.08 ไมโครกรัม/กรัม 13.38 ไมโครกรัม/กรัม และ 10.33 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างแป้งข้าวโพด ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่าเทคนิค NIRS สามารถนำไปใช้ในการประเมินปริมาณแอนโทไซยานินในตัวอย่างเมล็ดและแป้งข้าวโพดได้

คำหลัก: แอนโทไซยานิน เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) ข้าวโพด

Abstract

Corn is one of cereal crops that is rich of antioxidant. Purple corn is important source of anthocyanins (phenolic compound). Anthocyanins are known to have antioxidant activity and responsible for various biological activities. The determination of anthocyanin content requires a series of time-consuming wet chemistry techniques. The objective of current research was to evaluate the anthocyanin content in corn by using Near Infrared Spectroscopy (NIRS). Current study was conducted at Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture during the year of 2018-2020. One hundred and fifteen samples of corn kernel were obtained from various locations and varieties. Samples were analyzed for anthocyanin content by reference method and by scanning with NIRS at wavelength 400-2500 nanometer. Partial Least Squares regression was obtained by using unscrambler software. Findings of modeling showed a high correlation coefficient ($R=0.94-0.97$). Standard errors of prediction of corn kernel sample which include cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu), pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu), peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) and total anthocyanin content (TA) were 27.99 $\mu\text{g/g}$, 23.12 $\mu\text{g/g}$, 14.57 $\mu\text{g/g}$ and 11.23%, respectively. While standard errors of prediction of corn flour sample Cy-3-Glu, Pg-3-Glu, Pn-3-Glu and TA were 28.22 $\mu\text{g/g}$, 22.08 $\mu\text{g/g}$, 13.38 $\mu\text{g/g}$ and 10.33%, respectively. Results suggested that NIRS technique is effective to estimate anthocyanin content in corn.

Key Words: Anthocyanin, Near Infrared Spectroscopy, corn

6. คำนำ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่สำคัญของโลกและเป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยวิตามินและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยข้าวโพดแต่ละชนิดมีลักษณะรูปร่างและสีที่แตกต่างกันออกไป เช่น สีขาว สีเหลือง สีน้ำตาล สีแดง และสีม่วง ซึ่งแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีหรือองค์ประกอบของสารสำคัญที่แตกต่างกัน แอนโทไซยานินเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งในข้าวโพดที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) มี

คุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถละลายน้ำได้ (Herrera-sortero *et al.*, 2017) แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดง ม่วงและน้ำเงิน ในธรรมชาติพบได้มากในพืช ผักและผลไม้ที่มีสีน้ำเงิน สีแดง และสีม่วง เช่น กะหล่ำปลีม่วง มันเทศม่วง ข้าวเหนียวดำ ถั่วดำ และข้าวโพดม่วง เป็นต้น ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจในแอนโทไซยานินเนื่องจากมีคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันหรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ ป้องกันมะเร็ง (Mangalvedhe *et al.*, 2015) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้ยังมีการใช้แอนโทไซยานินในการรักษาความผิดปกติจากการไหลเวียนโลหิตซึ่งเป็นผลมาจากเส้นเลือดฝอยเปราะบาง (Wang and Prior, 1997) ในข้าวโพด แอนโทไซยานินพบมากในส่วนของแกนฝักและเมล็ดข้าวโพดที่มีสีม่วง ชนิดของแอนโทไซยานินที่พบ ได้แก่ cyanidin-3- glucoside (Cy-3-Glu) pelargonidin-3-glucosid (Pg-3-Glu) peonidin-3-glucoside (Pn-3-Glu) และอนุพันธ์ (Pascual-Teresa *et al.*, 2002) จากการศึกษาของ Pascual-Teresa และ Sanchez-Ballesta (2008) พบว่า ข้าวโพดสีม่วงเป็นแหล่งของแอนโทไซยานินที่สำคัญ โดยพบใน เมล็ด แกนฝัก และเปลือกหุ้มฝัก มีปริมาณ 1,642 3,400 และ 18,900 มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ อรุณทิพย์ และคณะ (2015) ศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 35 พันธุ์ พบว่า ในกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีสีม่วงมีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในเมล็ด 30.73-106.21 มิลลิกรัมของ cyanidin-3- glucoside ต่อตัวอย่างน้ำหนักสด 100 กรัม การหาปริมาณแอนโทไซยานินในปัจจุบันมีวิธีวิเคราะห์และใช้เครื่องมือหลายชนิด เช่น UV-VIS spectroscopy Mass spectrometry (MS) และ Capillary electrophoresis (CE) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการวิเคราะห์เหล่านี้มีราคาแพง ใช้เวลานาน ประมาณ 5-7 วันและตัวอย่างถูกทำลายไป

เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิคการประเมินที่ไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถตรวจวิเคราะห์รวดเร็ว ปลอดภัย และใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งในปัจจุบันมีการนำมาใช้ในการประเมินปริมาณสารสำคัญหลายชนิด เช่น การประเมินปริมาณสารสำคัญในใบชา (นฤเทพ และ จารุวรรณ, 2559) การประเมินปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดใน Chinese faba bean (*Vicia faba* L.) (Wang *et al.*, 2014) และการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในผลเบอร์รี่ (Zsivanovits *et al.*, 2010) เป็นต้น ซึ่งเทคนิค NIRS ใช้หลักการการสร้างสมการจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correction) หรือ R ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์และค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) ต่ำ สามารถนำสมการที่ได้ใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้ วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อศึกษาการนำเทคนิค NIRS ไปใช้ในการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในข้าวโพดโดยใช้เวลาสั้นและไม่ทำลายตัวอย่าง

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวโพดสีขาวย สีเหลือง สีม่วง และสีม่วงเข้ม
2. สารมาตรฐานแอนโทไซยานิน ได้แก่ cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu), pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) และ peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu)
3. เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) Agilent 1260 infinity Series
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-60 ยี่ห้อ Shimadzu
5. เครื่อง Near Infrared Spectrometer ของบริษัท FOSS รุ่น 6500
6. เครื่องบดและตะแกรงร่อนตัวอย่าง

- วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

รวบรวมเมล็ดข้าวโพดที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินต่างกัน โดยคัดเลือกจากเมล็ดข้าวโพดที่มีสีและพันธุ์แตกต่างกัน เช่น สีขาว สีเหลือง สีม่วง และสีม่วงเข้ม จากแปลงเพาะปลูกเกษตรกร ร้านค้าทั่วไป และศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จำนวน 115 ตัวอย่าง

1.1 คัดเลือกเมล็ดข้าวโพดจากข้อ 1 มีปริมาณสารแอนโทไซยานินต่างกัน จำนวน 98 ตัวอย่าง วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrometer จากบริษัท FOSS รุ่น 6500 โดยบรรจุตัวอย่างเมล็ดลงในอุปกรณ์บรรจุตัวอย่างชนิด ¼ rectangular ใช้หลักการสะท้อนแสงที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร

1.2 เตรียมตัวอย่างในรูปผงแป้งฟลาว โดยการนำเมล็ดข้าวโพดที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินต่างกัน จำนวน 115 ตัวอย่าง จากข้อ 1 นำไปบดให้ละเอียดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 120 เมช นำแป้งฟลาวข้าวโพดมาบรรจุลงในอุปกรณ์บรรจุตัวอย่างรูปร่างกลมและวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrometer จากบริษัท FOSS รุ่น 6500 ใช้หลักการสะท้อนแสง ที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร

2. ประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานิน

นำตัวอย่างข้าวโพดจากข้อ 1.1 และ 1.2 มาประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานิน ซึ่งประกอบด้วย cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu) pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) และ peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Yang และคณะ (2009) โดยสภาวะในการแยก คือ คอลัมน์ C18 (35um, 4.6x150mm) ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 60 องศาเซลเซียส ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ สาร A: 0.05% (v/v) Trifluoroacetic acid (TFA) in Milli-Q water และ B: Acetonitrile ใช้ระบบเกรเดียน โดยการแยกเวลาที่ 0-5 นาที สาร A 5% : B 95% จากนั้น นาทีที่ 20 สาร A 80% : B20% นาทีที่ 30 สาร A 4% : B96% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที และใช้ detector เป็น DAD วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin; TA) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ตามวิธีของ Francis (1989) ซึ่งเป็นการประเมินความ

เข้มข้นของแอนโทไซยานินโดยใช้กฎของ Lambert-Beer โดยมีค่าเฟคเตอร์ molecular absorption ของ cyanidin-3-O-glucoside เท่ากับ 98.2 คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TA) = $A_{530} \times \text{dilution factor} / 98.2$

สำหรับตัวอย่างเมล็ดที่ใช้ประเมินปริมาณสาร cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu) จำนวน 67 ตัวอย่าง pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) จำนวน 98 ตัวอย่าง peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) จำนวน 97 ตัวอย่าง และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin) จำนวน 73 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างแป้งข้าวโพดที่ใช้ประเมินปริมาณสาร cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu) จำนวน 84 ตัวอย่าง pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) จำนวน 85 ตัวอย่าง และ peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) 86 ตัวอย่าง และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin) จำนวน 115 ตัวอย่าง

