การใช้สเปกโทรสโกปีแบบสะท้อนแสงอินฟาเรดใกล้ในการวิเคราะห์หญ้าโคลเวอร์

(A use near infrared reflectance spectroscopy in analysis grass-clover)

ณัฐธิรชา ผาใต้

Nattiracha Patai

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

สัมมนาฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำนายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชโคลเวอร์ด้วยเครื่อง NIRS ได้ทำการศึกษาข้อมูลจากเอกสารทางวิชาการ จำนวน 3 ฉบับ จากการศึกษาพบว่า NIRS เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ทดสอบแบบไม่ทำลายตัวอย่าง การวัดค่าคลื่นแสงในช่วง NIR ที่สะท้อนจากตัวอย่างจะถูกนำมาประมวลผลและหาความสัมพันธ์ทางสถิติเปรียบเทียบกับข้อมูลของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์จะทราบถึงค่ามาตรฐานสมการสอบเทียบเพื่อใช้ในการทำนายค่าปัจจัยคุณภาพของวัตถุดิบ ผลที่ได้มีความแม่นยำสูง ดังนั้นการประมวลผลค่าย่านแสงที่วัดได้จากเครื่อง NIRS สามารถนำมาใช้ในการทดสอบหญ้าโคลเวอร์ได้

คำสำคัญ: NIRS การสอบเทียบ โคลเวอร์ โคลเวอร์หมัก

บทนำ

โคลเวอร์ (Clover) หรือแชมร็อค (Shamrock) ชื่อวิทยาศาสตร์ Trifolium L. repens วงศ์ Fabaceae ซึ่งมีประมาณ 300 สายพันธุ์ โคลเวอร์เป็นพืชตระกูลถั่ว ที่มีต้นกำเนิดในยุโรป มีการกระจายพันธุ์มากในซีกโลกเหนือที่มีอุณหภูมิปานกลางแต่หลายชนิดก็เกิดขึ้นในอเมริกาใต้และแอฟริการวมทั้งที่ระดับความสูงบนภูเขาในเขตร้อน เจริญเติบโตได้ดีบนดินทรายดินร่วนหรือดินร่วนปนทรายเล็กน้อย ในปีแรกโคลเวอร์สามารถออกดอกและผลิตเมล็ด การเติบโตในปีที่สองโคลเวอร์จะมีการพัฒนาอย่างเต็มที่ สามารถมีชีวิตอยู่ได้ 9-10 ปี โคลเวอร์ชอบแสงแดดทนต่อน้ำค้างแข็ง เติบโตได้ดีที่สุดในภูมิภาคที่มีภูมิอากาศเย็นชื้นไม่มีความแห้งแล้ง โคลเวอร์มีขนาดเล็ก เป็นพืชล้มลุก สูงไม่เกิน 30 เซ็นติเมตร ใบของโคลเวอร์จะมีสีเขียวตลอดทั้งปี โดยทั่วไปใบของโคลเวอร์จะมีสามกลีบ ในปัจจุบันการผสมโคลเวอร์สำหรับการเลี้ยงสัตว์และการผลิตโคลเวอร์หมักมีอย่างแพร่หลาย เพราะโคลเวอร์เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีโปรตีนเป็นจำนวนมากเหมาะแก่การนำมาใช้เสริมในอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่สัตว์เลี้ยง ประโยชน์ของโคลเวอร์นอกจากที่ใช้เป็นอาหารสัตว์แล้ว ยังมีการการปลูกโคลเวอร์เป็นพืชคลุมดินเพื่อช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินเพราะโคลเวอร์นั้นเป็นพืชที่มีความสามารถในการสร้างปมในรากและมีแบคทีเรียไรโซเบียอาศัยอยู่ ทำให้โคลเวอร์มีความสามารถในการตรึงในโตรเจนทำให้ดินมีคุณภาพดี ก่อนจะนำโคลเวอร์ไปใช้จะมีการตรวจหาสิ่งแปลกปลอมและองค์ประกอบในโคลเวอร์ วิธีการทดสอบโดยใช้ NIRS เป็นการทดสอบที่ใช้งานง่ายเครื่องมือมีขนาดที่เล็กและมีความแม่นยำที่สูง ดังนั้นสัมมนานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแม่นยำของเครื่อง NIRS โดยใช้โคลเวอร์เป็นตัวทดสอบ

รังสีอินฟราเรด หรือ รังสีความร้อน (Infrared Radiation, IR)

เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 0.75-100 μm (ช่วงความถี่ 1,011 – 1,014 เฮิร์ตซ์ (Hz)) หรืออยู่ในช่วงระหว่างแสงสีแดงกับคลื่นวิทยุ เช่นเดียวกันกับคลื่นไมโครเวฟ รังสีอินฟราเรดไม่เบี่ยงเบนในสนามแม่เหล็กไฟฟ้า และพลังงานจะเพิ่มขึ้นตามความถี่

รังสีอินฟราเรดถึงแบ่งเป็น 3 ช่วงด้วยกันคือ

รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infra-red หรือ NIR) มีความยาวคลื่นในช่วง 0.75 – 3 μm ใช้งานในช่วง 500 – 2,200 ºC ให้กำลังความร้อนต่อพื้นที่สูง ผ่านเข้าในเนื้อวัสดุได้ลึก และรวดเร็ว นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การอบแห้งผลิตภัณฑ์

รังสีอินฟราเรดย่านกลาง (Middle Infra-red หรือ mid-IR)มีความยาวคลื่นในช่วง 3 – 25 μm ใช้งานในช่วง 500 – 950 ºC ให้ความร้อนได้ปานกลาง และผ่านเข้าเนื้อวัสดุได้ลึกปานกลาง

รังสีอินฟราเรดย่านไกล (Far Infra-red หรือ FIR)มีความยาวคลื่นในช่วง 25 – 100 μm ใช้งานในช่วง 300 – 700 ºC ให้ความร้อน ผ่านเข้าไปในเนื้อวัสดุไม่ลึก ใช้งานประเภทที่ต้องการความร้อนต่ำ และจำกัดบริเวณพื้นผิว (นิรนาม, มปป)

Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ค่าของรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ของสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า ในด้านการเกษตรได้มีการศึกษาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในด้านวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ NIRS สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษศาสตร์ ประเมินคุณภาพได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการไม่ทำลายตัวอย่าง จึงสามารถนำมาตรวงสอบองค์ประกอบของหญ้าโคลเวอร์ และหญ้าโคลเวอร์หมักในอุตสาหกรรมการผลิตนมและเนื้อได้ เครื่อง NIRS มาก่อน สามารถวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการการดูดซับแสงในย่าน NIRS มีประโยชน์มากในการตรวจสอบวัสดุจำนวนมากโดยมีการเตรียมตัวอย่างเพียงเล็กน้อยนี้ เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRs) มีข้อจำกัดที่สามารถตรวจวัดได้เฉพาะโมเลกุลของสารอินทรีย์เท่านั้น เพราะโลหะ เช่น เงินหรือตะกั่ว และสารอนินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถดูดกลืนรังสีในช่วง NIR ได้เนื่องจาก NIR ไม่ได้เป็นระบบ Stand-alone ดังนั้น การสอบเทียบส่วนประกอบหรือตัวแปรต่างๆ รวมทั้งการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐานอยู่เป็นประจำจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมากเพื่อให้มั่นใจได้ว่าการสอบเทียบยังคงให้ความน่าเชื่อถืออยู่และจะต้องทำการปรับปรุงการสอบเทียบให้ทันสมัยอยู่เสมอ ถึงแม้ว่าวิธีการทางด้านคณิตศาสตร์และสถิติจะเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลสำคัญของสเปกตรัมที่มีการซ้อนทับแต่ต้องอาศัยคอมพิวเตอร์ที่ได้รับการพัฒนาในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของสเปกตรัมและองค์ประกอบหรือตัวแปรต่างๆ (ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 2, มปป)

Table 1 Calibration and validation statistics of four equations for the prediction of the botanical composition of forage samples.

