

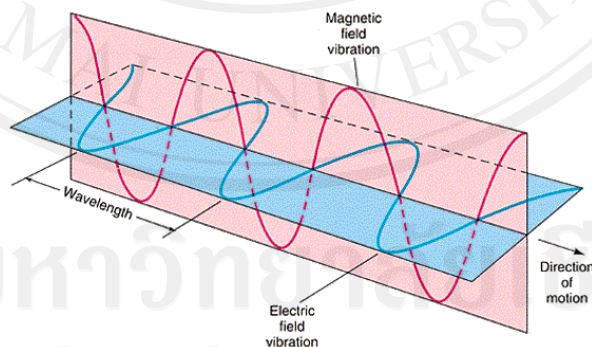
บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สเปกโทรสโกปี (Spectroscopy)

สเปกโทรสโกปี มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินคือ *spectrum* (รูปร่าง หรือ ภาพ) และรากศัพท์ภาษากรีกคือ *skopia* (มองดู) รวมกันแล้วหมายถึง การดูภาพแสงที่มาจากตัวอย่าง (Williams and Norris, 2001) เป็นการศึกษาที่ว่าด้วยการวัดและการวิเคราะห์รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า สสารดูดกลืนเข้าไปหรือเปล่งออกมา

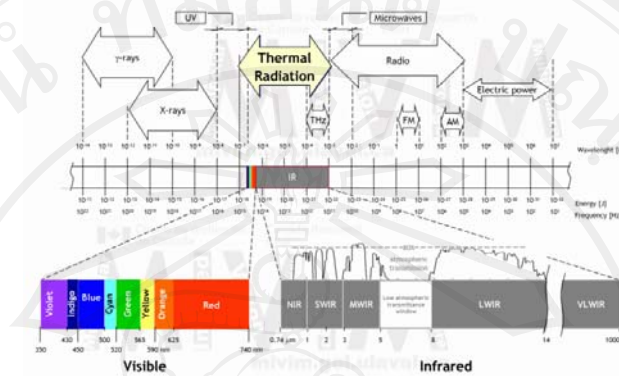
1. รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) มีคุณสมบัติ 2 แบบ ได้แก่ คลื่น (wave) และอนุภาค (particle) เมื่อพิจารณาคูสมบัติรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าแบบคลื่น จะมีลักษณะเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าชนิดคลื่นไซน์ (sine wave) ที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วนตั้งฉากกัน คือ ส่วนที่มีสมบัติไฟฟ้า (electric field) และส่วนที่มีสมบัติแม่เหล็ก (magnetic field) ระยะห่างระหว่างยอดคลื่นที่อยู่ติดกันเรียกว่า ความยาวคลื่น (λ) ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพ 2.1 ลักษณะคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Block, 2010)

ด้วยคุณสมบัติที่เป็นคลื่นจึงสามารถเกิดปรากฏการณ์เกี่ยวกับการสะท้อน (reflection) การหักเห (refraction) การเลี้ยวเบน (diffraction) หรือการกระเจิง (scattering) ได้

2. สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic spectrum) แสดงถึงลำดับแถบแม่เหล็กไฟฟ้าทั้งหมด โดยเริ่มตั้งแต่รังสีแกมมาที่มีพลังงานสูงสุดจนถึงคลื่นวิทยุที่มีพลังงานต่ำสุด ดังแสดงในภาพ 2.2



ภาพ 2.2 สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า (Ibarra-Castanedo, 2007)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near infrared spectroscopy; NIRS)

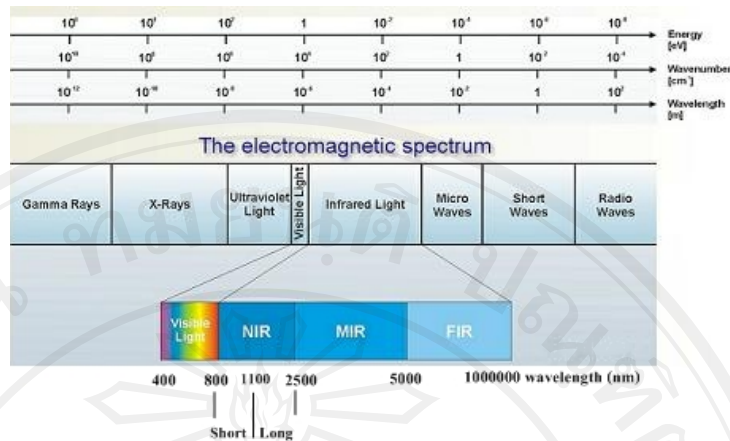
เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1800 โดย Sir William Herschel เป็นนักดาราศาสตร์ โดยได้ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของความร้อน (heating effect) ในช่วงความยาวคลื่นต่างๆของแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการแยกแสงด้วยแท่งปริซึม พบว่าผลกระทบของความร้อนเกิดขึ้นสูงสุดในแถบแสงที่อยู่ถัดไปจากแสงสีแดง แต่ไม่สามารถมองเห็นสเปกตรัมได้ จึงเรียกช่วงรังสีที่ค้นพบว่ารังสีอินฟราเรด (infrared; IR)

รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ หมายถึง รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่จัดอยู่ในรังสีอินฟราเรด โดยช่วงคลื่นอินฟราเรด สามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ อินฟราเรดย่านใกล้ (Near infrared; NIR) อินฟราเรดย่านกลาง (Mid infrared; Mid IR) และอินฟราเรดย่านไกล (Far infrared; Far IR) ตามลำดับ ดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 การแบ่งช่วงความยาวคลื่นของรังสีอินฟราเรด

ช่วง	ความยาวคลื่น (nm)	จำนวนคลื่น (cm ⁻¹)	ย่านอันตรกิริยา
อินฟราเรดย่านใกล้ (Near IR, NIR)	800-2500	12500-4000	โอเวอร์โทน, คอมบิเนชัน
อินฟราเรดย่านกลาง (Mid IR)	2500-25000	4000-400	การสั่นแบบพื้นฐาน
อินฟราเรดย่านไกล (Far IR)	2500-25000	4000-400	การสั่นแบบพื้นฐาน

คลื่นแสงอินฟราเรด เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่างช่วงคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (visible) และช่วงคลื่นแสงอินฟราเรดย่านกลาง ดังในภาพ 2.3 มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 800-2500 นาโนเมตร จำนวนลูกคลื่น (wave number) 12,500-4,000 cm⁻¹ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วงคลื่น คือ คลื่นสั้นมีความยาวคลื่นระหว่าง 800-1100 นาโนเมตร เป็นช่วงที่มีพลังงานสูง สามารถทะลุทะลวงเข้าไปในเนื้อตัวอย่างได้ดี โดยทั่วไปสามารถทะลุเข้าไปได้ถึง 1 เซนติเมตร จึงมักนิยมใช้ช่วงคลื่นสั้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทผลไม้ที่มีเปลือก ลำแสงจะผ่านเข้าไปถึงเนื้อที่อยู่ภายใน ทำให้ได้ข้อมูลสเปกตรัม เนื้อในของตัวอย่าง และคลื่นยาวมีความยาวคลื่นระหว่าง 1100-2500 นาโนเมตร มีพลังงานต่ำกว่าช่วงคลื่นสั้น โดยทั่วไปลำแสงสามารถทะลุผ่านได้ไม่เกิน 5 มิลลิเมตร เหมาะกับตัวอย่างทั่วไปทั้งของเหลวและของแข็ง เป็นช่วงที่ให้ข้อมูลทางเคมีมากกว่าช่วงคลื่นสั้นเนื่องจากเป็นช่วงที่แถบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่ง (first overtone) และคอมบิเนชัน (combination) ปรากฏ (ศุมาพร, 2552; Osborne *et al.*, 1993b)



ภาพ 2.3 ช่วงสเปกตรัมของคลื่นแสงอินฟราเรด (Simon, 2009)

พลังงานของคลื่นแสง NIR จะอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับการสั่น (vibration) ของพันธะภายในโมเลกุล หากการสั่นของพันธะใดเกิดที่ความถี่ตรงกับความถี่ของคลื่นแสง NIR จะเกิดการดูดกลืนขึ้น (Osborne *et al.*, 1993b) การดูดกลืนแสง NIR ใช้มากในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพของสารประกอบอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

2.2 การสั่นของโมเลกุล (molecule vibration)

จากทฤษฎีกลศาสตร์ควอนตัม อธิบายว่าโมเลกุลของสารประกอบขึ้นด้วยอะตอมที่เชื่อมต่อกันด้วยการสร้างพันธะเคมี (chemical bonding) พันธะในโมเลกุลจะเกิดการสั่น (vibration) อยู่ตลอดเวลา เรียกการสั่นชนิดนี้ว่า การสั่นในสถานะพื้น (vibrational ground state) ด้วยความถี่ซึ่งมีค่าเฉพาะ (quantized frequency) ถ้าโมเลกุลเกิดอันตรกิริยากับแสง NIR จะดูดกลืนรังสีที่มีความถี่ตรงกับความถี่ค่าเฉพาะ จนทำให้เกิดการสั่นในสถานะกระตุ้น (vibrational excited state) ระดับโอเวอร์โทน โมเลกุลไม่สามารถอยู่ในสถานะกระตุ้นได้จึงต้องคายพลังงานออกมาในรูปความร้อนเพื่อให้กลับคืนสู่การสั่นในสถานะพื้นตามเดิม เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า แทรนซิชัน (transition)

เทคนิค NIRS เป็นการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสง พลังงานของคลื่นแสง NIR ที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างเป็นจะถูกดูดกลืนโดยองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่งนั้น โมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง NIR ประกอบด้วยโมเลกุลของ X-H โดยที่ X คือ อะตอมของคาร์บอน, ไนโตรเจน, ออกซิเจน, หรือซัลเฟอร์ และ H คือ อะตอมของไฮโดรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก

ของสารอินทรีย์ เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง NIR ที่มีความถี่ตรงกับความถี่การสั่นของพันธะ โมเลกุลก็จะถูกกระตุ้นจากสถานะพื้น (ground state) ไปสู่สถานะกระตุ้น (excited state) กลายเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานสูงขึ้นทำให้เกิดการสั่น (vibration) หรือการหมุน (rotation) ของโมเลกุล

โมเลกุลของสารจะดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดได้นั้นมีข้อกำหนดที่สำคัญดังนี้

1. พลังงานของรังสีที่โมเลกุลดูดกลืนเข้าไป ต้องพอดีกับผลต่างของระดับพลังงานที่ทำให้เกิดแทรนซิชันของการสั่น

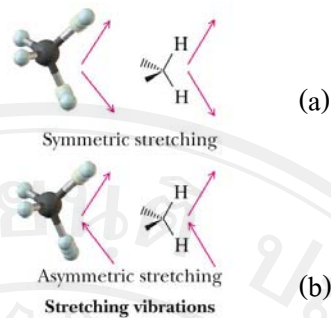
2. พลังงานต้องทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โมเมนต์ขั้วคู่ (dipole moment) ของโมเลกุล เรียกโมเลกุลนี้ว่า ไออาร์แอ็กทีฟ (IR-active) ได้แก่โมเลกุลที่ประกอบด้วยอะตอมต่างกัน ส่วนโมเลกุลที่ไม่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ได้ เรียก ไออาร์อินแอ็กทีฟ (IR-inactive) ได้แก่โมเลกุลที่ประกอบด้วยอะตอมที่เหมือนกัน เช่น O_2 , N_2 เป็นต้น เพราะไม่มีสนามแม่เหล็กเกิดขึ้นระหว่างอิเล็กตรอนของโมเลกุลอิสระกับสนามแม่เหล็กในช่วงรังสีอินฟราเรด

การสั่นของพันธะตามธรรมชาติ มีอยู่ทั้งหมด 2 แบบคือ การยืดหด (stretching) และการงอ (bending)

2.2.1 การสั่นแบบยืดหด (stretching vibration) เป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวระหว่างอะตอมที่สร้างพันธะกัน โดยเป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวของพันธะโมเลกุลระหว่างอะตอม จะทำให้ระยะห่างระหว่างอะตอมยาวขึ้น หรือสั้นลง มีทั้งแบบสมมาตร (symmetric stretching) และไม่สมมาตร (asymmetric stretching)

2.2.1.1 การยืดแบบสมมาตร (symmetric) คือพันธะระหว่างโมเลกุลทั้ง 2 ยืดออกหรือยัดเข้าเท่าๆกัน ดังภาพ 2.4 (a)

2.2.1.2 การยืดแบบไม่สมมาตร (asymmetric) คือ พันธะระหว่างโมเลกุลทั้ง 2 ยืดออกหรือยัดเข้าไม่เท่ากัน ดังภาพ 2.4 (b)



ภาพ 2.4 การสั่นแบบการยืดแบบสมมาตรและการยืดแบบไม่สมมาตร (พรหมทิพย์, 2548)

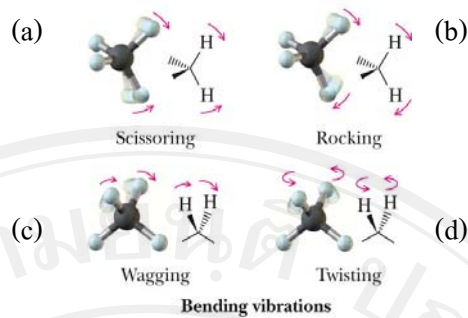
2.2.2 การสั่นแบบงอ (bending vibration) หรือการผิดรูป (deformation) เป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมุมของพันธะ โมเลกุลระหว่างอะตอม จะทำให้มุมระหว่างอะตอมกว้างออกหรือลดลง รูปแบบการสั่นแบบงอได้แก่

2.2.2.1 การงอแบบกรรไกร (scissoring) สองอะตอมที่ต่อกับอะตอมกลางแกว่งไปด้านข้างในระนาบของโมเลกุล ดังภาพ 2.5 (a)

2.2.2.2 การงอแบบโคลง (rocking) สองอะตอมที่ต่อกับอะตอมตรงกลางเคลื่อนที่เข้าหากันหรือออกจากกัน ในระนาบของโมเลกุล ดังภาพ 2.5 (b)

2.2.2.3 การงอแบบกระดิก (wagging) สองอะตอมที่ต่อกับอะตอมตรงกลางแกว่งไปข้างหน้าและข้างหลังนอกระนาบของโมเลกุล ดังภาพ 2.5 (c)

2.2.2.4 การงอแบบบิด (twisting) สองอะตอมที่ต่อกับอะตอมตรงกลางหมุนรอบพันธะนอกระนาบของโมเลกุลดังภาพ 2.5 (d)

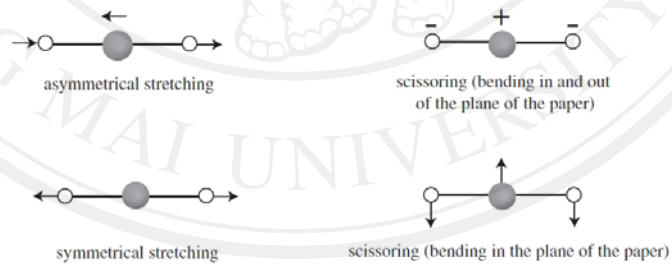


ภาพ 2.5 การสั่นแบบงอ (a) การงอแบบกรรไกร, (b) การงอแบบโคลง, (c) การงอแบบกระดิก และ (d) การงอแบบบิด (พรหมทิพย์, 2548)

ในกรณีที่มีโมเลกุลประกอบด้วยอะตอมจำนวนมาก หรือมีโครงสร้างซับซ้อน การคำนวณหาจำนวนแบบการสั่นจะทำได้ยากมาก สำหรับโมเลกุลที่มีจำนวนอะตอมน้อยๆ สามารถคำนวณหาจำนวนแบบการสั่นแบบพื้นฐานได้ดังนี้

จำนวนการสั่นหลักของโมเลกุลที่พบในการสั่นแบบพื้นฐานสามารถคำนวณได้ดังสูตรดังนี้

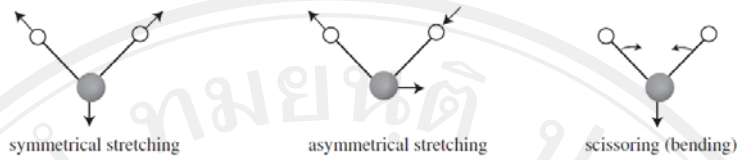
จำนวนแบบการสั่น = $3n-5$ เมื่อ n คือ จำนวนอะตอมสำหรับโมเลกุลที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (linear molecule) เช่น CO_2 จะมีแบบการสั่น = $(3 \times 3) - 5 = 4$ แบบ ดังภาพ 2.6



ภาพ 2.6 จำนวนแบบการสั่นของ CO_2 (Department of chemistry and biochemistry, 2002)

ผลการคำนวณแบบการสั่นมี 4 แบบ แต่การสั่นทำให้เกิดพีก (peak) มีเพียง 3 แบบการสั่น คือ การยืดแบบไม่สมมาตร การงอในระนาบ และการงอนอกระนาบ ส่วนการยืดแบบไม่สมมาตรไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่จึงไม่ดูดกลืนพลังงานจัดเป็น ไออาร์อินแอ็กทีฟ นอกจากนี้ยังปรากฏพีกให้เห็นเพียง 2 พีก คือ พีกเนื่องจากการยืดแบบไม่สมมาตร ส่วนการงอในระนาบและนอกระนาบเกิดพีกตำแหน่งเดียวกัน จึงซ้อนทับกันเห็นเป็นพีกเดียว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ดับเบิลดีเจเนอเรชัน (double degeneration)

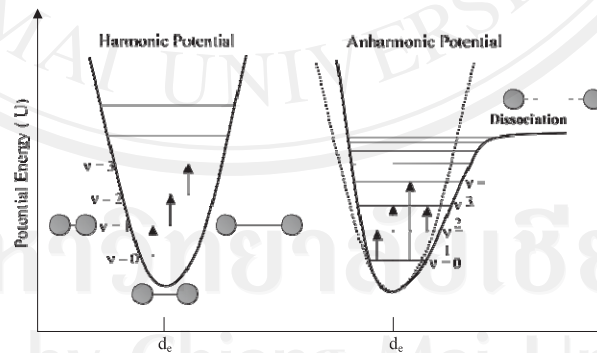
จำนวนแบบการสั่น = $3n-6$ สำหรับโมเลกุลที่มีโครงสร้างไม่เป็นเส้นตรง (nonlinear molecule) เช่น H_2O จะมีการสั่นพื้นฐานได้ 3 แบบ เนื่องจากมีโครงสร้างไม่เป็นเส้นตรง ดังภาพ 2.7



ภาพ 2.7 จำนวนแบบการสั่นของ H_2O (Department of chemistry and biochemistry, 2002)

ลักษณะการสั่นของพันธะในโมเลกุลด้วยรังสีอินฟราเรด (IR) และเนียร์อินฟราเรด (NIR) สเปกโทรสโกปีของโมเลกุลที่ประกอบด้วย 2 อะตอมเท่านั้น การสั่นของพันธะระหว่างโมเลกุลที่มี 2 อะตอม จะมีลักษณะคล้ายกับมีมวล 2 ก้อน ต่อกันด้วยสปริง

การสั่นของโมเลกุลสามารถอธิบายได้จากตัวอย่างของการสั่นแบบฮาร์โมนิกอย่างง่าย (harmonic oscillator) เป็นการเปลี่ยนแปลงพลังงานศักย์กับระยะห่างระหว่างอะตอม และการสั่นของโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมีชื่อเรียกว่า การสั่นแบบแอนฮาร์โมนิก (anharmonic oscillator) การสั่นแบบนี้จะมีระดับพลังงานแทนซิซันของสองระดับพลังงานที่อยู่ติดกันไม่เท่ากัน แต่จะแคบลงเมื่อเลขควอนตัมของการสั่นสะท้อน (v) มีค่าเพิ่มขึ้น เป็นเพราะว่ายิ่งระยะห่างระหว่างอะตอมหรือความยาวพันธะยาวขึ้น ความแข็งแรงของพันธะจะยิ่งลดน้อยลง การเคลื่อนไหวของโมเลกุลก็จะเป็นอิสระมากขึ้น พลังงานการสั่นจึงต่ำกว่าที่คาดไว้ดังภาพ 2.8



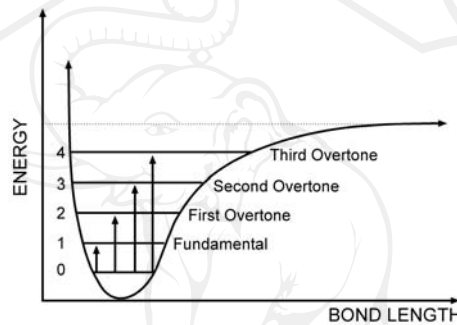
ภาพ 2.8 การสั่นแบบฮาร์โมนิกและการเปลี่ยนแปลงพลังงานศักย์ของโมเลกุลสำหรับการสั่นแบบแอนฮาร์โมนิก; d_e = equilibrium distance, U = minimum (Pasquini, 2003)

2.2.2 กระบวนการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรด

โมเลกุลที่สามารถดูดกลืนรังสีอินฟราเรด จะต้องมิลักษณะสำคัญ ดังนี้

1. ประกอบด้วยพันธะ X-H; X ได้แก่ C, O, N, S ฯลฯ
2. ควรมีคุณสมบัติตามกฎการเลือก (selection rule)
3. เกิดการสั่นแบบ โอเวอร์ โทน (overtone vibration) การสั่นแบบ โอเวอร์ โทนเป็น

ปรากฏการณ์ที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้เข้าไปทำให้เกิดการแทนที่ชั้นเปลี่ยนระดับพลังงานการสั่นจากระดับพื้น ($v=0$) ไปยังระดับกระตุ้นที่ 2,3....ขึ้นไป จะได้พีกที่เรียกว่าแถบโอเวอร์ โทน มีลักษณะความเข้มต่ำฐานกว้างดังภาพ 2.9



ภาพ 2.9 การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นแบบ โอเวอร์ โทนของโมเลกุลที่ดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ตามกฎการสั่นแบบแอนฮาร์โมนิก (Tigabu, 2003)

4. เกิดการสั่นแบบคอมบิเนชัน (combination vibration) การสั่นแบบคอมบิเนชันหรือแบบรวม

เกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลหนึ่งๆ มีการสั่นได้หลายชนิดและเกิดในเวลาพร้อมกัน บางครั้งการสั่นที่ต่างชนิดกันเกิดการรวมกันได้ จึงเกิดเป็นแถบคอมบิเนชันขึ้น

พีก (peak) หรือ แถบ (band) การดูดกลืนระดับโอเวอร์ โทนที่พบในช่วงเนียร์อินฟราเรด เกิดจากการดูดกลืนพลังงานเข้าไปทำให้เกิดการแทนที่ชั้นจากระดับพลังงานการสั่นที่สถานะพื้น ไปยังสถานะกระตุ้นมากกว่าเท่าตัว ดังนี้

การแทนที่ชั้นจากระดับ $v = 0 \rightarrow v = 2$ เรียกโอเวอร์ โทนอันดับหนึ่ง (first overtone)

การแทนที่ชั้นจากระดับ $v = 0 \rightarrow v = 3$ เรียกโอเวอร์ โทนอันดับสอง (second overtone)

การแทนที่ชั้นจากระดับ $v = 0 \rightarrow v = 4$ เรียกโอเวอร์ โทนอันดับสาม (third overtone)

โดยทั่วไปแถบโอเวอร์โทนจะมีความเข้มหรือค่าการดูดกลืนต่ำ เมื่อเทียบกับพีกที่เกิดจากการเปลี่ยนระดับพลังงานพื้นฐาน ($v = 0 \rightarrow v = 1$) ถึง 10 และ 100 เท่าตัว โดยแถบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งมีความเข้มสูงสุด รองลงมาคือโอเวอร์โทนอันดับสอง และสามตามลำดับ ดังนั้นไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโอเวอร์โทนอันดับที่สามขึ้นไป เนื่องจากมีความเข้มต่ำมาก

2.3 กลุ่มความถี่ (group frequencies)

การเกิดแถบคลื่นแสงเนียร์อินฟราเรด เกิดจากลักษณะของการสั่นแบบโอเวอร์โทน และคอมบิเนชัน การสั่นลักษณะดังกล่าวเป็นการระบุตำแหน่งของการตอบสนองต่อการสั่นของโมเลกุลของสารที่สามารถดูดกลืนแสง NIR ได้ดี โดยมีหลายกลุ่มความถี่ดังนี้

2.3.1 การสั่นแบบโอเวอร์โทนของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอน-ไฮโดรเจน (Carbon-Hydrogen overtone bands) คาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นโมเลกุลขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ และอยู่ในช่วงการสั่นแบบพื้นฐานของแถบช่วงคลื่นตั้งแต่ $v = 2972-2843 \text{ cm}^{-1}$ สำหรับโมเลกุลของแอลเคน(alkanes), ช่วง $v = 3010-3095 \text{ cm}^{-1}$ สำหรับโมเลกุลของแอลคีน (alkyne) และระบบอะโรมาติกที่ $v = 3310-3095 \text{ cm}^{-1}$ สำหรับโมเลกุลของแอลไคน์ (alkynes) แถบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของแอลเคน (alkanes) พบที่ความยาวคลื่น 1700 นาโนเมตร Tosi and Pinto (1972) ได้ศึกษาแอลเคน 50 กลุ่มตัวอย่างในช่วงคลื่น NIR ตั้งแต่ความยาวคลื่น 1690-1770 นาโนเมตร พบว่าสามารถระบุพีกที่ชัดเจนของโมเลกุลแอลเคนได้ 5 พีกคือช่วงความยาวคลื่น 1693, 1710, 1724, 1757 และ 1770 นาโนเมตร ในขณะที่ Wheeler (1959) ได้รายงานช่วงความยาวคลื่น 1659 และ 1705 นาโนเมตรสำหรับระบุตำแหน่งของกลุ่มเมทิล (methyl group) และกลุ่มเมทิลีน (methylene group) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1725 และ 1765 นาโนเมตร Rose (1938) ได้รายงานว่าพบแถบเมทิลีน (methylene bands) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1730 และ 1764 นาโนเมตรและแถบเมทิล (methyl bands) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1703, 1707 และ 1724 นาโนเมตร