3. สร้างสมการประเมินปริมาณแอนโทไซยานิน

นำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร และปริมาณสารแอนโทไซยานินของข้าวโพดในห้องปฏิบัติการ มาสร้างสมการโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler® version 9.7 (Camo, Oslo, Norway) โดยใช้หลักสถิติ Partial Least Square Regression (PLSR) แบบ Full cross validation เลือกสมการที่มีประสิทธิภาพในการประเมิน โดยดูจากค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: R) ให้ใกล้เคียง 1 ค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (Standard Error of Calibration: SEC) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมินต่ำ (Standard Error of Prediction: SEP) และค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Averages of difference between actual and NIR values, Bias) ต่ำ

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา

ตุลาคม 2561 - กุมภาพันธ์ 2563

สถานที่ดำเนินงานที่

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดและแป้งฟลาวข้าวโพด

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงในย่านเนียร์อินฟราเรด โดยใช้หลักการสะท้อนแสง ที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Near infrared Spectrometer ของบริษัท FOSS รุ่น 6500 ผลของเส้นสเปคตรัมตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจำนวน 98 ตัวอย่าง แสดงดัง Figure 1 โดยตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 1195 1450 และ 1940 นาโนเมตร เช่นเดียวกับในแป้งฟลาวข้าวโพด ผลเส้นสเปคตรัมของตัวอย่างแป้งฟลาวข้าวโพดจำนวน 115 ตัวอย่าง แสดงดัง Figure 1 แป้งฟลาวข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 1195 1450 และ 1940 นาโนเมตร ซึ่งที่ความยาวคลื่นดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำ แป้ง และโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเมล็ดและแป้งข้าวโพด (Osborne *et al.*, 1993)

การสร้างสมการประเมินปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค NIRS

จากการนำตัวอย่างเมล็ดและแป้งฟลาวข้าวโพดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในย่านเนียร์อินฟราเรด โดยใช้หลักการสะท้อนแสง ที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน ได้แก่ cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu), pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin) พบว่า เมล็ดข้าวโพดจำนวน 67 ตัวอย่าง มีปริมาณสาร cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu) อยู่ในช่วง 14.58-286.58 ไมโครกรัม/กรัม เมล็ดข้าวโพดจำนวน 98 ตัวอย่าง มีปริมาณสาร pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) 2.18-213.46 ไมโครกรัม/กรัม เมล็ดข้าวโพดจำนวน 97 ตัวอย่าง มีปริมาณสาร peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) 7.44-152.84 ไมโครกรัม/กรัม และเมล็ดข้าวโพดจำนวน 73 ตัวอย่าง มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin) 38.44-129.33% (ตารางที่ 1) ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินในแป้งฟลาวข้าวโพดจำนวน 115 ตัวอย่าง พบว่า ในแป้งฟลาวข้าวโพด 84 ตัวอย่าง มีปริมาณสาร cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-Glu) 4.15-307.99 ไมโครกรัม/กรัม แป้งฟลาวข้าวโพดจำนวน 85 ตัวอย่าง มีปริมาณสาร pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) 29.58-317.15 ไมโครกรัม/กรัม แป้งฟลาวข้าวโพดจำนวน 86 ตัวอย่าง มีปริมาณสาร peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) 7.44-152.84 ไมโครกรัม/กรัม และแป้งฟลาวข้าวโพดจำนวน 115 ตัวอย่าง มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin) 31.06-159.88% (ตารางที่ 1)

สร้างสมการโดยใช้หลักการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและค่าการดูดซับแสง (400-2500 นาโนเมตร) สูงใกล้เคียง 1 ค่าทางสถิติที่แสดงถึงความถูกต้องแม่นยำของสมการต่างๆ ดูได้จากค่าความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ (R) ค่าความคลาดเคลื่อนในการคำนวณ (SEC) และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) ต่ำ สร้างสมการประเมินปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวโพดด้วยวิธี PLSR แบบ Full cross validation โดยใช้ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร พบว่า สมการมีค่าความสัมพันธ์สูง โดยสมการประเมิน Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu) ในเมล็ดข้าวโพดใช้ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร มีค่าสัมพันธ์สหสัมพันธ์ (R) 0.96 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 21.34 ไมโครกรัม/กรัม (Table 6) ความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 27.99 ไมโครกรัม/กรัม ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Averages of difference between actual and NIR values, Bias) เท่ากับ -0.16 ไมโครกรัม/กรัม และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 11 ปัจจัย (Figure 2) สมการประเมิน pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) ใช้ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร มีค่าสัมพันธ์สหสัมพันธ์ (R) 0.95 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 16.52 ไมโครกรัม/กรัม ความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 23.12 ไมโครกรัม/กรัม ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ 0.39 ไมโครกรัม/กรัม และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 17 ปัจจัย สมการประเมิน peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) ใช้ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร มีค่าสัมพันธ์สหสัมพันธ์ (R) 0.95 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 11.53 ไมโครกรัม/กรัม ความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 14.57 ไมโครกรัม/กรัม ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ 0.11 ไมโครกรัม/กรัม และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 12 ปัจจัย และสมการประเมินปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TA) ใช้

ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) 0.94 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 8.75 % ความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 11.23 % ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ 0.02 % และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 10 ปัจจัย

สมการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในแป้งพลาข้าวโพด พบว่า สมการประเมินปริมาณสาร Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu) ใช้ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) 0.96 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 24.74 ไมโครกรัม/กรัม ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 28.22 ไมโครกรัม/กรัม (Figure 3) ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ -0.08 ไมโครกรัม/กรัม และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 7 ปัจจัย (Table 2) สมการประเมิน pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) ใช้ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) 0.95 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 17.01 ไมโครกรัม/กรัม ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 22.08 ไมโครกรัม/กรัม ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ -0.03 ไมโครกรัม/กรัม และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 12 ปัจจัย สำหรับสมการประเมินปริมาณสาร peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) ทำการปรับแต่ง (Transform) เส้นสเปกตรัมก่อนที่จะนำไปสร้างสมการด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยการทำอนุพันธ์ลำดับที่ 1 (First derivatives) โดยใช้ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร ในการสร้างสมการ ผลการทดลองพบว่า สมการมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง (R) 0.97 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 7.94 ไมโครกรัม/กรัม ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 13.30 ไมโครกรัม/กรัม ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ -0.10 ไมโครกรัม/กรัม และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 10 ปัจจัย ในขณะที่สมการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (TA) ใช้เส้นสเปกตรัมดั้งเดิมที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร ในการสร้างสมการ พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) 0.95 ความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) 9.09% ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) 10.33% ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (Bias) เท่ากับ 0.06% และมีปัจจัยเกี่ยวข้อง (F) 10 ปัจจัย (Table 2) สอดคล้องกับการทดลองของ Mangalvedhe และคณะ (2015) ใช้เทคนิค NIRS ในการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในเมล็ดข้าวโพดลูกผสมจำนวน 67 ตัวอย่าง พบว่าสมการมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficients of determination; R^2) เท่ากับ 0.72 และมีค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการประเมิน (SEP) เท่ากับ 48.93 ไมโครกรัม/กิโลกรัม

Regression coefficient

ค่า Regression coefficient ของสมการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินของเมล็ดข้าวโพด พบว่า สมการประเมินปริมาณสาร Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1348 1410 1660 2140 และ 2308 นาโนเมตร สมการประเมินปริมาณสาร pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1410 1660 1868 และ 2128 นาโนเมตร สมการประเมินปริมาณสาร penilidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) มีค่า Regression coefficient สูงที่

ความยาวคลื่น 1420 1660 1960 และ 2100 นาโนเมตร สมการประเมินปริมาณสาร Total anthocyanin (TA) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1350 1410 1520 1874 และ 2140 นาโนเมตร (Figure 4) สำหรับสมการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในแป้งพลาข้าวโพด พบว่า สมการประเมินปริมาณสาร Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1348 1410 1660 2140 และ 2308 นาโนเมตร สมการประเมินปริมาณสาร pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1410 1660 1868 และ 2128 นาโนเมตร สมการประเมินปริมาณสาร penilidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1420 1660 1960 และ 2100 นาโนเมตร สำหรับสมการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (TA) มีค่า Regression coefficient สูงที่ความยาวคลื่น 1350 1410 1520 1874 และ 2140 นาโนเมตร (Figure 5) สอดคล้องกับ Xiaowei และคณะ (2014) ทำการทดลองประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในดอกขาโดยใช้เทคนิค NIRS พบว่า ที่ความยาวคลื่น 1677-1733 และ 2091-2179 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ Cozzolino และคณะ (2008) รายงานว่า ความยาวคลื่นในช่วง 1415-1512 นาโนเมตร 1650-1750 นาโนเมตร และ 1955-2035 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งแอนโทไซยานินเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ .

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปีสามารถใช้ประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดและแป้งพลาข้าวโพดได้ โดยใช้เวลาน้อยเพียง 2-3 นาที และไม่ทำลายตัวอย่าง ด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปีจากบริษัท FOSS รุ่น 6500 โดยใช้หลักการสะท้อนแสง (reflection) ในตัวอย่างเมล็ด ที่ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร สามารถประเมินปริมาณสาร Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu) ได้ในช่วง 14.58-286.58 ไมโครกรัม/กรัม สาร Peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) 7.44-152.84 ไมโครกรัม/กรัม ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด 38.44-129.33 เปอร์เซ็นต์ และที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร สามารถประเมินสาร Pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) ได้ในช่วง 2.18-213.46 ไมโครกรัม/กรัม ในตัวอย่างแป้งพลาข้าวโพด ที่ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร สามารถประเมินปริมาณสาร Pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu) ได้ในช่วง 29.58-317.15 ไมโครกรัม/กรัม และ Peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) ได้ในช่วง 7.44-152.84 ไมโครกรัม/กรัม ที่ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร สามารถประเมินปริมาณสาร Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu) ได้ในช่วง 4.15-307.99 ไมโครกรัม/กรัม และที่ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร สามารถประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดได้ 31.06-159.88 เปอร์เซ็นต์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำเทคนิค Near Infrared Spectroscopy ไปใช้ในการประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดและแป้งพลาข้าวโพดได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ทำลายตัวอย่าง รวมทั้งเผยแพร่ผลงานแก่นักวิชาการ เกษตรกร นักศึกษา และผู้ที่สนใจ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) –

12. เอกสารอ้างอิง

- นฤเทพ เวชภิบาล และ จารุวรรณ บางแวก. 2559. การประเมินองค์ประกอบในใบชาโดยสเปกโตรสโกปีอินฟราเรด ย่านใกล้. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 47:3 (พิเศษ). 281-284.
- อรุณทิพย์ เหมะธลิน สุกุลกานต์ สิมลา สุรศักดิ์ บุญแต่ง และ สุดาทิพย์ อินทร์ชื่น (2015) ปริมาณแอนโทไซยานินในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงที่เก็บเกี่ยวในระยะรับประทานฝักสด.วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 32(2). 801-806
- Cozzolino, D., W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M.D. Mercurio, and P.A. Smith. (2008). Measurement of condensed tannins and dry matter in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least squares. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7631–7636.
- Herrera-Sotero, M., F. González-Cortés, H. García-Galindo, E. Juárez-Aguilar, M.R. Dorantes, J. Chávez-Servia, R. Oliart-Ros and R. Guzmán-Gerónimo. (2017). Anthocyanin Profile of Red Maize Native from Mixteco Race and Their Antiproliferative Activity on Cell Line DU145. <http://dx.doi.org/10.5772/67809>. 393-402.
- Mangalvedhe, A.A., M.C. Danao, M. Paulsmeyer, A.D. Rausch, V. Singh and J.A. Juvik. (2015). Anthocyanin determination in different corn hybrids using Near Infrared Spectroscopy. 2015 ASABE Annual International Meeting. New Orleans, Louisiana, July 26 – 29. 3-14.
- Francis, F. (1989). “Food colourants: anthocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*”, 28, 273-314.
- Osborne, B.G., T. Fearn, P.H. Hindle. (1993). Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis, 2nd Edition. Longman Scientific and Technical, Singapore. 227.
- Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J. C. (2002). LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1003–1006
- Pascual-Teresa S. and M.T. Sanchez-Ballesta. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Photochemistry Reviews*, 7: 281-299.
- Xiaowei, H., Z. Xiaobo, Z. Jiewen, S. Jiyong, Z. Xiaolei, M. Holmes. (2014). Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models. *Food Chem.*, 164, 536–543.
- Wang, J.J., H. Liu, G.X. Ren. (2014). Near-infrared spectroscopy (NIRS) evaluation regional analysis of Chinese faba bean (*Vicia faba* L.). *The crop journal* 2. 28-37.
- Wang, H., G. Cao, and R. L. Prior, (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304–309.

Yang, Z., Z. Chen, S. Yuan, W. Zhai, X. Piao and X. Piao. (2009). Extraction and identification of anthocyanin from purple corn, International Journal of Food Science and technology. 44. 2485-2492.

Zsivanovits, G., D. Ludeva and A. Iliev. (2010). Estimation of Anthocyanin content of berries by NIR method. 7th International conference of the Balkan Physical Union. <http://proceedings.aip.org/proceedings/cpcr.jsp>.

