

การทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วน โดยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

สุวรรณี เกศกมลასัน^{1/} ศศิพร ช่อลำไย^{2/} สุรนนท์ น้อยอุทัย^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสมการสำหรับการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหารผสมครบส่วนโดยเทคนิค Near infrared spectroscopy (NIRS) ใช้ตัวอย่างอาหารผสมครบส่วนจำนวน 259 ตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1,100-2,500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Near infrared spectrophotometer จากนั้น หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของอาหารผสมครบส่วน กับค่าองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้โปรแกรม WinISI IV โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบถดถอย (Regression) แบบ Partial least square (PLS) ผลการศึกษา พบว่า สมการสำหรับการทำนาย (Calibrated equation) ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า ฟอสเฟต ลิกโนเซลลูโลส และ ลิกนิน มีค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.79-0.98 และเมื่อมีการทวนสอบสมการ (Validation) แล้วพบว่า มีค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.89-0.98 และจากการประเมินศักยภาพของสมการโดยใช้มาตรฐาน ISO 12099: 2017 พบว่า สมการเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำเพียงพอสำหรับการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR

คำสำคัญ : เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี สมการทำนาย อาหารผสมครบส่วน

เลขทะเบียนผลงาน : 66(2)-0214-034

^{1/} กลุ่มวิจัยและพัฒนาการวิเคราะห์อาหารสัตว์ สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

^{2/} กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

Prediction of chemical composition in Total mixed ration by Near infrared Spectroscopy technique

Suwannee Kaskamalas^{1/} Sasiporn Cholumyai^{2/} Suranant Noi-uthai^{1/}

Abstract

A study aimed to develop equations to estimate the chemical composition of total mixed rations (TMR) using the Near-infrared spectroscopy (NIRS) technique was performed. A total of 259 TMR samples were scanned using wavelengths of 1,100-2,500 nm. Predictive equations were developed using Regression or Partial Least Square (PLS) methods in WinISI IV. Results showed that the r^2 values of calibrated equations to predict dry matter (DM), crude protein (CP), ether extract (EE), Ash, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL) of TMR ranged from 0.79 to 0.98. The r^2 values of the validated equations of those chemical compositions ranged from 0.89-0.98. Determination of equations based on the ISO12099: 2017 standard revealed that the calibrated equations developed in the present study were precise and accurate in analyzing the chemical compositions of TMR.

Keywords : NIRS , Prediction equation , Total mixed ration (TMR)

Registered No.: 66(2)-0214-034

^{1/}Feed Analysis Research and Development Section. Bureau of Animal Nutrition Development Muang Phatumthani 12000

^{2/}Forage Seed Technology Research and Development Section. Bureau of Animal Nutrition Development Muang Phatumthani 12000

คำนำ

อาหารผสมครบส่วน (Total mixed ration, TMR) หมายถึง การจัดการให้อาหารที่มีส่วนผสมของอาหารหยาบ รวมกับเมล็ดธัญพืชทั้งแหล่งอาหารโปรตีน พลังงาน แป้ง และวิตามิน แร่ธาตุ โดยจัดให้มีขนาดชิ้นและสัดส่วนของอาหารหยาบและอาหารชั้นที่เหมาะสม นำมาผสมรวมกันเป็นเนื้อเดียวกัน (วิโรจน์, 2560)

กรมปศุสัตว์ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อ โคนม กระบือ แพะ แกะ ใช้อาหาร TMR เนื่องจากทำให้สัตว์ได้โภชนาการครบตามความต้องการของสัตว์ ปัจจุบันสหกรณ์ผู้ผลิตอาหารโคเนื้อ โคนม มีการผลิตอาหาร TMR จำหน่ายให้กับสมาชิก พบว่า อาหาร TMR แต่ละแหล่งการผลิตมีการใช้วัตถุดิบในการประกอบอาหารที่แตกต่างกันไป ดังนั้นการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานทางเคมีแบบดั้งเดิม ใช้เวลาค่อนข้างนาน ไม่ทันต่อการปรับสูตรอาหาร มีการใช้สารเคมีจำนวนมาก ซึ่งมีความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายต่อตัวผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการได้ หากสามารถสร้างสมการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR จะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์รวดเร็วขึ้น ลดการใช้สารเคมี มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ และลดการทำลายสิ่งแวดล้อม

เครื่อง NIRS (Near infrared spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการวัดสเปกตรัมย่านเนียร์อินฟราเรด (800-2,500 นาโนเมตร) ซึ่งสารประกอบอินทรีย์และมีพันธะ C-H N-H O-H S-H และ C=O ภายในโมเลกุลสะท้อนออกมา (Reflect) (ศุมาพร, 2548) เทคนิคนี้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง กึ่งของแข็ง หรือของเหลวที่มีสีเข้ม สามารถทำนายได้หลายองค์ประกอบต่อการวัดตัวอย่าง 1 ครั้ง เช่น ค่าวัตถุแห้ง (Dry matter, DM) ค่าโปรตีน (Crude protein, CP) ส่วนประกอบของเยื่อใย ได้แก่ ค่าผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber, NDF) ลิ กโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber, ADF) และลิ กนิน (Acid detergent lignin, ADL) จึงได้ผลที่รวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่ใช้สารเคมี ลดต้นทุน และลดเวลาในการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีแบบดั้งเดิม

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากเครื่อง NIRS จะอยู่ในรูปของสเปกตรัมไม่สามารถทำนายองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างได้ทันที จำเป็นต้องใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ คือ เคมีเมทริกซ์ (Chemometrics) เพื่อสังเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมกับส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่าง แล้วนำมาสร้างเป็นสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration equation) ซึ่งสมการเทียบมาตรฐานที่ได้นี้จะต้องผ่านขั้นตอนการทวนสอบความถูกต้องของสมการ (Validation) เพื่อให้มีความแม่นยำก่อนนำไปใช้ทำนายค่าองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างต่อไป

ปัจจุบันยังไม่มีสมการเทียบมาตรฐานทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR ด้วยเทคนิค Near infrared spectroscopy (NIRS) ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้ จึงทำการศึกษาเพื่อสร้างสมการเทียบมาตรฐานสำหรับทำนายองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างอาหาร TMR ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งจะทำให้เกษตรกรสัตว์ได้รับผลวิเคราะห์เพื่อนำไปใช้ประกอบสูตรอาหารสัตว์ได้ทันต่อเหตุการณ์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองและสร้างสมการทำนายค่าองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เทคนิค NIRS ที่กลุ่มวิจัยและพัฒนาการวิเคราะห์อาหารสัตว์ สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2563 ถึง กันยายน 2564

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหาร TMR ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากสหกรณ์โคนมนครปฐม สหกรณ์โคนมไทย-เคนมาร์ค สวนมะเดื่อ จ.ลพบุรี สหกรณ์โคนมไทยมิลค์ จ.สระบุรี องค์การส่งเสริมกิจการโคนม จ.สระบุรี และสหกรณ์โคนมปากช่อง จ.นครราชสีมา จำนวน 52 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในจังหวัดลำปาง พิชญ์โลก กาญจนบุรี สุพรรณบุรี พิจิตร สระแก้ว เพชรบูรณ์ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด พัทลุง และนราธิวาส จำนวน 70 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ผลิตในศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ในจังหวัดลำปาง ชัยนาท เพชรบูรณ์ นครราชสีมา อุดรธานี บุรีรัมย์ สกลนคร มหาสารคาม นครพนม ยโสธร ประจวบคีรีขันธ์ และ สุราษฎร์ธานี จำนวน 137 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 259 ตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างๆ ละ ประมาณ 2 กิโลกรัม นำตัวอย่างอาหาร TMR อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักก่อนอบ และหลังอบ แล้วนำไปบดให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร และเก็บตัวอย่างที่บดแล้วไว้ในถุงพลาสติกซิปล็อคเพื่อป้องกันความชื้น แล้วนำไปสแกนเพื่อเก็บสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRS และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน

