

การสร้างสมการทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมัก โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

ปฐิมา บุตรชา^{1/} อาทิตยา สุขสะเกษ^{2/} เยาวลักษณ์ แหม่งป้ง^{1/}
ศุภกิจ สุนาโท^{1/} ราไพร นามสีลี^{1/}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างสมการทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมักโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (NIRS) ใช้ตัวอย่างหญ้าเนเปียร์หมักจำนวน 234 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาโดยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 1,100-2,500 นาโนเมตร ของตัวอย่างทั้งแบบแห้งและแบบสด จากนั้นนำมาสร้างสมการเทียบมาตรฐานโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับคุณค่าทางโภชนาต่างๆ โดยใช้โปรแกรม WinISI IV และวิเคราะห์เชิงสถิติแบบ PLS (Partial least square regression) และ MPLS (Modified partial least squares regression) ที่มีการปรับแต่งสเปกตรัมแบบใช้และไม่ใช้ SNV (Standard normal variate) และ Detrend ร่วมกับ Derivative, Gap, Smoothing, Second Smoothing และ Math treatment 10 รูปแบบจากการศึกษาพบว่า สมการทำนายที่สร้างจากการสแกนเก็บสเปกตรัมของตัวอย่างแบบแห้งมีค่า r^2 สูงกว่าแบบสด โดยแบบแห้งมีค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD อยู่ในช่วง 0.97-0.87 และแบบสดมีค่าอยู่ในช่วง 0.93-0.84 เมื่อพิจารณาความใช้ได้ของสมการจากค่า RPD พบว่า สมการทำนายจากการสแกนแบบสดจะให้ค่าความแม่นยำต่ำกว่า โดยมีเพียงค่าโปรตีน ไขมัน และ NDF เท่านั้นที่สามารถนำมาใช้งานได้ ในขณะที่สมการเทียบมาตรฐานจากการสแกนแบบแห้งสามารถนำไปใช้งานได้ทุกองค์ประกอบ มีเพียงค่า NDFD เท่านั้นที่ต้องมีการพัฒนาสมการต่อไป และจากการประเมินศักยภาพของสมการโดยใช้มาตรฐาน ISO 12099: 2017 พบว่า สมการเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำเพียงพอสำหรับใช้ในการทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมัก

คำสำคัญ: เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี คุณค่าทางโภชนา หญ้าเนเปียร์หมัก

เลขทะเบียนวิจัย: 61(1)-0214-005

^{1/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง อ.เมือง จ.ขอนแก่น

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์มहाสารคาม อ.เขียงยืน จ.มหาสารคาม

Prediction nutritive value of napier grass silage using near infrared spectroscopy

Patima Butcha^{1/} Atitiya Suksaket^{2/} Yaowalak Mangpung^{1/}
Supakit Sunato^{1/} Ramphrai Narmseelee^{1/}

Abstract

The purpose of this study was to create equations for Near Infrared Spectroscopy (NIRS) to predict nutritive values of napier grass silage. A total of 234 samples were analyzed for their nutritive values by standard laboratory process and scanned by NIRS in the wavelength 1,100-2,500 nm. for dried and fresh samples. Then, determine the relationship between the absorbance of napier grass silage and the nutritive values by using WINISI IV program and statistical analysis of PLS (Partial least square regression) and MPLS (Modified partial least squares regression) with SNV (Standard normal variate) and non-SNV (Standard normal variate) spectra modulated and detrend with Derivative, Gap, Smoothing, Second smoothing and Math treatment in 10 patterns. The result revealed that the calibration equations generated from dried samples had higher r^2 values compared to fresh samples. Dried samples showed r^2 values for DM CP EE Ash NDF ADF ADL IVDMD and NDFD in the range of 0.97-0.87 while fresh samples had values in the range of 0.93-0.84. When considering the validity of the RPD value, it was found that prediction equations from fresh scans illustrated lower accuracy, only CP EE and NDF values would be functional. For dried scans, it can be applied to all nutritive values, only NDFD requiring further equation development. When evaluating potential by the standards ISO12099 : 2017, the result showed that the prediction equations were accurate and precise for predicting the nutritive values of napier grass silage sufficiently.

Keywords : Near infrared spectroscopy, Nutritive value, Napier grass silage

Registered No. : 61(1)-0214-005

^{1/}Ruminants Feeding Standard Research and Development Center, Muang, Khonkaen.

^{2/}Maharakham Animal Nutrition Research and Development Center, Chiangyuen, Maharakham.

คำนำ

การทำพืชอาหารสัตว์หมัก (Silage) เป็นวิธีการถนอมพืชอาหารสัตว์วิธีหนึ่ง ซึ่งหากหมักได้ดีและมีการเก็บรักษาที่ถูกต้องจะทำให้ได้พืชหมักที่ยังรักษาคุณภาพของอาหารไว้ได้ถึง 85% ของพืชสด (วาสนา, 2008) พันธุ์หญ้าที่เกษตรกรนิยมนำมาหมัก คือหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) พันธุ์ต่างๆ เช่น หญ้าเนเปียร์ปากช่อง1 หญ้าเนเปียร์ยักษ์ หญ้าเนเปียร์สุราษฎร์1 เป็นต้น เนื่องจากเป็นหญ้าที่มีคุณภาพให้ผลผลิตต่อไร่สูงมีความน่ากินและมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ในน้ำ (Water soluble carbohydrate; WSC) สูงสามารถนำมาทำหญ้าหมักโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารเสริมใดๆ (ไกรลาศ, 2554) โดยหญ้าเนเปียร์ปลูกมากในหลายจังหวัดที่อยู่ในเขตพื้นที่การเลี้ยงโคนมและโคเนื้อ เช่น จังหวัดนครราชสีมา สุพรรณบุรี สระบุรี ราชบุรี ขอนแก่น ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และพัทลุง เป็นต้น ที่ผ่านมากเกษตรกรจะทำหญ้าหมักไว้ใช้ในยามขาดแคลนอาหารหยาบ แต่ปัจจุบันการจัดการให้อาหารสัตว์ ได้พัฒนารูปแบบการจัดการให้อาหารที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้สัตว์ได้รับโปรตีนและพลังงานที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิต โดยมีการคำนวณสัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น แล้วให้ในรูปของอาหารผสมเสร็จ (Total mixed ratio; TMR) ในส่วนของอาหารหยาบเกษตรกรจะใช้หญ้าเนเปียร์หมักเป็นส่วนผสมใน TMR เนื่องจากหญ้าหมักจะสามารถผสมเข้ากับอาหารข้นได้ง่าย อีกทั้งช่วยลดความเป็นฝุ่นและทำให้อาหารมีความน่ากินกว่าการใช้พืชแห้ง (สันติ, 2546) ในการประกอบสูตรอาหาร TMR จำเป็นต้องทราบคุณค่าทางโภชนาของวัตถุดิบต่างๆที่นำมาผสมทั้งในส่วนของอาหารหยาบและอาหารข้น และถ้าทราบผลได้รวดเร็วขึ้นจะทำให้สามารถคำนวณสูตรอาหารได้รวดเร็วขึ้น

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา เช่น ปริมาณวัตถุแห้ง (Dry matter ; DM) โปรตีน (Crude Protein ; CP) ไขมัน (Ether extract ; EE) เถ้า (Ash) ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber ; NDF) ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber ; ADF) ลิกนิน (Acid detergent lignin; ADL) ค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (*In vitro* dry matter digestibility ; IVTDMD) และค่าการย่อยได้ของผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber digestibility ; NDFD) เป็นต้น ของวัตถุดิบที่นำมาผสมเป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ทั้งที่เป็นอาหารหยาบและอาหารขมนั้น โดยทั่วไปจะดำเนินการในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีมาตรฐานที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงแต่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง อีกทั้งยังมีการใช้สารเคมีซึ่งส่งผลต่อสภาพแวดล้อมและตัวผู้วิเคราะห์อีกด้วย ขณะที่การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS นั้น เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถประเมินคุณค่าโภชนาในอาหารสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำ ไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่ใช้สารเคมี ไม่ทำลายสภาพแวดล้อม และลดค่าใช้จ่ายได้ในระยะยาวแต่เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS ต้องใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ (Chemometrics) เพื่อสังเคราะห์ข้อมูลรวมทั้งหาความสัมพันธ์ของสเปกตรัมกับคุณค่าทางโภชนาของตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการแล้วสร้างเป็นสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration equation) ซึ่งสมการที่ได้นี้จะต้องผ่านขั้นตอนการทวนสอบความถูกต้องของสมการ (Validation) เพื่อทดสอบความน่าเชื่อถือของสมการว่ามีความเหมาะสมหรือแม่นยำหรือไม่จึงจะนำไปใช้ทำนายค่าทางเคมีของตัวอย่างในอนาคตได้ การรวบรวมตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่ดีและครอบคลุมค่าตัวอย่างในอนาคตจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสร้างสมการ เพื่อให้ได้สมการที่

สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ ซึ่งตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสร้างสมการต้องมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่ดี มีความหลากหลายในด้านพื้นที่การผลิต ฤดูกาล อายุพืช มีค่าทางเคมีที่กระจายครอบคลุมค่าของตัวอย่างในอนาคต (จันทกานต์ และคณะ, 2553)

ดังนั้นการสร้างสมการสำหรับเครื่อง NIRS เพื่อทำนายคุณค่าทางโภชนาของตัวอย่างหญ้าเนเปียร์หมักในการศึกษาครั้งนี้ จะทำให้ทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมักได้รวดเร็วขึ้น และได้สมการที่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างแม่นยำทำให้เกษตรกรได้ข้อมูลรวดเร็ว สามารถนำไปคำนวณสูตรอาหารให้มีโภชนาเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์ได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองและสร้างสมการทำนายค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD ของหญ้าเนเปียร์หมัก โดยใช้เทคนิค NIRS ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างหญ้าเนเปียร์หมัก จำนวน 234 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหญ้าเนเปียร์พันธุ์ปากช่อง1 หมัก จากฟาร์มของกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น นครราชสีมา สกลนคร อุตรธานี เลย และนครพนม จำนวน 84 ตัวอย่าง จากการปลูกหญ้าเนเปียร์เพื่อทำการหมักที่ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยใช้หญ้าเนเปียร์ 3 พันธุ์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก คือ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง1 หญ้าเนเปียร์ยักษ์ และหญ้าเนเปียร์สุราษฎร์1 ที่อายุการตัดทุก 60 และ 90 วัน เป็นเวลา 1 ปี เพื่อให้เกิดความแตกต่างในเรื่องของอายุและฤดูกาล โดยหั่นหญ้าให้มีขนาดชิ้นประมาณ 1 นิ้ว อัดให้แน่นในถุงพลาสติกประมาณ 2 กิโลกรัม จำนวนซ้าละ 2 ถุง ใช้เวลาในการหมัก 21 วัน เมื่อครบตามกำหนดถุงที่หนึ่งนำไปแช่เย็นเพื่อรอนำไปเก็บสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRS และถุงที่สองนำมาอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักก่อนอบและหลังอบ จากนั้นนำมาบดให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร สำหรับการวิเคราะห์ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF และ ADL และใช้สแกนเก็บสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRS และบดขนาด 2 มิลลิเมตร สำหรับวิเคราะห์ค่าการย่อยได้ต่อไป

การวัดสเปกตรัมและวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา

1. วัดสเปกตรัมจากตัวอย่าง 2 แบบ คือ แบบแห้งและแบบสดโดยใช้เครื่อง NIRS ยี่ห้อ FOSS รุ่น 5000M (Foss Analytical A/S,Denmark) และโปรแกรม ISScan (Version 1.25) ความยาวคลื่นที่ใช้อยู่ในช่วง 1100-2498 นาโนเมตร และกำหนดให้สเปกตรัมแต่ละจุดห่างกัน 2 นาโนเมตรจะได้ค่าการดูดกลืนแสงจำนวน 700 ค่า โดยเก็บสเปกตรัมจากตัวอย่างแบบแห้งซึ่งเป็นตัวอย่างที่อบแล้วจากนั้นบดให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร ใส่ในเซลล์ใส่ตัวอย่างชนิด Quarter cup ขนาด 6X10 มิลลิเมตร และจากตัวอย่างแบบสดที่แช่เย็นไว้ นำมาวางให้อยู่ในอุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ตัวอย่างสดของหญ้าเนเปียร์หมักในเซลล์ใส่ตัวอย่างชนิด Natural product sample cell ทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 56X250 มิลลิเมตร โดยใส่ตัวอย่างให้กระจายสม่ำเสมอและอัดให้

แน่นสแกนในลักษณะขึ้นลง 8 ครั้งต่อการวัด 1 ครั้งทำการวัด 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง (Duplicates) การวัดแต่ละครั้งจะแสดงรายการคุณค่าทางโภชนาการ จำนวน 9 รายการ ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD นำค่าแต่ละรายการที่ได้จากการวัดมาเฉลี่ยเพื่อแสดงผลออกมาเป็นเส้นสเปกตรัม 1 เส้นต่อรอบ ซึ่งค่าที่ได้เรียกว่า ค่าการดูดกลืน (Absorbance)

2. นำตัวอย่างแบบแห้งขนาด 1 มิลลิเมตร มาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการต่างๆ โดยวิธีทางเคมี (Wet Chemical Analysis) ได้แก่ ค่าความชื้น ตามวิธีที่ 930.15 (AOAC, 2016) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง โปรตีนโดยหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl แล้วคูณด้วยแฟกเตอร์ 6.25 ตามวิธีที่ 2011.11 (AOAC, 2016) ไขมันตามวิธี ISO11085:2015 (ISO, 2015) เถ้าตามวิธี ISO5982:2002 (ISO, 2002) NDF ตามวิธีที่ 2002.04 (AOAC, 2016) ADF และ ADL ตามวิธีที่ 973.18 (AOAC, 2016) และตัวอย่างแบบแห้งขนาด 2 มิลลิเมตร วิเคราะห์ IVDMD โดยวิธีการใช้ถุงไนลอน (Nylon bag technique) ตามวิธีการของ Ørskov and McDonald (1979) และ NDFD ด้วยวิธี Osborne (2006) ค่าที่ได้เรียกว่าค่าจริง (Actual value)

3. ทำการวิเคราะห์หาค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการหรือ SEL (Standard error of laboratory) ด้วยวิธี Duplicate blind test เพื่อจะนำค่าไปประเมินสมการเทียบมาตรฐานที่สร้างได้ โดยสองเท่าของค่า SEL ต้องมากกว่าค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) (SA, 2017) ทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่งออกเป็นตัวอย่างย่อยที่ 1 และตัวอย่างย่อยที่ 2 กำหนดหมายเลขตัวอย่างไม่ให้ซ้ำกัน แล้วส่งวิเคราะห์เป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างย่อยที่ 1 ของตัวอย่างที่ 1 ถึง 10 และชุดที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างย่อยที่ 2 ของตัวอย่างที่ 1 ถึง 10 แต่ละชุดวิเคราะห์ตัวอย่างละ 1 ซ้ำ จากนั้นนำผลวิเคราะห์ของแต่ละคุณค่าทางโภชนาการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง และคำนวณหาค่า SEL โดยใช้สมการ

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

D = ผลต่างผลวิเคราะห์ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ของแต่ละตัวอย่าง

n = จำนวนตัวอย่าง (10)

การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบความใช้ได้ของสมการ

1. การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

นำข้อมูลสเปกตรัมและคุณค่าทางโภชนาการ มาหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม WIN ISI IV แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน คือกลุ่มที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration set) ทำนายค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD และกลุ่มทวนสอบความใช้ได้ของสมการ (Validation set) ในสัดส่วนกลุ่มสมการเทียบมาตรฐานต่อกลุ่มทวนสอบความใช้ได้ของสมการ เท่ากับ 80 ต่อ 20 เปอร์เซ็นต์ การสร้างสมการเป็นการสร้างแบบเต็มช่วงความยาวคลื่น (Full Spectrum Method) ด้วยวิธี Partial Least Squares (PLS) และ Modified Partial Least Squares (MPLS) ร่วมกับการไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม และปรับแต่งสเปกตรัมแบบ SNV-Detrend เพื่อลด