เช่นเดียวกับการศึกษาโอเวอร์โทนอันดับสองโดยพบที่ความยาวคลื่น 1150 นาโนเมตร รวมทั้งโมเลกุลของเมทิลในช่วงตำแหน่งการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 1190 นาโนเมตรและโมเลกุลเมทิลีนที่ความยาวคลื่น 1210 นาโนเมตร (Liddel and Kasper, 1933) รวมทั้งที่ความยาวคลื่น 1195 และ 1215 นาโนเมตรตามลำดับ (Wheeler, 1959) ที่ความยาวคลื่น 1152, 1190 พบแถบของเมทิล และที่ความยาวคลื่น 1210 นาโนเมตรพบแถบของเมทิลีน (Rose, 1938) แถบของโมเลกุลเมทิลีน

ในพอลิเมอร์ที่ความยาวคลื่น 1214 นาโนเมตร และโมเลกุลของพอลิเอทิลีนของไนลอน (nylon) ที่ความยาวคลื่น 1206 นาโนเมตร (Glatt and Ellis, 1951) โอเวอร์โทนอันดับสามเป็นพบที่ความเข้มต่ำในช่วงความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

กลุ่มอะโรมาติก CH (aromatic CH group) ประกอบด้วยการสั่นของโมเลกุลที่โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งและโอเวอร์โทนอันดับสองที่ความยาวคลื่น 1685 และ 1143 นาโนเมตร (Wheeler, 1959) โอเวอร์โทนอันดับสองในช่วงความยาวคลื่น 1136-1149 นาโนเมตร (Liddel and Kasper, 1933) และโอเวอร์โทนอันดับที่หนึ่งและโอเวอร์โทนอันดับที่สองในช่วงความยาวคลื่น 1695 และ 1143 นาโนเมตร (Rose, 1938) ถ้ามีโมเลกุลที่มีเข้ามาแทนที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นช่วงการสั่นพื้นฐานของหมู่ฟังก์ชัน CH รวมทั้งเกิดโอเวอร์โทนขึ้น เช่น การสั่นของโมเลกุลเมทิลที่เกิดในช่วงความยาวคลื่น 1690 นาโนเมตร เมื่อเกิดการแทนที่ของโมเลกุลแอลแคนจะเคลื่อนไปที่ความยาวคลื่น 1720 นาโนเมตรในแถบสเปกตรัมของเมทานอล และช่วงความยาวคลื่น 1730 นาโนเมตรในกรดเอทานอิก (ethanoic acid) หรือช่วงความยาวคลื่นที่ 1650 นาโนเมตรในอีเทนไนไตร (ethane nitrile) ช่วงของ CH ในไนลอน (nylon) และโปรตีนเกิดการสั่นของโมเลกุลในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันของกลุ่มแปปไทด์ที่ 1190, 1700, 1730 และ 1760 นาโนเมตรของโปรตีนในข้าวสาลี (Law and Tkachuk, 1977) แป้งและเพนโตเซน (pentosan) พบที่ความยาวคลื่น 1200, 1700, 1720, 1780 นาโนเมตร ในขณะที่ไขมันของข้าวสาลีพบที่ความยาวคลื่น 1170, 1210, 1720 และ 1760 นาโนเมตร (Law and Tkachuk, 1977) กรดไขมันประกอบด้วยโมเลกุลของหมู่ฟังก์ชัน CH_2 โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งพบที่ความยาวคลื่น 1740 และ 1770 นาโนเมตร และ $=\text{CH}$ โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งในช่วงความยาวคลื่น 1680 นาโนเมตร (Holman and Edmondson, 1956)

2.3.2 การสั่นแบบโอเวอร์โทนของออกซิเจน-ไฮโดรเจน (Oxygen-hydrogen overtone bands) Curcio and Petty (1951) พบสเปกตรัมของน้ำในช่วงโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งถึงโอเวอร์โทนอันดับสามของ OH str. ที่ช่วงความยาวคลื่น 1450, 970 และ 760 นาโนเมตร ตำแหน่งแถบการดูดกลืนของช่วง OH มีความแตกต่างกันขึ้นกับอุณหภูมิ และพันธะของไฮโดรเจนในธรรมชาติเช่น โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งพันธะ OH ของน้ำที่อยู่ร่วมกับโปรตีนพบที่ความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร (Hecht and Wood, 1956) และโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ OH ที่อยู่ร่วมกับคาร์โบไฮเดรตที่ความยาวคลื่น 1430-1440 นาโนเมตร (Osborne *et al.*, 1993b; ASTM, 1995) พันธะ OH ของ

โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของแอลกอฮอล์และฟีนอลเกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 1405-1425 นาโนเมตร (Goddu,1960) รวมทั้งโอเวอร์โทนอันดับสองในช่วงความยาวคลื่น 945 และ 985 นาโนเมตร รูปแบบของพันธะไฮโดรเจนเกิดจากการแทนที่ของการสั่นแบบพื้นฐานและความแตกต่างของการเปลี่ยนระดับพลังงานของการสั่นแบบโอเวอร์โทน พบที่ความยาวคลื่น 1492 และ 1110 นาโนเมตร Iwamoto *et al.*, (1987) พบว่าในช่วงความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร ประกอบด้วย 3 ช่วงความยาวคลื่นเกี่ยวข้องกับโมเลกุลของน้ำกับส่วนที่ไม่มีพันธะไฮโดรเจน, ส่วนที่มีพันธะไฮโดรเจน 1 พันธะ และพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ พบที่ความยาวคลื่น 1412, 1466 และ 1510 นาโนเมตรตามลำดับ แถบการดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการดูดกลืนเป็นผลมาจากอิทธิพลของน้ำ และความแตกต่างในแต่ละสถานะของน้ำที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผลิตภัณฑ์

Trott *et al.*, (1973) พบว่าผลของพันธะของน้ำที่มีต่อโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตและไซคลิกแอลกอฮอล์ (cyclic alcohols) สามารถเกิดได้ 3 แถบช่วงความยาวคลื่นของเส้นสเปกตรัมของโมเลกุลในกลุ่มของ cyclohexanol, α -D-glucose และ glycogen โดยช่วงความยาวคลื่นแรกที่ 1440 นาโนเมตรจะสัมพันธ์กับคาร์โบไฮเดรตของโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของการยึดโมเลกุลอิสระในกลุ่ม OH และที่ความยาวคลื่น 1490 และ 1580 นาโนเมตร สัมพันธ์กับแรงระหว่างโมเลกุลและภายในโมเลกุลของพันธะไฮโดรเจนและกลุ่มของ OH ตามลำดับ Osborne and Douglas (1981); Law and Tkachuk (1977) รายงานว่าช่วงความยาวคลื่นที่ 1450 และ 1540 นาโนเมตรสัมพันธ์กับปริมาณแป้งในข้าวสาลี

2.3.3 การสั่นแบบโอเวอร์โทนของไนโตรเจน-ไฮโดรเจน (Nitrogen-hydrogen (NH) overtone bands) เอไมด์ปฐมภูมิ (primary amide) พบที่ความยาวคลื่น 1500 และ 1530 นาโนเมตร เป็นผลมาจากการยึดของโมเลกุล NH ของโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งและความยาวคลื่นประมาณ 1000 นาโนเมตรเกี่ยวข้องกับโอเวอร์โทนอันดับสอง เอไมด์ทุติยภูมิ (secondary amide) พบในช่วงความยาวคลื่น 1520, 1540 และ 1030 นาโนเมตร และ aromatic primary amines พบในช่วงความยาวคลื่น 1460, 1500 และ 1000 นาโนเมตร สำหรับช่วงเอไมด์ตติยภูมิ (tertiary amines) ไม่พบช่วงความยาวคลื่นที่ตอบสนองต่อแสง NIR นอกจากนี้ methylamine และ dimethylamine พบในช่วงความยาวคลื่น 1520 และ 1528 นาโนเมตรตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามของพันธะ OH พบว่าเมื่อ

จับกับตำแหน่งของโมเลกุลของเอไมด์อุณหภูมิจะไม่มีผลต่อโมเลกุลของ NH แต่ปัจจัยที่มีผลคือการแทนที่ของโมเลกุลไฮโดรเจนเช่นแถบสเปกตรัมของไนลอนพบช่วงความยาวคลื่นที่ 1500 นาโนเมตรสัมพันธ์กับโมเลกุลอิสระของ NH และเกิดการเคลื่อนตัวของตำแหน่งพีกบนสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 1569 นาโนเมตรเป็นผลมาจากพันธะไฮโดรเจน (Glatt and Ellis, 1951; Foster *et al.*, 1964) การดูดกลืนของโมเลกุลเอไมด์ของ ethanamide พบการสั่นโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งแบบการยึดแบบสมมาตร (symmetric) และการยึดแบบไม่สมมาตร (asymmetric) ของโมเลกุลในกลุ่มฟังก์ชัน NH ที่ช่วงความยาวคลื่น 1430 และ 1490 นาโนเมตร N-methyl ethanamide พบที่ช่วงความยาวคลื่น 1475 นาโนเมตร (Krikorian and Mahpour, 1973) โมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยโมเลกุลเปปไทด์ (-CONH-) เชื่อมต่อกันและบางครั้งอาจพบ free amine หรือ amide side groups โดย Law and Tkachuk (1977) พบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของกลุ่มฟังก์ชัน NH ที่ความยาวคลื่น 1500 และ 1570 นาโนเมตรของโปรตีนในข้าวสาลี นอกจากนี้ Hecht and Wood (1956) พบพีก NH ที่ความยาวคลื่น 1550 นาโนเมตร

2.3.4 การสั่นแบบโอเวอร์โทนของฟังก์ชันในกลุ่มของกรดอะมิโน, เปปไทด์ และ โปรตีน (Miscellaneous overtone bands) ประกอบด้วยฟังก์ชันของ CH, OH หรือ NH มีความสำคัญมากต่อการตอบสนองคลื่นแสง NIR ในผลผลิตผลเกษตร พบกลุ่มของคาร์บอนิล (carbonyl group) ในช่วงการสั่นพื้นฐานที่โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งถึงโอเวอร์โทนอันดับห้าที่ช่วงความยาวคลื่น 2900, 1950, 1450, 1160 และ 970 นาโนเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ Kays *et al.* (2005) พบการสั่นที่ช่วงความยาวคลื่น 1480 นาโนเมตรซึ่งสัมพันธ์กับโมเลกุลของโปรตีน โดยช่วงโอเวอร์โทนอันดับสองพบที่ความยาวคลื่น 1960 นาโนเมตร สัมพันธ์กับโมเลกุลของอัลดีไฮด์ (aldehydes) และคีโตน (ketones) ช่วงความยาวคลื่น 1900-1950 นาโนเมตรสัมพันธ์กับ โมเลกุลของเอสเทอร์ (esters), ความยาวคลื่น 1920 นาโนเมตร สัมพันธ์กับโมเลกุลของเปปไทด์ และความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตรสัมพันธ์กับโมเลกุลของ carboxylic acids (Wheeler, 1959) ที่พีกดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับพีกของโมเลกุลของน้ำที่ความยาวคลื่น 1940 นาโนเมตรแต่อย่างไรก็ตามก็สามารถแยกความแตกต่างดังกล่าวได้ การสั่นแบบโอเวอร์โทนของกลุ่ม hydrogenic พบการสั่นแบบพื้นฐานในช่วงความยาวคลื่นสั้นและแบบโอเวอร์โทนกับโมเลกุลของสารประกอบของตัวอย่าง เช่นการสั่นแบบการยึดของ SH ที่โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งพบการสั่นที่โมเลกุลของ ethyl mercaptan ที่

ช่วงความยาวคลื่น 1740 นาโนเมตรเช่นเดียวกันกับที่ความยาวคลื่น 1892 นาโนเมตรที่สัมพันธ์กับโมเลกุลของ PH ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของสาร organophosphorous (Wheeler, 1959)

2.3.5 การสั่นแบบคอมบิเนชันของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอน-ไฮโดรเจน (Carbon-hydrogen combination bands) การสั่นแบบคอมบิเนชันหรือการสั่นแบบรวม(combination vibration) มีความสำคัญต่อโมเลกุลในกลุ่ม CH โดยมีผลต่อการสั่นของโมเลกุลทั้งแบบยืดหดและแบบบิดรูป พบพิกปรากฏที่ความยาวคลื่น 2000 และ 2500 นาโนเมตร และอาจพบพิกที่ต่ำกว่าในช่วงความยาวคลื่น 1300, 1450 นาโนเมตรและ 1000-1100 นาโนเมตร Law and Tkachuk (1977) พบพิกสัมพันธ์กับกลูเตนในข้าวสาลีที่ความยาวคลื่น 1390, 2290, 2300 และ 2740 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่น 1370, 2290, 2320 และ 2490 นาโนเมตรสัมพันธ์กับแป้งในข้าวสาลี และที่ความยาวคลื่น 1390, 2310 และ 2340 นาโนเมตร สัมพันธ์กับองค์ประกอบของไขมันที่พบในข้าวสาลี, ความยาวคลื่น 2314, 2354 และ 2371 นาโนเมตรพบว่ามีความสัมพันธ์กับโพลีเอทิลีน (polyethene) ที่ความยาวคลื่น 2303, 2349 และ 2370 นาโนเมตรพบว่ามีความสัมพันธ์กับไนลอน (Glatt and Ellis, 1951) โมเลกุลของ poly (2-methylpropene) พบที่ความยาวคลื่น 1400, 2260, 2310, 2350 และ 2470 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 1400, 2270, 2310, 2400, 2470 นาโนเมตร สัมพันธ์กับโมเลกุลของ polypropene (Foster *et al.*, 1964) ช่วงความยาวคลื่น 2140 และ 2190 นาโนเมตร สัมพันธ์กับกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด cis-unsaturation (Holman and Edmondson, 1956) การสั่นแบบคอมบิเนชันที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชัน =CH หรือ CH₂ และ C=C เช่น =CH str. กับ C=C str. พบที่ความยาวคลื่น 2137 นาโนเมตร ในขณะที่ CH₂ asym. str. และ C=C str. พบที่ความยาวคลื่น 2186 นาโนเมตร นอกจากนี้พันธะของคาร์บอนและไฮโดรเจนของอะตอม carbonyl carbon ของโมเลกุลอัลดีไฮด์ (aldehyde) พบการสั่นแบบพื้นฐานที่ช่วงความยาวคลื่น 2820 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 2200 นาโนเมตร สัมพันธ์กับ saturated aldehydes กับหมู่ฟังก์ชันของ C=O (Osborne *et al.*, 1993b)

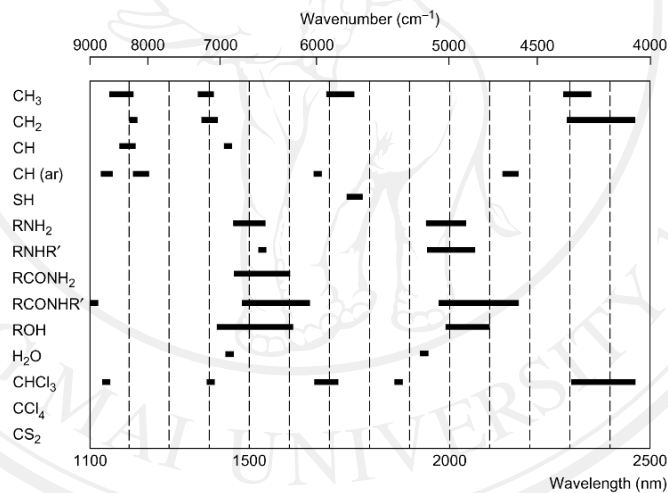
2.3.6 การสั่นแบบคอมบิเนชันของหมู่ฟังก์ชันออกซิเจน-ไฮโดรเจน (Oxygen-hydrogen combination bands) Curcio and Petty (1951) รายงานว่าพิก 1940 นาโนเมตรมีความสัมพันธ์กับโมเลกุลของน้ำ รวมทั้งที่ความยาวคลื่น 1870 และ 1996 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะไฮโดรเจนที่เป็นองค์ประกอบโมเลกุลของน้ำ (Giangiacomo (2006); Frank and Wen (1957); Nemethy and

Scheraga (1962); Bujis and Choppin (1963) รายงานว่า ที่ความยาวคลื่น 1000 และ 1300 นาโนเมตร เกี่ยวข้องกับ 3 รูปแบบของการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของน้ำ และยังพบว่าที่ความยาวคลื่น 1160 นาโนเมตร เกี่ยวข้องกับการสั่นใกล้เคียงกับกลุ่มของ OH, ที่ความยาวคลื่น 1200 นาโนเมตร เกี่ยวข้องกับการสั่นของ 1 กลุ่มพันธะ OH และที่ความยาวคลื่น 1250 นาโนเมตร สัมพันธ์กับ 2 OHs ของ H-bonded และ Hecht and Wood (1956) รายงานว่า พิก 1945 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะของน้ำถึงโมเลกุลของโปรตีน ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวพบว่าเกี่ยวข้องกับการสั่นแบบคอมบิเนชันของ OH str. กับ OH def. มีความสำคัญต่อการดูดกลืนต่อช่วงแสง NIR นอกจากนี้ยังพบช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวเกิดจากสารประกอบในหมู่ไฮดรอกซิล เช่น ความยาวคลื่น 2080 นาโนเมตร ในเอทานอล เกิดจาก OH str. และ OH def. Osborne and Douglas (1981) พบว่าการสั่นแบบโอเวอร์โทนและคอมบิเนชันของฟังก์ชันในกลุ่ม OH อาจเกิดการเลื่อนของพิกข้างเป็นผลมาจากพันธะไฮโดรเจน การสั่นแบบคอมบิเนชันพบในกลุ่มของฟังก์ชันระหว่าง OH str. และ C-O str. หรือ C-C str. รวมทั้ง Labbé *et al.* (2008) พบความสัมพันธ์ของ OH ของน้ำกับองค์ประกอบภายในของ switchgrass ที่ความยาวคลื่น 1425, 1722, 1907, 1953, 2116 และ 2260-2380 นาโนเมตร

2.3.7 การสั่นแบบคอมบิเนชันของหมู่ฟังก์ชันไนโตรเจน-ไฮโดรเจน (Nitrogen-hydrogen combination bands) เอไมด์ปฐมภูมิ (primary amines) พบการสั่นแบบคอมบิเนชันของ NH str. และ NH def. ที่ช่วงความยาวคลื่น 2000 นาโนเมตรเช่นเดียวกันกับ Krikorian and Mahpour (1973) รายงานว่าช่วงความยาวคลื่น 1960, 2000, 2050, 2100 และ 2150 นาโนเมตรสัมพันธ์กับโมเลกุลของเอไมด์ปฐมภูมิ โดยเกี่ยวข้องกับการสั่นของหมู่ฟังก์ชัน NH asym. str. กับ amide II, NH sym. str. กับ amide II, NH asym. str. กับ amide III, NH sym. str. กับ amide III และ twice amide I กับ amide III ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเฉพาะช่วง 3 ความยาวคลื่นจะเกิดการสั่นกับหมู่ฟังก์ชันของเอไมด์ทุติยภูมิ (secondary amides) ได้แก่ ที่ความยาวคลื่น 2000 นาโนเมตรสัมพันธ์กับฟังก์ชัน NH str. กับ amide II, ความยาวคลื่น 2100 นาโนเมตรสัมพันธ์กับฟังก์ชัน NH str. กับ amide III และ ความยาวคลื่น 2050 นาโนเมตรสัมพันธ์กับโมเลกุลของไนลอน (Glatt and Ellis, 1951) โมเลกุลของโปรตีนสามารถพบ 3 ช่วงความยาวคลื่นเด่นของการสั่นแบบคอมบิเนชัน NH ได้แก่ ความยาวคลื่น 1980, 2050 และ 2180 นาโนเมตร (Law and Tkachuk, 1977) ช่วงความยาวคลื่น 2058 และ 2174 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะในหมู่ฟังก์ชันของ α -polypeptides (Elliott *et al.*,

1954) นอกจากนี้ Hecht and Wood (1956) พบพีกที่ความยาวคลื่น 2060 นาโนเมตร สัมพันธ์กับ NH str., H-bonded กับ NH def., amide II และความยาวคลื่น 2180 นาโนเมตรสัมพันธ์กับ twice C=O str., amide I กับ amide III

ในคริสต์ศักราชที่ 1980 ได้มีการรวบรวมตำแหน่งพีกที่ความยาวคลื่นต่างๆที่ตอบสนองต่อช่วงแสง NIR เพื่อเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ โดยที่ University of Aberdeen in Scotland Murray (1987,1988) ได้จัดทำแผนภูมิฟังก์ชันของการดูดกลืนแสง NIR ในสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ รวมทั้ง ผลผลิตเกษตรที่มีโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชัน CH, OH และ NH เป็นส่วนประกอบดังภาพ 2.10 และมีการรวบรวมตำแหน่งแถบในสเปกตรัม NIR ที่สำคัญ ดังตาราง 2.2



ภาพ 2.10 ช่วงความยาวคลื่นที่สำคัญของการดูดกลืนแสง NIR (Osborne *et al.*, 1993b; Burns and Ciurczak, 2001)

ตาราง 2.2 ตำแหน่งแถบในสเปกตรัม NIR ที่สำคัญ

Wavelength (nm)	Bond vibration	Structure
760	O-H str. third overtone	H ₂ O
762	C-H str. fourth overtone	CH ₂
874	C-H str. third overtone	benzene
900	C-H str. third overtone	CH

ตาราง 2.2 ตำแหน่งแถบในสเปกตรัม NIR ที่สำคัญ (ต่อ)

Wavelength (nm)	Bond vibration	Structure
910	C-H str. overtone	protein
928	C-H str. third overtone	oil
990	O-H str. second overtone	starch
1020	2×N-H str. + 2×amide I	protein
1037	2×C-H str. + 2×C-H def. + (CH ₂) _n	oil
1143	C-H str. second overtone	aromatic
1395	2×C-H str. + C-H def.	CH ₂
1410	O-H str. first overtone	ROH
1440	O-H str. first overtone	sucrose, starch
	2×C-H str. + C-H def.	CH
1450	O-H str. first overtone	starch, H ₂ O
1480	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	glucose
1490	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	cellulose
1510	N-H str. first overtone	protein
1528	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	starch
1540	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	starch
1580	O-H str. first overtone (intermol. H-bond)	starch, glucose
1685	C-H str. first overtone	aromatic
1725	C-H str. first overtone	CH ₂
1765	C-H str. first overtone	CH ₂
1780	C-H str. first overtone	cellulose
1820	O-H str. + 2×C-O str.	cellulose
1900	O-H str. + 2×C-O str.	starch
1930	O-H str. + H-O-H def. combination	starch, cellulose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

ตาราง 2.2 ตำแหน่งแถบในสเปกตรัม NIR ที่สำคัญ (ต่อ)

Wavelength (nm)	Bond vibration	Structure
1940	O-H str. + O-H def.	H ₂ O
1980	N-H asym. str. + amide II	protein
2000	2×O-H def. + C-O def.	starch
	N-H sym. str. + amide II	CONH ₂ , CONHR
2050	N-H sym. str. + amide II	protein
2055	N-H asym. str. + amide I combination	protein
2060	N-H bend 2 nd overtone	protein
	N-H bend + N-H str. combination	protein
2070	O-H combination	oil
2080	O-H str. + O-H def. combination	ROH, sucrose, starch
2100	2×O-H str. + 2× C-O str. combination	starch
	C-O-O asym. str. 3 rd overtone	starch, cellulose
2132	N-H str. + C=O str. combination	amino acid
2140	C-H sym. def.	oil, NC=CH
2180	2×amide I + amide III	protein
2252	O-H str. + O-H def. combination	starch
2276	O-H str. + C-C str. combination	starch
2294	N-H str. + C=O str.	amino acid
2300	C-H bend 2 nd overtone	protein
2310	C-H str. + C-H def. combination	CH ₂
	C-H bend 2 nd overtone	oil
2323	C-H str. + C-H def. combination	CH ₂ , starch
2336	C-H str. + C-H def.	cellulose
2352	C-H def. second overtone	cellulose

ตาราง 2.2 ตำแหน่งแถบในสเปกตรัม NIR ที่สำคัญ (ต่อ)

Wavelength (nm)	Bond vibration	Structure
2380	C-H str. + C-C str. combination	oil
2461	C-H str. + C-C str. combination	starch
2470	C-N-C sym. str. 1 st overtone	protein
2488	C-H str. + C-C str. combination	starch, cellulose
2500	C-H str. + C-C str. combination	starch

ที่มา: วารุณีและคณะ, 2552; Osborne *et al.*, 1993b; Shenk *et al.*, 2001; Williams and Norris, 2001

str. = stretch, def. = deformation, sym. = symmetric, asym. = asymmetric

2.4 หลักการทำงานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (near infrared spectrophotometer)

ส่วนประกอบของเครื่อง NIR ที่สำคัญ (Siesler *et al.*, 2002) ได้แก่

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) เป็นแหล่งให้พลังงานแสงโดยชนิดของแหล่งกำเนิดแสงที่นิยมใช้ เช่น tungsten halogen เป็นแหล่งกำเนิดแสงช่วงวิสิเบิลและอุลตราไวโอเล็ต อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 2.5 ไมโครเมตร (μm) มักใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงของ NIR ด้วย