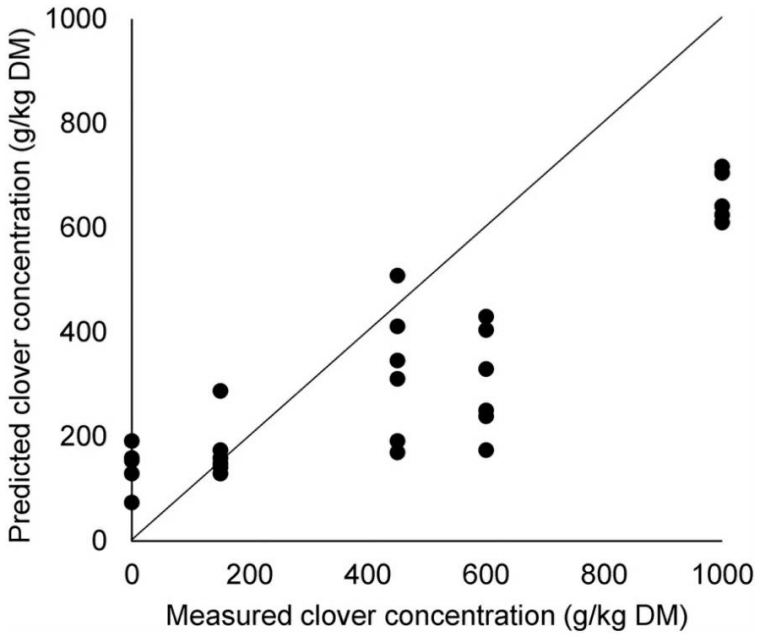
	Calibration			Validation		
	SEC	RSQ	SECV	RMSEP	Bias	RPD
Equation1						
Fa	3.7	0.92	6.1	5.4	-1.2	2.8
Lp	5.0	0.87	7.8	6.1	1.4	2.3
Tr	2.5	0.95	3.9	2.9	0.4	3.8
Equation2						
Fa	3.6	0.94	4.9	15.6	-1.9	1.0
Lp	3.3	0.94	5.0	15.9	7.4	0.9
Tr	1.4	0.98	1.9	6.8	0.7	1.6
Equation3						
Fa	1.8	0.98	2.3	14.3	0.6	1.1
Lp	1.8	0.98	2.2	21.7	-6.8	0.6
Tr	0.7	0.99	0.9	13.9	8.0	0.8

Equation4						
Fa	1.9	0.98	2.4	6.0	0.3	2.5
Lp	1.9	0.98	2.4	7.7	0.5	1.8
Tr	0.6	0.99	0.8	3.5	-0.7	3.1

Source: Cougnon et al. (2013)

จากการศึกษาสมการที่ 3 และ 4 มีค่า RSQ ที่ระดับ 0.98-0.99 ซึ่งเป็นค่าที่มีความแม่นยำสูงในการทำนายและประสิทธิภาพการทำนายองค์ประกอบจากตัวอย่างเทียมหรือสเปกตรัมเทียมได้ค่าความแม่นยำที่ไม่คงที่เกิดจากขาดความผันแปรของสิ่งแวดล้อมในตัวอย่างเทียมเมื่อเทียบกับตัวอย่างจริง จึงควรใช้วิธีการสอบเทียบโดยการใช้ตัวอย่างจริงที่มีความหลากหลายแทนการทำตัวอย่างเทียมจำนวนมากและมีข้อมูลค่อนข้างน้อยการเพิ่มรูปแบบสภาพแวดล้อมให้กับสเปกตรัมของตัวอย่างการสอบเทียบช่วยให้ได้การสอบเทียบที่มีความแม่นยำสูง

Figure 1 The results of a blind validation of a Near Infra-Red Spectroscopy prediction equation for clover concentration calibrated using a set of 94 diverse fresh grass-clover silage samples which were manually aspeciated to produce reference values and validated using an independent set of 30 grass-red clover silage samples of 6 known clover concentrations (0, 150, 450, 600, and 1000 g/kg dry matter)



Source: Thomson et al. (2018)

จากการศึกษาพบการวัดค่าและการทดสอบความเข้มข้นของโคลเวอร์มีความแม่นยำสูงสุดที่วัดจากกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เกิน 200 กรัมต่อกิโลกรัม จากตัวอย่างโคลเวอร์ 1,000 กรัมต่อกิโลกรัม โดยน้ำหนักแห้ง (DM) สมการสามารถคาดเดาค่าความเข้มข้นของโคลเวอร์ (CC) wfhไม่เกิน 300-400 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง (DM) กลุ่มตัวอย่างที่มี DM CC 150 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำในการทำนายที่ดีที่สุด การคาดการณ์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบทางพฤกษศาสตร์เหมือนกันมักจะแตกต่างกันที่ 150-400 กรัมต่อกิโลกรัม DM CC การสร้างสมการทำนายสำหรับ CC ได้แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำในการทำนายของการใช้เทคนิค NIRS ในการวัดองค์ประกอบทางพฤกษศาสตร์ของโคลเวอร์ที่มีการสร้างสมการคณิตศาสตร์เพื่อประมวลผลค่าย่านแสงที่วัดได้จากเครื่อง Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) ให้มีความแม่นยำสูง เพื่อทำนายค่าความเข้มข้นของโคลเวอร์ (CC) โดยใช้การประเมินค่าชุดตัวอย่างหญ้าโคลเวอร์ 30 ตัวอย่าง การตรวจสอบความถูกต้องข้าม (SECV) เป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าเฉลี่ยที่วัดได้ของสมการที่มีการปรับให้เหมาะสมและในการทดสอบความแม่นยำหลังปรับสมการคณิตศาสตร์ทำให้มีค่าความแม่นยำที่สูงขึ้น

Table 2 Indicators of calibration strength and prediction accuracy using cross-validation for a range of optimised new NIRS equations calibrated on spectra from 95 diverse grass-clover silages.