การวัดสเปกตรัม

นำตัวอย่าง (ขนาด 1 มิลลิเมตร) ที่เตรียมไว้มาสแกนเพื่อเก็บสเปกตรัมโดยใช้เครื่อง NIRS ยี่ห้อ FOSS รุ่น DS2500 (Foss Analytical A/S, Denmark) ที่ความยาวคลื่นช่วง 1,100 - 2,500 นาโนเมตร โดยใช้โปรแกรม ISScan NOVA และกำหนดให้สเปกตรัมแต่ละจุดห่างกัน 0.5 นาโนเมตร สแกนตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่บดแล้วในเซลล์ใส่ตัวอย่าง (Sample cell) โดยใช้ตัวอย่างให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ ทำ 2 ซ้ำ (Duplicates) การวัดแต่ละครั้งจะแสดงรายการองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 7 รายการ ได้แก่ วัตถุแห้ง (Dry matter, DM) โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP) ไขมัน (Ether extract, EE) เถ้า (Ash) ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber, NDF) ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber, ADF) และลิกนิน (Acid detergent lignin, ADL) นำค่าแต่ละรายการที่ได้จากการวัดมาเฉลี่ยเพื่อแสดงผลออกมาเป็นเส้นสเปกตรัม 1 เส้นต่อรอบ ซึ่งค่าที่ได้เรียกว่า ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. นำตัวอย่างอาหาร TMR ที่วัดสเปกตรัมแล้วไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ โดยวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (Wet chemical analysis) ได้แก่ ความชื้น (Moisture) ตามวิธีที่ 930.15 (AOAC, 2016) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า DM โดย $\%DM = 100 - \text{Moisture}$ วิเคราะห์ค่า CP โดยการหาไนโตรเจนด้วยวิธี Combustion แล้วคูณด้วยแฟกเตอร์ 6.25 ตามวิธีที่ 990.03 (AOAC, 2016) วิเคราะห์ค่า EE โดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ ตามวิธีที่ ISO 11085 (2015) วิเคราะห์ค่า Ash โดยการเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตามวิธีที่ 942.05 (AOAC, 2016) วิเคราะห์ค่าเยื่อใยต่างๆ ได้แก่ NDF ตามวิธีที่ 2002.04 (AOAC, 2016) ADF และ ADL ตามวิธีที่ 973.18 (AOAC, 2016) แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ค่าที่ได้เรียกว่าค่าจริง (Actual value)

2. หาค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในห้องปฏิบัติการ (Standard error of laboratory, SEL) ด้วยวิธี Duplicate blind test เพื่อนำค่าไปประเมินสมการเทียบมาตรฐานที่สร้างได้ โดย SEL ต้องมากกว่าค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) 2 เท่า (SA., 2017) โดยใช้ตัวอย่างอาหาร TMR จำนวน 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ซ้ำ (ซ้ำที่ 1 และ ซ้ำที่ 2) จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 20 ซ้ำ กำหนดหมายเลขตัวอย่างไม่ให้ซ้ำกัน เพื่อไม่ให้ผู้วิเคราะห์ทราบรายละเอียดของตัวอย่าง แล้วแบ่งส่งวิเคราะห์เป็น 2 ชุดๆ ละ 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างแต่ละชุดวิเคราะห์เพียง 1 ซ้ำ จากนั้นนำผลวิเคราะห์ของแต่ละรายการมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (On dry basis) และคำนวณหาค่า SEL ของแต่ละรายการ ดังนี้

$$SEL = \sqrt{\frac{\sum (D)^2}{n}}$$

D = ผลต่างของรายการวิเคราะห์ชุดที่ 1 และชุดที่ 2

n = จำนวนตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 10

การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration equation)

1. นำข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลองค์ประกอบทางเคมี มาหาความสัมพันธ์กันด้วยวิธี Partial least square regression (PLS) โดยใช้โปรแกรม WinISI IV แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ที่เป็นอิสระต่อกัน คือ กลุ่มที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration set) ทำนายค่า DM CP EE Ash NDF ADF และ ADL และกลุ่มที่ใช้ทดสอบความใช้ได้ของสมการ (Validation set) ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 การสร้างสมการเป็นการสร้างแบบเต็มช่วงความยาวคลื่น (Full spectrum method) ด้วยวิธี PLS และ Modified partial least squares (MPLS) ร่วมกับการไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม และมีการปรับแต่งสเปกตรัมด้วย Standard normal variate (SNV) และ Detrend เพื่อลดความแปรปรวนและสิ่งรบกวนอื่นๆ ที่อาจทำให้ข้อมูลสเปกตรัมมีการเปลี่ยนแปลงไป และใช้ Math treatment ที่ใช้ค่า Derivative number Gap Smoothing และ Second smoothing จำนวน 10 แบบ ดังนี้ (1,4,4,1) (2,4,4,1) (1,8,4,1) (2,8,4,1) (1,8,8,1) (2,8,8,1) (1,5,5,1) (2,5,5,1) (1,10,10,1) และ (2,10,10,1) โดยใช้ตามคำแนะนำในคู่มือการใช้โปรแกรม WinISI (Infrasoft international, 2005) ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานนี้จะตัดตัวอย่างที่ผลการวิเคราะห์แตกต่างไปจากกลุ่ม (Outlier) ของแต่ละองค์ประกอบทางเคมีออกไป จะได้สมการเทียบมาตรฐานของแต่ละรายการจำนวน 40 สมการ

2. ประเมินเพื่อคัดเลือกสมการที่ดีที่สุดสำหรับเครื่อง NIRS ในการทำนายค่า DM CP EE Ash NDF ADF และ ADL โดยใช้ค่าสถิติต่างๆ ดังนี้

2.1 r^2 (Coefficient of determination) คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีกับค่าที่ได้จากเครื่อง NIRS ค่าที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

2.2 SEC (Standard error of calibration) คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าวิเคราะห์ทางเคมีจากห้องปฏิบัติการกับค่าที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIRS ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างสมการ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

2.3 SECV (Standard error of cross validation) เป็นการหาค่าความผิดพลาดมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าวิเคราะห์ทางเคมีจากห้องปฏิบัติการกับค่าที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIRS ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้สร้างสมการโดยแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็นกลุ่มๆ

2.4 SEP (Standard error of prediction) คือ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าวิเคราะห์ทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ กับ ค่าที่วิเคราะห์ด้วยสมการของตัวอย่างกลุ่มที่ใช้ทดสอบสมการ สมการที่เหมาะสมควรมีค่า SEP ไม่เกิน 2 เท่าของค่า SEL

2.5 Bias คือ ค่าความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างค่าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS กับ ค่าวิเคราะห์ทางเคมี

2.6 Slope คือ ความชันของกราฟการกระจาย (Scatter plots) ระหว่างค่าวิเคราะห์ทางเคมีกับค่าที่ทำนายจากสมการเทียบมาตรฐาน

2.7 SEP© (Standard error of prediction corrected by bias) คือ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายซึ่งถูกแก้ค่าให้ถูกต้องด้วยค่า Bias