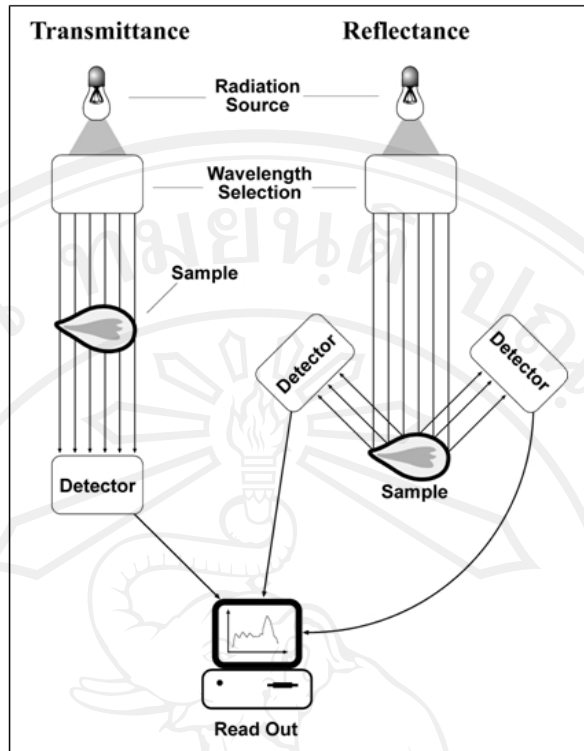
2. โมโนโครมาเตอร์ (monochomator) เป็นอุปกรณ์แยกคลื่นแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่น อุปกรณ์ที่ใช้ต้องไม่ดูดกลืนแสงในช่วง NIR เช่น ปริซึม (prisms) ทำจาก NaCl หรือ KBr และเกรตติง (grating) เป็นแผ่นแก้วหรือวัสดุโปร่งใสที่ขีดผิวหน้าให้เป็นร่องหรือแผ่นแก้วที่เคลือบโลหะหรือฟิล์มโลหะที่ขีดเงาให้เป็นร่อง โดยในปัจจุบันนิยมใช้ เกรตติง (grating) มากกว่า ปริซึม (prisms) เพราะเกรตติง (grating) สามารถแยกสเปกตรัมออกจากกันได้มากกว่า นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิยังมีผลต่อการทำงานของเกรตติง (grating) น้อยกว่าปริซึม แสงจะผ่านเกรตติง (grating) ที่มีช่องผ่านแสงเข้าและออกเพื่อควบคุมให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการ

3. ตำแหน่งที่วางตัวอย่าง (sample presentation) แสงจะกระทำกับตัวอย่างในรูปแบบที่ต้องการวิเคราะห์

4. อุปกรณ์สำหรับการตรวจวัด (detector) ทำหน้าที่บันทึกปริมาณแสงที่ตัวอย่างดูดกลืน จากนั้นจะแปลงผลเป็นสัญญาณส่งเข้าสู่ส่วนประมวลผล (read out) อุปกรณ์ที่ใช้ทำ detector มี 2 ชนิดที่นิยมใช้คือ ซิลิกา (silica type) มักใช้กับเครื่องอินฟราเรดที่ให้ความยาวคลื่นในช่วงวิสิเบิล (visible) และ NIR อีกชนิดคือ เลดซัลไฟด์ (lead sulfide, PbS) ใช้กับความยาวคลื่นช่วง 1100-2500 นาโนเมตร (Givens *et al.*, 1997)

5. ระบบอ่านสัญญาณ (read out) โปรแกรมจะประมวลผลให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้ได้ โดยจะเป็นตัวแปรค่าออกมา อาจเป็นตัวเลข หรือเป็นเส้นกราฟ แล้วบันทึกผลด้วยคอมพิวเตอร์

หลักการการทำงานของเครื่อง NIR ดังภาพ 2.11 โดยแสงจากแหล่งกำเนิดแสง ที่มีการกระจายของแสงอาศัยการดูดกลืนพลังงานแสงในแต่ละช่วงความยาวคลื่นของสารแต่ละชนิดที่มีไม่เท่ากัน และควบคุมด้วยระบบ โมโนโครมาเตอร์ มีความสามารถในการแยกลำแสงออกเป็นทีละความยาวคลื่น เพื่อที่จะใช้แสง ความยาวนั้นส่องไปยังตัวอย่าง และวัดค่าความเข้มของแสงที่สะท้อนออกมา เปรียบเทียบกับความเข้มของแสงที่ส่องเข้าไป (reflectance type) หรือวัดความเข้มของแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างเปรียบเทียบกับความเข้มของแสงที่ส่องเข้าไป (transmittance type) ด้วยอุปกรณ์สำหรับตรวจวัด (detector) กระทำแบบนี้ทีละความยาวคลื่นและนำค่าความเข้มแสงที่ได้ในแต่ละความยาวคลื่นเข้าสู่ส่วนประมวลผล (read out) จะได้กราฟการดูดกลืนแสงของตัวอย่างนั้นๆ โดยแกนนอนเป็นค่าความยาวคลื่น แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง หลังจากนั้นข้อมูลจะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อไป (พรรณทิพย์, 2548; ศิวลักษณ์, 2550)

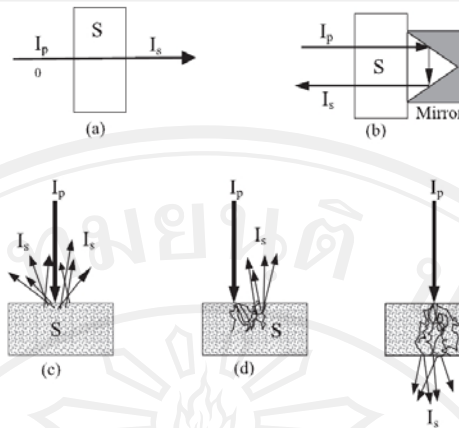


ภาพ 2.11 หลักการทำงานของเครื่อง NIR ทั้งแบบส่องผ่านและ สะท้อนกลับ (Tigabu, 2003)

2.5 แบบวิธีการวัด (sample presentation)

เทคนิคการวัดด้วยสเปกโทรเมทรีแบบ NIR (NIR spectrometry) เริ่มได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะตัวเมื่อ Karl Norris ได้เสนอว่าการวัดสเปกตรัม NIR สามารถทำได้ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลของปริมาณแสงที่สะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) จากตัวอย่างของแข็ง แทนที่จะเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลจากแสงที่ส่องผ่านซึ่งสัญญาณจะอ่อน ในปัจจุบันการวัดแสง NIR ที่สะท้อนแบบแพร่มีการประยุกต์ใช้ที่หลากหลาย

วิธีการวัดด้วยเทคนิค NIRS ที่มีการใช้มากที่สุดดังภาพ 2.12



(S: sample, I_o : incident light, I_s : light comes from the sample)

ภาพ 2.12 แบบวิธีการวัดด้วย NIRS (a) การส่องผ่าน (transmittance) (b) การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) (c) การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse transflectance) (d) อินเทอร์แอคแตนซ์ (interactance) (e) การส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงแสง (transmittance through scattering medium) (Pasquini, 2003)

การส่องผ่านในภาพ 2.12 (a) ใช้สำหรับตัวอย่างสารละลายใสบรรจุในหลอดควอทซ์หรือหลอดแก้วที่มีความหนาหรือทางเดินแสง (optical path หรือ path length) ตั้งแต่ 1 มิลลิเมตรถึง 50 มิลลิเมตร โดยตัวอย่างจะถูกฉายแสงด้านหนึ่งและถูกตรวจวัดอีกด้านหนึ่ง หลังจากส่องผ่านตัวอย่าง โดยทั่วไปแล้วแสงที่ส่องผ่านตัวอย่างจะมีปริมาณน้อยกว่าแสงสะท้อน ดังนั้นในการวัดจะต้องออกแบบระบบให้มีประสิทธิภาพเพื่อจะได้สัญญาณที่วัดได้มีอัตราส่วนระหว่างสัญญาณที่ต้องการกับสัญญาณรบกวนที่สูง (Birth and Hecht, 2001) ข้อที่ควรพิจารณาข้อหนึ่งคือ ช่วงความยาวคลื่นที่วัดตัวอย่าง โดยทั่วไปการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อความยาวคลื่นแสงสั้นลง นั่นคือในช่วงความยาวคลื่นสั้นของแสง NIR ตั้งแต่ 700-1000 นาโนเมตรจะมีแถบการดูดกลืนแสงที่อ่อน อุปกรณ์ตรวจวัดแสง NIR ในช่วงคลื่นสั้นนี้จะเป็นประเภทซิลิคอน สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำให้เลือกความหนาของหลอดดังนี้ ถ้าช่วงความยาวคลื่นคือ 970 นาโนเมตร ให้เลือกอุปกรณ์ที่มีความหนา 2-3 เซนติเมตรหรือมิลลิเมตร สำหรับการวัดความยาวคลื่น 1930 นาโนเมตรให้เลือกอุปกรณ์ที่มีความหนาน้อยกว่า 1 ทั้งนี้เนื่องจากความยาวคลื่นสูงการดูดกลืนน้ำจะมีค่าสูงดังนั้นควรใช้อุปกรณ์ที่ทำให้ตัวอย่างมีความหนาน้อยๆ เพื่อให้หน้าจะได้ไม่ดูดกลืนแสงมากจนไม่สามารถวัดแสงที่ส่องผ่านได้

ภาพ 2.12 (b) เป็นวิธีพิเศษในการวัดการส่องผ่านซึ่งเรียกว่า การส่องผ่านสะท้อน เป็นการวัดแสงที่มีการสะท้อนและส่องผ่านในตัวอย่าง แบบวิธีวัดลักษณะนี้แตกต่างจากการวัดแบบส่องผ่านในแง่ที่มีการทำให้ระยะแสงผ่านมีค่าเป็นสองเท่า นั่นคือ ทำให้แสงเดินทางผ่านตัวอย่างสองครั้ง ตามความหนาของหลอด วัดมาตรฐานอ้างอิงสำหรับการวัดทั้งสองแบบนี้บางครั้งจะใช้หลอดเปล่าถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวใส

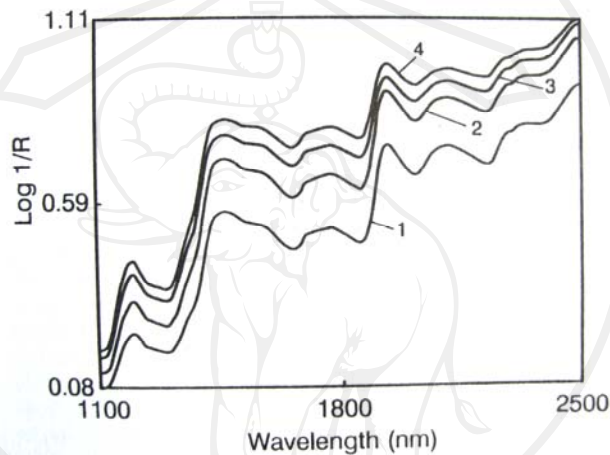
ในการวัดแบบสะท้อนดังภาพ 2.12 (c) แหล่งกำเนิดแสงและอุปกรณ์วัดแสงจะติดตั้งเป็นมุมเฉพาะต่อกันเช่นมุม 45 องศา ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการวัดแสงแบบสเปกคูลาร์ สำหรับการวัดแบบอินเทอร์แอคแทนซ์ (interactance) ดังภาพ 2.12 (d) แหล่งกำเนิดแสงและอุปกรณ์วัดแสงจะติดตั้งขนานกันเพื่อป้องกันไม่ให้แสงแบบสเปกคูลาร์สามารถส่องเข้าอุปกรณ์วัดแสงได้โดยตรง มุมการวัดคือ 90 องศา ซึ่งทำให้ได้แสงที่ผ่านตัวอย่างจริงๆ ส่วนแสงที่สะท้อนกลับมาตรงๆ บางส่วนที่ไม่ได้ผ่านเข้าไปในตัวอย่างไม่ถูกวัดเลย ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้ไฟเบอร์ออฟติกที่มีส่วนหนึ่งของใยแก้วนำแสงของ แหล่งกำเนิดแสงวางตัวเป็นวงแหวนและใยแก้วนำแสงของอุปกรณ์วัดแสงอยู่ตรงกลางภายในหัววัดเดียวกัน โดยในการวัดจะต้องวางตัวอย่างสัมผัสกับหัววัดนี้

ภาพ 2.12 (e) แสดงการวัดส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงของแสงเหมาะสำหรับวัดตัวอย่างของแข็งที่มีความหนาแน่นสูง เช่นการตรวจวัดทางคุณภาพของเม็ดยา เพราะมีความหนาหรือทางเดินของแสงที่เกิดการกระเจิงของแสงภายในและสามารถตรวจวัดหาข้อมูลองค์ประกอบของตัวอย่างได้ผลดีกว่าการวัดแบบส่องผ่านสะท้อน นอกจากนี้มีรายงานว่าความหนาหรือการส่องผ่านของแสงมีสูงถึง 65 ครั้งซึ่งสูงกว่าความหนาของเม็ดยาที่ตรวจวัด (Johanson *et al.*, 2002) การปิดกั้นแสงที่ไม่ต้องการเป็นปัจจัยสำคัญในการวัดแบบการส่องผ่านของตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เพราะมีผลในการบันทึกปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนของอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัด (Kawano, 2002a)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อเนียร์อินฟราเรดสเปกตรัมของธัญพืช (factors affecting NIR spectra in cereal)

2.6.1 ขนาดเมล็ด (kernel size) ขนาดของเมล็ดนับว่ามีความสำคัญต่อการวัดสเปกตรัมของธัญพืชทั้งเมล็ดดังแสดงในภาพ 2.13 คือความแตกต่างของสเปกตรัมเมล็ดข้าวสาลีเต็มเมล็ดกับขนาดเมล็ดที่จำแนกทางการค้า ซึ่งเมล็ดทั้งหมดมีองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน ดัชนีชี้วัด

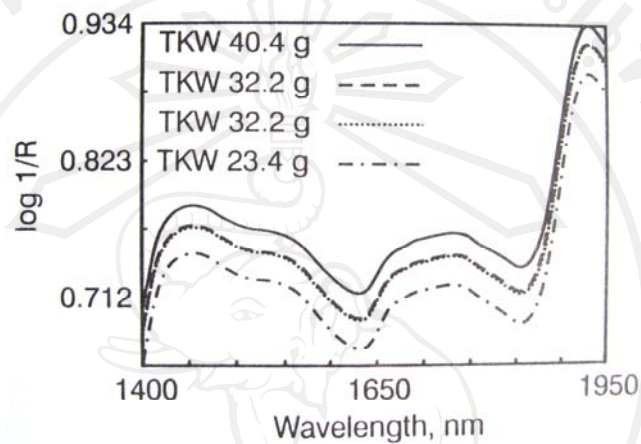
ขนาดเมล็ด (The particle size index; PSI) จะเป็นตัวทดสอบและคัดขนาด รูปร่างของเมล็ดแต่ละเกรดตามลักษณะผิวของเมล็ด (American Association of Cereal Chemists, 2000) วิธีการดังกล่าว เมล็ดข้าวสาลีที่มีลักษณะแข็ง (hard wheats) จะให้ค่า PSI ที่ต่ำกว่าเมล็ดปกติ ตัวอย่างเมล็ดที่จำแนกเพื่อการค้าจะประกอบไปด้วยขนาดเมล็ดตั้งแต่เล็กสุดไปจนถึงขนาดใหญ่สุด ซึ่งตัวอย่างของเมล็ดข้าวสาลีหรือตัวอย่างของเมล็ดพืชชนิดอื่นนั้น มีขนาดเมล็ดโดยเฉลี่ยรวมที่แตกต่างกัน ผลกระทบของขนาดเมล็ดส่งผลต่อการผ่านของแสงกับตัวอย่างและการใช้พลังงานของแสงที่แตกต่างกันตามลักษณะพื้นผิวของเมล็ด



ภาพ 2.13 ความแตกต่างสเปกตรัมของเมล็ดข้าวสาลีเต็มเมล็ดกับขนาดเมล็ดที่จำแนกทางการค้า 1= particle size index (PSI) (American Association of Cereal Chemists, 2000) 72 (very soft); 2= PSI 60 (medium hard/soft); 3= PSI 53 (hard) and 4= PSI 40 (extra hard: durum) (Williams and Norris, 2001)

นอกจากนี้ขนาดของข้าวสาลีมีหลากหลายตั้งแต่เล็กสุดถึงใหญ่สุด ดังนั้นขนาดเฉลี่ยของข้าวสาลีตัวอย่างแต่ละกลุ่มจึงมีความแตกต่างกันมาก ขนาดของเมล็ดส่งผลต่อค่าแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างและลักษณะการสะท้อนแบบแพร่ของแสงในตัวอย่างภาพ 2.14 โดย Williams and Norris (2001) แสดงลักษณะสเปกตรัม NIR ของข้าวสาลีแดงที่มีขนาดต่างกัน คือเมล็ดใหญ่ กลางและเล็ก ข้าวทั้งสามขนาดนี้ได้มาจากข้าวสาลีตัวอย่างเดียวกัน แต่จะนำมาคัดแยกขนาดด้วยตะแกรง (sieve) สเปกตรัมของข้าวสาลีที่มีเมล็ดใหญ่จะอยู่บนสุดเนื่องจากให้ขนาดเมล็ดที่ใหญ่จะทำให้เกิดช่องว่างในตัวอย่างได้มาก ถ้าแสงจึงส่องผ่านไปยังตัววัดสัญญาณได้ดี หากใช้การวัดแบบส่องผ่าน (transmission) จะต้องปรับระยะแสงผ่าน (pathlength) ให้กว้างขึ้น แต่ถ้าใช้การวัดแสงสะท้อนจะ

ไม่ก่อให้เกิดปัญหาเหล่านี้ และถ้านำข้าวสาลีตัวอย่างเริ่มต้นที่ประกอบด้วยหลายขนาดมาวัดสเปกตรัมจะได้สเปกตรัมซ้อนทับกับสเปกตรัมของข้าวที่มีขนาดกลาง Wang *et al.* (1999) รายงานลักษณะสเปกตรัม NIR ของข้าวโพดที่มีขนาดต่างกัน คือเมล็ดใหญ่ กลางและเล็กพบว่าขนาดของเมล็ดมีผลต่อการวัดในช่วงเนียร์อินฟราเรดมากกว่าช่วงวิสิเบิล



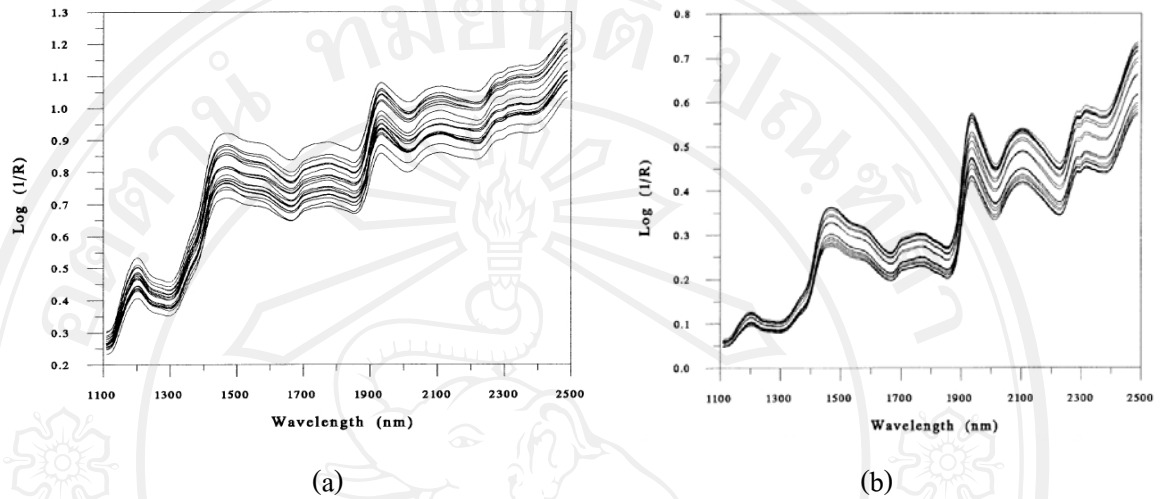
ภาพ 2.14 สเปกตรัม NIR ของข้าวสาลีแดงที่มีขนาดต่างกัน คือเมล็ดใหญ่ กลางและเล็ก. TKW= thousand kernel weight (น้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด) (Williams and Norris, 2001)

เมล็ดที่มีขนาดเล็กเช่น วัชพืช (weeds), ต้นพอปปี้ (poppy) หรือ คาโนลา (canola) จะมีขนาด พื้นผิวสัมผัสที่หนาแน่นมาก การวัดแบบสะท้อนกลับ อาจจำกัดการบันทึกปริมาณแสงที่ตัวอย่างถูกดูดกลืนของอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัด นอกจากนี้แหล่งพื้นที่ปลูกต่างกันก็มีผลเช่นเดียวกัน (Williams *et al.*, 1985)

ขนาดอนุภาคและการกระจายของขนาดอนุภาคของตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญต่อการวัดสเปกตรัมแบบสะท้อนกลับ ของข้าวสาลีบด (Williams, 1975; Williams and Thompson, 1978) มีรายงานว่า การกระจายของขนาดอนุภาคของตัวอย่างข้าวสาลีบด 5 ชั้นพบว่าการกระจายของอนุภาคของแต่ละชั้นไม่สม่ำเสมอมีผลต่อการวัดสเปกตรัมแบบสะท้อนกลับ (Watson *et al.*, 1976) รวมทั้งลักษณะผลึกโปรตีนและแป้ง (protein-starch granules) ที่เป็นองค์ประกอบภายในเมล็ดก็มีผลต่อการวัด NIR เช่นเดียวกัน (Watson *et al.*, 1977)

Norris and Williams (1984) ได้รายงานถึงผลของขนาดอนุภาคของเมล็ดโดยวัดสเปกตรัมของเมล็ดข้าวสาลีแบบสะท้อนกลับ ของเมล็ดปกติ และเมล็ดบดพบว่า เมล็ดปกติมีค่า

การดูดกลืนแสง (Log 1/R, a) สูงกว่าเมล็ดบดทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคขนาดใหญ่ (เมล็ดปกติ) สามารถสะท้อนแสงได้ต่ำกว่าอนุภาคขนาดเล็ก (เมล็ดบด) สอดคล้องกับ Manley *et al.* (1994) รายงานว่าค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ดปกติมีค่าสูงกว่าเมล็ดบด ดังภาพ 2.15



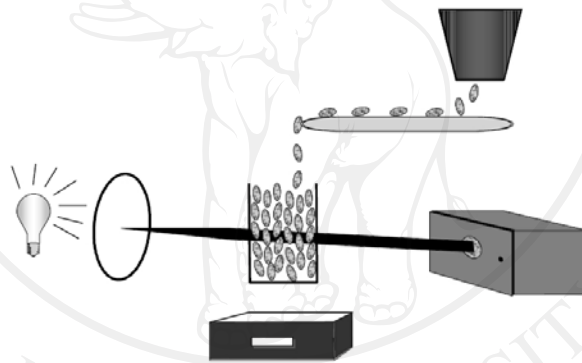
ภาพ 2.15 สเปกตรัมของเมล็ดข้าวสาลีปกติ (a) และเมล็ดบด (b) โดยวิธีการวัดแบบสะท้อนกลับของแสง (Manley *et al.*, 1994)

2.6.2 สิ่งปนเปื้อน (foreign material) เศษฟางข้าว, วัชพืช และเมล็ดพืชที่ปนมากับเมล็ดข้าว จะเป็นส่วนที่มีพื้นที่ผิวหนาแน่นและดูดกลืนแสงไว้ได้มาก ทำให้แสงผ่านตัวอย่างไปสู่ตัวรับสัญญาณได้น้อย ควรจะคัดเอาสิ่งปนเปื้อนออกก่อนทำการวัด (Williams *et al.*, 1985)

2.6.3 ความหนาตัวอย่าง (pathlength) ปัจจุบันนี้มีผลต่อระบบการวัดแสงที่ส่องทะลุผ่านตัวอย่าง เท่านั้น การปรับความหนาของตัวอย่าง หรือระยะทางที่ลำแสงส่องทะลุผ่านนั้น ขึ้นกับขนาดของเมล็ด โดยทั่วไประยะทางที่แสงส่องผ่านตัวอย่างมักจะเป็นไปตามลักษณะการออกแบบเครื่องและภาชนะใส่ตัวอย่าง (sample cell) ดังนั้นต้องหาระยะแสงผ่าน นั่นก็คือความหนาของตัวอย่างที่เหมาะสมในการวัดสเปกตรัมของแต่ละตัวอย่าง การปรับระยะแสงผ่านให้เหมาะสมจะช่วยลดช่องว่างระหว่างเมล็ด ทำให้ลำแสงส่องทะลุผ่านในตัวอย่างได้ต่อเนื่อง เช่น เครื่อง tecator infratec (Foss) ถ้าใช้วิเคราะห์ข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์ มีระยะแสงผ่านที่เหมาะสมเป็น 18 มิลลิเมตร และหากวัดสเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดหรือ ถั่วเหลือง จะใช้ระยะที่เหมาะสมเป็น 30 มิลลิเมตร กรณีที่ตัวอย่างเมล็ดมีขนาดเล็กหรือมีเปลือกหนาที่บดจะต้องปรับระยะแสงผ่านให้สั้น เพื่อให้มีลำแสงเหลือพอที่จะวิ่งไปสู่ตัววัดสัญญาณ หากใช้ระบบการวัดแสงสะท้อนจากตัวอย่าง จะลด

ความผิดพลาดเนื่องจากการใช้ระยะแสงผ่านที่ไม่เหมาะสมได้ เนื่องจากการวัดแสงสะท้อนจากตัวอย่างจะไม่ขึ้นกับค่าระยะแสงผ่าน (ค่าคงที่)