Item	n	SEC	r^2	Relative SECV, %
ADF (DM)	183	13.4	0.90	4.49
ADF (Fresh)	181	6.22	0.98	5.71
Alcohol	178	1.08	0.83	37.1
aNDF (DM)	183	18.5	0.89	4.80
aNDF (Fresh)	182	7.79	0.98	5.26
Ash (DM)	185	10.4	0.70	12.5
Ash (Fresh)	179	3.30	0.91	11.1
DOMD	172	3.10	0.83	5.47
$EDDM_{0.08}$	174	2.15	0.88	5.28
$EDN_{0.08}$	174	3.93	0.79	7.03
EE (DM)	180	2.67	0.83	11.2
EE (Fresh)	179	0.94	0.90	10.8
LA	173	4.76	0.81	41.5
N	180	0.65	0.97	8.33
NH_3-N	176	0.01	0.88	18.8
pH	180	0.16	0.93	4.18
TVC	185	5.39	0.82	27.9

TVFA	183	5.17	0.81	31.8
VCODM	181	7.17	1.00	2.10
WSE (DM)	180	10.1	0.92	31.4
WSE (Fresh)	181	4.62	0.93	29.6

Source: Thomson et al. (2018)

จากการศึกษาพบว่าการใช้สมการทางคณิตศาสตร์ในการวัดองค์ประกอบทางเคมีของหญ้าโคลเวอร์มีความแม่นยำสูง ค่า r^2 ในตารางพบว่าค่าที่ต่ำที่สุดคือ 0.70 เป็นค่าที่มีความแม่นในระดับปานกลาง และค่าที่สูงที่สุดคือ 1.00 เป็นค่าที่มีความแม่นยำสูง จากสมการคณิตศาสตร์ของเทคนิค NIRS ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้กับหญ้าหมักมีความรวดเร็วและแม่นยำแต่ไม่สามรถทำนายส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญบางส่วนได้ ดังนั้นในการใช้ NIRS ให้มีประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่แม่นยำที่สุดจึงควรมีการแก้ไขสมการคณิตศาสตร์ในการทดสอบเพื่อความแม่นยำที่สูงขึ้น

สรุป

การใช้สมการคณิตศาสตร์เพื่อประมวลผลค่าย่านแสงที่วัดได้จากเครื่อง Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) มีความรวดเร็วและแม่นยำสูงในการทดสอบหญ้าโคลเวอร์ การปรับสมการทางคณิตศาสตร์เพื่อให้มีค่าสมการที่มีความถูกต้องและในการทดสอบเทียบควรใช้ตัวอย่างจริงในการทดสอบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำนาย ดังนั้นการประมวลผลค่าย่านแสงที่วัดได้จากเครื่อง NIRS สามารถนำมาใช้ในการทดสอบหญ้าโคลเวอร์ได้

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 2. 2019. **คู่มือการวิเคราะห์คุณภาพอ้อยด้วยเครื่องเนียร์อินฟาเรดสเปกโตรมิเตอร์** สืบค้นจาก: http://km.ocsb.go.th/Uploads/03102019**.** 10 มีนาคม.

Siamchemi. มปป. **รังสีอินฟาเรด (Infrared Radiation :IR) ประโยชน์ และอันตรายจากรังสีอินฟาเรด** สืบค้นจาก: https://www.siamchemi.com/. 26 ธันวาคม.

M. Cougnon, C. Van Waes, P. Dardenne , J. Baert and D. Reheul. 2013. “Comparison of near infrared reflectance spectroscopy calibration strategies for the botanical composition of grass-clover mixtures”. **Grass and forage Science**. 69: 167-175.

A.L. Thomson, D.J. Humphries, J.E. Archer, N.W. Grant and C.K. Reynolds. 2018. “A survey of grass-clover lay management and creation of a near infra-red reflectance spectroscopy equation to predict clover concentration”. **Animal Feed Science and Technology**. 245: 48-53.

A.L. Thomson, D.J. Humphries, C. Rymer, J.E. Archer, N.W. Grant and C.K. Reynolds. 2018. “Assessing the accuracy of current near infra-red reflectance spectroscopy analysis for fresh grass-clover mixture silages and development of new equations for this purpose”. **Animal Feed Science and Technology**. 239: 94-106.