2.8 RPD (Ratio of standard error of performance to standard deviation) เป็นสัดส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าทางเคมี และ ค่า SEP ของตัวอย่างในกลุ่ม Validation sample set

ในการพิจารณาเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่ดีที่สุด จะพิจารณาจากสมการที่มีค่า r^2 สูง และมีค่า SEC SECV ที่มีค่าต่ำ จากสมการเทียบมาตรฐานของแต่ละรายการจำนวน 40 สมการ คัดเลือกสมการที่ดีที่สุด 3 สมการเพื่อนำไปทดสอบความใช้ได้ของสมการต่อไป

การทดสอบความใช้ได้ของสมการ (Validation test)

นำสมการเทียบมาตรฐานที่คัดเลือกไว้จำนวน 3 สมการ นำมาทดสอบเพื่อวัดประสิทธิภาพของสมการว่าสามารถใช้ในการประเมินค่าได้แม่นยำมากน้อยเพียงใด โดยนำสเปกตรัมของตัวอย่างกลุ่มทดสอบ ที่ทราบค่าทางเคมีแล้วนำมาทำนายด้วยสมการเทียบมาตรฐาน แล้วประเมินความใช้ได้ของสมการโดยใช้ค่าสถิติต่างๆ ดังนี้ $SEP < 2$ SEL $Bias < 0.55$ SEC $SEP(C) < 1.29$ SEC และ $Slope \sim 1$ (SA., 2017)

และพิจารณาระดับคุณภาพของสมการด้วยค่า RPD ดังตารางที่ 1 แล้วเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่ดีที่สุดเพียง 1 สมการสำหรับนำไปใช้ในการทำนายองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง NIRS ต่อไป

ตารางที่ 1 เกณฑ์การพิจารณาความใช้ได้ของสมการด้วยค่า RPD

ค่า RPD	ชั้นคุณภาพของสมการ	ค่าองค์ประกอบเคมีที่ทำนายได้กับการนำไปใช้งาน
0.0 – 1.9	แย่มาก (Very poor)	ค่าที่ทำนายได้ยังไม่เหมาะสมในการนำไปใช้งาน
2.0 - 2.4	แย่ (Poor)	ค่าที่ทำนายได้ ใช้สำหรับ การคัดเลือกตัวอย่างเบื้องต้น (Rough screening)
2.5 - 2.9	พอใช้ (Fair)	ค่าที่ทำนายได้ใช้สำหรับ การคัดเลือกตัวอย่างได้ (Screening)
3.0 - 3.4	ดี (Good)	ค่าที่ทำนายได้ใช้สำหรับการควบคุม คุณภาพตัวอย่างได้ (Quality control)
3.5 - 4.0	ดีมาก (Very good)	ค่าที่ทำนายได้ ใช้ในการควบคุมคุณภาพกระบวนการงานได้ (Processcontrol)
> 4.1	ยอดเยี่ยม (Excellent)	ค่าที่ทำนายได้ใช้แทนค่าวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการได้

ที่มา : William et al. (2019)

ประเมินศักยภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยมาตรฐาน ISO 12099 : 2017

โดยสมการเทียบมาตรฐานที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดจะถูกนำมาประเมินศักยภาพด้วยมาตรฐาน ISO 12099: 2017 (ISO, 2017) โดยจะทำการประเมินด้วยค่าสถิติ คือ Bias SEP Slope ที่มีการคำนวณ ดังนี้

1. การตรวจสอบค่า Bias โดยเทียบกับ Bias confidence limit (T_b) ตามสมการ ถ้าค่า Bias มีค่าน้อยกว่า T_b แสดงว่า ค่า Bias หรือ ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายไม่มีนัยสำคัญ

$$T_b = \pm \frac{t_{(1-\alpha/2)} * SEP}{\sqrt{n}}$$

T_b	คือ	ค่า bias confidence limit
$t_{(1-\alpha/2)}$	คือ	ค่า t value ของการทดสอบ 2 ทาง ด้วย degree of freedom ที่สอดคล้องกับ SEP ที่มีค่าเท่ากับ n-1
SEP	คือ	standard error of prediction (ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มทดสอบ)
n	คือ	จำนวนตัวอย่างในกลุ่มทดสอบ

2. การตรวจสอบค่า SEP เป็นการคำนวณค่า T_{UE} (The unexplained error confidence limit) หากค่า SEP น้อยกว่า T_{UE} แสดงว่า ค่า SEP หรือค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มทดสอบไม่มีนัยสำคัญ คำนวณได้ ดังนี้

$$T_{UE} = SEC \sqrt{F_{(\alpha, v, M)}}$$

T_{UE}	คือ	The unexplained error confidence limit
$F_{(\alpha, v, M)}$	คือ	ค่า F value
SEC	คือ	standard error of calibration (ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการสร้างสมการของกลุ่มสร้างสมการ)
α	คือ	ระดับความน่าจะเป็นของการเกิดความผิดพลาดชนิดที่ 1 (type I error) โดยทั่วไป คือ 5%
v	คือ	$n_{\text{validation set}} - 1$ (degree of freedom ที่สอดคล้องกับ SEP)
M	คือ	$n_{\text{validation set}} - p - 1$ (degree of freedom ที่สอดคล้องกับ SEC) โดย p คือ number of terms หรือ PLS factors of the model)

3. การตรวจสอบ slope เป็นความชันของกราฟการกระจาย (scatter plots) ระหว่างค่าองค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ได้จริงเป็นค่าอ้างอิง (แกน y) กับค่าที่ทำนายที่ได้จากสมการ

เทียบมาตรฐาน ด้วยเครื่อง NIRS (แกน x) ซึ่งจะสอดคล้องกับสมการเส้นตรง โดยมีค่า slope b และ intercept a คำนวณได้ตามสมการ

$$\begin{aligned}y &= a + b\hat{y} \\ b &= \frac{S_{\hat{y}y}}{S_{\hat{y}}^2} \\ a &= \bar{y} - b\bar{\hat{y}}\end{aligned}$$

$S_{\bar{y}y}$ คือ ความแปรปรวนร่วมระหว่างค่าทำนายกับค่าจริง (Covariance)

$S^2_{\bar{y}}$ คือ ความแปรปรวนของค่าทำนายในกลุ่มทดสอบ

$\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าที่ทำนายจากสมการเทียบมาตรฐาน

$\hat{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าอ้างอิงที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

จากนั้นทดสอบค่า Slope ที่คำนวณได้โดยใช้ t-test ดังสมการ

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (a + b\hat{y}_i)]^2}{n-1}}$$

$$t_{obs} = |b-1| \sqrt{\frac{S_{\bar{y}}^2(n-1)}{S_{res}^2}}$$

S_{res} คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Residual

T_{obs} คือ The observed value

N คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่มทดสอบ

y_i คือ ค่าอ้างอิงที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

$\hat{y}_i$ คือ ค่าที่ทำนายได้จากสมการเทียบมาตรฐาน

หากค่า t_{obs} น้อยกว่า $t_{(1-\alpha/2)}$ แสดงว่า ความชันของกราฟการกระจายระหว่างค่าทางเคมีจริงที่เป็นค่าอ้างอิงกับค่าที่ทำนายจากสมการเทียบมาตรฐานไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่าง TMR จำนวน 259 ตัวอย่าง มีค่า DM CP EE Ash NDF ADF และ ADL ดังแสดงตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสม และองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR แยกตามรายภาคของประเทศไทย