ความแปรปรวนและสิ่งรบกวนอื่นๆที่อาจทำให้ข้อมูลสเปกตรัมมีการเปลี่ยนแปลงไป และใช้ Derivative mathematics หรือ Math treatment ที่ใช้ค่า Derivative number, Gap, Smoothing and 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) (2,10,10,1) โดยใช้ตามคำแนะนำในคู่มือการใช้เครื่อง NIRS (Infrasoft International, 2005) จะได้สมการเทียบมาตรฐานของแต่ละรายการจำนวน 40 สมการ

หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงกับค่าทำนาย (Coefficient of determination, r^2) ซึ่งควรมีค่าเข้าใกล้ 1 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการสร้างสมการ (Standard error of calibration, SEC) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการพิสูจน์แบบไขว้ (Standard error of cross validation, SECV) ซึ่งควรมีค่าต่ำ (Infrasoft International, 2005)

ในการพิจารณาการเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่ดีที่สุด จะพิจารณาจากค่า r^2 ที่มีค่าสูง และค่าผลต่างของ SEC และ SECV ที่มีค่าต่ำจากสมการเทียบมาตรฐาน 40 สมการ จะเลือกสมการที่ดีที่สุดมา 3 สมการ เพื่อนำมาทวนสอบความใช้ได้ของสมการต่อไป

2. การทวนสอบความใช้ได้ของสมการ

นำสมการที่คัดเลือกจำนวน 3 สมการ มาทวนสอบความใช้ได้ของสมการเพื่อวัดประสิทธิภาพของสมการว่าสามารถใช้ในการประเมินค่าได้แม่นยำมากน้อยเพียงใด โดยนำสเปกตรัมของตัวอย่างกลุ่มทวนสอบมาประเมินความถูกต้องแม่นยำโดยใช้ค่าสถิติต่างๆ ได้แก่ ค่า SEP ควรมีค่าน้อยกว่าสองเท่าของ SEL ($SEP < 2 SEL$) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยระหว่างค่าที่ได้จากวิธีทางเคมีและค่าที่ได้จากวิธี NIRS (Bias) ควรมีค่าน้อยกว่า 0.55 เท่าของ SEC ($Bias < 0.55 SEC$) ค่า Standard Error of Prediction correction ($SEP(C)$) น้อยกว่า 1.29 เท่าของ SEC ($SEP(C) < 1.29 SEC$) ค่าความชันใกล้ 1 ($Slope \sim 1$) ตามวิธีการของ SA (2017) นอกจากนี้ ได้พิจารณาระดับชั้นคุณภาพของสมการด้วยค่า RPD (Ratio of Performance to Deviation) ตามวิธีการของ Williams et al. (2019) ดังแสดงใน Table 1 โดยเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่ดีที่สุดเพียง 1 สมการ สำหรับนำไปใช้ในการทำนายคุณค่าทางโภชนาด้วยเครื่อง NIRS ต่อไป

Table 1 Criteria of prediction efficiency : Williams et al. (2019)

RPD Value	Classification	Application
0.0 - 1.9	Very poor	Not recommended
2.0 - 2.4	Poor	Rough screening
2.5 - 2.9	Fair	Screening
3.0 - 3.4	Good	Quality control
3.5 - 4.0	Very good	Process control
> 4.1	Excellent	Any application

RPD = Ratio of performance to deviation

3. สมการเทียบมาตรฐานที่คัดเลือกมา 1 สมการ (ข้อที่ 2) นำมาประเมินประสิทธิภาพตามมาตรฐาน ISO 12099:2017 (ISO, 2017) ดังนี้

3.1 การตรวจสอบค่า Bias โดยการคำนวณค่า Bias confidence limit (T_b) ตามสมการถ้าค่า Bias มีค่าน้อยกว่า T_b แสดงว่า ค่า Bias ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ซึ่งค่า T_b คำนวณได้ ดังนี้

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

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

3.2 การตรวจสอบค่า SEP เป็นการคำนวณค่า T_{UE} (The unexplained error confidence limit) หากค่า SEP น้อยกว่า T_{UE} แสดงว่า ค่า SEP ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ซึ่งค่า T_{UE} 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) โดยทั่วไปคือ 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)

3.3 การตรวจสอบ Slope เป็นความชันของกราฟการกระจาย (Scatter plots) ระหว่างคุณค่าทางโภชนาที่วิเคราะห์ได้จริงเป็นค่าอ้างอิง (แกน y) กับค่าที่ทำนายที่ได้จากสมการเทียบมาตรฐาน ด้วยเครื่อง NIRS (แกน x) ซึ่งจะสอดคล้องกับสมการเส้นตรงโดยมีค่า Slope b และ Intercept a คำนวณได้ตามสมการ

$$y = a + by$$

$$b = \frac{S_{\bar{y}y}}{S_{\bar{y}}^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{\bar{y}}$$

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

$S_{\bar{y}}^2$ คือ ความแปรปรวนของค่าทำนายในกลุ่มทดสอบ

$\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าที่ทำนายจากสมการเทียบมาตรฐาน

$\bar{\bar{y}}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าอ้างอิงที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

จากนั้นทดสอบค่า Slope ที่คำนวณได้โดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ดังสมการ

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

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

S_{res} คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของResidual

t_{obs} คือ The observed value

n คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่มทดสอบ

y_i คือ ค่าอ้างอิงที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

$\bar{y}_i$ คือ ค่าที่ทำนายได้จากสมการเทียบมาตรฐาน

หากค่า t_{obs} น้อยกว่า $t_{(1-\alpha/2)}$ แสดงว่าความชันของกราฟการกระจายระหว่างค่าทางเคมีกับค่าที่ทำนายได้จากสมการเทียบมาตรฐานไม่แตกต่างจาก 1 แสดงว่า ค่า Slope ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

คุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมัก

ตัวอย่างหญ้าเนเปียร์หมักได้จากการรวบรวมจากเกษตรกรและตัวแทนจำหน่ายหลายพื้นที่ในประเทศไทยและตัวอย่างจากการปลูกหญ้าภายในระยะเวลา 1 ปี ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ปากช่อง1 ยักษ์ และสุราษฎร์ 1 โดยตัดที่อายุ 60 และ 90 วัน และทำการหมักเป็นเวลา 21 วัน โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกสุ่มเก็บทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง เพื่อให้ครอบคลุมและมีความหลากหลายของตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนา ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD พบว่ามีค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย ค่า SD และ ค่า SEL ดังแสดงใน Table 2 จะเห็นว่าช่วงข้อมูลของแต่ละองค์ประกอบครอบคลุมค่าวิเคราะห์ของหญ้าเนเปียร์หมักที่

รายงานในตารางคุณค่าทางโภชนาของวัตถุดิบอาหารโคนม (คณะกรรมการความต้องการโภชนาโคนมในประเทศไทย, 2563) ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD เท่ากับ 21.31 7.08 1.85 10.07 70.21 46.64 7.02 48.37 และ 43.91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและใกล้เคียงกับงานวิจัยของพิมพร และคณะ (2562) ได้ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมัก พบว่ามีค่าวัตถุแห้ง โปรตีน NDF ADF และ ADL เท่ากับ 92.21 5.91 84.90 35.15 และ 9.82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทดสอบเพื่อหาค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (Standard error of laboratory; SEL) จะเห็นว่าค่า SEL มีค่าต่ำ แสดงว่าค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยโดยเมื่อนำค่า SEL ไปประเมินความใช้ได้ของสมการในขั้นตอนการทวนสอบสมการพบว่า ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนาย (SEP) มีค่าน้อยกว่าสองเท่าของ SEL (SA, 2017)

Table 2 Total sample, nutritive value and standard error of napier grass silage.