2.6.4 การบรรจุตัวอย่าง (sample access) เครื่องบางชนิดจะออกแบบให้มีช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ลงไป ภายในช่องจะมีแปรงที่คอยหมุนให้ตัวอย่างผ่านลงไปสู่ที่ใส่ตัวอย่าง (sample cell) ลำแสงจะส่องผ่านตัวอย่างที่จุดนี้แล้วผ่านไปทั่วตัววัดสัญญาณดังภาพ 2.16 ความคลาดเคลื่อนสามารถเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ ตัวอย่างมีขนาดเล็กและหลุดไปจากแปรงหมุน ตัวอย่างที่เข้าไปในที่ใส่ตัวอย่างไม่แน่น เกิดลักษณะการไหลของตัวอย่างขณะทำการวัด นอกจากนี้ถ้าตัวอย่างมีความชื้นสูง เช่น เมล็ดข้าวโพด การเคลื่อนตัวของเมล็ดจะไม่ลื่นไหล ทำให้ตัวอย่างไหลเข้าและออกจากที่ใส่ตัวอย่างได้ยาก



ภาพ 2.16 ระบบการวิเคราะห์ตัวอย่างธัญพืชด้วยเทคนิค NIRS ชนิดวัดแสงส่องผ่าน (Osborne and Fearn, 1986)

2.6.5 สี (color) ตัวอย่างที่มีสีสว่างมากจะสะท้อนแสงได้ดี หากวัดที่แสงส่องผ่านออกมาจากตัวอย่างจึงวัดสัญญาณได้ต่ำแต่ถ้าวัดแสงที่สะท้อนจากตัวอย่างก็จะได้สัญญาณดี ความแตกต่างของสีจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อทำนายสัดส่วนของเมล็ดตัวอย่างที่ปะปนกันอยู่ได้ สอดคล้องกับ McCaig *et al.* (1993) ได้ใช้ช่วงคลื่น VIS และ NIR ในการจัดจำแนกเมล็ดข้าวสาลีสีแดง และสีขาออกจากกัน แต่ไม่สามารถทำได้ในเมล็ดเดี่ยว (single kernels) ต่อมา Dowell (1998) รายงานว่า การวัดสเปกตรัมแบบสะท้อนกลับในช่วง 450-1688 นาโนเมตร สามารถจำแนกเมล็ดข้าวสาลีที่มีสีขาและสีแดงออกจากกันได้อย่างแม่นยำ มากกว่า 99 % ของเมล็ดเดี่ยว และ 100 % ในการจัดจำแนกภายในโรงเก็บเมล็ด เช่นเดียวกับ Delwiche and Massie (1996) รายงานว่า

97.5 % และ 98.8 % สามารถจัดจำแนกเมล็ดข้าวสาลีสีขาว และ สีแดงออกจากกันได้โดยใช้ช่วงความยาวคลื่นที่ 551-750 นาโนเมตร นอกจากนี้การจำแนกสีของเมล็ดข้าวสาลียังเกี่ยวข้องกับขนาดของเมล็ด โดยพบว่าสัดส่วนของเมล็ดที่มีสีเข้มมาจากเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ (Wang *et al.*, 1999)

2.6.6 ปริมาณความชื้น (moisture content) ปริมาณความชื้นที่มีในตัวอย่างธัญพืชเริ่มตั้งแต่ต่ำสุดเข้าใกล้ศูนย์ถึงมากกว่า 50 % หากปริมาณความชื้นในตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงมาก จะทำให้รูปร่างสเปกตรัมเปลี่ยนแปลง และตำแหน่งที่ปรากฏในพิกสเปกตรัมเลื่อนตำแหน่งไปสอดคล้องกับ Osborne *et al.*, (1993b) รายงานว่า สเปกตรัมของข้าวสาลีก่อนอบและหลังอบจะเห็นพีกน้ำหายไปและค่าการดูดกลืนแสงลดลงทั้งสเปกตรัม เนื่องจากตัวอย่างแห้งสะท้อนแสงได้ดีกว่าตัวอย่างเปียก ดังนั้นระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIRS ต้องควบคุมสภาวะในการทดลองโดยเฉพาะอุณหภูมิ เพื่อไม่ให้ความชื้นในตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลง

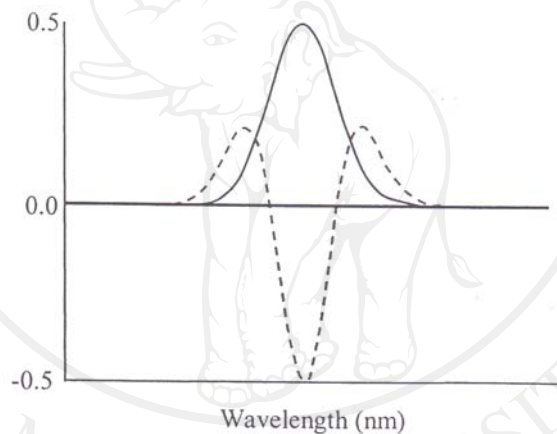
2.6.7 อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิธัญพืชที่นำมาวัดสเปกตรัมควรคงที่ อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงจะทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่แม่นยำ จุดที่สำคัญได้แก่ เครื่องบดเมล็ดพืช เครื่องบดจะต้องไม่ทำให้เกิดความร้อนขณะบด เพราะจะทำให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิเปลี่ยนไป ความชื้นในตัวอย่างก็เปลี่ยนไปด้วย ซึ่งความแตกต่างของสเปกตรัมอาจจะไม่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน แต่จะส่งผลกระทบต่อความแม่นยำของสมการ (Blanco and Valdés, 2004)

2.7 การแปลงหรือการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัม (spectral pretreatment)

สเปกตรัม NIR โดยทั่วไปจะมีลักษณะที่เห็นได้ชัดคือ มีย่านการดูดกลืนเหลื่อมซ้อนกัน (overlapping) และความแตกต่างของขนาดสเปกตรัมหรือ Log (1/R) อันเนื่องมาจากสภาพการกระเจิงแสงหรือปัจจัยอื่นๆที่กล่าวมามีผลกระทบที่มากกว่าผลจากความแตกต่างของความเข้มข้นขององค์ประกอบ ที่ต้องการวัดส่งผลกระทบต่อสมการที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำในการทำนายลดลง (Bokobza, 1998) ดังนั้นก่อนที่จะนำสเปกตรัมไปวิเคราะห์จึงควรนำข้อมูลสเปกตรัมไปปรับด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์เพื่อลดความคลาดเคลื่อนดังกล่าวให้เหลือน้อยที่สุด วิธีการแปลงข้อมูลสเปกตรัมที่ดีที่สุด คือ วิธีทำให้ได้สมการทำนายที่มีความสามารถทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างได้ใกล้เคียงที่สุด ทำได้โดยการทดลองใช้แต่ละวิธีจนกว่าจะได้วิธีทำนายที่มีความแม่นยำที่สุด โดยต้องเข้าใจความหมายและคำนึงถึงข้อดีข้อเสียแต่ละวิธีให้ชัดเจน (Hruschka, 2001) วิธีการทางคณิตศาสตร์ที่นิยมใช้มีดังนี้

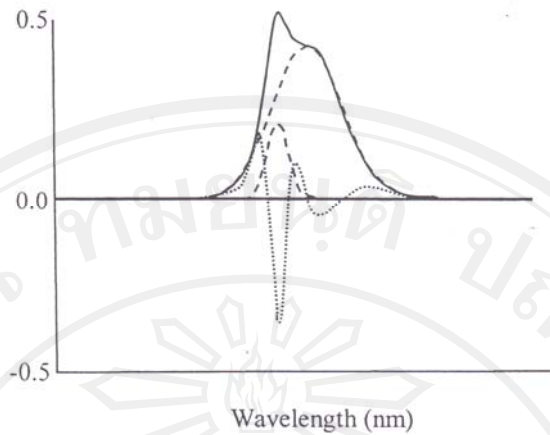
2.7.1 การแปลงค่าด้วยวิธีอนุพันธ์ (derivative transformation)

การหาค่าอนุพันธ์ของสเปกตรัมเป็นวิธีที่ใช้ประโยชน์ในการแก้ปัญหาการซ้อนทับกันของจุดยอดในสเปกตรัมและการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมทั้งแบบเบสไลน์ออฟเซตและเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น การคำนวณค่าอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) ของสเปกตรัม จะทำให้เกิดการแยกของจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันออกมา ดังภาพ 2.17 แสดงให้เห็นภาพทั่วไปของแถบการดูดกลืนแสง (absorption band) ของสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) และอนุพันธ์อันดับสองของสเปกตรัม (second derivative spectrum) นั้น ทั้งนี้จะพบว่าจุดยอดที่เป็นบวกในส่วนซ้ายและส่วนขวาของค่าอนุพันธ์อันดับสอง (เส้นประในภาพ 2.20) ส่วนจุดยอดตรงกลางจะมีค่าลบสูงสุดและตรงกับจุดยอดของสเปกตรัมเริ่มต้น



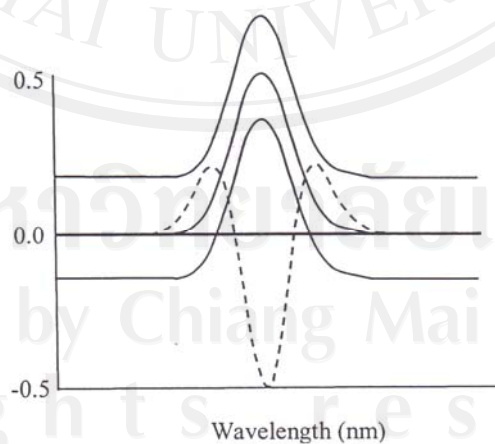
ภาพ 2.17 สเปกตรัมดั้งเดิม (เส้นทึบ) และอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) ของสเปกตรัม (เส้นประ) (อนุพันธ์, 2552)

การแก้ปัญหาการเหลื่อมซ้อนกันของจุดยอดในสเปกตรัมด้วยการแปลงเป็นค่าอนุพันธ์อันดับสองแสดงในภาพ 2.18 ซึ่งจะเห็นสเปกตรัมเริ่มต้น 2 สเปกตรัม (เส้นประในรูป) มีจุดยอดเหลื่อมซ้อนกันเป็นผลให้บางส่วนของสเปกตรัมด้านขวาบวกเพิ่มกับค่าจุดยอดของสเปกตรัมทางซ้าย ทำให้สเปกตรัมรวมมีจุดยอดด้านซ้ายสูงกว่าจุดยอดด้านขวา เมื่อแปลงสเปกตรัมเป็นค่าอนุพันธ์อันดับสอง (เส้นไขปลาในภาพ 2.18) จะทำให้จุดยอดทั้งสองแยกตัวออกจากกันอย่างชัดเจนเพียงแต่จุดยอดกลับหัวเท่านั้นเอง



ภาพ 2.18 การแปลงเป็นค่าอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) (เส้นไขปลา) เพื่อแยกจุดยอดของสเปกตรัม (อนุพันธ์, 2552)

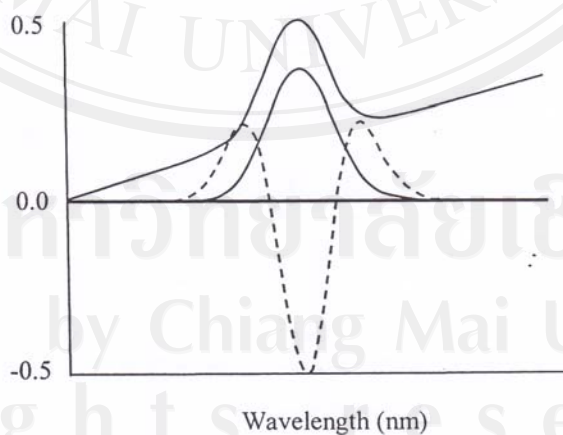
นอกจากนั้นแล้วอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative) ของสเปกตรัมยังช่วยแก้ปัญหาที่สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น (เบสไลน์ออฟเซต) อันเนื่องมาจากปัจจัยที่กล่าวมาแล้ว (ภาพ 2.19) ถ้าค่าที่เพิ่มขึ้นของสเปกตรัมอันเนื่องมาจากปัจจัยที่ทำให้สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นตามความยาวคลื่นหรือเพิ่มขึ้นเสมือนถูกบวกเพิ่มด้วยเส้นตรงที่มีความชันเป็นบวกการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับสองของสเปกตรัมจะช่วยลดผลกระทบดังกล่าวลงดังแสดงในภาพ 2.20 ทั้งนี้เนื่องจากอนุพันธ์อันดับสองของเส้นตรงจะมีค่าเป็นศูนย์



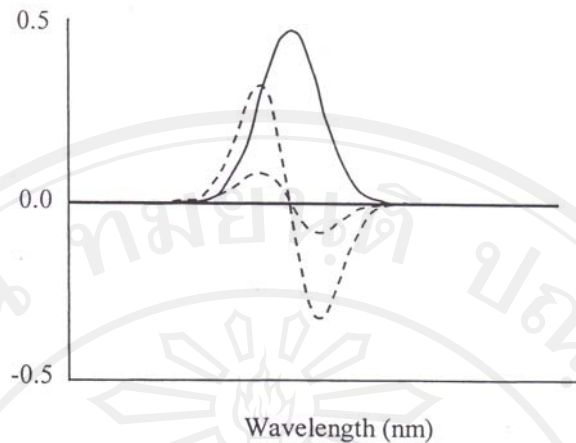
ภาพ 2.19 การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative) (เส้นประ) แก้ปัญหาการบวกเพิ่มที่คงที่ตลอดความยาวคลื่นของสเปกตรัมหรือเบสไลน์ออฟเซต (อนุพันธ์, 2552)

การแปลงค่าเป็นอนุพันธ์อันดับสองจะช่วยลดผลกระทบจากการกระเจิงของแสง ทั้งที่เป็นผลบวก (additive effect) ที่ทำให้ขนาดสเปกตรัมเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่นในลักษณะที่เป็น การบวกเพิ่มด้วยค่าบนเส้นตรงที่เป็นมุมเอียง ซึ่งค่าบวกเพิ่มจะน้อยที่ความยาวคลื่นสั้น และค่าบวกเพิ่มจะสูงที่ความยาวคลื่นสูง (ภาพ 2.20) และผลเชิงคูณ (multiplicative effect) ที่ทำให้ขนาดสเปกตรัมเพิ่มขึ้นตามความยาวคลื่น ในลักษณะที่มีค่าคงที่มาคูณค่าการดูดกลืนแสง ในแต่ละความยาวคลื่น โดยจะลดผลกระทบหลังจากผลเชิงบวก

โดยสรุปแล้วจุดเด่นของวิธีการแปลงเป็นค่าอนุพันธ์อันดับสองในงานด้าน NIR คือการแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันในสเปกตรัมออกจากกัน และการลดผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมมีขนาดเพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่น การแปลงค่าอนุพันธ์เป็นอนุพันธ์อันดับหนึ่งก็ให้ผลในลักษณะเดียวกันแต่จะชัดเจนน้อยกว่า อย่างไรก็ตามอนุพันธ์อันดับหนึ่งมีความหมายอีกนัยหนึ่งคือ เปรียบเสมือนเป็นการนำค่า $\text{Log}(1/R)$ ที่ความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกัน 2 ค่ามาลบกัน ถึงกระนั้นก็ตามอนุพันธ์อันดับหนึ่งให้ความหมายเป็นค่าความชันของสเปกตรัมที่แต่ละความยาวคลื่น (ภาพ 2.21) ซึ่งทำให้แปลความหมายยาก อนุพันธ์อันดับสองจะได้รับความนิยมมากกว่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งเนื่องจากว่า อนุพันธ์อันดับสองจะให้จุดยอดตรงกับจุดยอดของสเปกตรัมดั้งเดิม แม้ว่าจะเป็นจุดยอดกลับหัวก็ตาม ข้อดีอีกด้านหนึ่งของการแปลงเป็นค่าอนุพันธ์ก็คือ ในการวิเคราะห์ สหสัมพันธ์ (multiple regression) เพื่อสร้างสมการเทียบมาตรฐาน



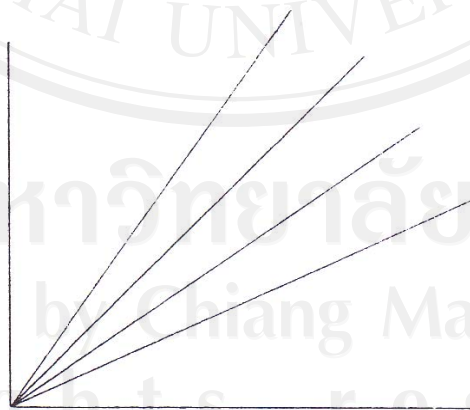
ภาพ 2.20 การแปลงค่าเป็นอนุพันธ์อันดับสองเพื่อแก้ปัญหการบวกเพิ่มที่มีค่าเปลี่ยนแปลงตามความยาวคลื่นเป็นเส้นตรงมีความชันของสเปกตรัม (อนุพันธ์, 2552)



ภาพ 2.21 อนุพันธ์อันดับหนึ่งให้สเปกตรัมที่มีค่าความชันตรงกับจุดยอดของสเปกตรัมเดิม (อนุพันธ์, 2552)

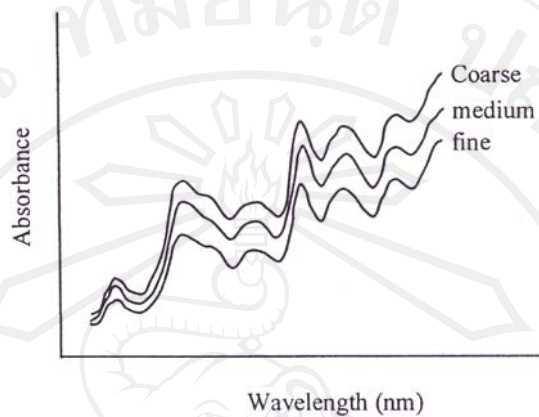
2.7.2 multiplicative scatter correction (MSC)

เป็นเทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อลดผลที่เกิดจากการกระเจิงของแสง (scattered light) ต่อสเปกตรัม NIR ที่ได้จากการวัดแบบการสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) และแบบส่องผ่าน โดยทั่วไปการกระเจิงแสงจะทำให้ความชันโดยรวมของสเปกตรัมเปลี่ยนไป เปรียบเสมือนว่าสเปกตรัมถูกทำให้หมุนรอบจุดที่ความยาวคลื่นต่ำสุดของสเปกตรัม ถ้าสมมติให้สเปกตรัมเป็นเส้นตรง สเปกตรัมจะถูกทำให้มีความชันแตกต่างไปจากเดิมหรือเหมือนกับเส้นตรงถูกหมุนไปดังแสดงในภาพ 2.22



ภาพ 2.22 กราฟที่มีความชันเปลี่ยนแปลงไปเปรียบเสมือนเส้นตรงนั้นหมุน (อนุพันธ์, 2552)

MSC ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อให้สามารถลดผลกระทบแบบผลคูณ แต่ในทางปฏิบัติสามารถลดผลในแบบผลบวกได้ด้วย หรือผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงเท่ากันตลอดช่วงความยาวคลื่น



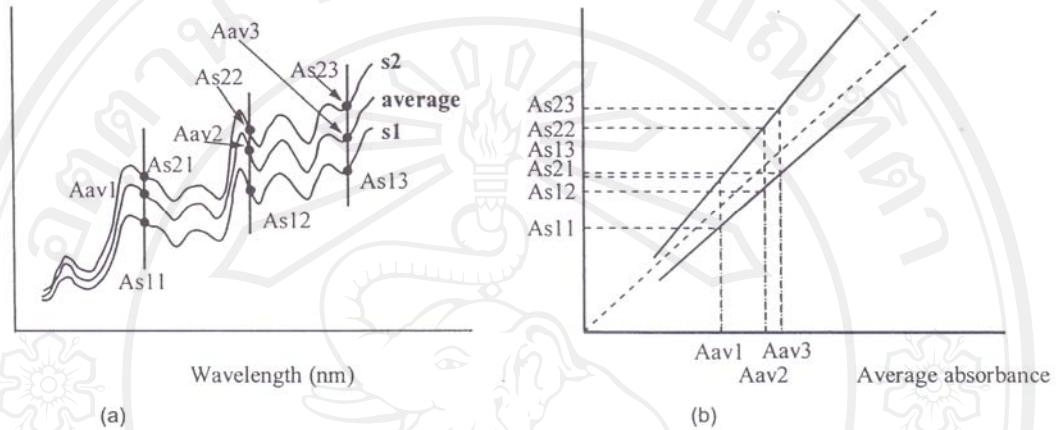
ภาพ 2.23 ตัวอย่างแบ่งที่มีขนาดอนุภาคแตกต่างกัน 3 ขนาดแต่มีค่าทางเคมีเท่ากัน (อนุพันธ์, 2552)

จากภาพ 2.23 เป็นตัวอย่างสเปกตรัมที่ได้รับผลแบบผลคูณ โดยในรูปแบบเป็นแบ่งที่มีส่วนประกอบ ทางเคมีเหมือนกัน แต่ถูกบดให้มีขนาดอนุภาคแตกต่างกัน 3 ขนาด จะพบว่าตัวอย่างที่มีอนุภาคใหญ่จะดูดกลืนแสงมากกว่าตัวอย่างที่มีอนุภาคเล็กกว่าและผลที่เกิดขึ้นจะทำให้สเปกตรัมแตกต่างกันมากขึ้นที่ความยาวคลื่นสูง ซึ่งเปรียบเสมือนว่าจะทำให้สเปกตรัมหมุนรอบจุดเริ่มต้นเป็นมุมแตกต่างกัน เนื่องจากการกระเจิงแสงที่เกิดจากขนาดอนุภาคที่แตกต่างกัน

Martens and Russwurm (1983) คิดค้นวิธีทางคณิตศาสตร์ที่ทำให้สเปกตรัมแต่ละอันหมุนกลับมาตำแหน่งเดิมเพื่อให้สเปกตรัมตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดให้มากที่สุด

การปรับแก้ด้วยวิธี MSC มีขั้นตอนดังนี้ จากภาพ 2.24 ขั้นแรกจะต้องนำสเปกตรัมของตัวอย่างทั้งหมดมาเฉลี่ยเพื่อให้ได้สเปกตรัมเฉลี่ยก่อน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในภาพ 2.24 (a) ที่แต่ละ ความยาวคลื่นของแต่ละตัวอย่างมาพลอตกับค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดทุกความยาวคลื่นซึ่งได้เส้นตรงที่มีความชันไม่เท่ากับหนึ่ง เช่นในภาพ 2.24 ตัวอย่าง s2 มีความชันน้อยกว่าหนึ่ง เกิดจากการพลอต Aav1 กับ As21 เป็นต้น ถ้าตัวอย่างใดมีสเปกตรัมเหมือนกับสเปกตรัมเฉลี่ยกราฟจะเป็นเส้นตรงที่มีความชันเท่ากับหนึ่ง

แต่ละจุดในภาพ 2.24 คือการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหนึ่งๆ กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่าง s1 และตัวอย่าง s2 ที่ความยาวคลื่นต่างๆตลอดช่วง ดังนั้นถ้าสเปกตรัมประกอบด้วย 701 จุดแต่ละเส้นในภาพ 2.24 ก็จะมี 701 จุดด้วยเช่นกัน เส้นแต่ละเส้นแทนหนึ่งตัวอย่างการพลอตในลักษณะนี้จะแสดงให้เห็นถึงรูปแบบการกระเจิงแสงที่มีอยู่ในสเปกตรัม



ภาพ 2.24 พลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสง Asi (absorbance หรือ Log (1/R) ของสเปกตรัมของตัวอย่าง s1 และ s2 (แกน Y) กับค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมเฉลี่ย Aavi (แกน X) (อนุพันธ์, 2552)

วิธีการของ MSC ก็คือการหมุนสเปกตรัมในภาพ 2.23 ของแต่ละตัวอย่างให้มาตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ย ขั้นตอนการหมุนดังกล่าวทำได้โดยการหาค่าคงที่ค่าหนึ่งมาลบออกจากสเปกตรัมเพื่อลดผลจากการเลื่อนตัวของสเปกตรัมและต้องหาค่าคงที่อีกค่าหนึ่งมาหารค่าการดูดกลืนแสงของทุกๆจุด (ความยาวคลื่น) ของตัวอย่างเพื่อปรับความชันของสเปกตรัมที่เปลี่ยนไป หรือก็คือการปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงเป็นสัดส่วนเพื่อให้ค่าตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ย วิธีการให้ได้มาซึ่งค่าคงที่ดังกล่าวคือวิธีวิเคราะห์ความถดถอย (Regression) เพื่อหาสมการเส้นตรงของแต่ละตัวอย่างในภาพ 2.24 ดังนี้

$$x_{iw} = a_i + b_i \bar{x}_w$$

$$w = 1, \dots, p$$

โดยที่

x_{iw} = ค่าเฉลี่ย ค่า Log (1/R) ของตัวอย่างที่ I ที่ความยาวคลื่น w ของตัวอย่างที่มี p ความยาวคลื่น

\bar{x}_w = ค่าเฉลี่ย Log (1/R) ที่ความยาวคลื่น w ของตัวอย่างทั้งหมด

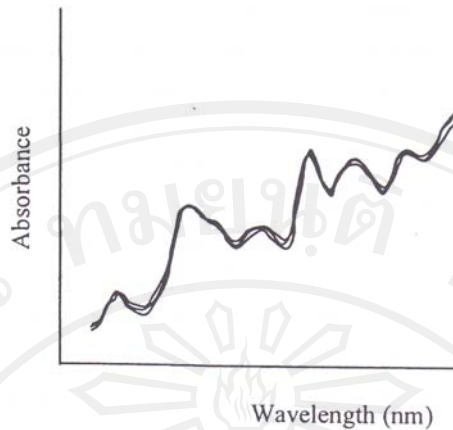
a_i และ b_i = ค่าคงที่สำหรับสมการความถดถอยของตัวอย่าง i