ภาค	N	ส่วนผสมของอาหาร TMR				องค์ประกอบทางเคมี						
		แหล่งโปรตีน	แหล่งพลังงาน	แหล่งแร่ธาตุ	แหล่งอาหารหยาบ	DM (%)	CP	EE	Ash	NDF	ADF	ADL
เหนือ	83	- กากและผิวถั่วเหลือง	- มันเส้นกากปาล์ม	- เกลือแร่ธาตุรวม	- ต้นข้าวโพดพร้อมฝักหมัก ฟางข้าว	81.45 - 95.49	6.41 - 25.21	0.66 - 7.15	2.11 - 16.20	14.76 - 71.59	10.68 - 49.56	1.96 - 9.34
		- ถั่วเหลืองไขมันเต็ม	- เมล็ดข้าวโพดบด	- ไคแคลเซียม	- เปลือกฝักข้าวโพด							
		- อาหารชั้น	- ฟุนข้าวโพด	- ปริมิคซ์	- แห้ง หญ้าเนเปียร์สด							
			- รำละเอียด		- หญ้าแพงโกลาสต							
กลาง	38	- อาหารชั้น	- รำละเอียด	- ไม่เต็ม	- ต้นข้าวโพดพร้อมฝักหมัก ฟางข้าว	89.91 - 94.64	6.17 - 20.69	0.75 - 5.26	7.00 - 17.90	38.09 - 65.98	21.47 - 44.28	3.63 - 7.88
			- กากมันขาว		- หญ้าเนเปียร์สด และหมัก							
ตะวันออกเฉียงเหนือ	97	- กากถั่วเหลือง	- มันเส้น	- แร่ธาตุรวม	- เนเปียร์ปากช่อง1	88.09 - 94.06	7.09 - 21.46	0.47 - 6.76	6.39 - 15.30	24.83 - 54.79	13.79 - 35.35	1.91 - 6.73
		- ถั่วเหลืองอบ	- กากน้ำตาล	- ผงฟู	- เกลือ							
		- ยูเรีย	- โพตบด		- ฟางข้าว							
		- อาหารชั้น	- กากเปียร์		- ต้นข้าวโพดพร้อมฝักหมัก							
กลางตอนล่างและใต้	41	- กากถั่วเหลือง	- มันเส้น	- รำ	- ไม่เต็ม	88.29 - 94.20	11.24 - 22.46	0.82 - 7.57	8.32 - 17.90	27.57 - 61.15	19.80 - 40.11	3.49 - 13.39
		- อาหารชั้น	- กากน้ำตาล		- เนเปียร์ปากช่อง1							
			- ซีเค้กากปาล์ม		- ฟางข้าว							
			- กากเนื้อในปาล์ม		- หญ้าฟิลแคทุ้มสด							
					- ต้นข้าวโพดพร้อมฝักสด							

ตัวอย่างอาหาร TMR ที่สุ่มเก็บจากแต่ละสถานที่ที่ได้ข้อมูลจากการสอบถาม สามารถจำแนกประเภทของวัตถุดิบที่ใช้เป็นส่วนผสมของแหล่งโปรตีน พลังงาน แร่ธาตุ และอาหารหยาบของแต่ละภาคพบว่า มีความหลากหลายไปตามชนิดของวัตถุดิบที่สามารถหาได้ในพื้นที่ (ตารางที่ 2)

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดลำปาง พิจิตร พิษณุโลก และ เพชรบูรณ์ มีการปลูกถั่วเหลืองมาก จึงใช้กากถั่วเหลือง และอาหารชั้นเป็นแหล่งโปรตีน แหล่งพลังงานใช้เมล็ดข้าวโพด ฟุนข้าวโพด เนื่องจากภาคเหนือเป็นแหล่งปลูกข้าวโพด และอาหารหยาบที่ใช้กันมาก คือ ข้าวโพดหมัก ฟางข้าว เปลือกข้าวโพดแห้ง หญ้าเนเปียร์สด และหญ้าแพงโกลาสต รวมถึงผลพลอยได้จากการปลูกข้าวโพด

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัด สุพรรณบุรี นครปฐม และ ชัยนาท ใช้อาหารชั้นเป็นแหล่งโปรตีน แหล่งพลังงานใช้รำละเอียดและกากมัน ส่วนอาหารหยาบส่วนมากใช้ข้าวโพดหมัก ฟางข้าว หญ้าเนเปียร์หมัก หญ้าเนเปียร์สด หญ้าแพงโกลาแห้ง และต้นข้าวสด เนื่องจากพื้นที่ภาคกลางมีพื้นที่เหมาะสมสำหรับปลูกข้าว ข้าวโพด หญ้าเนเปียร์ หญ้าแพงโกลา และมันสำปะหลัง

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด สระบุรี นครราชสีมา นครพนม บุรีรัมย์ อุดรธานี และขอนแก่น ส่วนมากใช้กากถั่วเหลือง ถั่วเหลืองอบ อาหารชั้น ยูเรีย เป็นแหล่งโปรตีน แหล่งพลังงาน ใช้ มันเส้น กากน้ำตาล กากเบียร์ เนื่องจากเป็นแหล่งปลูกลำไส้และลำไส้เล็ก และมีโรงงานผลิตเบียร์ และอาหารหยาบส่วนมาก ใช้หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 สด หญ้าเนเปียร์หมัก ฟางข้าว ต้นข้าวโพดพร้อมฝักหมัก หญ้ากีนีสสด หญ้ารูชีสด เปลือกและซังข้าวโพดแห้ง

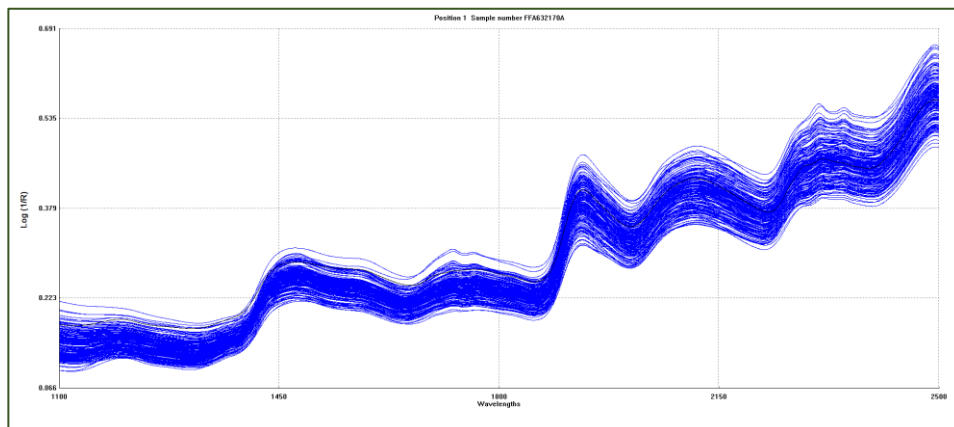
ภาคกลางตอนล่างและภาคใต้ ได้แก่ จังหวัด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี พัทลุง และนราธิวาส ใช้กากถั่วเหลือง และอาหารชั้น เป็นแหล่งโปรตีน แหล่งพลังงานใช้มันเส้น กากน้ำตาล กากสัลดจ์ ปาล์มน้ำมัน เนื่องจากเป็นแหล่งปลูกปาล์มน้ำมัน แหล่งอาหารหยาบใช้ หญ้าแพงโกลาแห้ง หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หญ้าพลิแคทูลัมสด ต้นข้าวโพดพร้อมฝักสด ฟางหมัก ซึ่งหญ้าพลิแคทูลัม สามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ภาคใต้