Parameter	N	Minimum	Maximum	Average	±SD	SEL
DM, %	212	87.36	95.38	92.33	1.65	0.23
CP, %	210	2.73	11.05	6.23	1.50	0.05
Fat, %	210	0.84	3.16	1.96	0.37	0.03
Ash, %	211	3.75	18.56	9.83	2.87	0.24
NDF, %	210	63.36	85.06	75.09	4.42	0.77
ADF, %	211	38.44	64.32	52.18	4.71	0.90
ADL, %	175	2.35	13.80	8.27	1.80	0.88
IVDMD, %	225	31.36	73.94	52.26	7.75	0.24
NDFD, %	212	18.04	47.85	32.85	5.55	0.40

N, Number of samples; SD, Standard deviation; SEL, Standard error of laboratory; DM, Dry matter; CP, Crude protein; EE, Ether extract; NDF, Neutral detergent fiber; ADF, Acid detergent fiber; ADL, Acid detergent lignin; IVDMD, In vitro dry matter digestibility ; NDFD, Neutral detergent fiber digestibility.

การสร้างและทวนสอบความใช้ได้ของสมการเทียบมาตรฐาน

ทำการเก็บสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 1,100 - 2,498 นาโนเมตร โดยใช้วิธีการวัดแบบสะท้อนกลับ (Reflectance) จากนั้นทำการแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อใช้เป็นตัวอย่างกลุ่มสำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐาน และกลุ่มที่ใช้ทวนสอบความใช้ได้ของสมการ โดยใช้สัดส่วนการเลือกตัวอย่างแบบเว้นช่วงตามที่กำหนดคือ กำหนดตำแหน่งเริ่มต้นและจำนวนตัวอย่างที่ต้องการเว้นช่วงเพื่อแบ่งกลุ่ม โดยเลือกตัวอย่างแบบเว้นช่วง 2,4 สำหรับสร้างสมการทั้งจากตัวอย่างแบบแห้งและแบบสด จากนั้นนำตัวอย่างในกลุ่มสำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐานจะถูกนำมาจัดกลุ่มโดยใช้หลักการ Principal component analysis (PCA) ที่ใช้หลักการคำนวณค่ามหาโนบิส (Mahalanobis distance) เพื่อตัดตัวอย่างที่มีค่าอยู่นอกกลุ่มออก ซึ่งค่าที่ผิดปกตินี้อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การสแกนที่ผิดพลาดหรือความ

ผิดปกติของสเปกโตรมิเตอร์ เช่น มีความชื้นสูง หรืออุณหภูมิสูง (ปานมันส์, 2564) ทำให้เหลือจำนวนตัวอย่างเพื่อใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐานและกลุ่มที่ใช้ทวนสอบความใช้ได้ของสมการ ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย และค่า SD ดังแสดงใน Table 3 จะเห็นว่าช่วงข้อมูลของแต่ละค่าในกลุ่มสำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐานครอบคลุมค่าของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบความใช้ได้ของสมการ โดยตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกัน

Table 3 Number of sample and nutritive value of calibration and validation sets of napier grass silage.

Parameter	Calibration set					Validation set				
	N	Min.	Max.	Mean	SD	N	Min.	Max.	Mean	SD
Dried napier grass silage										
DM, %	155	87.36	95.38	92.46	1.65	32	87.39	95.18	92.67	1.71
CP, %	150	3.32	11.05	6.27	1.50	39	3.65	10.06	6.18	1.56
Fat, %	157	1.10	2.89	1.94	0.37	33	1.39	2.83	1.90	0.38
Ash, %	152	5.23	18.56	10.20	2.87	36	6.47	17.74	10.32	3.01
NDF, %	149	63.36	83.23	74.87	4.42	36	64.77	82.71	74.96	4.80
ADF, %	154	38.44	64.32	51.72	4.71	29	47.12	58.66	52.12	2.93
ADL, %	132	3.13	12.58	8.18	1.80	30	5.39	12.16	8.50	1.74
IVDMD, %	167	36.09	70.37	52.08	7.75	40	38.13	66.65	51.48	7.61
NDFD, %	156	19.02	43.62	32.80	5.54	40	22.37	43.32	32.08	5.11
Fresh napier grass silage										
DM, %	139	88.35	96.04	92.19	1.28	30	89.85	94.53	92.01	1.13
CP, %	145	2.73	9.54	6.13	1.13	40	4.17	8.73	6.32	1.14
Fat, %	146	0.84	3.16	2.00	0.39	44	1.38	2.83	1.98	0.36
Ash, %	130	3.75	15.24	9.49	1.92	22	6.66	13.20	9.29	1.75
NDF, %	125	65.54	85.06	75.30	3.25	23	69.8	80.98	75.22	3.31
ADF, %	124	41.68	63.33	52.50	3.61	21	47.38	58.47	52.38	2.63
ADL, %	150	2.35	13.80	8.07	1.91	24	5.87	12.16	8.31	1.39
IVDMD, %	125	31.36	73.94	52.65	7.10	30	40.35	65.90	52.82	6.47
NDFD, %	128	18.04	47.85	32.95	4.97	20	24.05	42.76	33.56	4.95

N, Number of sample; Min, Minimum; Max, Maximum; SD, Standard deviation; DM, Dry matter; CP, Crude protein; EE, Ether extract; NDF, Neutral detergent fiber; ADF, Acid detergent fiber; ADL, Acid detergent lignin; IVDMD, In vitro dry matter digestibility ; NDFD, Neutral detergent fiberdigestibility.

เมื่อนำกลุ่มตัวอย่างสำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐานมาสร้างสมการ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป WINISI IV ร่วมกับการใช้หลักสถิติ PLS regression แบบ Full cross validation และ MPLS แบบปรับแต่งและไม่ปรับแต่ง พบว่าข้อมูลสเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของหญ้าเนเปียร์หมักทั้งแบบแห้งและแบบสด (Figure 1(A)) ลักษณะสเปกตรัมที่ได้มีพีกกว้าง โดยสเปกตรัมของตัวอย่างแบบสดจะมีฐานพีกและการเลื่อนตัวมากกว่าตัวอย่างแบบสดแห้ง เนื่องจากโมเลกุลน้ำที่แทรกอยู่ตามรูพรุนในเนื้อเยื่อพืชมีผลต่อการหักเหและทะลุผ่านของแสงในช่วงคลื่น NIR นอกจากนี้ตัวอย่างแบบสดจะมีฟิล์มบางๆ เคลือบอยู่บนพื้นผิวของตัวอย่างซึ่งจะรบกวนการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบหลักอื่นที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย (Cozzolino et al., 2006) จาก Figure 1(A) จะเห็นว่าสเปกตรัมในตัวอย่างแบบสด พบพีกที่ความยาวคลื่น 2100 นาโนเมตรซึ่งมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของโปรตีน ได้รับผลจากการดูดกลืนแสงของน้ำทำให้พีกไม่ชัดเจนเท่ากับสเปกตรัมของตัวอย่างแบบแห้ง นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลของขนาดอนุภาค ความเป็นเนื้อเดียวกัน รวมทั้งระดับของเยื่อใยชนิดต่างๆ ที่สะสมอยู่มีผลให้สเปกตรัมมีจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันโดยตัวอย่างขนาดเล็กจะสะท้อนแสงได้ดีกว่าตัวอย่างขนาดใหญ่ จึงอาจมีความแปรปรวนที่เกิดจากการกระเจิงแสง (กรกช, 2553) ดังนั้นก่อนการสร้างสมการทำนายจึงควรมีการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมก่อนเพื่อลดความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น

การปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์สามารถช่วยลดอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวได้ โดยการใช้วิธี SNV และ Detrend ร่วมกับวิธีอนุพันธ์ (Derivative treatment) อันดับที่ 1 และ 2 ทำให้สามารถแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันในสเปกตรัมออกจากกัน และลดผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมมีขนาดเพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่น (จินทกานต์ และคณะ, 2553) เมื่อพิจารณาลักษณะของสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์ (Figure 1(B) และ 1(C)) จะเห็นว่า การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิคข้างต้นจะช่วยขยายสัญญาณให้ชัดเจนมากขึ้นและลดความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้นจากการกระเจิงแสงของตัวอย่าง (Kasemsunran et al., 2004) โดย SNV ช่วยลดสัญญาณรบกวนขณะที่ detrend จะช่วยลดความโค้งของแต่ละสเปกตรัม ส่วน derivative ที่อยู่ในรูปของ derivative, gap, smoothing, second smoothing นั้น จะช่วยแก้ปัญหาการซ้อนทับกันของจุดยอดในสเปกตรัมและการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม โดยการสร้าง 2nd derivative ของสเปกตรัม จะทำให้เกิดการแยกของจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันอยู่ขณะที่ 1st derivative ของสเปกตรัมจะช่วยแก้ปัญหาที่สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น ตามแกน Y อันเกิดจากขนาดอนุภาคของตัวอย่างที่แตกต่างกัน อนุภาคขนาดใหญ่จะเปลี่ยนทิศทางการเดินทางของแสงลงไปในตัวอย่างได้น้อยกว่าอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้แสงเดินทางเข้าไปในตัวอย่างได้ระยะทางมากกว่า ก่อนที่จะสะท้อนกลับออกมาทำให้ถูกดูดกลืนมากกว่า ส่วน gap และ smoothing จะช่วยปรับสเปกตรัมที่มีลักษณะเป็นยอดแหลมเล็กกระจายให้เรียบขึ้น (อนุพันธ์, 2548)

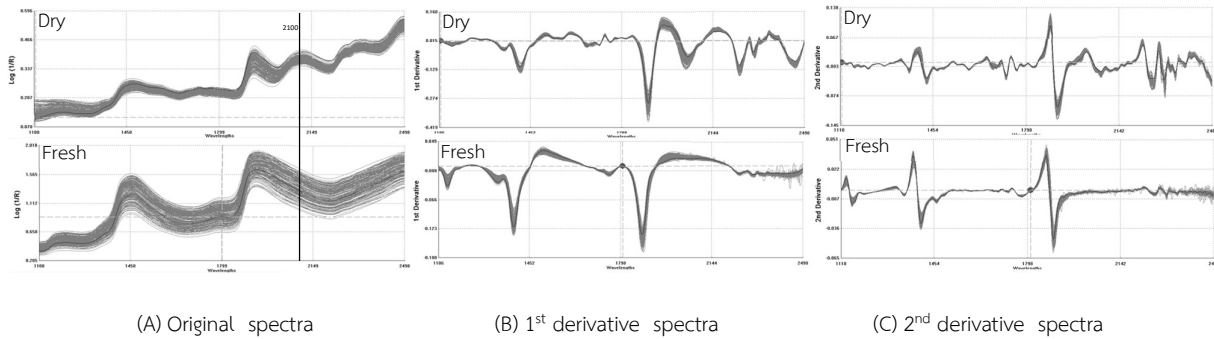


Figure 1 Original spectra (A) and 1st derivative spectra (B) and 2nd derivative spectra (C) of dried and fresh napier grass silage.

หลังจากการปรับแต่งสเปกตรัมของสมการเทียบมาตรฐานทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมักจากการเก็บสเปกตรัมทั้ง 2 วิธี ได้แก่ แบบแห้งและแบบสดทั้ง 9 รายการๆ ละ 40 รูปแบบ รวมทั้งหมด 720 สมการ จากนั้นทำการคัดเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่เป็นไปตามเกณฑ์มาทำการทวนสอบความถูกต้องของสมการรายการละ 3 สมการ เพื่อหาสมการเทียบมาตรฐานที่ดีที่สุด พบว่าค่าสถิติของสมการเทียบมาตรฐานทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมักจากการสแกนตัวอย่างแบบแห้งมีค่า r^2 เข้าใกล้ 1 มากกว่าแบบสดในทุกรายการ ดังแสดงใน Table 4 ในขณะที่ทุกสมการมีค่า SECV และผลต่างของค่า SEC และ SECV ต่ำตามเกณฑ์การประเมินที่กำหนดไว้และเมื่อทวนสอบความใช้ได้ของสมการพบว่า ค่า r^2 ของตัวอย่างแบบแห้งสูงกว่าแบบสด โดยแบบแห้งมีค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD เท่ากับ 0.97 0.95 0.91 0.96 0.96 0.93 0.93 0.96 และ 0.87 ตามลำดับ และแบบสดมีค่าเท่ากับ 0.87 0.93 0.91 0.88 0.90 0.84 0.87 0.85 และ 0.84 ตามลำดับ ในส่วนของค่า Bias พบว่า ทุกแบบมีค่าต่ำหรือเท่ากับ 0 ซึ่งค่า Bias ควรมีค่าไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ บ่งบอกว่าค่าที่ทำนายด้วยเทคนิค NIRS ไม่แตกต่างจากค่าจริงที่วิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

เมื่อพิจารณาความใช้ได้ของสมการจากค่า RPD พบว่า สมการเทียบมาตรฐานจากการสแกนแบบแห้งสำหรับทำนายค่าวัตถุแห้ง โปรตีน เถ้า NDF และ IVDMD มีค่า RPD มากกว่า 4.1 ขึ้นไปอยู่ในระดับที่ยอดเยี่ยสามารถใช้ทำนายได้กับทุกงาน (Any application) สมการทำนายค่า ADF และ ADL มีค่า RPD ระหว่าง 3.5-4.0 อยู่ในระดับที่สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพกระบวนการ (Process control) สมการทำนายค่าไขมันเป็นสมการที่อยู่ในระดับดีโดยมีค่า RPD ระหว่าง 3.0-3.4 ซึ่งสามารถนำไปใช้ทำนายในงานควบคุมตรวจคุณภาพ (Quality control) ส่วนสมการทำนายค่า NDFD สามารถใช้ได้ในงานคัดเลือกเบื้องต้นโดยมีค่า RPD เท่ากับ 2.7 เมื่อเปรียบเทียบกับสแกนตัวอย่างแบบสดซึ่งส่วนใหญ่มีค่า RPD อยู่ในระดับสามารถใช้ได้ในงานคัดเลือกเบื้องต้นเท่านั้น โดยมีค่า RPD อยู่ระหว่าง 2.5-2.9 มีเพียงสมการทำนายค่าโปรตีนที่มีค่า RPD ระหว่าง 3.5-4.0 อยู่ในระดับที่สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพกระบวนการ (Process control) และสมการทำนายค่าไขมัน และ NDF ที่อยู่ในระดับดีโดยมีค่า RPD ระหว่าง 3.0-3.4 ซึ่งสามารถนำไปใช้ทำนายในงานควบคุมตรวจคุณภาพ (Quality control) ได้ และจากผลที่ได้พบว่า ค่า r^2 และ RPD

ของ NDFD มีค่าน้อยทั้งสองรูปแบบ ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์การย่อยได้มีส่วนของการศึกษาจากสัตว์ทดลองมักมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นจากความแปรปรวนของสัตว์ควบคู่กับข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีหลายขั้นตอน ดังนั้นค่าการย่อยได้จึงอาจไม่แม่นยำเท่ากับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาอื่น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในปัจจุบันพบว่า สามารถพัฒนาสมการการย่อยได้ให้มีความแม่นยำสูงและมีประสิทธิภาพได้ (Park R.S., 1998)

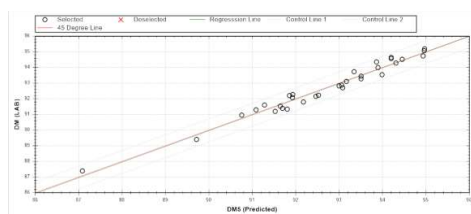
Table 4 Statistical analysis of Calibration and Validation sets.