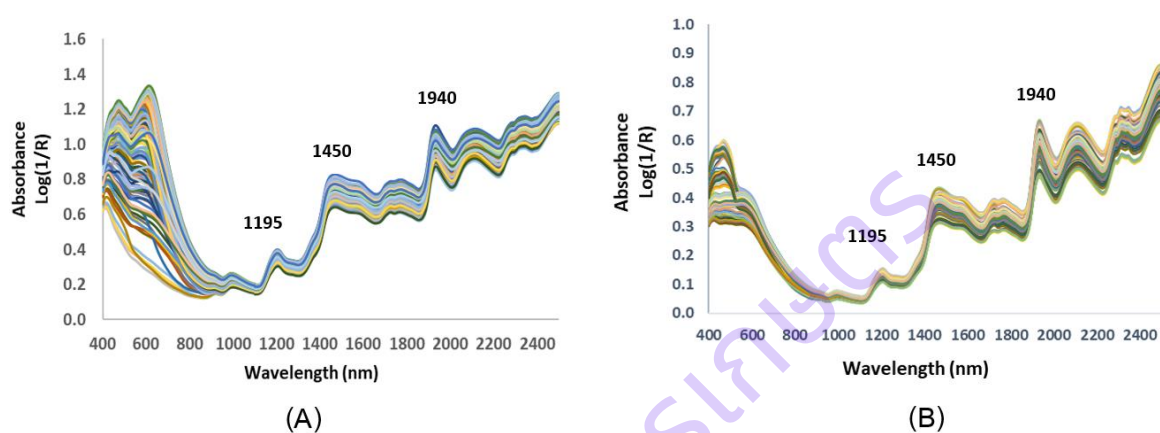


Figure 1 The original NIR spectra of various anthocyanins content of corn (A) kernel and (B) flour at wavelength region 400-2500 nm

Table 1 The characteristics of samples used in model for Anthocyanins content of corn.

Item	Kernel				Flour			
	Cy-3-Glu	Pg-3-Glu	Pn-3-Glu	TA	Cy-3-Glu	Pg-3-Glu	Pn-3-Glu	TA
Min-	14.58-	2.18-	7.44-	38.44-	4.15-307.99	29.58-	7.44-	31.06-
Max	286.58	213.46	152.84	129.33		317.15	152.84	159.88
Mean	131.38	123.28	65.82	75.30	129.78	134.27	69.43	76.06
SD	85.11	49.68	36.76	24.85	87.77	54.99	36.40	28.35
Numb er	67	98	97	73	84	85	86	115
Unit	µg/g	µg/g	µg/g	%	µg/g	µg/g	µg/g	%

Table 2 The statistical analysis of NIRS models to predict anthocyanins content of corn by the Unscrambler program

Sample	Qualities	Wavelength (nm)	Pretreatment	R	SEC	SEP	Bias	F
Kernel	Cy-3-Glu	1000-2500	original	0.96	21.34	27.99	-0.16	11
Kernel	Pg-3-Glu	400-2500	original	0.95	16.52	23.12	0.39	17
Kernel	Pn-3-Glu	1000-2500	original	0.95	11.53	14.57	0.11	12
Kernel	TA	1000-2500	original	0.94	8.75	11.23	0.02	10
Flour	Cy-3-Glu	800-2500	original	0.96	24.74	28.22	-0.08	7
Flour	Pg-3-Glu	1000-2500	original	0.95	17.01	22.08	-0.03	12
Flour	Pn-3-Glu	1000-2500	1 st derivative	0.97	7.94	13.30	-0.10	10
Flour	TA	400-2500	original	0.95	9.09	10.33	0.06	10

1st derivative: First derivative, R: Coefficient of correlation, SEC: Standard error of calibration, SEP: Stand error of prediction; Bias: The average difference between actual value and NIRS value, F: The number of factors used in the calibration equation, N: Number of sample