ค่า SEL ของการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ DM CP EE Ash NDF ADF และ ADL ของตัวอย่าง TMR พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.12 0.23 0.13 0.05 0.31 0.28 และ 0.21 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งค่า SEL ของรายการ Ash มีค่าต่ำสุดอาจเนื่องจากวิธีวิเคราะห์ Ash มีขั้นตอนน้อยและไม่ยุ่งยากจึงทำให้ความแตกต่างของผลวิเคราะห์มีค่าต่ำ ความแตกต่างของผลวิเคราะห์อาจเกิดขึ้นได้จากค่าความผิดพลาด (Error) ในกระบวนการวิเคราะห์ที่สามารถพบได้เสมอ โดยมีทั้งค่า Error ของระบบ (Systematic error) และ ค่า Error จากผู้ทำการวิเคราะห์ (Personal error) (Taylor, 1997) ดังนั้นกระบวนการวิเคราะห์ที่มีหลายขั้นตอนจึงมีโอกาสเกิดค่า Error ได้มากกว่าส่งผลให้มีค่า SEL สูง โดยค่า SEL ที่ได้มีค่าต่ำจะทำให้เพิ่มความเป็นไปได้ที่จะประสบความสำเร็จในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Nie et al., 2009)

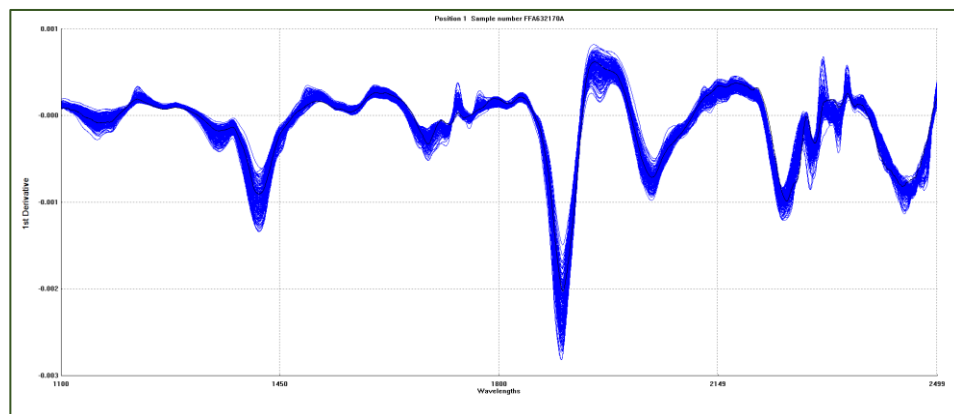
ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมี และค่า Standard error of laboratory (SEL) ของห้องปฏิบัติการ

รายการ	รายละเอียด	จำนวน	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	± SD	SEL
DM (%)	ตัวอย่างทั้งหมด	243	88.10	95.15	92.49	1.40	0.12
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน	192	88.10	95.15	92.51	1.37	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	30	88.29	95.10	92.43	1.53	
CP (%DM)	ตัวอย่างทั้งหมด	247	6.43	24.40	14.74	3.34	0.23
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน	194	6.43	24.40	14.69	3.28	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	40	6.52	23.39	14.77	3.47	
EE (%DM)	ตัวอย่างทั้งหมด	256	0.48	7.67	2.37	1.30	0.13
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน	200	0.48	7.67	2.34	1.26	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	40	0.63	7.48	2.34	1.30	
Ash (%DM)	ตัวอย่างทั้งหมด	249	5.80	18.32	9.75	2.21	0.05
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน	197	5.80	18.32	9.74	2.20	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	35	6.07	18.21	9.76	2.31	
NDF (%DM)	ตัวอย่างทั้งหมด	249	14.66	69.67	45.58	9.40	0.28
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน	198	14.66	69.67	45.69	9.21	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	40	18.11	68.49	45.53	9.96	
ADF (%DM)	ตัวอย่างทั้งหมด	253	11.10	44.28	28.09	6.22	0.31
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน	200	11.10	44.28	28.14	6.18	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	40	12.67	41.46	28.06	6.39	
ADL (%DM)	ตัวอย่างทั้งหมด	247	1.71	8.17	4.39	1.41	0.21
	ตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ	194	1.71	8.17	4.39	1.40	
	ตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ	40	1.90	8.08	4.42	1.46	

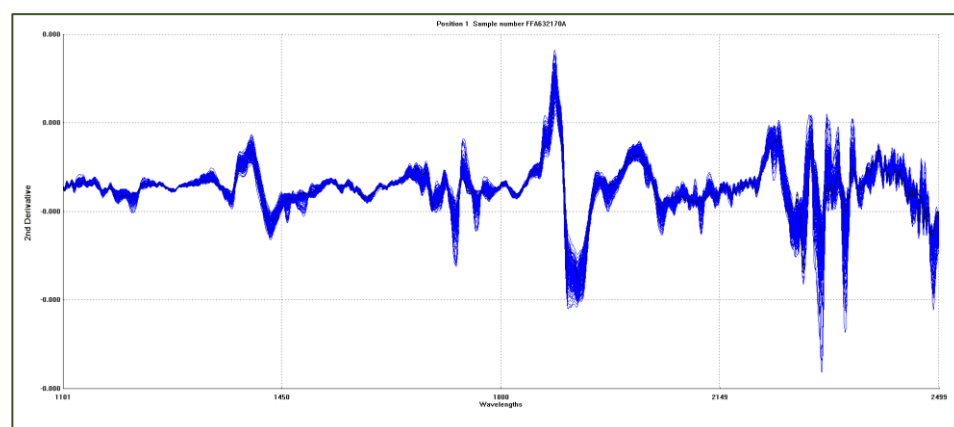
หมายเหตุ DM= วัตถุแห้ง, CP=โปรตีนหยาบ, EE=ไขมัน, Ash=เถ้า, NDF=ผนังเซลล์, ADF=ลิกโนเซลลูโลส, ADL=ลิกนิน, SD=ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, SEL=ความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในห้องปฏิบัติการ



(a) Original spectra ไม่ปรับแต่ง



(b) 1st derivative spectra



(c) 2nd derivative spectra

ภาพที่ 1 NIRS spectra of TMR : (a) original spectra
(b) 1st derivative spectra (c) 2nd derivative spectra

ตารางที่ 4 ค่าสถิติของสมการทำนายองค์ประกอบทางเคมีที่คัดเลือกได้

Parameter				Treatment	Calibration set				Validation set				
					N	r ²	SEC	SECV	N	r ²	SEP	Bias	RPD
DM, %	MPLS	None	2,10,10,1	192	0.79	0.63	0.79	30	0.91	0.42	-0.12	3.37	
CP, %	PLS	SNV+Detrend	2,8,4,1	194	0.96	0.69	0.93	40	0.98	0.15	-0.03	8.12	
EE, %	MPLS	None	2,4,4,1	200	0.98	0.17	0.25	40	0.98	0.18	0.03	7.07	
Ash, %	MPLS	SNV+Detrend	2,4,4,1	197	0.90	0.69	0.96	35	0.89	0.73	0.11	3.08	
NDF,%	MPLS	SNV+Detrend	2,8,4,1	198	0.97	1.60	2.20	40	0.98	1.48	-0.09	6.75	
ADF, %	MPLS	None	2,5,5,1	200	0.96	1.24	1.60	40	0.96	1.24	-0.18	5.17	
ADL, %	MPLS	None	2,4,5,1	194	0.94	0.35	0.53	40	0.93	0.39	0.04	3.88	

หมายเหตุ N, Number of sample; r², coefficient of determination; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross validation; SEP, Standard Error Prediction; Bias, ค่าความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างค่าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS กับ ค่าวิเคราะห์ทางเคมี; RPD, Ratio of prediction to deviation; DM, Dry Matter; CP, Crude Protein; EE, Ether Extract; NDF, Neutral detergent fiber; ADF, Acid detergent fiber; ADL, Acid detergent lignin.

เมื่อนำชุดข้อมูลสมการเทียบมาตรฐาน มาสร้างสมการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติแบบถดถอย (Regression) แบบ PLS และ MPLS สร้างแบบเต็มช่วงความยาวคลื่น ทั้งแบบไม่ปรับแต่ง และปรับแต่งสเปกตรัม เพื่อให้ได้สมการที่ดีที่สุดขององค์ประกอบทางเคมีแต่ละค่า ซึ่งแต่ละองค์ประกอบทางเคมีทำการสร้างสมการจำนวน 40 สมการ แล้วเลือกสมการที่มีประสิทธิภาพในการทำนายที่ดีที่สุดมา 1 สมการ ซึ่งในการพิจารณาตัดสินใจเลือกสมการที่มีประสิทธิภาพในการทำนายจะพิจารณาจากสมการที่มีค่า r² และ 1-VR สูง มีค่า SEC และ SECV ที่มีค่าต่ำ (Guo et al., 2021) แล้วนำสมการที่ได้ไปใช้ทำนายข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างในชุดทดสอบความถูกต้องของสมการ

Shenk and Westerhaus (1991) รายงานว่า เทคนิค Modified Partial Least Squares (MPLS) ให้ผลในการพัฒนาค่า SEP ของสมการทำนายดีขึ้นได้มากกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับวิธี Modified Stepwise Regression (MSR) Westerhaus (2014) ได้นำเสนอว่าวิธี MPLS จะให้ผลในการสร้างสมการทำนายที่แม่นยำกว่าวิธี Partial Least Squares (PLS) โดยวิธี PLS จะให้ผลกับสเปกตรัมที่มีความแปรปรวนอันเนื่องมาจากองค์ประกอบในการสร้างสมการ (Calibration constituent) ส่วนวิธี MPLS จะให้ผลดีเมื่อต้องการตัดแหล่งที่มาของความแปรปรวนของสเปกตรัมตรงช่วงความยาวคลื่นบนสเปกตรัม

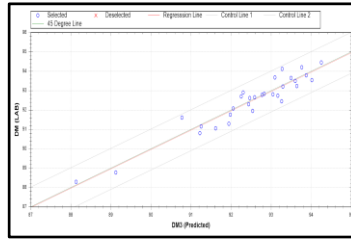
ภาพที่ 1 (a) แสดงตัวอย่างสเปกตรัมของอาหาร TMR ที่ไม่มีการปรับแต่ง ลักษณะสเปกตรัมที่ได้มีพีค (Peak) กว้าง และมีการกระจายตัวของสเปกตรัม มีจุดยอดพีคที่เหลื่อมซ้อนกัน เนื่องจากความแตกต่างของอนุภาคตัวอย่าง รวมทั้งระดับเยื่อใยชนิดต่างๆ ส่งผลให้การกระเจิงแสงแตกต่างกัน (William et al., 2019) ทั้งนี้เมื่อปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ โดยใช้วิธีการ SNV และ Detrend ร่วมกับการใช้ 1st และ 2nd Derivative ของสเปกตรัมที่อยู่ในรูปของ Derivative Gap Smoothing Second smoothing ดังภาพที่ 1 (b) และ (c) ตามลำดับ การใช้ 1st Derivative สามารถช่วยแก้ปัญหาที่สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น (การเลื่อนตัวของสเปกตรัมตามแกน Y) และการใช้ 2nd Derivative สามารถช่วยลดสัญญาณรบกวน ลดการกระเจิงแสงและลดความโค้งของแต่ละสเปกตรัม ทำให้สามารถแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันในสเปกตรัมที่ออกจากกันได้ชัดเจน (อนุพันธ์, 2548) การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิคข้างต้น จะช่วยขยายสัญญาณให้ชัดเจนมากขึ้น และลดความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้นจากการกระเจิงแสงของตัวอย่าง (Kasemsumran et al., 2004)

การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน ทำนายองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของอาหาร TMR พบว่า แต่ละรายการ มีรูปแบบของสมการที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ การใช้ Derivative Gap และ Smoothing ดังในตารางที่ 4 และเมื่อทดสอบความใช้ได้ของสมการเทียบมาตรฐานจากค่า RPD พบว่า สมการทำนายค่า CP EE NDF และ ADF อยู่ในเกณฑ์ยอดเยี่ยมสามารถใช้ได้ทุกงาน ($RPD \geq 4.1$) สมการทำนายค่า ADL อยู่ในเกณฑ์การควบคุมกระบวนการงาน ($3.5 \leq RPD \leq 4.0$) และสมการทำนายค่า DM และ Ash อยู่ในเกณฑ์ควบคุมคุณภาพ ($3.0 \leq RPD \leq 3.4$) (William et al., 2019) และสมการทำนายค่า CP EE NDF และ ADF มีค่า r^2 มากกว่า 0.95 (0.96-0.98) ส่วนสมการทำนายค่า DM Ash และ ADL มีค่า r^2 ต่ำกว่า 0.95 (0.89-0.93)

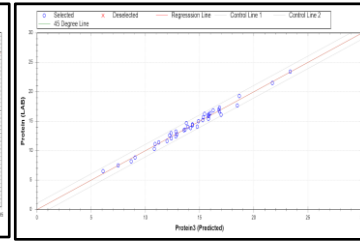
การที่สมการทำนายค่า CP ให้ผลการทำนายที่มีค่า RPD สูง อาจเนื่องมาจากในการวิเคราะห์หาปริมาณ CP เป็นการหาปริมาณไนโตรเจน (N) ที่มีในตัวอย่าง ขณะที่เทคนิค NIRS จะมีความจำเพาะกับพันธะ N-H ที่เป็นพันธะที่พบในสารโปรตีน จึงทำให้ค่าที่ทำนายได้มีความแม่นยำสูง ส่วนค่า NDF ADF และ ADL เป็นค่าของเยื่อใย โดย NDF คือส่วนของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเยื่อใยชนิดเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) ขณะที่ ADF คือ การหาค่าส่วนของผนังเซลล์ที่ประกอบของเซลลูโลส และลิกนิน และ ADL คือส่วนของลิกนิน การที่ค่า r^2 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า NDF ADF และ ADL ในตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ทางเคมีกับค่าที่ได้จากเครื่อง NIRS มีค่าต่ำกว่า 0.9 อาจมีสาเหตุจากการที่เทคนิค NIRS จะใช้ได้ดีกับสารประกอบอินทรีย์ที่มีพันธะ C-H -N-H -O-H -S-H และ C=O ขณะที่ NDF เป็นค่ารวมของเยื่อใย 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่เชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน โดยเฮมิเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลัก คือ glucomannan ที่มี galactose side branch เชื่อมต่อแบบ α -(1-6) กับ manose mainchain ขณะที่ลิกนิน คือ aromatic polymer ของ p-coumaryl alcohol (Shenk et al., 2001) และ coniferyl alcohol ที่เชื่อมต่อกัน 159 ด้วยพันธะ ether (C-O-C) และ -C-C นอกจากนี้ลิกนินยังจับกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นเกิดเป็นสารประกอบที่ซับซ้อน โดยใน

พืชตระกูลหญ้า ลิกนินจะจับกับ pantosans ด้วยพันธะ alkali-labile ซึ่งพันธะ labile คือ ester linkage (C-C-O และ O-C-O) (Jeffries, 1994) การปรับปรุงสมการเทียบมาตรฐานให้มีความถูกต้องแม่นยำเพิ่มขึ้นทำได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีค่าครอบคลุมค่าต่ำสุด-สูงสุดของ NDF

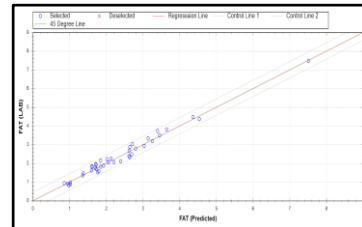
อย่างไรก็ตามสมการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR ในการทดลองครั้งนี้ พบว่ามีค่าที่ไม่ต่างจากรายงานของ Mentink et al. (2006) ที่รายงานว่าเทคนิค NIRS สามารถใช้ทำนายค่าองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานในตัวอย่างอาหาร TMR ได้ดี โดยใช้อาหาร TMR จำนวน 110 ตัวอย่าง ในการสร้างสมการทำนายค่า CP EE Ash และ NDF พบว่ามีปริมาณ CP ในช่วง 12.6-21.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่า r^2 เท่ากับ 0.87 มีปริมาณ EE ในช่วง 1.2-7.9 เปอร์เซ็นต์ มีค่า r^2 เท่ากับ 0.81 มีปริมาณ Ash ในช่วง 6.0-12.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่า r^2 เท่ากับ 0.77 และมีปริมาณ NDF ในช่วง 22.4-50.4 เปอร์เซ็นต์ มีค่า r^2 เท่ากับ 0.90 รายงานของ Ki et al. (2009) ที่ศึกษาในอาหาร TMR สำหรับโคนมในเกาหลี โดยศึกษาจำนวน 253 ตัวอย่าง สแกนด้วยเครื่อง NIRS ยี่ห้อ Foss รุ่น 6500 เพื่อวิเคราะห์ค่า DM CP EE CF Ash ADF และ NDF พบว่ามีปริมาณ DM ในช่วง 6.08-11.12 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.70 ค่า ปริมาณ CP ในช่วง 9.21-19.03 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.96 ค่า ปริมาณ EE ในช่วง 0.31-6.19 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.80 ค่า ปริมาณ CF ในช่วง 10.33-29.63 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.89 ค่า ปริมาณ Ash ในช่วง 5.00-10.89 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.90 ค่า ปริมาณ ADF ในช่วง 15.69-32.48 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.93 และปริมาณ NDF ในช่วง 28.19-54.02 เปอร์เซ็นต์ r^2 เท่ากับ 0.89 และค่า SEP ของค่า DM CP EE CF Ash ADF และ NDF เท่ากับ 0.37 0.29 0.32 0.38 0.96 0.86 และ 1.45 ตามลำดับ ผู้วิจัยได้รายงานว่าความแม่นยำในการทำนายค่าจะแม่นยำมากขึ้นถ้าจำนวนตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น และ รายงานของ Pereira-Crespo et al. (2022) ศึกษาในตัวอย่างอาหาร TMR 121 ตัวอย่าง เพื่อทำนายค่า CP NDF ADF CF และ EE ได้ค่า r^2 เท่ากับ 0.99 0.99 0.98 0.99 และ 0.99 และค่า RPD เท่ากับ 6.2 6.2 4.6 5.0 และ 6.6 ตามลำดับ ซึ่งจากค่า RPD ที่รายงานค่าที่ทำนายได้จากสมการที่สร้างได้มีความน่าเชื่อถือสูง สามารถใช้งานได้ในทุกกรณี



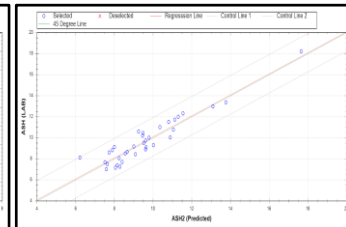
ก. DM



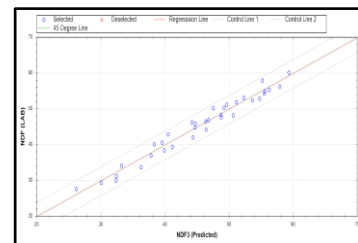
ข. CP



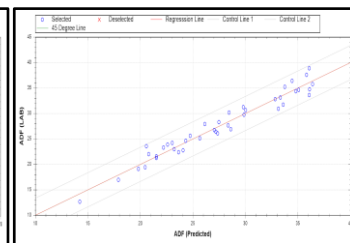
ค. EE



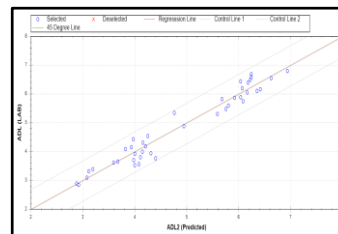
ง. Ash



จ. NDF



ฉ. ADF



ช. ADL

ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมี (แกน X) และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการ (แกน Y)

จากภาพที่ 2 (ก-ช) พบว่า ข้อมูลส่วนใหญ่กระจายอยู่รอบเส้นทแยงมุม แสดงให้เห็นว่า ค่าที่ทำนายได้จากสมการเทียบมาตรฐานมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้จริง

ประเมินศักยภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยมาตรฐาน ISO 12099 :2017

นำสมการเทียบมาตรฐานที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด มาประเมินศักยภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้านมาตรฐาน ISO 12099:2017 (ISO, 2017) ซึ่งเป็นมาตรฐานที่ใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการหาค่าองค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่าง โดยทำการประเมินค่าทางสถิติ คือ ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (Bias) ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) และค่าความชัน (Slope) ดังแสดงใน ตารางที่ 5 พบว่าทุกองค์ประกอบทางเคมีของ อาหาร TMR มีค่า Bias หรือค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ของทุกตัวอย่าง มีค่าน้อยกว่าค่า T_b ซึ่งแสดงว่าค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยในการทำนายไม่มีความสำคัญ กล่าวคือ ค่าจากการวิเคราะห์ทางเคมีและค่าที่ได้จากการทำนายไม่แตกต่างกัน มีค่า SEP หรือค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนาย มีค่าน้อยกว่าค่า T_{UE} กล่าวคือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายมีค่าต่ำเพียงพอที่จะยอมรับได้ และจากการตรวจสอบค่า slope หรือความสัมพันธ์ของค่าจากการวิเคราะห์ทางเคมีกับค่าที่ได้จากการทำนาย ซึ่งจะใช้ค่า t_{obs} ในการตรวจสอบ slope พบว่าค่า t_{obs} มีค่าน้อยกว่าค่า $t_{(1-\alpha/2)}$ กล่าวคือ slope มีค่าไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 5 ค่าสถิติวัดประสิทธิภาพสมการตาม ISO 12099 : 2010 ของ อาหาร TMR