Parameter				Treatment		Calibration set				Validation set				
						N	r ²	SEC	SECV	N	r ²	SEP	Bias	RPD
Dried napier grass silage														
DM, %	MPLS	NONE	1,8,8,1	155	0.89	0.53	0.63	32	0.97	0.29	-0.02	5.90		
CP, %	MPLS	None	1,8,4,1	150	0.91	0.44	0.55	39	0.95	0.34	-0.01	4.56		
Fat, %	MPLS	SNV+DETREND	1,8,8,1	157	0.79	0.17	0.21	33	0.91	0.12	0.00	3.32		
Ash, %	MPLS	None	2,8,4,1	152	0.88	1.00	1.07	36	0.96	0.58	0.01	5.21		
NDF, %	PLS	None	1,8,4,1	149	0.89	1.48	1.65	36	0.96	0.95	0.00	5.08		
ADF, %	PLS	SNV+DETREND	1,10,10,1	154	0.81	1.93	2.17	29	0.93	0.76	-0.06	3.89		
ADL, %	PLS	None	1,5,5,1	132	0.92	0.55	0.59	30	0.93	0.44	-0.01	3.95		
IVDMD, %	MPLS	NONE	1,8,4,1	167	0.91	2.35	2.60	40	0.96	1.61	0.09	4.74		
NDFD, %	MPLS	SNV+DETREND	1,4,4,1	156	0.84	2.24	2.71	40	0.87	1.87	0.18	2.74		
Fresh napier grass silage														
DM, %	MPLS	SNV+DETREND	2,4,4,1	139	0.70	0.70	0.75	30	0.87	0.41	0.01	2.77		
CP, %	MPLS	SNV+DETREND	2,4,4,1	145	0.82	0.48	0.56	40	0.93	0.31	0.01	3.73		
Fat, %	MPLS	SNV+DETREND	1,5,5,1	146	0.92	0.11	0.14	44	0.91	0.11	-0.01	3.28		
Ash, %	MPLS	SNV+DETREND	2,8,4,1	130	0.75	0.95	1.32	22	0.88	0.60	-0.01	2.92		
NDF, %	PLS	None	1,10,10,1	125	0.63	1.99	2.42	23	0.90	1.04	0.00	3.18		
ADF, %	PLS	NONE	2,8,4,1	124	0.56	2.40	2.68	21	0.84	1.06	-0.16	2.50		
ADL, %	MPLS	None	2,10,10,1	150	0.73	1.00	1.06	24	0.87	0.50	0.08	2.77		
IVDMD, %	PLS	NONE	1,10,10,1	125	0.64	4.23	4.33	20	0.85	2.48	0.20	2.61		
NDFD, %	MPLS	NONE	2,5,5,1	128	0.70	2.72	3.38	30	0.84	1.99	-0.23	2.50		

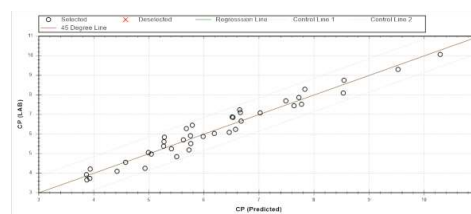
N, Number of sample; r², coefficient of determination; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross validation; SEP, Standard Error Prediction; RPD, ratio of performance to deviation; DM, Dry matter; CP, Crude protein; EE, Ether extract; NDF, Neutral detergent fiber; ADF, Acid detergent fiber; ADL, Acid detergent lignin; IVDMD, In vitro dry matter digestibility ; NDFD, Neutral detergent fiber digestibility.

เมื่อเปรียบเทียบค่า RPD ที่ได้พบว่า การวิเคราะห์จากตัวอย่างแบบแห้งมีค่าสูงกว่าแบบสด สอดคล้องกับงานของพิมพร และคณะ (2562) ได้ศึกษาการทำนายคุณค่าทางโภชนาของหญ้าเนเปียร์หมักด้วยเครื่อง Fourier transform near infrared spectrometer (FT-NIR) ทั้งตัวอย่างแบบสดและแห้ง พบว่าการทำนายจากหญ้าเนเปียร์แบบสดมีความแม่นยำต่ำกว่าแบบแห้ง โดยสมการทำนายค่า วัตถุแห้ง โปรตีน NDF ADF และ ADL มีค่า RPD เท่ากับ 7.77 7.20 1.64 1.39 และ 1.82 ในตัวอย่างแบบแห้ง และมีค่า RPD เท่ากับ 2.79 2.78 1.84 1.38 และ 1.72 สำหรับแบบสดตามลำดับ เช่นเดียวกับ Cozzolino et al. (2006) ทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างสดของข้าวโพดในประเทศอูรุกวัยพบว่า สมการทำนายที่ได้มีค่า RPD ของ วัตถุแห้ง โปรตีน NDF และ ADF ส่วนใหญ่อยู่ในระดับพอใช้ โดยมีค่าเท่ากับ 2.4 4.8 1.3 2.1 และ 1.2 ตามลำดับ สาเหตุที่การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIR ในแบบสดยังมีค่าความแม่นยำต่ำกว่าเนื่องจากเนื้อเยื่อพืชสภาพสดมีน้ำเป็นองค์ประกอบค่อนข้างมากทำให้เกิดการหักเหของแสง รวมถึงปัจจัยจากขนาดและการกระจายตัวของตัวอย่างอีกด้วย (Murray and cowe (2004)) แต่อย่างไรก็ตามหากพัฒนาการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบสดด้วยเทคนิค NIR ได้จะสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่สามารถเกิดการสูญเสียองค์ประกอบบางอย่างที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการอบแห้งและบด (Vranic M et al., 2006) รวมทั้งช่วยลดความล่าช้าในการสุ่มและเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการขนส่งอีกด้วย

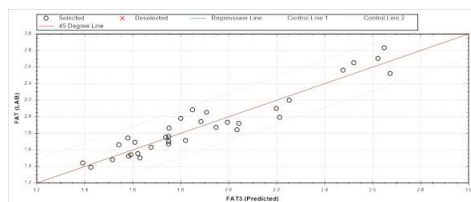
จาก Figure 2 (A-I) และ 3 (A-I) คือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (แกน Y) และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการเทียบมาตรฐาน (แกน X) ของตัวอย่างแบบแห้งและแบบสดตามลำดับ พบว่าค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการเทียบมาตรฐานของค่าวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า NDF ADF ADL IVDMD และ NDFD มีค่าการกระจายตัวที่ครอบคลุมค่าต่ำสุดถึงสูงสุดของข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน โดยข้อมูลส่วนใหญ่กระจายอยู่รอบเส้นทแยงมุม แสดงให้เห็นว่าค่าที่ทำนายได้จากสมการเทียบมาตรฐานมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้จริง



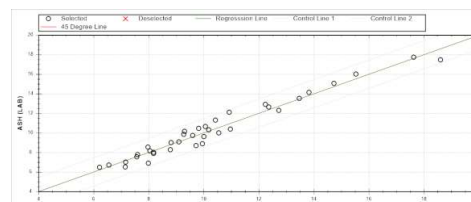
A. DM



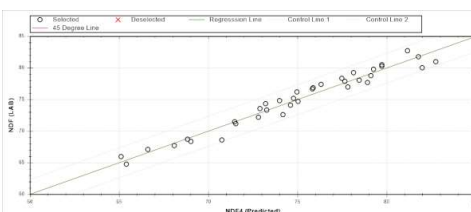
B. CP



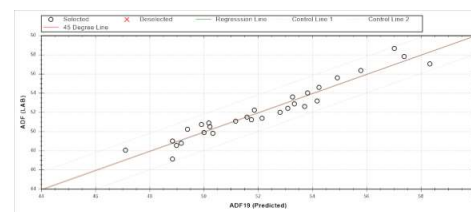
C. EE



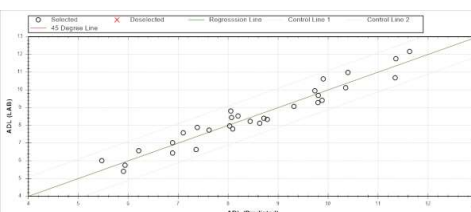
D. Ash



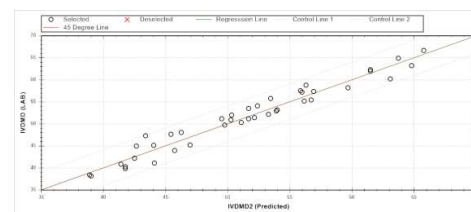
E. NDF



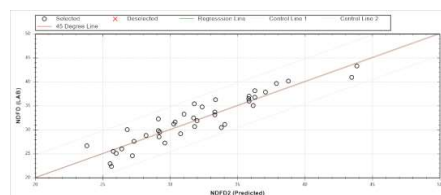
F. ADF



G. ADL



H. IVMDM



I. NDFD

Figure 2 Relationship between NIRS predicted and actual values of nutritive value of dried napier grass silage in validation sets.

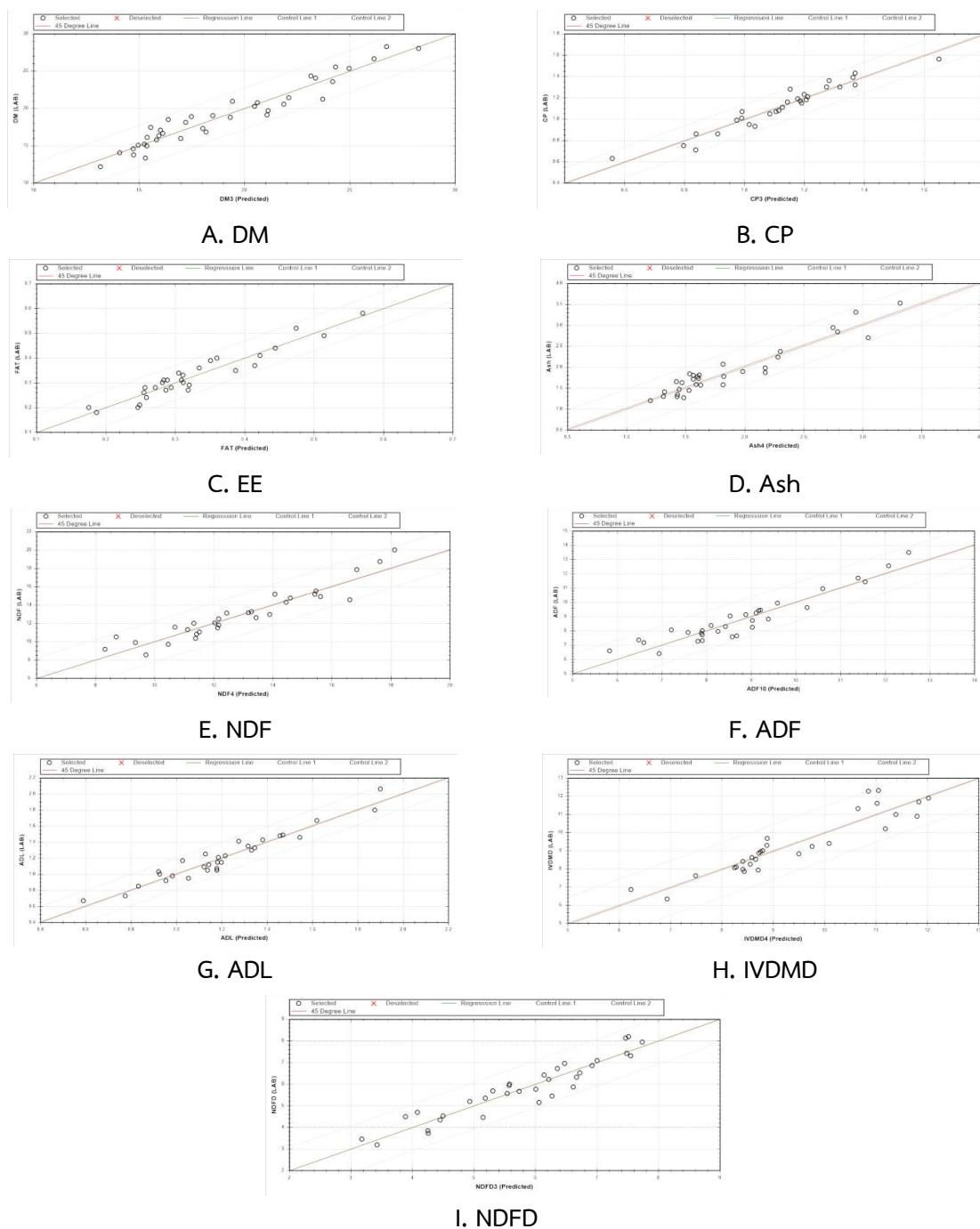


Figure 3 Relationship between NIRS predicted and actual values of nutritive value of fresh napier grass silage in validation sets.

Table 5 Statistics performance measurement of developed calibration equation for nutritive value according to ISO 12099:2017.

Parameter	Bias			SEP			Slope			
	Calculated value	Criterion (T_b)	Result	Calculated value	Criterion (T_{UE})	Result	Observed value (t_{obs})	Calculated value	Criterion($t_{(1-\alpha/2)}$)	Result
Dried napier grass silage										
DM, %	-0.02	0.10	Pass	0.75	2.41	Pass	0.10	1.00	2.04	Pass
CP, %	0.00	0.11	Pass	0.34	0.51	Pass	0.04	1.00	2.02	Pass
Fat, %	0.00	0.04	Pass	0.11	0.21	Pass	0.01	1.00	2.04	Pass
Ash, %	0.02	0.19	Pass	0.58	1.22	Pass	-0.04	1.00	2.03	Pass
NDF, %	0.00	0.32	Pass	0.94	1.81	Pass	-0.35	1.00	2.03	Pass
ADF, %	0.06	0.29	Pass	1.21	1.64	Pass	0.06	1.00	2.05	Pass
ADL, %	-0.01	0.16	Pass	0.44	0.69	Pass	0.02	1.00	2.04	Pass
IVDMD, %	0.09	0.60	Pass	1.61	2.85	Pass	-0.03	1.00	2.02	Pass
NDFD, %	0.17	0.60	Pass	1.87	2.73	Pass	0.04	1.00	2.02	Pass
Fresh napier grass silage										
DM, %	0.01	0.15	Pass	0.41	0.87	Pass	-0.01	1.00	2.04	Pass
CP, %	0.01	0.10	Pass	0.30	0.59	Pass	0.02	1.00	2.02	Pass
Fat, %	-0.01	0.03	Pass	0.11	0.13	Pass	-0.05	1.00	2.02	Pass
Ash, %	-0.01	0.27	Pass	0.60	1.22	Pass	0.05	1.00	2.08	Pass
NDF, %	0.00	0.45	Pass	1.04	2.54	Pass	-0.08	1.00	2.07	Pass
ADF, %	-0.16	0.48	Pass	1.05	3.10	Pass	0.03	1.00	2.09	Pass
ADL, %	0.08	0.21	Pass	0.50	1.27	Pass	-0.06	1.00	2.07	Pass
IVDMD, %	0.19	1.16	Pass	2.48	5.48	Pass	0.01	1.00	2.09	Pass
NDFD, %	-0.23	0.74	Pass	1.99	3.40	Pass	-1.50	1.00	2.05	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 obtained from table t-distribution for a probability of $\alpha = 0.05$; DM, Dry matter; CP, Crude protein; EE, Ether extract; NDF, Neutral detergent fiber; ADF, Acid detergent fiber; ADL, Acid detergent lignin; IVTDM, In vitro dry matter digestibility ; NDFD, Neutral detergent fiberdigestibility.

ประเมินศักยภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยมาตรฐาน ISO 12099:2017

จากสมการเทียบมาตรฐานที่ได้และผ่านการทวนสอบความถูกต้องของสมการจัดว่าเป็นสมการเทียบมาตรฐานที่ดีที่สุดจะนำมาประเมินศักยภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยมาตรฐาน ISO 12099:2017 (ISO, 2017) อีกครั้ง ซึ่งเป็นมาตรฐานที่ใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์โดยใช้เทคนิค NIRS ในการหาปริมาณคุณค่าทางโภชนาการต่างๆ ในตัวอย่าง โดยจะทำการประเมินค่าทางสถิติ คือ ค่า Bias SEP และ Slope ดังแสดงใน Table 5 พบว่าทุกคุณค่าทางโภชนาการของหญ้าเนเปียร์หมัก มีค่า Bias ของทุกรายการน้อยกว่าค่า T_b ซึ่งแสดงว่าค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือ ค่าจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการและค่าที่ได้จากการทำนายไม่แตกต่างกันมีค่า SEP น้อยกว่าหรือเท่ากับค่า T_{UE} กล่าวคือ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายต่ำเพียงพอที่จะยอมรับได้ และจากการตรวจสอบค่า Slope หรือค่าความสัมพันธ์ของค่าจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการกับค่าที่ได้จากการทำนาย ซึ่งจะใช้ค่า t_{obs} ในการตรวจสอบ Slope พบว่า ค่า t_{obs} มีค่าน้อยกว่าค่า $t_{(1-\alpha/2)}$ กล่าวคือ Slope มีค่าไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายคุณค่าทางโภชนาการของหญ้าเนเปียร์หมักด้วยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี โดยใช้ความยาวคลื่น 1,100-2,500 นาโนเมตร โดยการใช้สเปกตรัมจากการสแกนตัวอย่างทั้งแบบแห้งและแบบสด พบว่าได้สมการเทียบมาตรฐานดังนี้

- สมการเทียบมาตรฐานทำนายค่าได้ในระดับยอดเยี่ยม ได้แก่ ค่าวัตถุแห้ง โปรตีน เถ้า NDF และ IVDMD สำหรับแบบแห้ง
- สมการเทียบมาตรฐานทำนายค่าได้ในระดับดีมาก ได้แก่ ค่า ADF และ ADL สำหรับแบบแห้ง และค่าโปรตีน สำหรับแบบสด
- สมการเทียบมาตรฐานทำนายค่าได้ในระดับดี ได้แก่ ค่าไขมัน สำหรับแบบแห้ง และค่าไขมัน และ NDF สำหรับแบบสด
- สมการเทียบมาตรฐานทำนายค่าได้ในระดับพอใช้ ได้แก่ ค่า NDFD สำหรับแบบแห้ง และค่าวัตถุแห้ง เถ้า ADF ADL IVDMD และ NDFD สำหรับแบบสด

และสมการเทียบมาตรฐานที่ได้ทุกสมการมีค่า Bias SEP และ Slope ผ่านเกณฑ์การประเมินศักยภาพตามมาตรฐาน ISO 12099:2017 แสดงว่า สมการเทียบมาตรฐานที่ได้มีความแม่นยำสามารถทำนายค่าได้ไม่แตกต่างกับค่าจริงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคุณจันทกานต์อรณนันท ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์อาหารสัตว์ที่ให้คำแนะนำตลอดมา คุณวรรณมา อ่างทอง และคณะกรรมการวิชาการสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ที่ให้คำแนะนำ ตรวจสอบ

และแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยและพัฒนาการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์มหาสารคาม และศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา สำหรับตัวอย่างในการวิเคราะห์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาต่างๆ และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีที่ช่วยให้งานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ข้อเสนอแนะ

สมการเทียบมาตรฐานของหญ้าเนเปียร์หมักที่สแกนจากตัวอย่างแบบสดส่วนใหญ่ยังสามารถทำนายค่าอยู่ในระดับพอใช้ควรต้องมีการพัฒนาต่อ สำหรับองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีค่าอยู่ในระดับดีขึ้นไปแล้วนั้นยังควรมีการพัฒนาสมการต่อเนื่องเป็นประจำทุกปีตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ เพื่อปรับสมการเทียบมาตรฐานให้เป็นปัจจุบัน และมีความถูกต้องแม่นยำในการทำนายตัวอย่างที่จะเกิดขึ้นในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรกช วรรณกุล. 2553. การประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์น้ำจิ้มไก่ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีย่านใกล้อินฟราเรด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไกรลาศ เขียวทอง. 2554. คู่มือการปลูกหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา กองอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์.
- คณะกรรมการความต้องการโภชนาโคมนในประเทศไทย. 2563. ความต้องการโภชนาของโคมนในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- จันทกานต์ อรณนันท เฉลา พัทธสินสุข และสุรนนท์ น้อยอุทัย. 2553. การทำนายส่วนประกอบทางเคมีของหญ้าแพงโกล่าด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. รายงานผลงานวิจัยกองอาหารสัตว์ประจำปี พ.ศ.2553 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 309-327.
- ปานมนัส ศิริสมบุญ, 2564. พื้นฐานเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. ภาควิชาวิศวกรรมการเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง. แหล่งที่มา <https://nirsresearch.com/sites/6731/files/u/พื้นฐานเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี.pdf>. ตุลาคม 30, 2565.
- พิมพ์พร คำทวีกิชาติ ศรีภัยเสาวลักษณ์ แยมหมื่นอาจ และ วรรณพร ทะพิงค์แก. 2562. การทำนายองค์ประกอบทางเคมีของเนเปียร์หมักด้วยเครื่องฟูเรียรทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. วารสารแก่นเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปีที่ 47 ฉบับพิเศษ 2 หน้า 715-722.
- วาสนา ศิริแสน. (2008). ผลการเสริมเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมี และเอนไซม์ ต่อการปรับปรุงคุณภาพพืชหมัก. การเกษตรราชภัฏ. 7(1).44-56.
- สันติ แฝงเฒ่า. 2546. ผลของอาหารผสมครบส่วนที่มีหญ้าหมักเป็นอาหารหยาบหลักต่อสมรรถภาพการผลิตของโครีดนม. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- อนุพันธ์ เติตวงศ์วรกุล. 2548. การปรับแต่ง NIR Spectrum ก่อนการวิเคราะห์. เอกสารประกอบการฝึกอบรม “การตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค NIR Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก” ระหว่างวันที่ 19-23 ธันวาคม 2548 จัดโดย หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีการตรวจสอบสินค้าโดยไม่ทำลาย, สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 62 – 81.
- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International 20th ed. Maryland.
- Cozzolino, D., A. Fassio, E. Fernández, and E. Restaino, and A. La Manna. 2006. Measurement of chemical composition in wet whole maize silage by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 129:329–336.
- Infrasoft International. 2005. WinISI III Manual. FOSSTecator AB. Hillerod. 192p.
- ISO. 2002. International Standard (ISO 5984:2002 (E)). 2nd Edit. Animal feeding stuffs – Determination of crude ash.
- ISO. 2015. International Standard (ISO 11085:2015). 2nd Edit. Cereals, cereals-based products and animal feeding stuffs - Determination of crude fat and total fat content by the Randall extraction method.
- ISO. 2017. International Standard (ISO 12099:2017(E)) 2nd Edit. Animal feeding stuffs, Cereals and milled cereal products-Guidelines for the application of near infrared spectrometry. International Organization for Standardization. All rights reserved. Geneva.
- Kasemsumran, S., Y. P. Du, K. Maruo, and Y. Ozaki. 2004. Selective removal of interference signals for near-infrared spectra of biomedical samples by using region orthogonal signal correction. *Analytical Chemical Acta*. 82:97-103.
- Murray I., and I. Cowe. 2004. Near Infrared Spectroscopy in Agriculture. The American Society of Agronomy, Inc. 44:75–115.
- Orskov, E. R. and I. McDonald. 1979. The Estimation of Protein Degradability in the Rumen from Incubation Measurements Weighted According to Rate of Passage. *J. Agri.Sci.* 92 : 499-503
- Osborne, V.R. 2006. Improving environmental sustainability of beef farms in Ontario by measuring neutral detergent fiber digestibility. ICAR. แหล่งที่มา : <http://www.ontarioforagecouncil.com/about-us/forage-research/146-final-report/file>. March 29, 2016.

- Park, R.S., R.E. Agnew, F.J. Gordon, and R.W.J. Steen. The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on undried samples of grass silage to predict chemical composition and digestibility parameters. *Animal Feed Science and Technology*, vol.72: 155–167.
- SA. 2017. Sithiporn Associates Company. WIN ISI 4, Training Manual. 80 p.
- Vranic M., M. Knezevic., Zs. Seregely, K. Bosnjak, J. Leto, and G. Perculiji. 2006. Prediction of Dry Matter and Crude Protein Content in Fresh Grass Silage by Near Infrared Spectroscopy. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, vol.1: 57–75.
- Williams, P., J. Antoniszyn, and M. Manley. 2019. *Near Infrared Technology: Getting the best out of light*. 1st edition. African Sun Media under the Sun Press imprint, Las Vegas. 301p.