ในแต่ละตัวอย่างก็จะได้ค่า a_i และ b_i อย่างละค่าแตกต่างกัน ค่า a_i และ b_i นี้จะนำมาใช้คำนวณ (หรือหามุขสเปกตรัม) ค่าสเปกตรัมใหม่ ดังนี้

$$x_{i,MSC} = \frac{(x_{iw} - a_i)}{b_i}, \quad w = 1, \dots, p$$

สเปกตรัม NIR ของแป้งตัวอย่างที่ปรับแก้ด้วยวิธี MSC แล้วแสดงผลอยู่ในภาพ 2.25 ซึ่งสเปกตรัม NIR ในรูปของแต่ละตัวอย่างจะถูกปรับแก้ เสมือนกับถูกหมุนให้มาใกล้สเปกตรัมเฉลี่ยข้อพึงระวังคือถ้าใช้ MSC กับสเปกตรัมตัวอย่างในกลุ่มแคลิเบรชันก็ต้องใช้ MSC กับกลุ่มตัวอย่างที่จะนำมาประเมินค่าทางเคมีในอนาคตด้วย ดังนั้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่จะใช้ถูกบันทึกเก็บไว้สำหรับใช้กับตัวอย่างในอนาคต

การใช้วิธี MSC ให้ผลต่อรูปร่างสเปกตรัมแตกต่างจากการใช้วิธีอนุพันธ์อันดับสองอย่างเห็นได้ชัด แม้ผลการปรับแก้จะเป็นไปในแนวเดียวกันในการวิเคราะห์ก็ตาม โดยรูปร่างของสเปกตรัมหลังจากใช้วิธี MSC แล้วจะมีรูปร่างไม่แตกต่างจากสเปกตรัมก่อนการปรับแก้มาก ในขณะที่รูปร่างของสเปกตรัมหลังจากวิธีอนุพันธ์อันดับสอง จะแตกต่างจากสเปกตรัมเริ่มต้นอย่างชัดเจน การใช้วิธี MSC จะให้ผลดีที่สุด ถ้ามีการปรับแก้การเลื่อนตัวของสเปกตรัมก่อน



ภาพ 2.25 สเปกตรัม NIR ที่ได้รับผลกระทบแบบผลคูณหลังจากการปรับแก้ด้วย MSC

2.7.3 วิธีปรับสเปกตรัมให้เรียบ (smoothing)

เป็นการแปลงข้อมูลสเปกตรัมที่มักจะใช้กับข้อมูลที่มีสัญญาณรบกวน (noise) มากทำให้สเปกตรัมไม่เรียบวิธีการทำได้โดยการหาค่าเฉลี่ยเคลื่อนที่ (moving average) โดยมีการแทนที่ค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความยาวคลื่นด้วยค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในช่วงหนึ่งความยาวคลื่นแล้วคำนวณซ้ำจนครบตลอดช่วงความยาวคลื่น สามารถลดปัญหาของสัญญาณรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสง (signal to noise) โดยได้สเปกตรัมที่มีลักษณะเหมือนสเปกตรัมดั้งเดิม แต่จะเรียบสม่ำเสมอว่า (Siesler *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ยังมีวิธีการแปลงสเปกตรัมที่นิยมหลายวิธีเช่น standard normal variant (SNV) โดยเป็นวิธีการกำจัดอิทธิพลของการกระเจิงแสงออกจากสเปกตรัมที่มักจะใช้คู่กับการปรับแนวโน้มของเส้นสเปกตรัม (detrending) การปรับแก้ด้วย SNV แล้วจึงตามด้วยการปรับแก้แนวโน้มหรือการลดความโน้มเอียงเส้นสเปกตรัม ทั้งนี้เพื่อปรับแก้ผลที่เกิดจากการกระเจิงแสงที่มักจะส่งผลเป็นแบบผลคูณต่อค่าการโน้มเอียงเส้นสเปกตรัม และปรับแก้ผลที่เกิดจากการกระเจิงแสงที่มักจะส่งผลเป็นแบบผลคูณต่อค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งผลการปรับแก้จะคล้ายกับวิธีการปรับแก้แบบ MSC ส่วนวิธีปรับเส้นแนวโน้มจะใช้ต่อจากวิธี SNV เพื่อปรับแก้เพิ่มเติม โดยเป็นวิธีที่ลดความแปรปรวนที่ทำให้เกิดการเคลื่อนตัวในแนวตั้งของเส้นสเปกตรัม (baseline shift) แต่โดยทั่วไปการปรับแก้ด้วยวิธี SNV อย่างเดียวก็เพียงพอ วิธีการปรับแนวโน้มจะใช้ต่อจากวิธี SNV เสมอจะไม่ถูกใช้เพียงวิธีเดียว (อนุพันธ์, 2552; Barnes *et al.*, 1993) ทั้งนี้ Tallada *et al.* (2009) รายงานว่า MSC

หรือ SNV เป็นวิธีการแปลงสเปกตรัมที่ดีในการลดการกระเจิงของแสงได้สอดคล้องกับ Wang *et al.* (1999) รายงานว่า MSC ถูกนำมาใช้เพื่อลดผลกระทบจากขนาดของเมล็ดที่แตกต่างกันในการวัดแบบสะท้อนกลับได้อย่างแม่นยำ

2.8 การเลือกวิธีการปรับสเปกตรัม NIR

การเลือกวิธีการปรับสเปกตรัมอาจสรุปได้เป็นข้อๆดังนี้

1. ถ้าสเปกตรัมมีสัญญาณรบกวนมาก หรือสเปกตรัมมีลักษณะเป็นยอดแหลมเล็กกระจายตลอดช่วงความยาวคลื่นบนสเปกตรัม อาจพิจารณาใช้วิธีการทำให้สเปกตรัมเรียบ (smoothing) เพื่อปรับให้สเปกตรัมเรียบขึ้น

2. ถ้าสเปกตรัมมีการเลื่อนตัวในแนวแกน y (baseline shift or offset) อันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆควรใช้อนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative) ปรับสเปกตรัมหรือใช้วิธีอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative)

3. ถ้าสเปกตรัมมีการเลื่อนตัวในแนวแกน y และเกิดการหมุนทำให้ที่ความยาวคลื่นสูงมีค่าเบี่ยงเบนมากกว่าที่ความยาวคลื่นต่ำ และถ้าต้องการให้เกิดการแยกยอดสเปกตรัมออกจากกันในกรณีสเปกตรัมเหลื่อมซ้อนกันอันเนื่องมาจากแถบคอมบิเนชัน (combination bands) ควรใช้วิธีอนุพันธ์อันดับสอง

4. ถ้าต้องการแก้ปัญหาคืออิทธิพลของขนาดตัวอย่างให้เลือกใช้วิธีการปรับให้เป็นปกติ (normalization)

5. ถ้าต้องการแก้อิทธิพลการกระเจิงแสง (scattering) ที่ทำให้สเปกตรัมเลื่อนตัวตามแกน y และเกิดการหมุนเหมือนในข้อ 3 ควรใช้วิธี MSC (multiplicative scattering correction)

ไม่ควรเลือกใช้วิธีหลายๆวิธีที่ให้ผลการปรับสเปกตรัมเหมือนกันและควรศึกษาพิจารณารูปร่างสเปกตรัมโดยรวมก่อนว่าน่าจะเป็นการเกิดจากอิทธิพลของอะไรแล้วจึงใช้วิธีการปรับแต่งดังกล่าว

2.3 ดังนั้นวิธีการปรับแต่งสเปกตรัม NIR ที่ดีที่สุดคือ วิธีที่ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้สมการเทียบมาตรฐานที่มีความสามารถในการประเมินค่าทางเคมีของตัวอย่างในอนาคตได้ใกล้เคียงที่สุด

ตาราง 2.3 วิธีการปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์ (รณฤทธิ, 2554)

Situation	Pretreatment
Noisy	Smoothing
Baseline shift	Second derivative
Broad band	Second derivative
Sample size	Normalization
Scattering	MSC or SNV + Detrend

2.8 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis)

ส่วนใหญ่แล้วการนำเทคนิค NIRS มาใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลผลิต ถือว่าเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ แต่ยังคงพบว่ามีกรนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของผลผลิต ได้เช่น NIRS สามารถใช้วัดคุณภาพการสีของข้าวสาลีโดยตรวจสอบจากความบริสุทธิ์ของผลผลิต และทำนายระดับความแข็งของข้าวสาลีโดยเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของโปรตีนและความชื้น ภายในเมล็ด (Osborne, 1991) ทั้งยังสามารถทำนายคุณสมบัติพื้นฐานทางวิถึกลจากปริมาณของ เอนโดสเปิร์มของข้าวสาลี (Glenn *et al.*, 1991) รวมทั้งทำนายถึงศักยภาพในกระบวนการผลิตและ วิเคราะห์ปัจจัยในการทำงานของเครื่องมือ (Finney *et al.*, 1988) ใช้ NIRS ในการกำหนดระดับ คุณภาพการแตกหักของแป้งข้าวสาลีเพื่อการค้ำ (Osborne and Douglas, 1981; Osborne *et al.*, 1982) และทำนายความสัมพันธ์ของลักษณะการย่อยและการสกัดจากการแตกหักของแป้งโดยอาศัย คุณสมบัติพื้นฐานของวิธีการทางเคมีในการทำนายคุณภาพผลผลิต (Evers and Stevens, 1985) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายคุณภาพของมอลต์จากสารสกัดน้ำร้อน (hot water extract) ในการทดสอบก่อนการคัดแยกธัญของข้าวบาร์เลย์ (Morgan and Gothard 1979; Starr *et al.*, 1981; McGuire, 1982) รวมถึงการใช้ในการทำนายลักษณะเนื้อสัมผัส (sensory texture) ของถั่วแข็งจากตัวแปรพื้นผิวและตัวแปรของรสชาติให้เหมาะสมกับความต้องการของผู้บริโภค (Martens and Martens, 1986)

เทคนิคทางสถิติที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพจากสเปกตรัมที่ได้จากการวัดด้วย NIR มีหลายวิธี เช่น วิธี discriminant analysis ที่ช่วยในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างที่มี 2 กลุ่มและมีจำนวนตัวแปร 2 ตัว เช่น กำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆเป็นตัวแปรอิสระ (X) ซึ่งเป็นข้อมูลเชิงปริมาณและกำหนดให้ตัวแปรตาม (Y) เช่น ขนาดอนุพันธ์หรืออนุพันธ์ของตัวอย่างเป็นตัวแปรเชิงกลุ่ม วิธีนี้นอกจากจะจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้แล้วยังสามารถบอกได้ว่าตัวแปรตามตัวใดที่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ดีที่สุด หรือการใช้เทคนิค canonical correlation analysis (Robert *et al.*, 1996) นอกจากนี้พบว่าวิธีการวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA) ถือเป็นวิธีทางสถิติวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพของตัวอย่างร่วมกับข้อมูลที่ได้จาก NIRS (Evans *et al.*, 1993a)

2.8.1 การวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบหลัก (principle component analysis: PCA)

PCA เป็นวิธีการหนึ่งทางสถิติในการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัว (multivariate analysis) โดยใช้เทคนิคที่อาศัยการลดจำนวนตัวแปรอิสระ (X) ไม่จำเป็นต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมก่อน (Evans *et al.*, 1993b) ด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรขึ้นมาใหม่ที่เรียกว่า ปัจจัย หรือองค์ประกอบ (factors or principle components: PC) PC ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นการสร้างโดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงเส้นของข้อมูลเดิม แล้วนำความสัมพันธ์จากข้อมูลมาสร้าง PC โดยที่ PC ลำดับแรก (PC1) จะอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้มากที่สุด (Osborne *et al.*, 1993a) โดยส่วนมากแล้ว PC1 จะสัมพันธ์กับความแปรปรวนที่มาจากขนาดหรือรูปร่างของตัวอย่าง ไม่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีที่จะมีความสัมพันธ์กับ PC ที่อยู่ในลำดับที่สูงขึ้น (Robert *et al.*, 1996) PC ลำดับถัดมา (PC₂, ..., PC_n) จะอธิบายความสัมพันธ์ที่ทำให้เกิดความแปรปรวนภายในข้อมูลลดน้อยลงตามลำดับ จำนวน PC ที่สร้างขึ้นใหม่จะมีจำนวนเท่าใดขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของข้อมูลเดิม คือ ถ้าข้อมูลเดิมมีความสัมพันธ์กันมาก จำนวน PC ที่สร้างขึ้นใหม่ก็จะม้น้อย แต่ถ้าข้อมูลชุดนั้นมีความแปรปรวนมาก จำนวน PC ที่สร้างขึ้นใหม่จะมีจำนวนมาก โดยที่ PC ที่สร้างขึ้นนี้จะไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (Osborne *et al.*, 1993a)

ประโยชน์การสร้างตัวแปรใหม่นอกจากจะสามารถลดจำนวนตัวแปรอิสระให้เหลือน้อยลงแล้ว จำนวนตัวแปรใหม่ที่สร้างขึ้นมาทั้งหมดยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

2.8.1.1 นำกลับไปประมาณค่าตัวแปรเดิม

2.8.1.2 นำคะแนนปัจจัยที่หาได้ (PCA score) ไปใช้ในการทำนายค่าตัวแปรตามโดยนำไปสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธีทางสถิติการถดถอย (regression)

2.8.1.3 ใช้น้ำหนักปัจจัย (PCA loading) และคะแนนปัจจัย ในการอธิบายโครงสร้างของข้อมูล โดยในแต่ละ PC จะสามารถอธิบายความแปรปรวนของตัวแปรเดิมได้แตกต่างกัน ซึ่ง PC1 อธิบายความแปรปรวนของข้อมูลเดิมได้มากที่สุดเสมอ

ข้อดีของการใช้เทคนิค PCA คือ สามารถลดจำนวนตัวแปรอิสระ โดยใช้ข้อมูลทั้งสเปกตรัม และไม่ต้องใช้ค่าทางเคมี (Robert *et al.*, 1996)

2.9 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณต้องมีการสร้างสมการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมี โดยต้องมีกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการถดถอยเชิงเส้นระหว่างข้อมูลวิเคราะห์ทางเคมีกับข้อมูลสเปกตรัม กลุ่มตัวอย่างที่ดีจะต้องมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เพียงพอทั้งตัวอย่างปัจจุบันและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ในอนาคต โดยเฉพาะปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ต้องมีค่าครอบคลุมปริมาณทั้งต่ำสุดและสูงสุดของตัวอย่าง โดยมีการสุ่มตัวอย่างที่ถูกต้อง เพียงพอ เพราะขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างถือเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญที่ส่งผลต่อความถูกต้องของสมการที่สร้างขึ้น โดยตัวอย่างที่ถูกสุ่มเก็บมานั้นจะต้องเป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มประชากรตัวอย่างในอนาคตที่จะถูกทำนายด้วยเทคนิค NIRS (ชงชัย และ ปิติพร, 2552; Hruschka, 2001) และควรพิจารณาวิธีวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและมีความแม่นยำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องเนื่องจากส่งผลต่อสมการที่สร้างขึ้น (พรรณทิพย์, 2548; Kawano, 2002b) การวิเคราะห์เชิงปริมาณทาง NIRS แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.9.1 การสร้างสมการเทียบ (calibration equation)

การสร้างสมการทำได้ 2 วิธี

2.9.1.1 wavelength selected method เป็นวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกตัวแปรอิสระเฉพาะความยาวคลื่น (wavelength) ที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่จะทำการทำนาย เทคนิคในการคัดเลือกตัวแปรอิสระมีหลายเทคนิค เช่น เลือกรู้จากความถี่ความชันหรือเอกสารอ้างอิงที่บ่งบอกถึงช่วงความยาวคลื่นที่คาดน่าจะมีความสัมพันธ์กับค่าที่จะทำการวิเคราะห์ หรืออาจจะใช้เทคนิคทางสถิติในการคัดเลือกความยาวคลื่นที่คาดน่าจะมีความสัมพันธ์ เช่น การถดถอยพหุคูณ (multiple regression) หรือการสร้างกราฟคอเรลโลแกรม (correllogram) (ชงชัย และ ปิติพร, 2552)

2.9.1.1.1 การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (single linear regression: SLR) เป็นการสร้างสมการที่ประกอบด้วยตัวแปรสองชนิดที่มีความสัมพันธ์กันคือ ตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) SLR เป็นการเลือกพิจารณาความสัมพันธ์เชิงปริมาณของตัวอย่างที่มีความยาวคลื่นเพียงความยาวคลื่นเดียว (single wavelength) แต่เนื่องจากตัวอย่างประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ในการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางเคมีด้วย NIRS จึงไม่สามารถใช้ความยาวคลื่นเพียงความยาวคลื่นเดียวได้ จึงต้องใช้ข้อมูลจากหลายความยาวคลื่น (multiple wavelengths) เพื่อทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ สมการ SLR สามารถเขียนได้ดังนี้

$$Y = b_0 + b_1X$$

เมื่อ Y = ค่าองค์ประกอบทางเคมี

X = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับค่าทางเคมี

b_0 = ค่าคงที่ ณ จุดตัดแกน Y เมื่อ X มีค่าเท่ากับ 0

b_1 = ค่าคงที่การถดถอย

2.9.1.1.2 การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression: MLR) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ลีสตแควร์ผกผัน (inverse least squares) เป็นวิธีการทางสถิติที่ใช้ในการสร้างสมการแคลิเบรชัน โดยที่สมการที่สร้างขึ้นมาจะประกอบไปด้วยตัวแปรอิสระ (X_1, X_2, \dots, X_p) มากกว่า 1 ตัว และตัวแปรตาม (Y) ซึ่งเป็นค่าตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (reference methods) 1 ตัว เทคนิคการสร้างสมการแบบนี้มีความซับซ้อนบนการแสดงรูปแบบความสัมพันธ์และการสร้างสมการมากกว่าเทคนิคการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย ซึ่งความยุ่งยากและซับซ้อนอยู่ที่การคัดเลือกตัวแปรอิสระที่เหมาะสม (X_1, X_2, \dots, X_p) และการหาค่าคงที่ของตัวแปรในสมการ (a, b_1, b_2, \dots, b_p) โดยที่สมการที่แสดงความสัมพันธ์สามารถเขียนได้ดังนี้คือ

$$Y = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p$$

การพิจารณาว่าตัวแปรอิสระใดบ้างที่มีผลต่อค่าตัวแปรตามอาจจะใช้วิธีการสร้างกราฟคอเรลโลแกรมหรือใช้วิธีการคำนวณทางสถิติของ การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ ได้แก่ ก) การถดถอย

ที่เป็นไปได้ทั้งหมด (all possible regression) ข) กระบวนการกำจัดตัวแปรย้อนกลับ (backward elimination procedure) ค) กระบวนการเลือกตัวแปรแบบไปข้างหน้า (forward selection procedure) หรือ ง) กระบวนการถดถอยทีละขั้น (stepwise regression procedure)

ข้อดีข้อเสียสำหรับการใช้เทคนิคการถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ

ข้อดี

1. การสร้างสมการอยู่บนพื้นฐานของกฎของ Beer
2. ค่อนข้างสะดวก รวดเร็วในการคำนวณค่าต่างๆ และการสร้างสมการ
3. เหมาะสำหรับตัวอย่างผสมที่ประกอบไปด้วยสารหลายชนิดเพราะความรู้เกี่ยวกับการสั้นไหวของสารในแต่ละความยาวคลื่นเฉพาะ ทำให้สามารถคัดเลือกความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องกับสารต่างๆ ที่มีอยู่ในส่วนผสมและนำมาสร้างสมการ

ข้อเสีย

1. การคัดเลือกหาความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องค่อนข้างเสียเวลาและบางครั้งค่าที่อ่านได้ในแต่ละความยาวคลื่นที่เลือกมาอาจมีความสัมพันธ์กันทำให้เกิดปัญหาความซ้ำซ้อนของตัวแปรที่เรียกว่า การเกิด โคลลิเนียริตี้ (collinearity)
2. การมีตัวแปรอิสระมากคือ มีหลายความยาวคลื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงจำเป็นต้องมีการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนมากขึ้น ทำให้สิ้นเปลืองและเสียเวลาในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะวิธีการมาตรฐาน (reference method) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวิธีการวัดค่าทางเคมีประเภทที่ใช้ร่วมกับกรด ต่าง หรือ แอลกอฮอล์ (wet analysis)
3. ในการคัดเลือกตัวแปรอิสระหรือความยาวคลื่นที่เหมาะสมจากความยาวคลื่นทั้งหมดมาสร้างสมการอาจได้ข้อมูลไม่ครอบคลุมมากพอ จึงทำให้ค่าจากการทำนายสูงหรือต่ำกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมี (ชงชัย และ ปิติพร, 2552; Osborne *et al.*, 1993b)

2.9.1.2 full spectrum method การคัดเลือกหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม (selective wavelength) จากความยาวคลื่นทั้งหมดที่มีในสเปกตรัมมาสร้างสมการเทียบมาตรฐานอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย ค่าข้อมูล ที่ไม่ถูกต้องและเกิดปัญหาได้ค่าทำนายที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่าค่าที่แท้จริง อันเนื่องมาจากเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นในการสร้างสมการ หรือเกิดปัญหาเมื่อมีตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานน้อยและทำให้ได้สมการที่ตัวแปรอิสระมากเกินไปในสมการที่ทำให้ข้อมูลไม่น่าเชื่อถือ (over fitting) การใช้ข้อมูลทั้งหมดที่มีอยู่ในทุกความยาวคลื่นของสเปกตรัม (full spectrum) หรือในช่วงความยาวคลื่นที่สนใจ มาสร้างสมการเป็นการเลือกช่วงความ

ยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยการลดจำนวนตัวแปรอิสระ (X) และสร้างตัวแปรกลุ่มใหม่ขึ้นมา วิธีทางสถิติที่นิยมใช้ได้แก่

2.9.1.2.1 principal component regression (PCR) เป็นการวิเคราะห์ผล โดยลดตัวแปรอิสระ (X) ด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรอิสระเดิมที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรใหม่ หรือองค์ประกอบที่เรียกว่าแฟกเตอร์ (factor score; F) หรือ principal component (PC) แล้วจึงนำค่าแฟกเตอร์ไปสร้างสมการเชิงถดถอย ก่อนนำมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (Y) ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์มาตรฐานเพื่อสร้างสมการทำนายตัวแปรตาม (Y)

2.9.1.2.2 partial least square regression (PLSR) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) โดยเป็นการลดจำนวนตัวแปรเทคนิคหนึ่งเช่นเดียวกับวิธี PCR อย่างไรก็ตาม PLSR จะแตกต่างกับ PCR ตรงที่ในช่วงจัดกลุ่มลดจำนวนตัวแปร ในการสร้างตัวแปรใหม่นั้นจะมีการนำข้อมูลตัวแปรตาม (Y) เข้ามาร่วมในการสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่าค่าคะแนนปัจจัย (factor loading) PLSR เป็นกระบวนการขั้นตอนเดียวที่ไม่จำเป็นต้องมีการแยกไปทำขั้นตอน regression อีกเนื่องจากค่าคะแนนปัจจัย ที่สร้างขึ้นมาใหม่จะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม ในขณะที่วิธีการ PCR ค่าคะแนนปัจจัยที่สร้างขึ้นมาจะมีความเกี่ยวข้องกับข้อมูลตัวแปรเดิมในสเปกตรัมเท่านั้น จำเป็นต้องนำค่าคะแนนปัจจัย ที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (Y) โดยการสร้างสมการถดถอยอีกครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการทำนายค่าตัวแปรตามต่อไป

ในการประยุกต์ใช้เทคนิค PLSR เพื่อสร้างสมการเทียบมาตรฐานสามารถทำได้ 2 วิธีคือการสร้างสมการถดถอยแบบ PLSR 1 และ PLSR 2 โดยวิธีการถดถอยแบบ PLSR 1 คือ การสร้างสมการสำหรับทำนายค่าตัวแปรตามเพียง 1 ตัว โดยใช้สมการ 1 สมการ ในขณะที่วิธีการถดถอยแบบ PLSR 2 คือการสร้างสมการสำหรับทำนายค่าตัวแปรตามหลายตัวโดยใช้สมการเดียวกัน โดยทั่วไปแล้วสมการที่สร้างด้วยวิธีการถดถอยแบบ PLSR 1 จะให้ค่าความถูกต้องของการทำนายดีกว่าสมการที่สร้างโดยใช้วิธีการถดถอยแบบ PLSR 2 สมการ PLSR สามารถเขียนได้ดังนี้ คือ

$$Y = b_0 + b_1F_1 + b_2F_2 \dots + b_nF_n$$

เมื่อ F_1, F_2, \dots, F_n = ค่าตัวแปรใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับข้อมูล Y ที่ตำแหน่ง n ตัวแปร

$b_0, b_1, b_2, \dots, b_n$ = ค่าสัมประสิทธิ์ในการถ่วงน้ำหนักที่มีความสัมพันธ์กับข้อมูล Y ที่ตำแหน่ง n ตัวแปร

ลักษณะสเปกตรัมของคลื่นแสง NIR พบว่ามีสเปกตรัมที่ซ้อนทับกันและมีพีกที่กว้าง การสร้างสมการทำนายของค่าประกอบทางเคมีถ้าพิจารณาเพียงความยาวคลื่นเดียวหรือความยาวคลื่นน้อยๆ จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้องเมื่อเทียบกับการพิจารณาทั้งสเปกตรัม หรือบางช่วงของสเปกตรัม วิธีการพิจารณาดังกล่าวจะช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น Bruce *et al.* (1991) ได้มีการศึกษาเพื่อทำนายองค์ประกอบของโปรตีน, ไขมัน และแป้ง ในเมล็ดข้าวโพดบดและไม่บดพบว่าวิธี PLSR ของไขมันในเมล็ดไม่บดให้ค่าผิดพลาดของการทำนายต่ำกว่า วิธี MLR แต่สำหรับค่าของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต PLSR และ MLR ที่สร้างขึ้นให้ค่าแตกต่างกันไม่มาก สอดคล้องกับ Baye *et al.* (2006) พบว่า PLSR สามารถทำนายองค์ประกอบของกรดไขมันที่สำคัญที่พบในเมล็ดข้าวโพดที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของน้ำหนักของเมล็ดรวมทั้งความสัมพันธ์ของส่วนประกอบทางเคมีในเมล็ดข้าวโพด เช่น เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์แป้ง และสัดส่วนที่แน่นอนระหว่างปริมาณโปรตีนต่อเมล็ดได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้การทำนายคุณภาพของแป้งข้าวโพดโดยใช้วิธี PLSR สร้างสมการทำนายค่าได้ดีกว่าวิธี MLR อย่างมีนัยสำคัญ (Wehling *et al.*, 1996)