Parameter	Bias			SEP			Slope		
	Calculated value	Criterion (T_b)	Result	Calculated value	Criterion (T_{UE})	Result	Observed value (t_{obs})	Criterion ($t_{(1-\alpha/2)}$)	Result
DM, %	0.04	0.16	Pass	0.42	0.78	Pass	0.00	2.02	Pass
CP, %	0.02	0.13	Pass	0.15	0.83	Pass	0.00	2.02	Pass
EE, %	0.03	0.06	Pass	0.18	0.20	Pass	0.00	2.02	Pass
Ash, %	0.11	0.25	Pass	0.73	0.85	Pass	0.00	2.03	Pass
NDF, %	0.09	0.47	Pass	1.48	1.94	Pass	0.00	2.02	Pass
ADF, %	0.18	0.04	Pass	1.24	1.50	Pass	0.00	2.02	Pass
ADL, %	0.04	0.13	Pass	0.39	0.42	Pass	0.00	2.02	Pass

T_b , The calculation of the bias confidence limits; SEP, standard error of prediction

T_{UE} , The unexplained error confidence limits; t_{obs} , The observed t value; $t_{(1-\alpha/2)}$, The t value

สรุปผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร TMR โดยใช้เทคนิค NIRS โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 1,100-2,500 นาโนเมตร สรุปได้ดังนี้

1. สมการที่อยู่ในชั้นคุณภาพยอดเยี่ยม คือ CP EE NDF และ ADF
2. สมการที่อยู่ในชั้นคุณภาพดีมาก คือ ADL
3. สมการที่อยู่ในชั้นคุณภาพดี คือ DM และ Ash
4. เมื่อประเมินศักยภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยมาตรฐาน ISO 12099:2017 พบว่า ค่า Bias SEP และ Slope ผ่านมาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ และคุณจันทกานต์ อรณนันทน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์อาหารสัตว์ สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ ที่จัดสรรงบประมาณจากโครงการการศึกษาข้อมูลคุณภาพการหมักและคุณค่าทางโภชนาการของข้าวโพดพร้อมฝักหมัก สำหรับเป็นอาหารสัตว์เพื่อใช้ในการกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ทุกแห่ง และสหกรณ์โคนมนครปฐม สหกรณ์โคนมไทย-เดนมาร์ก สวนมะเดื่อ จ. ลพบุรี สหกรณ์โคนมมวกเหล็ก จ.สระบุรี องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย จ.สระบุรี และสหกรณ์โคนมปากช่อง จ.นครราชสีมา ที่เอื้อเฟื้อในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยและพัฒนาการวิเคราะห์อาหารสัตว์ทุกท่านในการวิเคราะห์ตัวอย่าง และสร้างสมการ ขอขอบคุณคณะกรรมการวิชาการสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ที่ช่วยตรวจสอบและพิจารณารายงาน ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2560. TMR ยุคใหม่โคนมไทย. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,ขอนแก่น.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. 2548. หลักการพื้นฐานของเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี Theory and principle of near infrared spectroscopy. น.8-20. ใน วารุณี ธนะแพทย์ ศุมาพร เกษมสำราญ รณฤทธิ์ ฤทธิรณ ธีรภรณ์ สุทธิวิจิตรภักดี และนิลเนตร ลีลุตเดช. คณะผู้รวบรวมจัดทำเอกสาร การตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค NIR Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก. หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีการตรวจสอบสินค้าโดยไม่ทำลาย. สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.
- อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. 2548. การปรับแต่ง NIR Spectra ก่อนการวิเคราะห์. น. 62-81. ใน วารุณี ธนะแพทย์ ศุมาพร เกษมสำราญ รณฤทธิ์ ฤทธิรณ ธีรภรณ์ สุทธิวิจิตรภักดี และนิลเนตร ลีลุตเดช. คณะผู้เรียบเรียงจัดทำเอกสาร. การตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค NIR Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก.หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีการตรวจสอบสินค้าโดยไม่ทำลาย. สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ

- AOAC. 2016. Official Method of Analysis of AOAC International. 20th Ed: AOAC International Rockville., Maryland.
- Guo, T., L. Dai, B. Yan, G. Lan, F. Li, F. Li, F. Pan, and F. Wang. 2021. Measurements of chemical compositions in corn stover and wheat straw by near-infrared reflectance Spectroscopy. Available source: <https://doi.org/10.3390/ani11113328>., January 21, 2022.
- Infrasoft International. 2005. WinISI III manual-version 1.60. Foss Tecator AB, Hoganas.
- ISO. 2015. International standard (ISO11085:2015(E)). Cerals, cereals-based products and animal feeding stuff-Determination of crude fat and total fat content by the Randall extraction method. International Organization for Standardization. All rights reserved, Geneva.
- ISO. 2017. International standard (ISO12099:2017(E)) 2nd Edit. Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal product-Guidelines for the application of near infrared spectrometry. International Organization for Standardization. All rights reserved, Geneva.
- Jeffries, T.W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicellulose. Available Source: <http://www.128.104.77.882/documents/pdf1994/jeffr94b.pdf>, March 18, 2022.
- Kasemsumran, S., Y.P. Du, K. Maruo, and Y. Ozaki. 2004. Selective removal of interference singles for near-infrared spectra of biomedical by using region orthogonal signal correlation. *Analytical Chemical Acta*. 82:97-103.
- Ki, K.S., S.B. Kim, H.J. Lee, and S.H. Yang. 2009. Prediction on the quality of total mixed ration for dairy cows by near infrared reflectance spectroscopy. *Kor. Grassl. Forage Sci*. 29 (3): 253-262.
- Mentink. R.L., P.C.Hoffman and L.M.Baumant. 2006. Utility of near-infrared reflectance spectroscopy to predict nutrient composition and In vitro digestibility of total mixed rations. *J. Dairy Sci*. 89: 2320-2326.
- Nie, Z., G.F. Tremblay, G. Belanger, R. Berthiaume, Y Castonguay, A. Bertrand, R. Michaud, G. Allard, and J. Han. 2009. Near-infrared reflectance spectroscopy prediction of neutral detergent-soluble carbohydrates in timothy and alfalfa. *J. Dairy Sci*. 92:1702-1711.
- Pereira-Crespo, S., A. Botana, M. Veiga, L. Gonzalez, C Resch, V. Garcia-Souto, M. P. Martinez-Diz, R. Lorenzana, and G. Flores-Calvete. 2022. Prediction of quality of total mixed ration for dairy cows by near Infrared spectroscopy and empirical equations. *J. Applied Animal Research*, 50:1, 69-79.
- SA. 2017. Sithiporn Associates Company. WIN ISI 4, Training Manual.
- Shenk, J. S., J. J. Workman, and M. O. Westerhaus. 2001. Application of nir spectroscopy to agriculture products. pp. 419 – 474. In: D. A. Burns, and E. W. Ciurczak, (eds.), *Handbook of near-infrared spectroscopy*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York
- Shenk, J. S. and M.O. Westerhaus. 1991. Population definition, sample selection and calibration. *Procedures for near Infrared reflectance spectroscopy*. *Crop Science*, (31): 469-474.

- Taylor, J. R. 1997. An introduction to error analysis. 2nd Ed. University Science Books. Sausalito, California.
- Westerhaus, M. 2014. Eastern analytical symposium award for outstanding achievements in near infrared spectroscopy: my contributions to near infrared spectroscopy. FOSS. Available source: http://www.fossanalytics.com//media/files/documents/paper/software/winisi/2014_nirnews_eas_markwesterhaus.pdf, April 12, 2022.
- William, P., J. Antoniszyn and M. Manley. 2019. Near infrared technology getting the best out of light. 1st edition. Afican Sun Media under the Sun Press imprint. Stellenbosch, Western Cape.