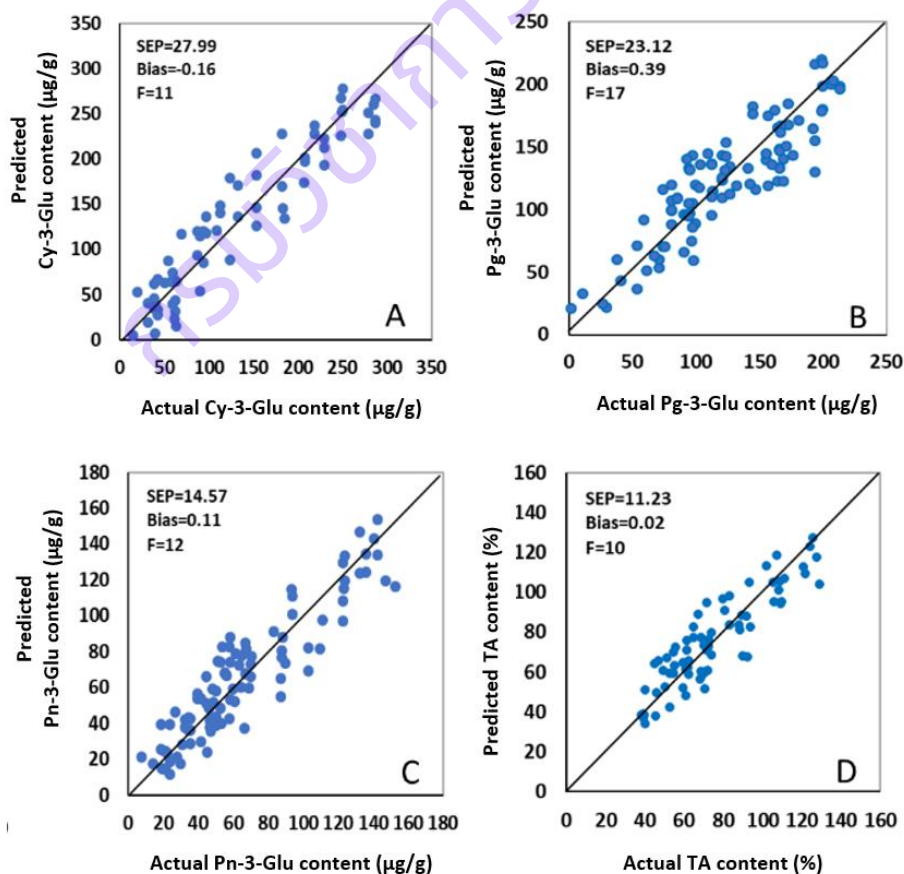


Figure 2 Scatter plots for validation model of corn kernel; (A) Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu), (B) pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu), (C) peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) and (D) total anthocyanin content (TA).

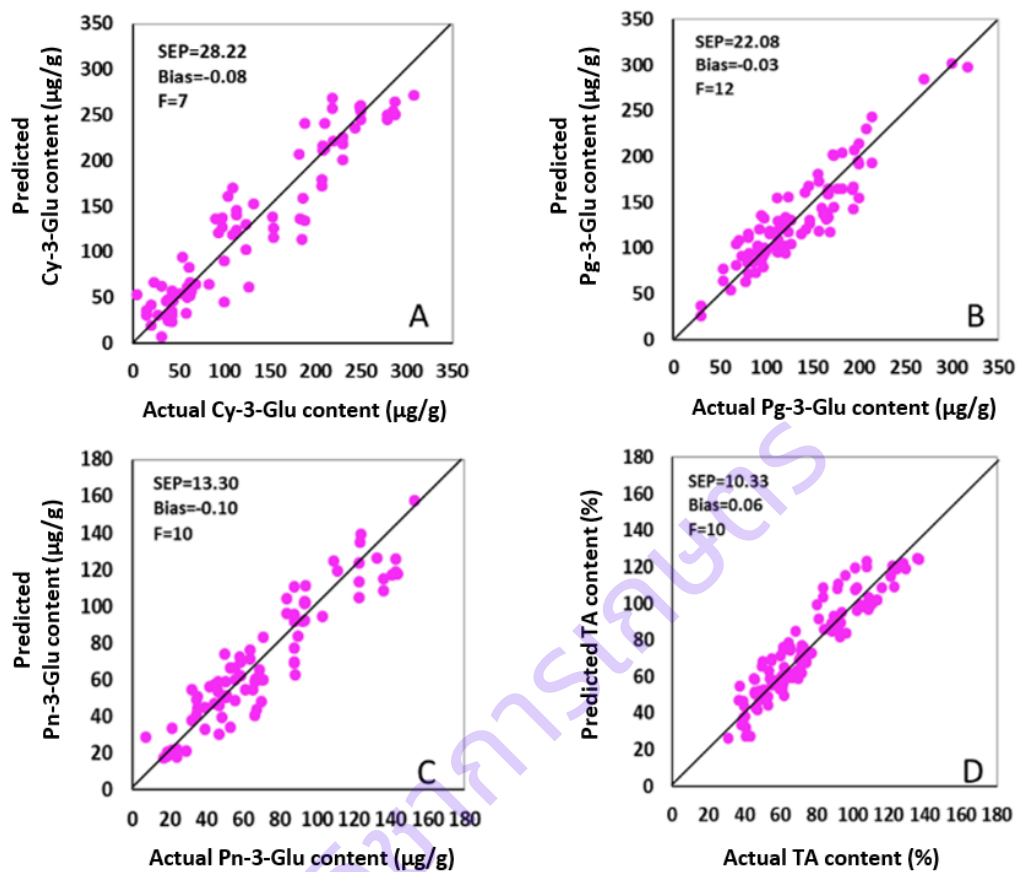


Figure 3 Scatter plots for validation model of corn flour; (A) Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu), (B) pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu), (C) peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) and (D) total anthocyanin content (TA).

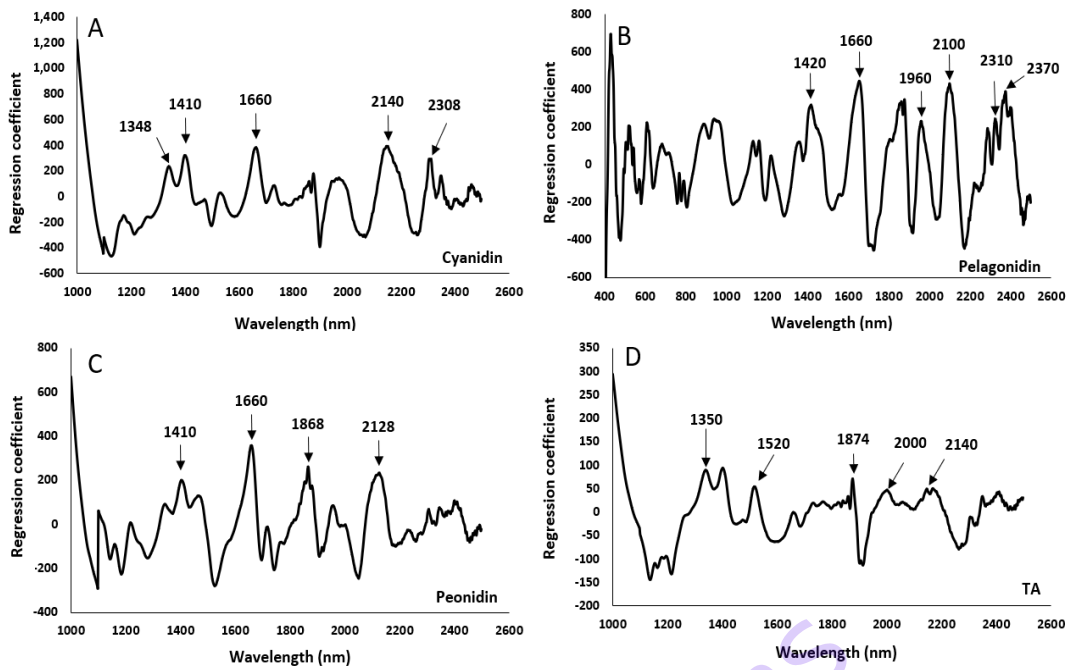


Figure 4 Regression coefficient plots to evaluate anthocyanin content of corn kernel; (A) Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu), (B) pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu), (C) peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) and (D) total anthocyanin content (TA).

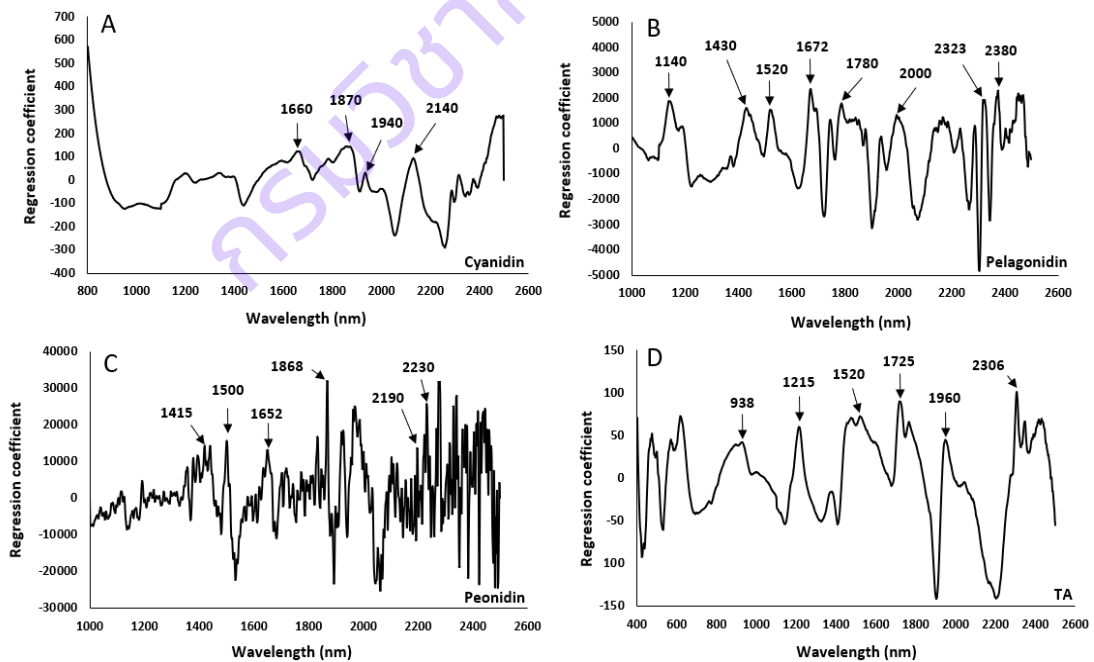


Figure 5 Regression coefficient plots to evaluate anthocyanin content of corn flour; (A) Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Cy-3-Glu), (B) pelargonidin-3-O-glucoside (Pg-3-Glu), (C) peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-Glu) and (D) total anthocyanin content (TA).