Wang *et al.* (1999) รายงานว่า PLS model ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อจัดจำแนกผลกระทบที่เกิดจากขนาดของเมล็ดที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของเมล็ดข้าวโพดในการวัดแบบสะท้อนกลับ ทั้งยังสามารถระบุพิกของกลุ่ CH ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของคาร์โบไฮเดรตและเมื่อแปลงข้อมูลทั้งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative พบพีกองค์ประกอบของไขมันของกลุ่มตัวอย่างธัญพืชอาหาร (Kays *et al.*, 2005) แม้ว่าวิธี PLSR จะให้ผลการทำนายดีกว่าวิธี MLR (Workman and Mark, 1992) แต่อย่างไรก็ตามการทำนายระดับการสุกของแป้งนั้นวิธี MLR สามารถทำนายค่าได้แม่นยำกว่าวิธี PLSR หากสมการทำนายที่สร้างขึ้นในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมเพราะวิธีดังกล่าวให้ค่า standard errors of cross validation (SECV) และค่า R ที่สูงกว่า (Cheewapramong, 2007)

สมการทำนายที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมหรือไม่ สามารถพิจารณาได้จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R), ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (standard error of calibration, SEC), และค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIR (bias) (Williams, 2001)

2.9.2 การทดสอบสมการ (validation method)

เมื่อได้สมการแล้วจะต้องนำสมการที่ได้มาทดสอบเพื่อจัดประสิทธิภาพของสมการว่าสามารถใช้ประเมินค่าได้แม่นยำมากน้อยเพียงใดวิธีที่นิยมมี 2 วิธี

2.9.2.1 full cross validation

วิธีนี้ตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นตัวอย่างชุดเดียวกันกับกลุ่มที่ใช้ในการสร้างสมการมีวิธีการคือ

ขั้นตอนที่ 1 ตัดตัวอย่างที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการทำนายค่าทางเคมี จากนั้นใช้ตัวอย่างที่เหลือคำนวณหาสมการ เมื่อได้สมการแล้วนำตัวอย่างที่ 1 ที่ตัดออกไปตอนแรกมาทดสอบสมการ

ขั้นตอนที่ 2 ตัดตัวอย่างที่ 2 ออกไป นำตัวอย่างที่ 1 กลับเข้ามาในกลุ่มสร้างสมการรวมกับตัวอย่างอื่นๆ ที่เหลือเพื่อสร้างสมการ เมื่อได้สมการนำตัวอย่างที่ 2 มาทดสอบสมการ ทำซ้ำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งทดสอบสมการครบทุกตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างแต่ละตัวจะถูกตัดออก 1 ครั้งเท่านั้น

การทดสอบในลักษณะนี้เป็นการทดสอบภายใน (internal validation) ซึ่งวัดผลโดยการดูค่า root mean square error of cross validation (RMSECV) เป็นการวัดค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการประเมินด้วยสมการที่สร้างขึ้นกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ ถ้ามีความแตกต่างน้อยแสดงว่าสมการมีประสิทธิภาพให้ค่าที่สามารถยอมรับได้และมักใช้กับตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย

2.9.2.2 test set

เป็นการทดสอบโดยนำกลุ่มตัวอย่างชุดใหม่ (test set) มาทดสอบค่าจากสมการที่ได้ โดยตัวอย่างชุดใหม่ที่นำมาวิเคราะห์ต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง การวัดสเปกตรัม ปัจจัยต่างๆ ในระหว่างวิเคราะห์และการแปลงข้อมูลสเปกตรัมต้องเหมือนกับกลุ่มตัวอย่างในการสร้างสมการ การทดสอบลักษณะนี้เรียกว่า การทดสอบภายนอก (external validation) และพิจารณาความแม่นยำจากค่าทางสถิติ

ถ้าผลการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับผลที่อ้างอิง และให้ค่าทางสถิติที่ดี แสดงว่าสมการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีนั้นยอมรับได้ และสามารถนำไปใช้ทำนายปริมาณตัวอย่างต่อไปได้อย่างถูกต้อง (อนุพันธ์, 2545)

2.10 ค่าทางสถิติที่ใช้ในการพิจารณาการสร้างสมการ

1. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R) คือค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) หากค่าที่คำนวณได้มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 หมายถึง สมการที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ในการอธิบายค่าทำนายที่เกิดจากอิทธิพลของตัวแปรอิสระ (X) กับค่าตัวแปรตาม (Y) ที่มีความสัมพันธ์กันมาก เกณฑ์การพิจารณาค่า R ดังตาราง 2.4 (Williams, 2007)

2. ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (standard error of calibration, SEC) คือค่าที่บอกถึงสมการที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้ในการทำนายต่อไปได้ดีหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

3. ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (standard error of prediction, SEP) คือค่าที่บอกถึงการนำเอาสมการที่สร้างขึ้นมาทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากเครื่อง NIR มีความแม่นยำสูงหรือต่ำ ถ้าค่าที่คำนวณได้มีค่าน้อย หมายความว่าสมการที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำสูง

4. ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIR (average of difference between actual value and NIR value, bias) คือค่าเฉลี่ยของการทำนายข้อมูลของตัวแปรตาม (Y) และค่าเฉลี่ยของข้อมูลตัวแปรอิสระ (X) มีความแตกต่างกันหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

5. อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่ม validation set ต่อค่า SEP (ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, RPD) ค่าจากที่คำนวณได้มีค่าสูง หมายถึง ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ทำนายได้จาก NIR มีค่าน้อยกว่าค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากวิเคราะห์จริง เกณฑ์การพิจารณาค่า RPD ดังตาราง 2.5 (Williams, 2007)

ตาราง 2.4 เกณฑ์การพิจารณาค่า R และ R²

Value of R	Value of R ²	Interpretation
Up to ± 0.5	Up to 0.25	Not usable in NIRS calibration
$\pm 0.51-0.70$	0.26-0.49	Poor correlation, research the reasons
$\pm 0.71-0.80$	0.50-0.64	Rough screening
$\pm 0.81-0.90$	0.66-0.81	Screening and approximate calibration
$\pm 0.91-0.95$	0.83-0.90	Usable with caution for most applications, including
$\pm 0.96-0.98$	0.92-0.96	Usable in most applications, including quality assurance
$\pm 0.99 >$	0.98 >	Usable in any application

ที่มา: Williams (2007)

ตาราง 2.5 เกณฑ์การพิจารณาค่า RPD

RPD Value	Classification	Application
0.0-2.3	Very poor	Not recommended
2.4-3.0	Poor	Rough screening
3.1-4.9	Fair	Screening
5.0-6.4	Good	Quality control
6.5-8.0	Very good	Process control
8.1 >	Excellent	Any application

ที่มา: Williams (2007)

2.11 ข้าวโพด

เมล็ด (seed or grain) เมล็ดของข้าวโพดจัดเป็น single - seed fruit เรียกว่า caryopsis เช่นเดียวกับเมล็ดข้าว อาจเรียกว่า kernel หรือ grain ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง การสะสมอาหารและแร่ธาตุผ่านทางราก จนถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมในช่อดอกตัวเมีย (female inflorescence) หรือเรียกว่า ฝัก (ear) โดยโครงสร้างนี้อาจมีเมล็ดข้าวโพดอยู่ 300 - 1,000 เมล็ด ขึ้นกับจำนวนแถวของเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของช่อดอกข้าวโพด น้ำหนักของเมล็ดมีความแปรปรวนตั้งแต่ 19 - 40 กรัมต่อ 100 เมล็ด (FAO, 1992)

ตาราง 2.6 การกระจายน้ำหนักของชิ้นส่วนหลักของเมล็ดข้าวโพด

Structure	Percent weight distribution
Pericarp	5-6
Aleurone	2-3
Endosperm	80-85
Germ	10-12

ที่มา: FAO (1992)

มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) จะเชื่อมติดกับ pericarp ภายในเมล็ดมีเพียงเมล็ดเดียว ผลและเมล็ดรวมเป็นหน่วยเดียวกัน มี pericarp ห่อหุ้มอยู่ชั้นนอกสุด (Wolf *et al.*, 1952a) รูปร่างของเมล็ดขึ้นกับความหนาแน่นของเมล็ดบนฝัก เมล็ดที่อยู่ส่วนปลายและส่วน โคนจะมีลักษณะค่อนข้างกลม ส่วนเมล็ดที่อยู่ตรงกลางมักจะเป็นและมีเหลี่ยมมุมที่ฐานของ pedicel หรือ tip cap จะพบเนื้อเยื่อสีดำเรียกว่า black layer ซึ่งจะปรากฏให้เห็นเมื่อเมล็ดแก่ และที่ส่วนของเมล็ดจะมีรอยเรียกว่า silk scar เป็นรอยต่อของเส้นไหมที่แห้งหลุดไป

เมล็ดข้าวโพดประกอบด้วยส่วนต่างๆ 5 ส่วน คือ

1. pericarp มีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ ไม่มีสีหุ้ม เมล็ดที่อยู่ส่วนยอดของเมล็ดจะมีรอยซึ่งเรียกว่า silk scar ซึ่งเป็นรอยต่อของเส้นไหมแห้งที่หลุดไป เกิดจากเนื้อเยื่อของผนังรังไข่หลังจากที่ได้รับการผสมแล้ว ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันเมล็ดทั้งก่อนและหลังงอก เพื่อไม่ให้เชื้อราและแบคทีเรียเข้าไปในเมล็ด (Johann, 1935; Kiesselbach, 1949) ในเมล็ดที่แก่และแห้งเต็มที่ pericarp จะอยู่นอกสุด โดยจะเจริญพัฒนาแยกเป็นอิสระจาก endosperm และ embryo King and Scott (1982) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแข็ง (hardness) ของเมล็ดข้าวโพดต่อความต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ว่ายังไม่สามารถตรวจสอบได้แน่นอน แต่ความหนาของ pericarp รอยแตกที่ pericarp ของเมล็ด อาจมีความสำคัญต่อการตรวจสอบถึงความต้านทานต่อเชื้อนี้ได้ โดยในเมล็ดที่แห้งจะมี pericarp ประมาณ 5-6 % เกือบ 50 % ของ pericarp มีองค์ประกอบเป็นพวก hemicellulose (Wolf *et al.*, 1953) ซึ่งจะขยายตัวเมื่อแช่น้ำ สัดส่วนของ pericarp กับ endosperm จะกลับกัน กล่าวคือ ถ้าเมล็ดมี endosperm มาก สัดส่วนของ pericarp ก็จะมีจำนวนเนื้อเยื่อ

pericarp ทั้งหมดจะต่ำลงถ้าความหนาแน่น โดยความหนาและน้ำหนักมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดได้สังเกตพบว่า ความแตกต่างของความหนาของ pericarp ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าวโพด (Wolf *et al.*, 1969)

2. testa หรือเรียกว่า true seed coat มีอยู่ 3 ชั้นซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ติด pericarp เข้าไปทั้ง testa และ pericarp รวมกันเรียกว่า hull ในชั้นพืชส่วนใหญ่ suberized semipermeable membrane ของ testa จะทำหน้าที่เป็นสิ่งกีดขวางต่อการเจริญของเชื้อรา เช่น ในข้าวสาลี ชั้นของ testa นับว่าเป็นส่วนสำคัญในการต้านทานต่อการแทงผ่านของเชื้อรา *Gibberella saubinetii* (Mont.) Sacc. (Pugh *et al.*, 1932)

3. aleurone layer เป็นเยื่อที่มีลักษณะบางๆ อยู่ติด testa เข้าไปจะเป็นส่วนที่หุ้ม endosperm ทั้งหมด ไม่มีสิ่งขากแก่การสังเกตหรือแยกออกจาก testa หรือ pericarp มีความสำคัญเกี่ยวกับการงอกของเมล็ด เพราะเป็นที่สังเคราะห์ enzyme สำคัญที่ใช้ย่อยอาหารใน endosperm

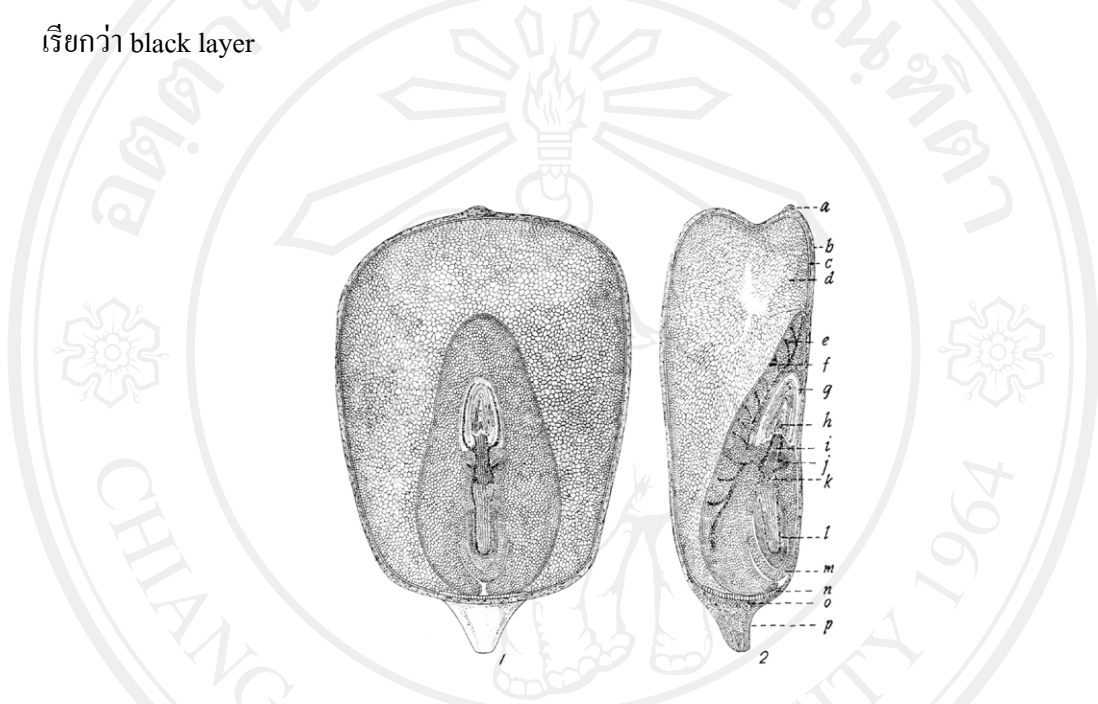
4. endosperm เป็นส่วนที่เก็บสะสมอาหารของเมล็ด มีสีต่างๆหลายสี เช่น เหลือง ขาวและส้ม เป็นต้น มากกว่า 80 % ของเมล็ด คือส่วนของ endosperm ความหนาของ endosperm มีตั้งแต่ 7 ถึง 70 ไมครอน ส่วนที่บางที่สุดคือ บริเวณเหนือ germ และส่วนที่หนาที่สุดคือ บริเวณเหนือด้านข้างและหลังของเมล็ด (Wolf *et al.*, 1952a) อาหารที่สะสมส่วนใหญ่จะเป็นพวกแป้งซึ่งมี 2 ชนิด

4.1 แป้งอ่อน (soft starch) หรือ floury endosperm มักจะพบตามส่วนบนหรือกลางเมล็ด เป็นแป้งซึ่งอยู่หลวมๆมีสีขาวขุ่น

4.2 แป้งแข็ง (hard starch) หรือ horny endosperm พบด้านข้างหรือด้านบนของเมล็ด เป็นแป้งที่เซลล์อยู่รวมกันแน่น ลักษณะค่อนข้างใส

5. embryo หรือ germ ส่วนนี้จะเจริญเป็นต้นอ่อน อยู่ทางด้านล่างของเมล็ด โดยฝังอยู่ด้านหนึ่งของ endosperm ประกอบด้วยแกนกลาง (central axis) ปลายข้างหนึ่งคือ radical ซึ่งมี coleorhizae ห่อหุ้มอยู่ไปทางด้าน pedicel อีกด้านหนึ่งเป็นส่วนของ stem tip ซึ่งมีใบอ่อน

(embryonic leaves) ประมาณ 5 ใบ ม้วนติดกันเป็นกรวย และมี coleoptile หุ้มอยู่ด้านข้างของแกนกลางติดกับ endosperm จะพบ scutellum ซึ่งคือ ใบเลี้ยงของเมล็ด ในเมล็ดข้าวโพดประกอบด้วยส่วนของ germ ประมาณ 10-14 % ส่วนนี้มีลักษณะ oily portion อยู่ก่อนไปทางด้านล่างของเมล็ด โดยฝังตัวอยู่ทางด้านเหนือของ endosperm (Wolf *et al.*, 1952b) ฐานของเมล็ดจะติดกับช่ง โดยส่วนของ pedicel ซึ่งเมื่อข้าวโพดแก่ที่บริเวณ pedicel ติดกับช่งจะพบเนื้อเยื่อสีดำ ซึ่งเรียกว่า black layer



ภาพ 2.26 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าวโพด แสดงลักษณะข้าวโพดเต็มเมล็ด (1) และภาพตัดขวางอธิบายส่วนประกอบของเมล็ด (2) ประกอบด้วย a: silk scar, b: pericarp, c: aleurone, d: endosperm, e: scutellum, f: glandular layer of scutellum, g: coleoptile, h: plumule with stem and leaves, i: first internode, j: lateral seminal root, k: scutellar node, l: primary root, m: coleorhizae, n: basal conducting cells of endosperm, o: brown abscission layer, p: pedicel or flower stalk

(Edward, 2001)

2.12 องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การศึกษาข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพดจำนวนมากพบว่าเป็นผลเกี่ยวเนื่องมาจากลักษณะพันธุกรรมของข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ โดยจะส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ดทั้งนี้ ผลจากปัจจัยสภาพแวดล้อมและการเกษตรกรรมมีบทบาทสำคัญเช่นเดียวกัน

Severson (1998) รายงานว่าในเมล็ดข้าวโพดมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันออกไปตามสัดส่วนดังต่อไปนี้

ตาราง 2.7 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพด แสดงจาก 100 กรัม

chemical component	as 100 g. of edible	chemical component	as 100 g. of edible
water (%)	13.8	P (mg.)	268
protein (g.)	8.9	Fe (mg.)	2.1
fat (g.)	3.9	K (mg.)	284
carbohydrates (g.)	72.2	thiamin (mg.)	0.37
fiber (g.)	2.0	riboflavin (mg.)	0.21
ash (g.)	1.2	niacin (mg.)	2.2
Ca (mg.)	22	Mg (mg.)	147

ที่มา: Severson (1998)

โดยองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างสามารถพบได้ในหลายๆส่วนของเมล็ด ในขณะเดียวกัน ในอวัยวะหนึ่งของเมล็ดก็อาจสะสมอาหารไว้หลายๆชนิด (วันชัย, 2538) จากตาราง 2.8 เป็นตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า ส่วนต่างๆของเมล็ดข้าวโพด มีสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป จะเห็นว่าในส่วนของเอนโดสเปิร์มมีองค์ประกอบใกล้เคียงกับเมล็ดทั้งหมด แต่ในคัพจะพบว่า มีไขมันและโปรตีนอยู่สูง ส่วนในเปลือกพบว่ามีแป้งและโปรตีนอยู่สูง

ตาราง 2.8 องค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของเมล็ดข้าวโพด (%)

chemical component	pericarp	endosperm	germ
protein	3.7	8.0	18.4
ether extract	1.0	0.8	33.2
crude fiber	86.7	2.7	8.8
ash	0.8	0.3	10.5
starch	7.3	87.6	8.3
sugar	0.34	0.62	10.8

ที่มา: Watson (1987)

จากตาราง 2.8 พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมีปริมาณใยอาหาร (crude fiber) ประมาณ 87 % โดยมีส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ 67 % เซลลูโลส 23 % และลิกนิน 0.1 % (Sosulski and Wu, 1988; Burge and Duensing, 1989) ในเอนโดสเปิร์ม พบว่า มีปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบ 87.6 % และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 8 % รวมทั้งมีปริมาณไขมันรวมค่อนข้างต่ำ โดยปริมาณของแป้งและโปรตีนของเมล็ดจะขึ้นกับขนาดของ endosperm

บริเวณส่วนของคัพภะ (germ) มีปริมาณของไขมันรวม (crude fat) และโปรตีนในระดับที่ค่อนข้างสูง คือ 33 % และ 18.4 % ตามลำดับ คุณภาพของโปรตีนที่พบในคัพภะมีมากกว่าที่พบในเอนโดสเปิร์มและเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญที่สุดของเมล็ด นอกจากนี้สายพันธุ์ข้าวโพดที่บริเวณคัพภะมีปริมาณโปรตีนสูงขนาดของคัพภะจะมีขนาดใหญ่กว่าข้าวโพดพันธุ์อื่นๆแต่ปริมาณสัดส่วนของไขมันก็มีปริมาณมากตามไปด้วย (Landry and Moureaux, 1980) แร่ธาตุและองค์ประกอบทางเคมีในชั้น aleurone มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง คือ 19 % (Bressani and Mertz, 1958) ใยอาหารส่วนใหญ่มาจากบริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด Webber (1987); Bressani *et al.* (1990) พบว่าน้ำหนักของเมล็ดและองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ดข้าวโพดโดยเฉพาะคุณค่าทางโภชนาการมีความสำคัญมาก ถ้าใช้ข้าวโพดเพื่อการบริโภคนอกจากนี้ยังพบปริมาณไขมันบริเวณส่วนของคัพภะค่อนข้างสูง

แป้ง (starch) องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเมล็ดข้าวโพดเป็นแป้งมากถึง 72-73 % ของน้ำหนักเมล็ด สำหรับส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เช่น กลูโคส, ซูโครส และฟรุกโตส มีปริมาณที่แตกต่างกันประมาณ 1-3 % ของน้ำหนักเมล็ด องค์ประกอบของแป้งในเมล็ดข้าวโพดประกอบด้วย 2 พอลิเมอร์ของกลูโคส โดยมีอะมิโลสเป็นโมเลกุลเส้นตรงและเป็นเส้นหลักและมีอะมิโลเพกตินเป็นแขนงย่อยของเส้นใย องค์ประกอบของแป้งในข้าวโพดถูกควบคุมโดยลักษณะพันธุกรรม ข้าวโพดทั้งชนิดหัวนุบ (dent) และหัวแข็ง (flint) พบว่า endosperm มีปริมาณอะมิโลส 25-30 % ของแป้ง และอะมิโลเพกตินประมาณ 70-75 % ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) พบว่ามีอะมิโลเพกติน 100 % โดยยีน AE (amylase-extender) ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์และเพิ่มสัดส่วนของแป้งสูงกว่า 50 % ของยีนอื่นๆ หรือเกิดจากการเปลี่ยนสัดส่วนจากอะมิโลสเป็นอะมิโลเพกตินในแป้งข้าวโพด (Boyer and Shanon, 1987)

โปรตีน (protein) ปริมาณของโปรตีนจะแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ของข้าวโพดโดยพบประมาณ 8-11 % ของน้ำหนักเมล็ด มี 2 ชนิดโดยส่วนใหญ่แล้วจะพบในเนื้อในของ endosperm Landry and Moureaux (1982) รายงานว่าพบทั้ง albumins, globulins และปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนประมาณ 18 % ของไนโตรเจนทั้งหมด โดยมีประมาณ 7, 5 และ 6 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของ prolamine ที่สามารถละลายได้ในอะซิโตน

ไขมันและกรดไขมัน (oil and fatty acid) ปริมาณองค์ประกอบของไขมันส่วนใหญ่มาจากส่วนที่เจริญเป็นต้นอ่อน มีการควบคุมโดยลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ พบประมาณ 3 – 18 % น้ำมันข้าวโพดมีระดับกรดไขมันอิ่มตัว 11 % กรดปาล์มมิก (palmitic acid) และกรดสเตียริก (stearic acid) 2 % และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในระดับค่อนข้างสูงโดยส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid) และอะราชิโดนิก (arachidonic acid) ประมาณ 24 % นอกจากนี้ น้ำมันข้าวโพดค่อนข้างมีเสถียรภาพเนื่องจากมีปริมาณของกรดไขมัน (0.7 %) และพบสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง การกระจายของกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบเป็นกรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดไลโนเลอิก (linoleic acid)

ใยอาหาร (dietary fibre) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบมากเช่นเดียวกันในเมล็ดข้าวโพด โดยส่วนใหญ่พบใน pericarp และ tip ในส่วน pericarp จะห่อหุ้มส่วนของ endosperm และมีขนาดเล็กกว่าชั้นห่อหุ้มของส่วนคัพภะ เป็นทั้งส่วนประกอบเส้นใยที่ละลายน้ำได้ และไม่ละลายน้ำ Sandstead *et al.* (1987); Van Soest *et al.* (1979) รายงานว่า ไร่ข้าวโพด (corn bran) ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 75 % เซลลูโลส (cellulose) 25 % และลิกนิน (lignin) 0.1 % เมื่อวัดด้วยน้ำหนักแห้ง

แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เมื่อเมล็ดข้าวโพดสุกแก่เต็มที่ ปริมาณของแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆจะน้อยกว่าแป้ง พบปริมาณของน้ำตาล 1 และ 3 % โดยมีซูโครส (sucrose) เป็นองค์ประกอบหลัก พบมากในต้นอ่อน และมีระดับของมอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide), ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharides) และ ไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharides) ในปริมาณสูง 12 วันหลังจากผสมเกสรพบว่า มีปริมาณน้ำตาลในระดับสูง และแป้งในปริมาณต่ำ แต่เมื่อเมล็ดโตเต็มที่ ปริมาณน้ำตาลจะลดลงและสัดส่วนของแป้งก็จะมากขึ้น ตัวอย่างเช่น หลังจากเก็บเมล็ดไว้ 16 วันพบว่าระดับน้ำตาลมี 16 % ของน้ำหนักแห้งในเมล็ด แต่มีระดับที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกับอายุ สัดส่วนของซูโครสหลังจากดอกบาน 15-18 วันมีระหว่าง 4-8 % ของน้ำหนักแห้ง ความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลที่สูงดังกล่าวจึงเป็นเหตุผลว่าข้าวโพดฝักอ่อนเป็นที่นิยมของผู้บริโภค

แร่ธาตุ (minerals) ความเข้มข้นของเถ้า (ash) มีประมาณ 1.3 % พบปริมาณเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับใยอาหาร ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีผลต่อความสัมพันธ์ของแร่ธาตุที่อยู่ในเมล็ด โดย Bressani *et al.* (1989) พบว่า บริเวณคัพภะมีปริมาณแร่ธาตุที่สะสมอยู่ในปริมาณมาก โดยพบมากถึง 11 % เมื่อเปรียบเทียบกับ endosperm ที่พบเพียง 1 % และเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดเต็มเมล็ดพบว่า บริเวณคัพภะมีการสะสมของแร่ธาตุมากถึง 78 % พบ ฟอสฟอรัส (phosphorus), ไฟเตส (phytate) จากโพแทสเซียม (potassium) และแมกนีเซียม (magnesium) ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่พบบริเวณ embryo มีประมาณ 0.90 % และพบแคลเซียมในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับรัฐพืชชนิดอื่น

วิตามินที่ละลายในไขมัน (fat-soluble vitamins) เมล็ดข้าวโพดประกอบด้วยวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน 2 ชนิดคือ โปรวิตามิน เอ (provitamin A) หรือ คาร์โรทีนอยด์ (carotenoids) และวิตามินอี (vitamin E) คาร์โรทีนอยด์พบมากในเมล็ดข้าวโพดที่มีสีเหลือง สำหรับเมล็ดข้าวโพดที่มีสีขาวจะพบปริมาณคาร์โรทีนอยด์ในปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย คาร์โรทีนอยด์พบมากในส่วนที่แข็ง (hard endosperm) และพบน้อยมากบริเวณส่วนของคัพพะ นอกจากนี้พบว่าเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) มีความสำคัญในการสังเคราะห์วิตามินเอ Bressani and Scrimshaw (1958) พบว่าเบต้าแคโรทีนมีประมาณ 22 % ของปริมาณ แคโรทีนอยด์ทั้งหมด (6.4-11.3 $\mu\text{g/g}$) ในตัวอย่างของเมล็ดข้าวโพดสีเหลืองปริมาณ cryptoxanthin มีประมาณ 51 % ของคาร์โรทีนอยด์ทั้งหมด พบว่ามีปริมาณของวิตามิน เอ เท่ากับ 1.5-2.6 $\mu\text{g/g}$ โดยคาร์โรทีนอยด์ในเมล็ดข้าวโพดถูกเข้าทำลายได้ง่าย ภายหลังจากเก็บรักษา Watson (1962) รายงานว่า ข้าวโพดหลังเก็บเกี่ยวมีน้ำหนัก 4.8 mg/kg หลังจากเก็บรักษาในโรงเก็บ 36 เดือนพบว่าน้ำหนักลดลง 1.0 mg/kg โดยส่วนที่สูญเสียดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบต้าแคโรทีนเพื่อเพิ่มปริมาณวิตามินเอ

วิตามินที่ละลายได้ในน้ำ (water-soluble vitamins) พบมากในส่วนที่แข็งของ aleurone layer คัพพะ และ endosperm ตามลำดับ โดยพบไทอะมีน (thiamin) หรือ วิตามินบี 1 (vitamin B₁) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) หรือ วิตามิน บี 2 (vitamin B₂) ซึ่งสภาพแวดล้อม การเกษตรกรรม จะมีผลมากกว่าลักษณะทางพันธุกรรม นอกจากนี้ nicotinic acid เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำที่มีงานวิจัยกันมาก เพราะมีผลเชื่อมโยงกับการขาดไนอะซิน (niacin) (Christianson *et al.*, 1968) ปริมาณไนอะซินพบประมาณ 20 $\mu\text{g/g}$ บางครั้งการสังเคราะห์ไนอะซินพบปริมาณน้อยมากในเมล็ด ทั้งที่เกิดจากความไม่สมดุลของกรดอะมิโน เช่น อัตราส่วนระหว่างลิวซีน (leucine) กับไอโซลิวซีน (isoleucine) รวมทั้งความปกติของทริปโตเฟน (tryptophan) ก็มีความสำคัญ (Gopalan and Rao, 1975; Patterson *et al.*, 1980) และในเมล็ดข้าวโพดพบว่าไม่มีวิตามินบี 12 ส่วนเมล็ดที่โตเต็มที่พบปริมาณของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ในปริมาณน้อย Yen *et al.* (1976) พบ ไพริโดซีน (pyridoxine) 2.69 mg/kg รวมถึงปริมาณของวิตามินอื่นๆเช่น โคลีน (choline), กรดโฟลิก (folic acid) หรือ วิตามินบี 9 (vitamin B₉) และกรดแพนโทเทนิก (pantothenic acid) หรือวิตามิน บี 5 (vitamin B₅) มีปริมาณน้อย

2.13 การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS กับเมล็ดข้าวโพด

Jiang *et al.* (2006) พบว่าตำแหน่ง embryo ด้านบนและด้านล่างเป็นตำแหน่งที่ง่ายต่อการสร้างสมการเทียบมาตรฐานเพื่อทำนายองค์ประกอบของโปรตีนและแป้ง โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) ของโปรตีนที่ 0.91 และ 0.94 ไขมันที่ 0.94 และ 0.95 แป้งที่ 0.90 และ 0.89 ตามลำดับในการวัดแบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) โดยมีสมการเทียบมาตรฐานในการทำนายค่าโปรตีน, แป้ง และไขมันของเมล็ดข้าวโพดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ 1114-1836 นาโนเมตร, 781-2498 นาโนเมตร และ 1332-1836 นาโนเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ Liang-ming *et al.* (2004) ใช้เทคนิค NIR reflectance เพื่อหาปริมาณของโปรตีนและแป้งในเมล็ดข้าวโพดโดยสร้างสมการเทียบมาตรฐาน PLSR ของโปรตีนและไขมันที่ความยาวคลื่น $10000-40000\text{ cm}^{-1}$ 1^{st} + MSC และที่ความยาวคลื่น $9000-4000\text{ cm}^{-1}$ แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วย 1^{st} + straight line subtraction ตามลำดับ พบค่า R^2_{cal} , R^2_{cv} และ R^2_{val} ที่ 0.97, 0.92 และ 0.95 ตามลำดับ รวมทั้งสามารถทำนายองค์ประกอบของกรดไขมันชนิด ปาล์มมิติก โอเลอิก และไลโนเลอิกซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนได้อย่างแม่นยำ (Baye *et al.*, 2006) มีรายงานว่า การวัดแบบส่องผ่านในช่วงความยาวคลื่น 850 และ 1050 นาโนเมตรที่ตำแหน่ง embryo ส่วนล่าง สามารถทำนายองค์ประกอบของไขมันในเมล็ดข้าวโพดแบบเมล็ดเดี่ยวและกองเมล็ดขนาดใหญ่ในโรงเก็บได้อย่างถูกต้องโดยมีค่า R เท่ากับ 0.75 และ 0.97 ตามลำดับ (Orman and Robert, 1992)

Campbell *et al.* (1999) ใช้เทคนิค NIR transmittance ในการทำนายองค์ประกอบของอะมิโลสที่ได้จากแป้งข้าวโพดและเมล็ดข้าวโพดพบว่าค่า R, SEP และ RPD เท่ากับ 0.96, 5.1 %, 3.8 และ 0.96, 2.7 %, 3.5 ตามลำดับซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนักในการทำนายปริมาณอะมิโลสรวมทั้งยังสามารถกำหนดระดับการปลอมปนของตัวอย่างเมล็ดที่มีปริมาณอะมิโลสสูงได้อย่างแม่นยำ (Campbell *et al.*, 1997) พบสมการเทียบมาตรฐานในช่วงความยาวคลื่น 904 - 1685 นาโนเมตรโดยสามารถทำนายองค์ประกอบของโปรตีนหยาบ (crude protein), น้ำหนักรวมของเมล็ด (kernel mass) ให้ค่า R^2 และ SEP เท่ากับ 0.75, 0.47 % และ 0.76, 0.03 g. ตามลำดับ (Tallada *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังสามารถทำนายองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นชนิด ทริปโตเฟน (tryptophan) และไลซีน (lysine), ไขมัน และส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลได้ รวมทั้งพัฒนาเทคนิคการ

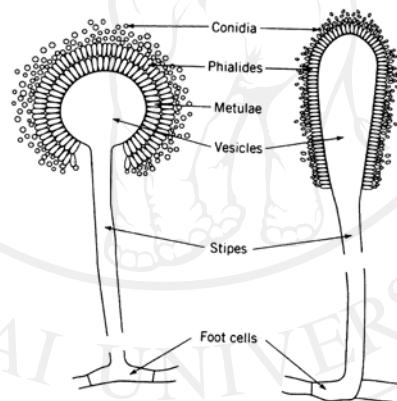
สร้างสมการเทียบมาตรฐานเพื่อทำนายองค์ประกอบของข้าวโพดแบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) ประเมินความเป็นไปได้ของภาพถ่ายจากสเปกโตรมิเตอร์ร่วมกับ NIR hyperspectral พบว่าสมการที่ดีที่สุดของความชื้นและไขมันในเมล็ดให้ค่า SECV และ RPD เท่ากับ เท่ากับ 1.20 %, 2.74 และ 1.38 % และ 1.45 ตามลำดับ (Cogdill *et al.*, 2004)

2.13 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Aspergillus flavus* Link ex Fries

A. flavus จัดอยู่ใน Kingdom Fungi, Phylum Ascomycota, Oder Eurotiales, Family Trichocomaceae, Genus *Aspergillus*, Species *Flavus* (Alexopoulous and Mims, 1979; Klich and Pitt, 1988; Yu *et al.*, 2005; Klich, 2007) เป็นสาเหตุของการเข้าทำลายในพืชไร่หลายชนิด เช่น ข้าวโพด, ถั่วลิสงและฝ้าย โดยข้าวโพดพบการเข้าทำลายมากที่สุด (Taubenhaus, 1920) สามารถแพร่กระจายจากที่หนึ่งไปเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในอีกที่หนึ่งรวมทั้งมีความสามารถในการสร้างสารพิษและมีวิวัฒนาการในการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายของมนุษย์ (St. Leger *et al.*, 2000)

Raper and Fennell (1965) รายงานว่า กลุ่มของ *A. flavus* มีมากถึง 9 ชนิด (species) และ 2 สายพันธุ์ (varieties) ประกอบด้วย *A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. oryzae* var. *effusus*, *A. zonatus*, *A. clavato-flavus*, *A. tamaris*, *A. flavo-furcatis*, *A. subolivaceus* และ *A. avenaceus* จีโนม (genome) หรือข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของ *A. flavus* มีรูปร่างขนาด 36 Mb และประกอบด้วย 8 โครโมโซม (chromosomes) มีตำแหน่งยีน (genes) ที่ 13 071 มีความยาว 1384 bp (Yu *et al.*, 2005) ลักษณะที่สำคัญประกอบด้วยเส้นใยที่มีผนังกัน (septum hyphae) ไม่มีสีหรือมีสีอ่อน (hyaline or subhyaline) มีก้านชูสปอร์ (conidiophore) เจริญจากเส้นใยโดยตรง มีลักษณะยาวและไม่แตกกิ่งก้านสาขา ไม่มีสี ผนังหนา ผิวขรุขระ ปกติยาวน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ยาวประมาณ 700-800 ไมครอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-25 ไมครอน ผนังหนา 1 ไมครอน ซึ่งเจริญมาจากส่วนของ foot cell ซึ่งมีผนังหนา ไม่มีสี ส่วนปลายก้านชูสปอร์ไปงอกเป็น vesicle มีรูปร่างค่อนข้างกลม แบบ glubose หรือ subglubose ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-65 μm (Raper and fennel, 1965; Hedayati *et al.*, 2007) บนกระเปาะบริเวณ vesicle เป็นที่เกิดของ sterigma มีตั้ง

(phialide) มีทั้งแบบชั้นเดียว (uniseriate) หรือสองชั้น (biseriate) โดยชั้นเดียวมีขนาดยาวประมาณ 10 μm ในกรณีที่มีสองชั้น ชั้นในส่วนที่ติดกับ vesicle เรียกว่า metulae (primary sterigma) ซึ่งมีขนาดยาวประมาณ 5 μm (เสาวรสและอังคณา, 2528) ส่วนชั้นนอกซึ่งเป็น phialide (secondary sterigma) ซึ่งตั้งอาจเกาะรอบกระเปาะ หรือเพียงบางส่วนของกระเปาะและเป็นที่เกิดของเซลล์ที่ทำให้เกิดสปอร์ (conidia) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 μm สปอร์เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ สปอร์รูปร่างกลมและผนังขรุขระซึ่งมีเซลล์เดียว โคนิเดียอ่อนจะอยู่ปลายตั้ง เวลาที่โคนิเดียอ่อนเกิดจะดันโคนิเดียแก่ออกไป จึงปรากฏโคนิเดียเป็นสาย (basipetal chain) บนปลาย sterigma เมื่อตรวจดูภายใต้กล้อง stereobionocular microscope พบว่า ไม่มีสีเมื่อยังอ่อนอยู่ ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวแกมเหลืองรูปร่างค่อนข้างกลม (globose) หรือแตกออกเป็นแฉก 3-4 แฉก ตำแหน่งที่ก้านชูออกจากสายรา เรียกว่า foot cell ซึ่งจะมีความใหญ่กว่าสายราและมีขอบเขตที่ชัดเจน มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบใช้เพศและไม่ใช้เพศ แต่การสืบพันธุ์แบบใช้เพศเกิดขึ้นน้อยมาก (Alexopoulos and Mims, 1979)



ภาพ 2.27 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus spp.* (Klich, 2007)

ชนิดา (2536) ได้ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA พบว่า ในวันแรกเชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาว เมื่อเริ่มเข้าวันที่ 2 จะสร้างสปอร์และเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุได้ 7 วัน โดย เชื้อราสร้างโคโลนีสีเขียวแกมเหลือง เป็นสีของ conidial head ที่เจริญจากเส้นใย (hyphae) ที่ไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน (hyaline หรือ subhyaline) และมีผนังกั้น (septum hyphae) บางไอโซเลท (isolate) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วสามารถสร้างกลุ่มของเส้นใยที่อัดกันแน่นเป็นลักษณะกลม (sclerotium) กระจัดกระจายอยู่บนผิวอาหารทั่วไป มีสีน้ำตาลดำ โดยมีขนาดเส้นผ่าน

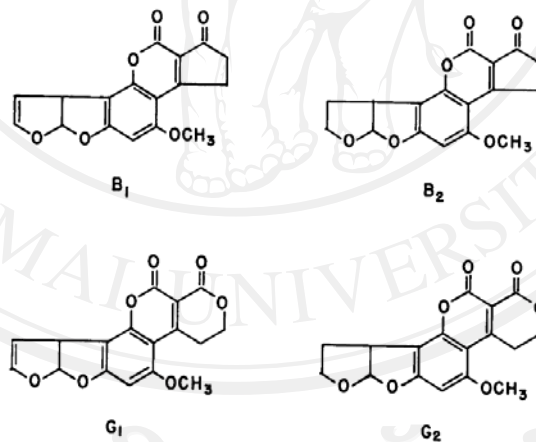
ศูนย์กลาง 400-700 μm (Klich, 2002a; Raper and funnel, 1965) Wicklow (1983) รายงานว่า เชื้อรา *A. flavus* สามารถผลิต sclerotium เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมโดยจะงอกภายใน 48-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25, 28 และ 37 °C ไม่ว่าในดินหรือบนทรายชั้น เม็ด sclerotium ที่ฝังดินที่ชั้นลึก 1 เซนติเมตร ต่อมาเมื่อสัมผัสกับอากาศจะสร้าง conidial head ทั้งนี้ conidium ของ *A. flavus* จะไม่งอกถ้าตกลงดิน ถึงงอกเส้นใยก็ตาย คงมีแต่ conidium ที่ปลิวไปตกบนไหมข้าวโพด จัดว่าเป็นแหล่งเริ่มต้นของการระบาด (primary inoculum) จากรายงานพบว่า domesticated mold หรือเรียกว่า koji mold เช่น *A. oryzae* และ *A. sojae* มี conidium ใหญ่ ผิวเรียบ ในขณะที่ wild type เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* มี conidium เล็กกว่าและผิวหยาบ ทั้งนี้สันนิษฐานว่ากลุ่มหลังนี้ปรับตัวเพื่อเกาะติดกับแหล่งอาหารและแมลงพาหะ ซึ่งรวมทั้งไหมข้าวโพดด้วย (อุดมและธรรมศักดิ์, 2528) ทั้ง wild type และ domesticated mold ต่างก็ผลิต sclerotium ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อย่างไรก็ตามความสำคัญของ sclerotium โดยเฉพาะ *A. flavus* เป็นแหล่งผลิต conidium ชุดแรกที่ปลิวไปตกที่ไหมแล้วทำลายเมล็ดข้าวโพด รวมทั้งสามารถอยู่ข้ามฤดูได้เพราะอยู่ในดินได้นาน ตรงกลางโคโลนีสีเข้มสุดและจางลงไปเรื่อยๆ เมื่อห่างจากจุดศูนย์กลางเนื่องจากตรงกลางโคโลนีมี conidial head ขึ้นอย่างหนาแน่นและอายุแก่กว่า ขอบของโคโลนีจะเห็นเป็นเส้นสีขาวและมี conidial head ขึ้นอย่างเบาบางกระจายทั่วไป เป็นเซลล์ที่ฟุ้งกระจายได้ดีในอากาศสามารถปะปนกับพืชปลูกและเมล็ดพืชตั้งแต่ในแปลงปลูกเข้าไปในโรงเก็บนอกจากนี้ยังจัดเป็น storage fungi คือ เชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดพืชในโรงเก็บ เชื้อรานี้สามารถเจริญเติบโตเป็น saprophyte ที่ไม่เจาะจงและปะปนกับเศษซากพืชที่กระจุกกระจายทั่วไปทั้งบนผิวดินและในดิน ซึ่งจัดเป็นแหล่งของเชื้อราในชั้นปฐมภูมิ (primary inoculum) เป็นที่อาศัยของสปอร์และถือเป็นแหล่งผลิต โคนิเดียให้กระจายในดินที่สำคัญในฤดูปลูกต่อไปและสามารถแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็วโดยการพัดพาของอากาศและกระแสลม เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างกว้างในเขตร้อนชื้นที่ละติจูด 26-35° และในเขตหนาวที่ละติจูด 45° (Klich, 2002b; Manabe and Tsuruta, 1978) ถ้าความชื้นพอเพียงตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 12-48 °C และมีศักย์ภาพของน้ำในดิน (water potential) ที่ระดับ -2 mPa จนถึงระดับ -35 mPa ซึ่งต่ำกว่าระดับของเชื้อราทั่วไป (Klich *et al.*, 1992) แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วง 25-35 °C ในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศมากกว่า

75 % (Richard and Payne, 2003) และมีค่า water activity (a_w) อยู่ระหว่าง 0.86-0.96 (Vujanovic *et al.*, 2001)

2.14 อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins)

A. flavus สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีความชื้นสูง กล่าวคือ ที่ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 81 % สปอร์ของเชื้อราสามารถงอกได้ และเชื้อจะสร้างสปอร์ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 83 % (Christensen and Mirocha, 1976; Sauer and Burroughs, 1980) เมื่ออากาศมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็น 86-87 % (หรือ A_w เท่ากับ 0.85) เชื้อราสามารถเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ซึ่งจัดเป็น secondary metabolite ซึ่งถูกสร้างขึ้น โดยพวก mycotoxin storage fungi สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารเคมีพวก difranocoumarin ซึ่งแยกออกมาจากเชื้อราพวก *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่พบอยู่ทั่วไปจะเป็น อะฟลาทอกซิน ชนิดบี1 (AFB₁) บี2 (AFB₂), จี1 (AFG₁) และ จี2 (AFG₂) และอีกหลายชนิดในปริมาณเล็กน้อย สารพิษอะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและทนความร้อนได้สูงถึง 260 °C (ประสงค์, 2530; Sanz *et al.*, 1989) โมเลกุลของอะฟลาทอกซิน มีนิวเคลียสของ coumarin เชื่อมโยงกับ bifuran และ pantanose อนุพันธ์ของสารทั้ง 4 สามารถแยกออกจากกันภายใต้การเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 256-365 นาโนเมตร คำว่า B และ G เป็นคำย่อมาจากแสงฟลูออเรสเซนส์สีน้ำเงินและเขียวที่ผลิตโดยสารทั้งสองชนิดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตบนแผ่นตรวจสอบแบบ Thin-layer โดยสารพิษ B₁ จะให้แสงสีน้ำเงิน ชนิด G₁ สีเขียว ชนิด B₂ และ G₂ เป็น derivative ที่มีการเพิ่มหมู่ hydrogen เข้าไป ตัวเลขที่อยู่ด้านล่าง 1 และ 2 แสดงถึงความสำคัญมากขึ้นตามลำดับ (Dutton and Heathcote, 1966) โดยทั่วไปแล้วจะพบ B₁ ในธรรมชาติมากที่สุด และ Aflatoxin B₁ ยังเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงมากที่สุดในกลุ่ม ทั้ง 4 อนุพันธ์พบว่า B₁ มีความเข้มข้นของสารอนุพันธ์มากกว่า G₁ และ G₂ *A. flavus* จะสร้างเฉพาะ B₁ และ B₂ และ *A. parasiticus* จะผลิตสารตัวเดียวกันนี้พร้อมกับ G₁ และ G₂ ในบางครั้งอาจพบอะฟลาทอกซิน ชนิด M₁, M₂ และ P₁ ซึ่งเป็น derivative ของ B₁ และ B₂ ซึ่งพบในสิ่งขบถ่ายน้ำมันของพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (โดยเฉพาะวัว) เมื่อดูโครงสร้างรวมของอะฟลาทอกซิน แล้วจะพบว่า เป็นสารพวก heterocyclic ที่มีหมู่ Oxygen อยู่หลายตำแหน่ง Dutton and Heathcote (1966) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างวง hemiacetal ของ B₁ และ G₁

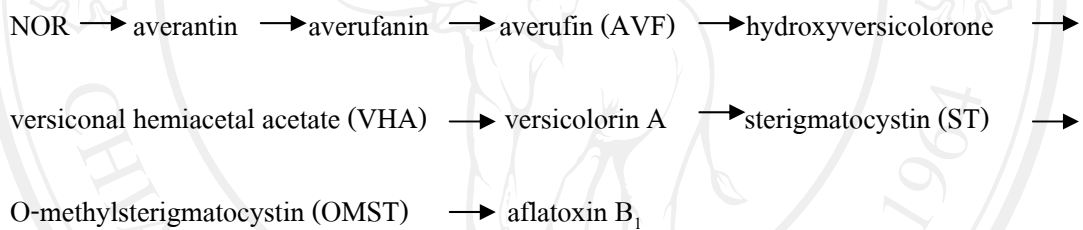
กำหนดให้มี B₂ และ G₂ โดย 2 อนุพันธ์ของ 4-Hydroxylated ของสารพิษตัวสุดท้ายจะเกิดในถั่วลิสง และข้าวโพด การผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นผลจากการรวมกันของชนิดสารตั้งต้นและสภาพแวดล้อม ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารพิษสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ ปัจจัยทางกายภาพ, อาหาร และทางชีววิทยา ปัจจัยทางกายภาพประกอบด้วย อุณหภูมิ, pH, ความชื้น, แสง, อากาศ และระดับก๊าซต่างๆในบรรยากาศ การผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน สามารถผลิตได้ที่ระดับอุณหภูมิระหว่าง 12-42 °C ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-35 °C (เมทนีและคณะ, 2531; Diener and Davis, 1966) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมอาจสูงถึงช่วง 37-43 °C (Sorenson *et al.*, 1967; Hunter, 1969; Diener and Davis, 1970; Rambo *et al.*, 1975) และสามารถผลิตสารพิษได้ดีเมื่อเจริญในสภาพที่มีความชื้นสูง ระดับความชื้นสำหรับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพดคือ 25% ที่อุณหภูมิ 30 °C และระดับต่ำสุดของความชื้นในบรรยากาศอยู่ระหว่าง 83 % และ 88 % โดยเฉพาะคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และออกซิเจน (O₂) มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน



ภาพ 2.28 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซิน ชนิดบี1 (AFB₁) บี2 (AFB₂), จี1 (AFG₁) และ จี2 (AFG₂)
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved
(Goldblatt, 1967)

ที่ 20 % ของคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศที่ลดลงในการผลิตสารพิษส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา การเพิ่มขึ้นของระดับออกซิเจนในบรรยากาศที่ 10 % ทำให้เกิดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ลดลงแต่ที่ระดับออกซิเจนน้อยกว่า 1 % การเจริญเติบโตและการผลิต

อะฟลาทอกซิน ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ หลายๆงานวิจัยพบว่า pH เริ่มแรกไม่มีผลต่อการสร้างสารพิษ แต่ยังมีงานวิจัยอื่นๆได้แสดงให้เห็นว่าระดับกรดอ่อนส่งผลในการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินสูงขึ้น แต่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่ลดลง (Landers *et al.*, 1967) สภาพธรรมชาติและห้องปฏิบัติการมีผลต่อการผลิตสารพิษ โดยแหล่งของคาร์บอนสำหรับสร้างสารพิษมีทั้งกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) หรือฟรุกโตส (fructose) สำหรับสังกะสี (zinc) และแมงกานีส (manganese) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารพิษ แต่ถ้าหากว่ามีส่วนผสมของแคดเมียม (cadmium) และเหล็ก (iron) ทำให้การเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษลดน้อยลง อะฟลาทอกซินมีกลไกการสังเคราะห์อย่างน้อย 18 ปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงของ multi enzymatic โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ polypeptide จากอะซิเตทซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์คล้ายกรดไขมัน โดยกลไกการสังเคราะห์ aflatoxin B₁ (Prieto and Woloshuk, 1997) มีดังนี้

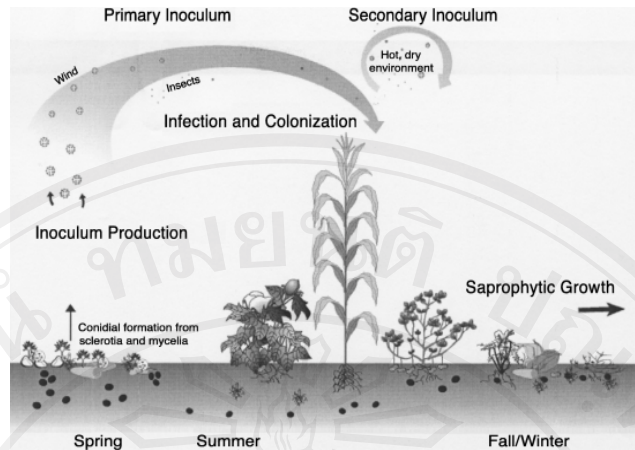


ในกระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน กรด norsolorinic (NOR) เป็นสารตัวแรกที่เป็นกลางโดยการเปลี่ยนรูปจาก sterigmatocystin (ST) ไปเป็น O-methylsterigmatocystin (OMST) และสุดท้ายเป็น aflatoxin ซึ่งกระบวนการขั้นตอนสุดท้ายเป็นการผลิตสารพิษของทั้ง *A. flavus* และ *A. parasiticus* (Bennet and Papa, 1988; Yu *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1995) บางเอนไซม์ (enzyme) มีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินและบางยีน (gene) สามารถเกิดการจำลองตัวเอง ประกอบด้วยยีน pksA, pksL1, fasI A, nor-1, nor A, avfI, abs, verl, stcP, omtA, ordI, avnA และ aflR เป็นยีนสำคัญในกลไกการแสดงออกของยีน (Skory *et al.*, 1992; Prieto and Woloshuk, 1997; Motomura *et al.*, 1999) การจำแนกยีนที่สังเคราะห์สารอะฟลาทอกซินที่ตำแหน่งยีน 75-kb ระหว่างเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ทั้งหาความสัมพันธ์ร่วมของตำแหน่งยีนของเชื้อราทั้งสองชนิดพบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกัน รวมทั้งมีความคล้ายคลึงกับเชื้อราอีกหลายชนิดเช่น *A. nidulans*, *Bipolaris spp.*, *Chaetomium spp.*, *Farrowia spp.* และ *Monocillium spp.* โดยพบว่า

สามารถผลิต sterigmatocystin (ST) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของอะฟลาทอกซิน เช่นในเชื้อรา *A. nidulans* กระบวนการสังเคราะห์ sterigmatocystin (ST) พบว่ามีการจับกันที่ตำแหน่งยีน 60-kb (Brown *et al.*, 1996; Keller and Hohn, 1997)

2.15 ขบวนการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus*

A. flavus จะเข้าทำลายเมล็ดหากมีสภาพแวดล้อมหรืออุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม (Richard and Payne, 2003) แหล่งของเชื้อราในชั้นปฐมภูมิที่มีศักยภาพมากที่สุดอยู่ในรูปสปอร์ของเชื้อรา (conidia) จะเกิดการปนเปื้อนไปกับเมล็ดตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ขณะเก็บเกี่ยว รวมถึงการปนเปื้อนจากเชื้อราที่แพร่กระจายทั่วไปในอากาศ ติดไปกับภาชนะที่บรรจุ และปนเปื้อนติดไปกับแมลงในโรงเก็บ เพื่อความอยู่รอดแล้วสปอร์ของเชื้อราที่ติดไปกับพืชจะเคลื่อนตัวไปสู่ที่ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ขบวนการเข้าทำลายเริ่มต้นเมื่อสปอร์ตกลงไปหรือติดไปกับส่วนของพืช หากสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะก่อให้เกิดขบวนการทางชีวเคมีซึ่งมีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเปลี่ยนแปลงไป และต้องการพลังงานเพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้นจุดที่รับเชื้อจึงกลายเป็นจุดที่ติดเชื้อขึ้นมาเป็น infection unit จากภาพ 2.29 แสดงระยะก่อนการเก็บเกี่ยวของฝ้าย, ข้าวโพด และถั่วลิสงที่ถูกเข้าทำลายโดย *A. flavus* sclerotia และ conidia เกิดขึ้นจาก *A. flavus* ที่เจริญบนใบที่แห้งเหี่ยวหลุดร่วงของพืชปลูกและในดิน จัดเป็นแหล่งของเชื้อราในชั้นปฐมภูมิ (primary inoculum) ของพืชปลูก โดยอยู่ในช่วงของฤดูใบไม้ผลิจากนั้นจะเกิดการพัดพาโดยลมและแมลง ซึ่งสอดคล้องกับ St. Leger *et al.* (2000) กล่าวว่า แมลงเป็นพาหะแหล่งใหญ่ในการแพร่กระจายของเชื้อ *A. flavus* สู่พืชปลูก เมื่อถึงฤดูร้อน conidia จะถูกสร้างขึ้นและเกิดการเข้าทำลายพืชปลูกในปริมาณที่สูงซึ่งจัดเป็น secondary metabolite โดยเมื่อเข้าสู่ฤดูฝนมีสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศที่เหมาะสมก็จะเกิดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) (Scheidegger and Payne, 2003)

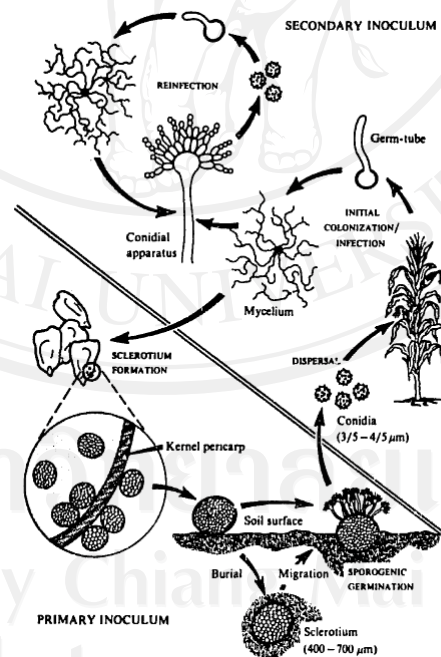


ภาพ 2.29 ขบวนการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* (Scheidegger and Payne, 2003)

เชื้อรา *A. flavus* เข้าทำลายและเจริญในเมล็ดข้าวโพดโดยเริ่มต้นจาก conidium ของเชื้อรา งอกเป็น germ tube หลังจากที่ conidium ตกสัมผัสกับผิวของเมล็ดข้าวโพด 8 ชั่วโมง germ tube จะเจริญแทงทะลุรอยต่อของเซลล์ผิวเมล็ดเข้าไปเจริญอยู่ทั้งแบบอยู่ระหว่างเซลล์ (inter cellular) และอยู่แบบในเซลล์พืช (intra cellular) ระยะเวลาที่ใช้ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจาก conidium สัมผัสกับผิวของเมล็ดข้าวโพด ต่อจากนั้นเชื้อราก็จะเจริญและพัฒนาสร้าง conidial head ทั้งที่บน ผิวเมล็ดและบริเวณ tip cap และเจริญหนาแน่นมากหลังจาก 36 ชั่วโมง แต่ในส่วน germ และ endosperm พบเชื้อราเพียงเล็กน้อย เชื้อราเข้าทำลายในส่วนของ tip cap และ pericarp ได้มากที่สุด รองลงมาคือส่วนของ germ, floury endosperm และ horny endosperm (ชนิดาและคณะ, 2536) สอดคล้องกับ Tsurata *et al.* (1981) รายงานว่า บริเวณ tip cap ของเมล็ด เป็นบริเวณสำคัญที่เป็น ทางเข้าสู่เมล็ดของเชื้อรา โดยศึกษาการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิด ในเมล็ดข้าวโพดภายหลังการเก็บเกี่ยว ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เชื้อราทั้งหมดจะเจริญบนผิวของ เมล็ดที่บริเวณตรงกลางของ germ และ tip cap ในส่วนของ germ พบเส้นใยตรงกลางของ germ เส้น ใยส่วนมากจะเจริญปกคลุม germ อยู่แค่ที่ผิว มีส่วนน้อยที่เจริญบนผิว แล้วแทงผ่านชั้น pericarp เข้า ไป บริเวณ tip cap ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ติดกับขั้ว ประกอบด้วยโครงสร้าง sponge like structure โครงสร้างดังกล่าวไม่พบ cuticle พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และเชื้ออื่นอีก 3 ชนิด เส้นใย สามารถเจริญผ่านเข้าไปในเมล็ดและแพร่กระจายจาก tip cap ผ่าน germ ไปยัง endosperm ได้ และ

พบว่าเชื้อรา *A. flavus* ส่วนใหญ่จะเจริญอยู่ที่ germ (68 %) รองลงมาที่ tip cap (50 %) และน้อยที่สุดที่ endosperm (12 %) (Fennell *et al.*, 1973)

Siriacha *et al.* (1992) รายงานว่า การเข้าทำลายข้าวโพดของเชื้อรา *A. flavus* พบเชื้อ *A. flavus* เจริญปกคลุมที่ผิวและเจริญเข้าทำลายภายในส่วนของไหม ชัง และเมล็ดมากกว่าส่วนอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญลุกลามบริเวณไหมแล้วสร้างเส้นใยเจริญผ่านเข้าไปในเมล็ดยังไม่มีความสามารถทำให้เกิดความเสียหายแก่ข้าวโพดได้ (Jones *et al.*, 1980; Payne, 1983) แต่สภาพของไหมมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญพัฒนาของเชื้อราบนผิวนอกของไหม และเจริญไปตามเส้นไหมเข้าทำลายเมล็ด โดยเชื้อมีการเจริญลุกลามมากที่ระยะ 1 สัปดาห์หลังออกไหม (Jones *et al.*, 1980) เมื่อไหมอยู่ในระยะที่ยังไม่ได้รับการผสม conidium งอกได้เล็กน้อย ไม่สามารถเจริญลุกลามได้ (Marsh and Payne, 1984)



ภาพ 2.30 การเข้าทำลายข้าวโพดของเชื้อรา *A. flavus* (Batan, 1986)

2.16 การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจหาเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพืช

เมล็ดพืชที่เก็บรักษาไว้ในโรงเก็บมักเกิดความเสียหายอยู่เสมอ หากมีการเก็บรักษาในสภาพที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสาเหตุสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อเมล็ดพืชได้มาก โดยจุลินทรีย์ที่พบว่าเข้าทำลายเมล็ดพืชส่วนใหญ่คือ เชื้อรา (fungi) ปัจจุบันพบว่ามีเชื้อรามากกว่า 150 ชนิด (species) เข้าทำลายเมล็ดพืชและเมล็ดพืชอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus* spp. เป็นกลุ่มเชื้อราที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เมล็ดพืชที่เก็บรักษาในโรงเก็บมากที่สุด (สมบัติ, 2535) หากเก็บเมล็ดในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความชื้นไม่เหมาะสม (Richard and Payne, 2003) แหล่งของเชื้อราที่พบมากจะอยู่ในรูปของสปอร์ที่เกิดการปนเปื้อนไปกับเมล็ดตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ขณะเก็บเกี่ยว รวมถึงการปนเปื้อนจากเชื้อราที่แพร่กระจายทั่วไปในอากาศ ติดไปกับภาชนะที่บรรจุและปนเปื้อนติดไปกับแมลงในโรงเก็บ (Scheidegger and Payne, 2003) โดยทั่วไปได้มีการประเมินอัตราการปนเปื้อนและความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อราเหล่านี้เช่น จากรายงานของ Nandi (1978) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ 3 ชนิดในข้าวสาลีในระหว่างการเก็บรักษาได้แก่ *A. candidus*, *A. glaucus* และ *Penicillium* sp. โดยการหาปริมาณของ glucosamine ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไคตินที่ได้จากเชื้อราโดยการสกัดด้วยสารเคมี สอดคล้องกับ Donald and Mirocha (1977) ศึกษาปริมาณของเชื้อราที่ปนเปื้อนบนเมล็ดถั่วเหลืองจากการหาปริมาณของไคติน โดยวิเคราะห์จาก glucosamine ในระหว่างการเก็บรักษา 1 เดือนพบว่าสามารถวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำแต่ใช้เวลาค่อนข้างนาน

การประเมินอัตราการปนเปื้อนและความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อราเหล่านี้กระทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากต้องอาศัยขั้นตอนของการตรวจสอบที่ใช้เวลานาน ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดพืช ให้มีความรวดเร็วแม่นยำ ไม่ทำลายตัวอย่าง และลดการใช้สารเคมีอันจะช่วยลดต้นทุนการผลิตในระยะยาว เพื่อสร้างความปลอดภัยในการควบคุมคุณภาพเมล็ดพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากรายงานของ Roberts *et al.* (1987) ได้นำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง พบว่าสามารถทำนายค่าปริมาณไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (fungal cell wall polymer of glucosamine) ที่ปนเปื้อนในหญ้าอัลฟัลฟาแห้งได้อย่างแม่นยำ ต่อมา Robert *et al.* (1991) ใช้เทคนิค MLR สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น โดยใช้ปริมาณ

กลูโคซามีนซึ่งเป็นโพลีเมอร์ในโคตินของเชื้อรา *A. ochraceus* ทำลายในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ได้ค่า $R = 0.86$ สัมพันธ์กับความยาวคลื่น 2356 นาโนเมตร นอกจากนี้ Dowell *et al.* (1999) รายงานว่าสามารถใช้ NIRS ตรวจการเกิดสะเก็ดแผลโดยการประมาณค่า deoxynivalenon (DON) และระดับของฟลักตเดิยรอยในเมล็ดข้าวสาลีได้ ได้ R^2 (correlation of determination) = 0.64, SE (standard error) = 44 ppm และ N (number of sample) = 88 พบว่าทุกตัวอย่างการทดลองมี DON มากกว่า 120 ppm และเมื่อนำน้ำหนักของเมล็ดเพิ่มขึ้น ค่า DON และ ergosterol จะลดลง เพราะเมล็ดที่มีขนาดเล็กกว่าจะมีความเข้มข้นของ DON และ ergosterol ที่สูงกว่า หรือการที่เมล็ดถูกทำลายน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงความยาวคลื่นที่ใช้สำหรับทำนายการเกิด DON และ ergosterol คือ 500-1700 นาโนเมตร เช่นเดียวกับ Pearson *et al.* (2001) รายงานว่า เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างการปนเปื้อนของ aflatoxin ในเมล็ดข้าวโพด โดยใช้ transmittance spectra ในช่วงความยาวคลื่น 500 ถึง 950 นาโนเมตร และ reflectance spectra แสดงให้เห็นระดับแสง สีเขียว – เหลือง และวิเคราะห์ aflatoxin the USDA-FGIS (ศูนย์บริการตรวจสอบเมล็ดของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา) ทดสอบ aflatoxin โดยการ affinity Chromatography วิเคราะห์สเปกตรัมจำแนกความแตกต่าง least squares regression จากเมล็ดพืชที่แบ่งกลุ่มแล้ว มากกว่า 95 % มีสารพิษที่สูง (> 100 ppb) หรือต่ำกว่า (< 10 ppb) การแบ่งกลุ่มเมล็ดพืชที่มีสารพิษระหว่าง 10 ppb และ 100 ppb ประมาณ 25 % โดยวิธีการ transmittance หรือ reflectance ให้ผลคล้ายกัน เมื่อจำแนกความแตกต่างวิเคราะห์ least squares regression 2 feature วิธีการ transmittance ให้ผลดีที่สุด การตรวจด้วยระบบอัตโนมัติที่มีความเร็วสูงในการจัดเรียงข้อมูลส่วน reflectance spectra ใช้ feature เดียวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในอุตสาหกรรมข้าวโพดที่ให้ค่าการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน ที่รวดเร็ว รวมทั้ง Kos *et al.* (2002) รายงานว่า ใช้ช่วง mid-infrared spectroscopy ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *F. graminearum* โดยตรวจหาจากปริมาณของสารพิษ deoxynivalenol ทั้งยังใช้เทคนิค PCA ในการแยกการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในกองตัวอย่างได้

นอกจากนี้ Dowell *et al.* (2002) รายงานว่าการใช้ reflectance กับ transmittance spectroscopy สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของ fumonisin ได้ในเมล็ดข้าวโพด โดยสามารถแยกส่วนที่ปนเปื้อนมาก (+) >100 ppm กับส่วนที่ปนเปื้อนน้อย (-) < 10 ppm พบว่าการวัดแบบสะท้อน

กลับ (reflectance) ยังให้ค่าที่ถูกต้องกว่าการวัดแบบส่องผ่าน (transmittance) และยังมีรายงานว่าเทคนิค NIR reflectance สามารถวัดการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. graminearum* ของเมล็ดข้าวโพด โดยแยกเป็นขนาดของเมล็ดระหว่าง $> 250 \mu\text{m}$ และ $100 \mu\text{m}$ โดยใช้เทคนิค PCA ในการแยกกลุ่มพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และไขมันบ้างแต่ไม่มีผลมากนัก นอกจากนี้ยังพบปริมาณมวลรวมของเชื้อรา (total fungal biomass) และสารพิษ deoxynivalenol รวมทั้งแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ไม่ได้ปนเปื้อนซึ่งพบปริมาณ ergosterol ที่ $310 \mu\text{g/kg}$ และตัวอย่างที่ปนเปื้อนพบที่ $310 - 2596 \mu\text{g/kg}$ ยังพบสารพิษมากถึง $310 - 2596 \mu\text{g/kg}$ (Kos *et al.*, 2003) รวมทั้ง NIR transmittance สามารถตรวจหาสารพิษ deoxynivalenol ของเชื้อรา *F. culmorum* ที่ได้จากตัวอย่างข้าวสาลีโดยใช้เทคนิค PCA, PLSR พบว่าช่วงความยาวคลื่น $670 - 1100$ นาโนเมตร R เท่ากับ 0.984, SEP เท่ากับ $381 \mu\text{g/kg}$ เป็นค่าที่ดีที่สุดในการทำนาย (Pettersson and Åberg, 2003) ทั้งยังมีรายงานของ Wang *et al.* (2004) สามารถแยกความแตกต่างของเมล็ดปกติและเมล็ดที่เกิดความเสียหายจากเชื้อ โดยใช้ NIR reflectance ที่ความยาวคลื่นระหว่าง $400 - 1700$ นาโนเมตร เมื่อใช้เทคนิค PLSR พบว่ามีความแม่นยำมากถึง 99 % ที่ช่วงความยาวคลื่น $490-1690$ นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยของ calibration sample set และ validation sample set ที่ 93.5 % และ 94.6 % ตามลำดับโดยสามารถจำแนกค่า validation sample set ที่ 100, 99, 84, 94 และ 96 % ซึ่งสัมพันธ์กับเมล็ดปกติ, เมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ Phomopsis, *Cercospora kikuchii*, soy bean mosaic virus (SMV) และ downy mildew damage ตามลำดับ และ NIR reflectance สามารถตรวจสอบขนาดผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium sp.* โดยใช้ช่วงความยาวคลื่น $1000-1700$ นาโนเมตร ในเมล็ดข้าวสาลี จากนั้นใช้สมการทางสถิติมาจำแนก เช่น สมการเชิงเส้นและ nonparametric ซึ่งให้ความถูกต้องสูงถึง 88% (cross-validation) และ 97 % จากผลการทดลองเมื่อนำไปหาค่าที่เหมาะสมของความยาวคลื่น ($\log 1/R_{\lambda_1} - \log 1/R_{\lambda_2}$) และมี slope ของค่าการดูดกลืนแสงของคาร์โบไฮเดรตออกมาเป็นแถบดำที่ประมาณ 1200 นาโนเมตร ซึ่งสามารถแยกเมล็ดที่มีลักษณะดีกับเมล็ดที่แตกหักออกจากกันได้ (Delwiche and Hareland, 2004)

จากรายงาน Berardo *et al.* (2005) พบว่าสามารถใช้ NIR spectroscopy ตรวจสอบองค์ประกอบของวัตถุดิบที่เฉพาะและไม่ทำลายตัวอย่าง มีความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว ง่ายในการปฏิบัติ

ได้มีการนำ NIR มาใช้ในการประเมินสารพิษ micotoxigenic จากเชื้อรา และที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยนำตัวอย่างข้าวโพด 200 และ 80 ตัวอย่าง รวม 2 ชนิด จากตัวอย่างข้าวโพดที่เพาะปลูก ใน 16 พื้นที่ทางทิศเหนือของทางอิตาลี และข้าวโพดที่ถูก inoculate ด้วยเชื้อ *F. verticillioides* โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ ergosterol และสารพิษ fumonisin B₁ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า NIR สามารถทำนายได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยเมล็ดที่มีเชื้อรา *F. verticillioides* ได้ผลเทียบเท่า ergosterol และ fumonisin B₁ สมการเทียบมาตรฐานของ infection ergosterol และ fumonisin B₁ อย่างมีนัยสำคัญ สามารถที่จะทำนายได้ดีโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *F. verticillioides* ในเมล็ดข้าวโพดโดยได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination, R²) เท่ากับ 0.75 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของวาลิเดชัน (standard error of cross validation, SECV) เท่ากับ 7.43 % ส่วนข้าวโพดหยาบได้ค่า R² เท่ากับ 0.79 และ SECV เท่ากับ 10.95 ตามลำดับ จากการทำนายสามารถที่จะยืนยันความถูกต้อง โดยการทำ scatter plot ของเมล็ดที่ติดเชื้อ *F. verticillioides* เทียบกับค่าการทำนาย โดย NIRS ในตัวอย่างข้าวโพดได้ค่า R² เท่ากับ 0.80 แสดงให้เห็นว่าเทคโนโลยี NIR สามารถใช้ตรวจหาการปนเปื้อนหลังการเก็บเกี่ยวข้าวโพด โดยเฉพาะเชื้อรา *F. verticillioides* และสารพิษ fumonisin และอาจเป็นเครื่องมือควบคุมความปลอดภัยสำหรับอาหาร

มีรายงานถึงการวัดแบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) แบบสะท้อนกลับของแสงในช่วงความยาวคลื่น 550 - 1700 นาโนเมตร โดยคัดเมล็ดข้าวโพดก่อนเก็บเกี่ยวและขณะเก็บเกี่ยว พบว่าช่วงความยาวคลื่นที่ 715 และ 965 นาโนเมตรสามารถจำแนกเมล็ดที่ไม่ปนเปื้อนได้อย่างแม่นยำถึง 98.1 % และ 96.6 % ในเมล็ดที่เปลี่ยนสีและพบการปนเปื้อนของ *A. flavus*, *A. niger*, *Diplodia maydis*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* และ *Trichoderma viride* (Pearson and Wicklow, 2006) สอดคล้องกับ Wegulo and Dowell (2008) รายงานว่าสามารถใช้ระบบ single-kernel near-infrared (SKNIR) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดแบบวางเมล็ดเดี่ยวในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *F. graminearum* เป็นสาเหตุหลักของโรค Fusarium head blight ทำให้เมล็ดหลุดและเปลี่ยนสีเกิดลักษณะที่เรียกว่า Fusarium-damaged kernel (FDK) ที่พบในข้าวสาลีพบว่าค่า R อยู่ระหว่าง 0.89 - 0.91 และ Fernández-Ibañez *et al.* (2008) รายงานว่าสามารถใช้ NIRS ในการตรวจสอบอะฟลาทอกซินในธัญพืชซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและต้นทุนต่ำ โดยประเมินศักยภาพ ความรวดเร็ว

ในการตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น อะฟลาทอกซินบี₁ (AFB₁) โดยนำตัวอย่าง 152 ตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้ผลที่รวดเร็วในการตรวจสอบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี₁ (AFB₁) ในธัญพืช ได้ทดลองโดยใช้ standard normal variate and detrending (SNVD) กับ การตรวจวัดด้วย FT-NIRs ในข้าวโพด พบว่า R² เท่ากับ 0.80 และ SECV เท่ากับ 0.21 และในข้าวบาร์เลย์ได้มีการพัฒนาการใช้ standard normal variate and detrending (SNVD) กับ การตรวจวัดด้วย NIRS พบว่าค่า R² เท่ากับ 0.85 และ standard error of cross validation (SECV) เท่ากับ 0.18 และใช้การวิเคราะห์ข้อมูล spectral data ใน Log (1/R) สำหรับ FT-NIRs พบว่าได้ค่า R² เท่ากับ 0.84 และ SECV เท่ากับ 0.18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved