การวิเคราะห์คุณภาพของผลิตผลเกษตรด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

โดย

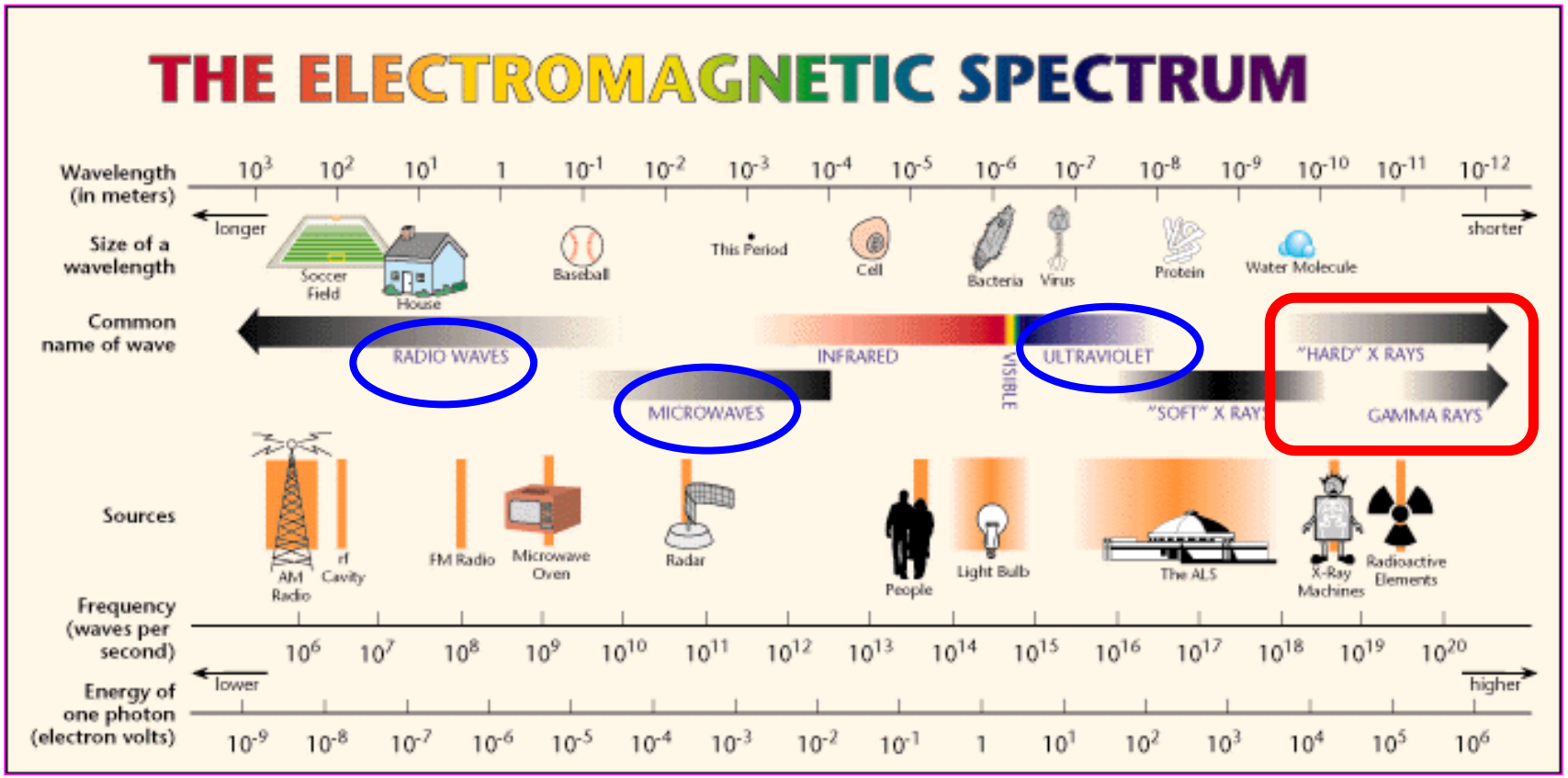
ดร. ปาริชาติ เทียนจุมพล

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
(Near Infrared Spectroscopy, NIRs)

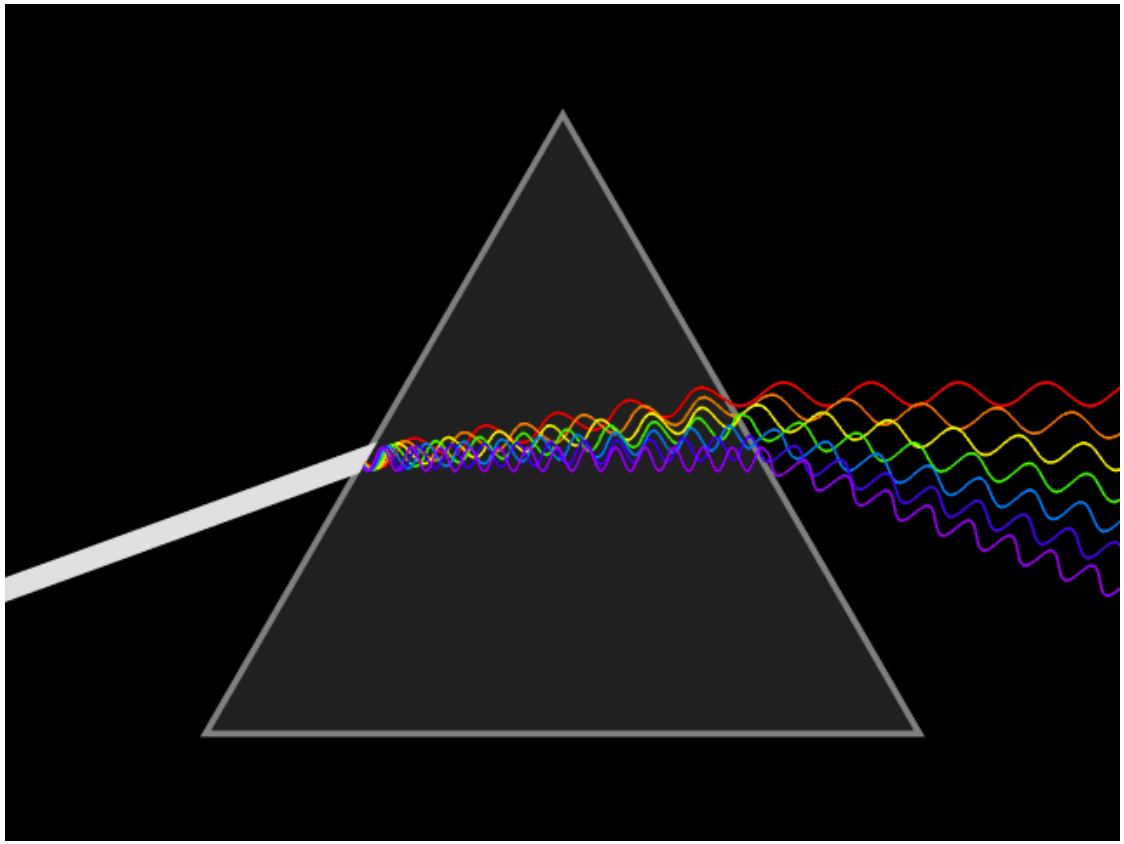
: เทคนิคซึ่งใช้คลื่นแสง **NIR** ในช่วงความยาวคลื่น 700-2500 นาโนเมตรในการตรวจสอบตัวอย่างทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ อาศัยหลักการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง

Near Infrared (NIR)?
(เนียร์อินฟราเรด)



คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ากับชีวิตประจำวัน!!!

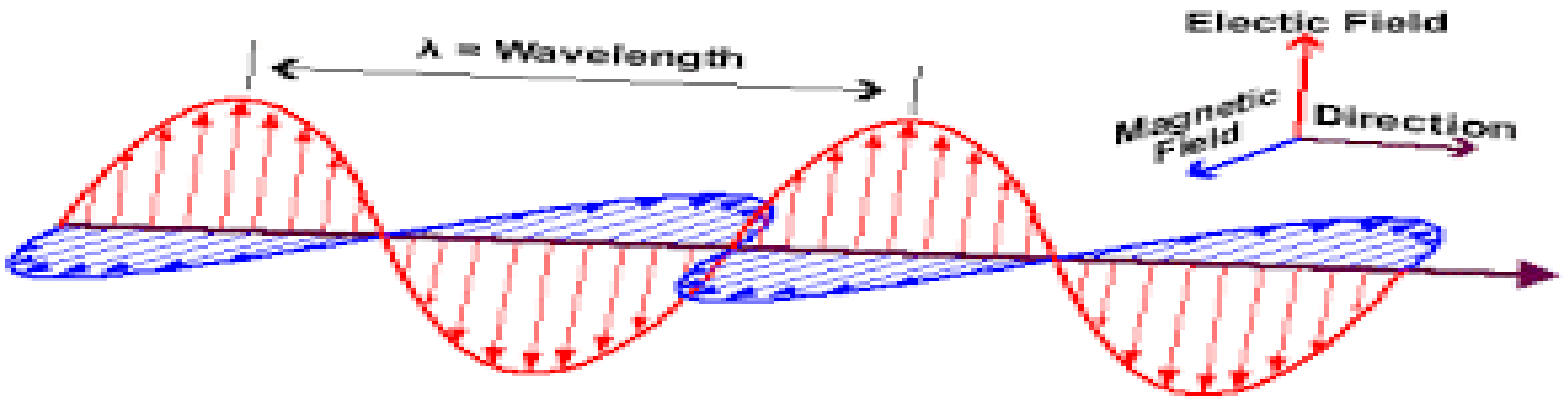
คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า
(Electromagnetic wave)

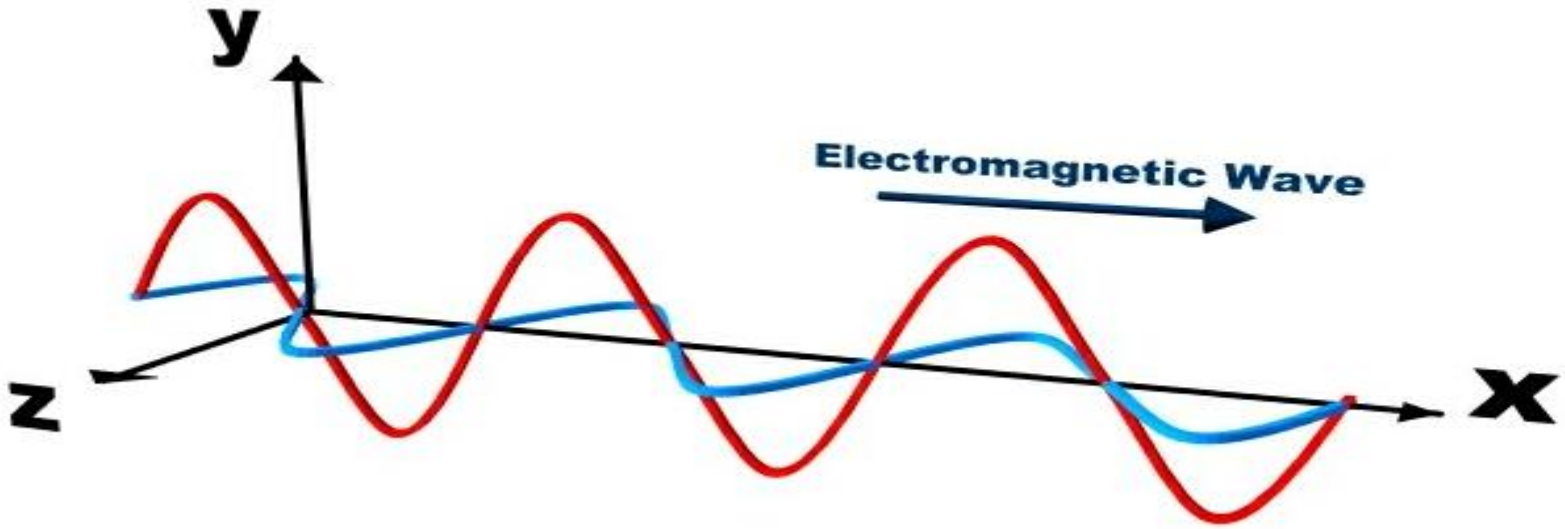


คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า:

คลื่นที่เกิดจากคลื่นไฟฟ้าและคลื่นแม่เหล็กตั้งฉากกันและเคลื่อนไปยังทิศทางเดียวกัน คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสามารถเดินทางได้ด้วยความเร็ว 299,792,458 เมตร/วินาที หรือเทียบเท่ากับความเร็วแสง

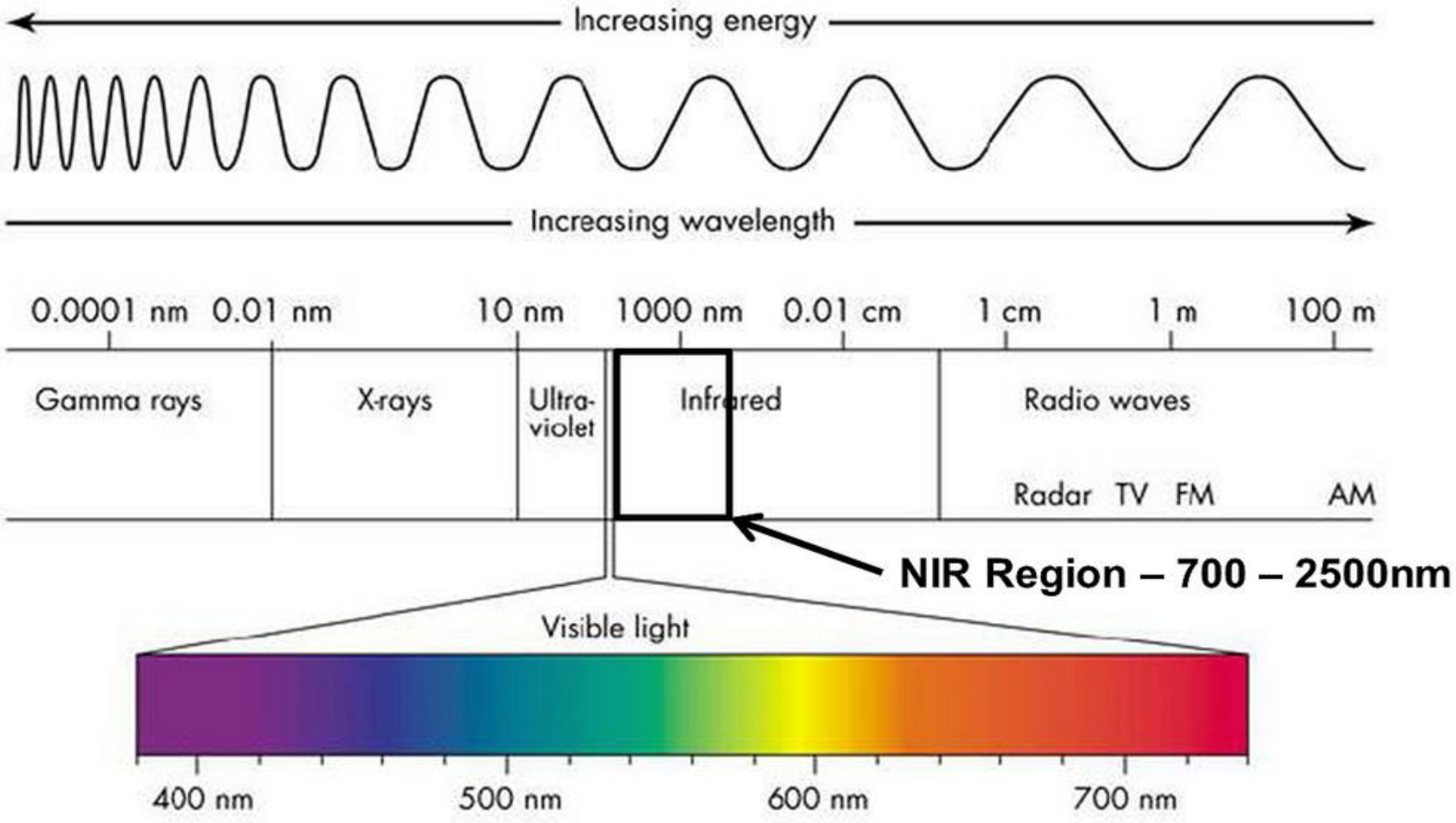
Electromagnetic wave





สมบัติคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

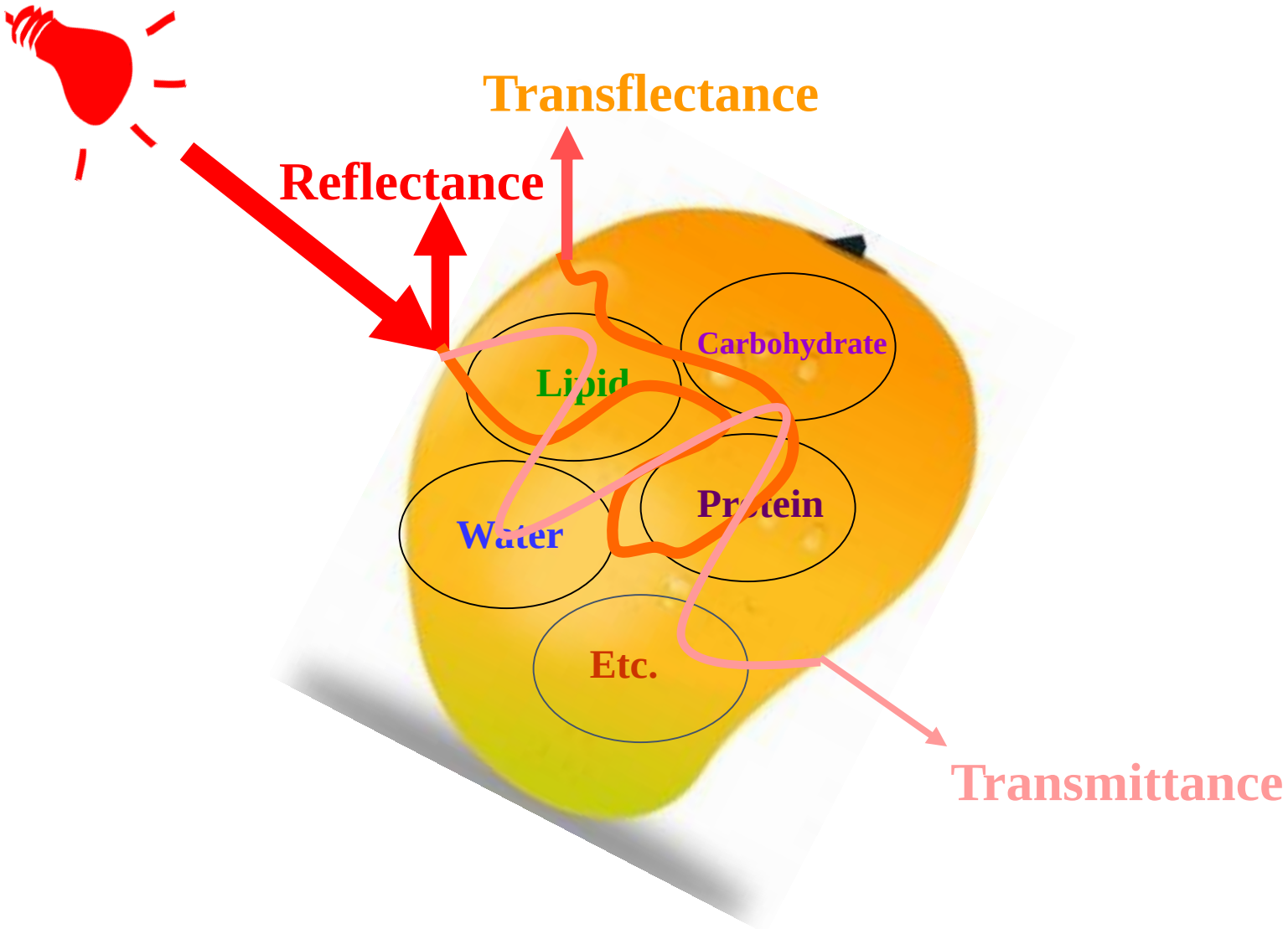
1. ไม่ต้องใช้ตัวกลางในการเคลื่อนที่ (บางชนิด)
2. อัตราเร็วของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าทุกชนิดในสุญญากาศเท่ากับ 299,792,458 เมตร/วินาที ซึ่งเท่ากับ อัตราเร็วของแสง
3. เป็นคลื่นตามขวาง
4. ถ่ายเทพลังงานจากที่หนึ่งไปอีกที่หนึ่ง
5. ถูกปล่อยออกมาและถูกดูดกลืนได้โดยสสาร
6. ไม่มีประจุไฟฟ้า
7. คลื่นสามารถแทรกสอด สะท้อน หักเห และเลี้ยวเบนได้


Increasing energy
Increasing wavelength
0.0001 nm
0.01 nm
10 nm
1000 nm
0.01 cm
1 cm
1 m
100 m
Gamma rays
X-rays
Ultra-violet
Infrared
Radio waves
Radar
TV
FM
AM
NIR Region – 700 – 2500nm
Visible light
400 nm
500 nm
600 nm
700 nm

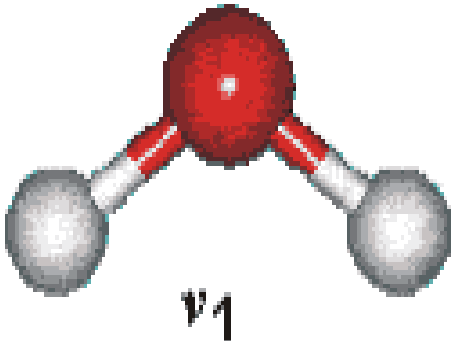
ข้อดีของเทคนิค NIRs

- ✓ ไม่ทำลายผลิตผล (Nondestructive technique)
- ✓ ใช้ระยะเวลาในการตรวจวัดสั้น (Short time measuring)
- ✓ ลดการใช้สารเคมีในการตรวจวัด (Chemical free)
- ✓ ลดการเกิดของเสีย (Reduce waste)
- ✓ ประหยัดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ (Safe cost)

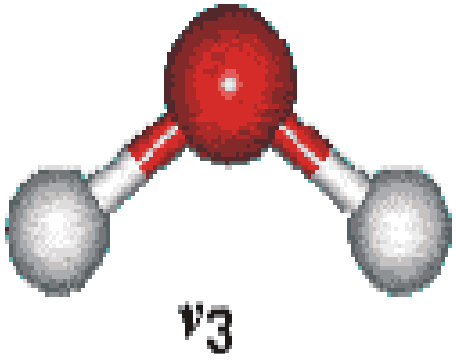
อันตรกิริยาของ NIR กับตัวอย่าง
(Light interaction)



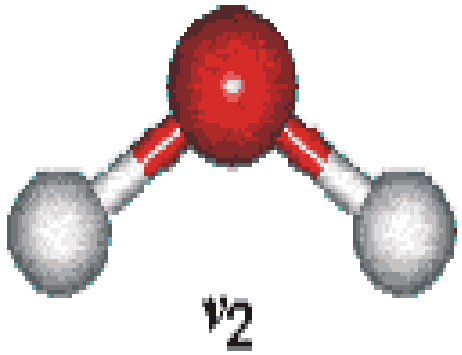
รูปแบบการสั่นของโมเลกุล
(Molecule vibration)



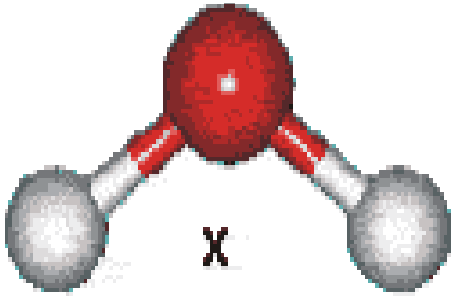
Symetric stretching



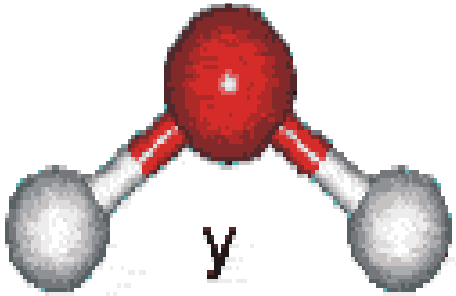
Asymetric stretching



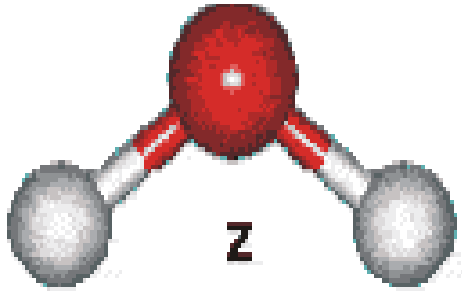
Scissoring



Wagging



Rocking



Twisting

ค่าการดูดกลืนแสงสัมพัทธ์ของตัวอย่าง
(Relative absorbance of sample)

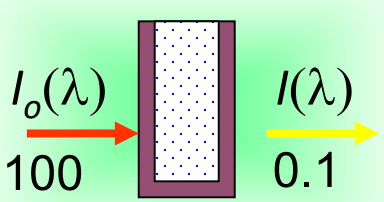
$$A(\lambda) = \log (I_s(\lambda)/I(\lambda))$$

$$= \log [\{I_s(\lambda)/I_o(\lambda)\}\{I_o(\lambda)/I(\lambda)\}$$

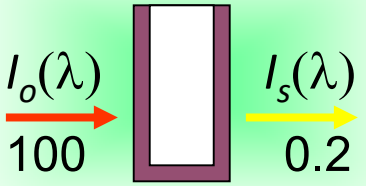
$$= \log [I_o(\lambda)/I(\lambda)] - \log (I_o(\lambda)/I_s(\lambda))$$

$$= A^*(\lambda) - A^*_s(\lambda)$$

การคำนวณ



Sample

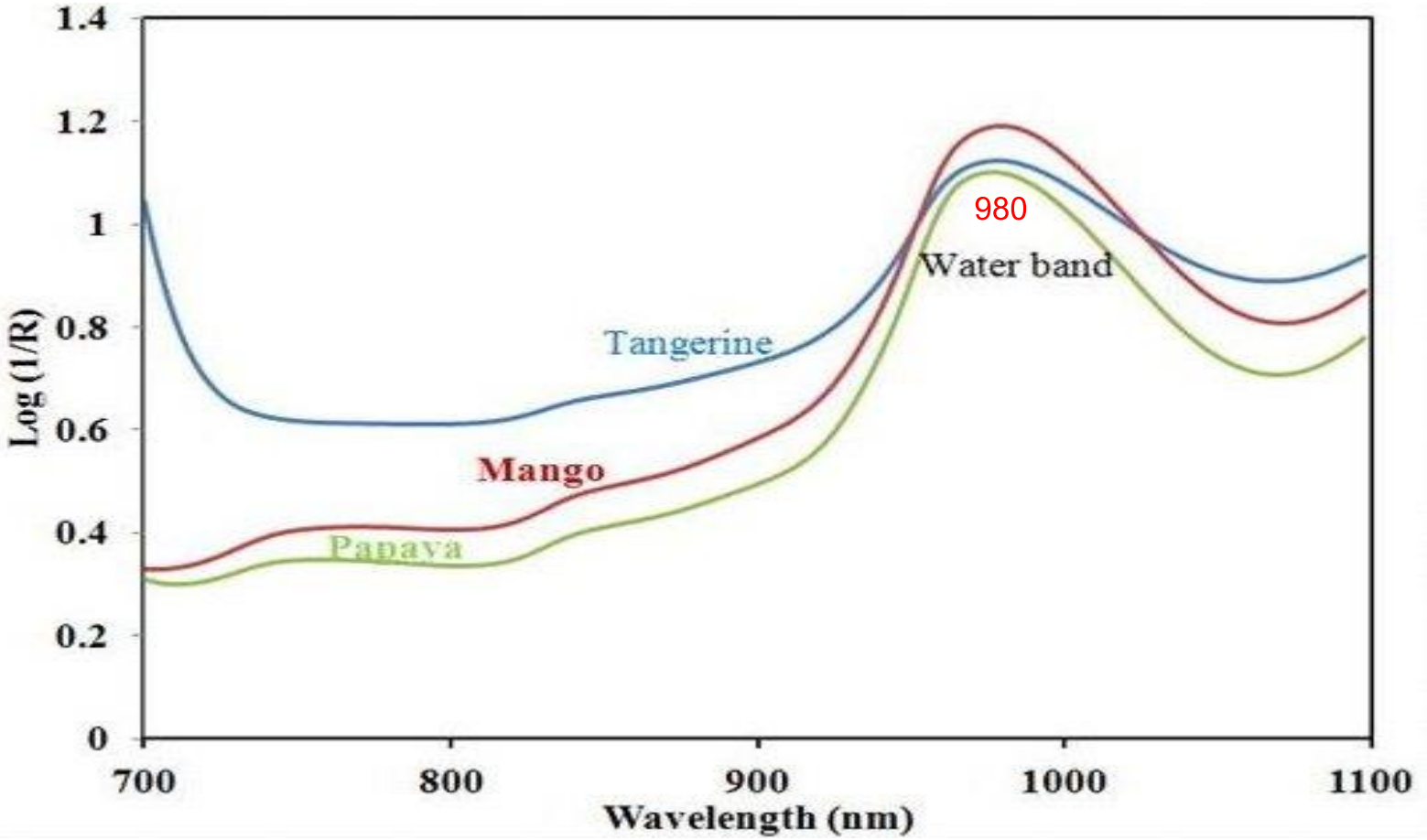


Reference

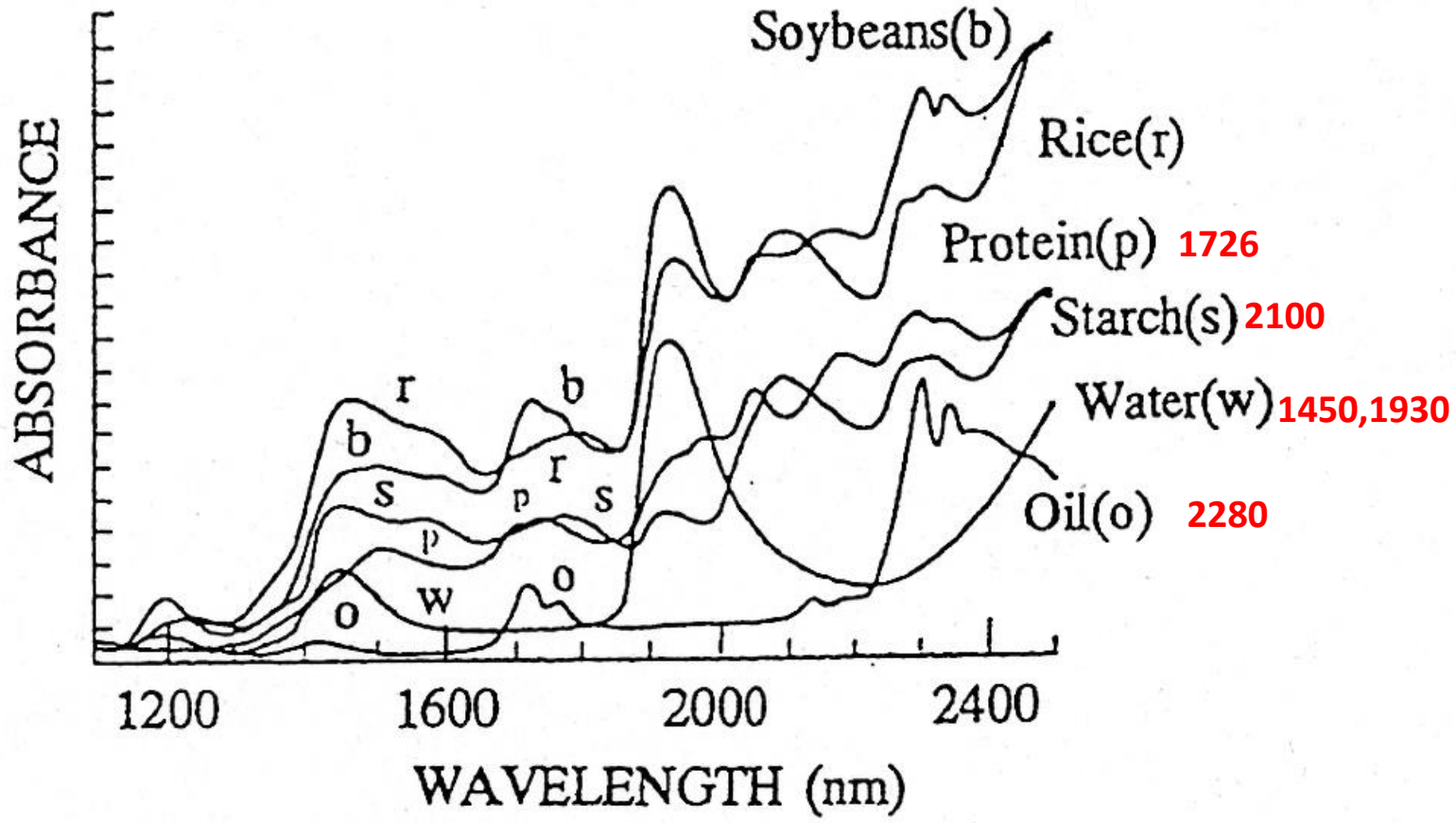
$$A(l) = \log (I_s(l)/I(l)) = \log(0.2/0.1)$$

$$= 0.3$$

สเปกตรัมของผลไม้ (Fruit spectrum)



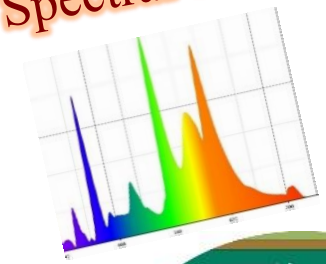
สเปกตรัมเมล็ดพืช (Grains spectra)



กระบวนการนำเทคนิค NIRs มาใช้ประโยชน์

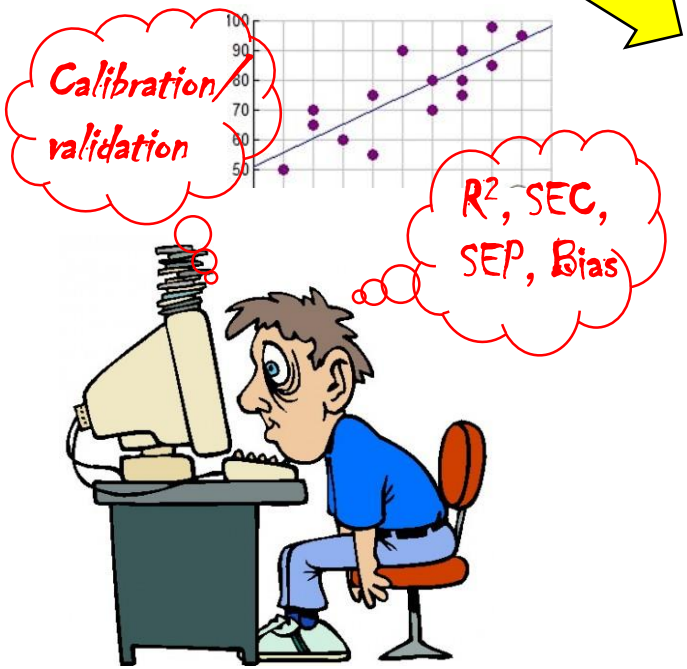
1. Data acquisition

Spectral data

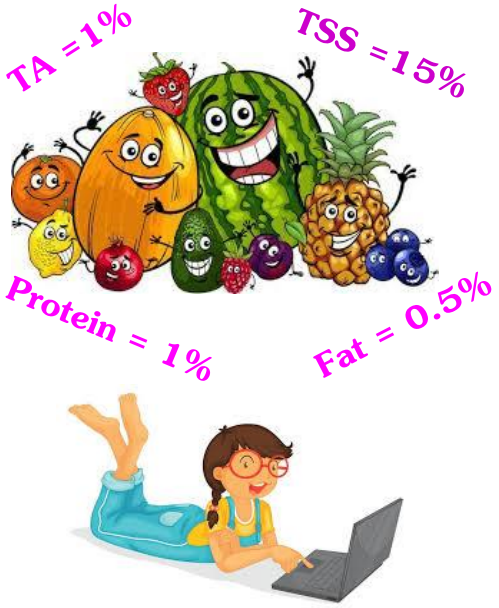


Chemical data

2. Model development

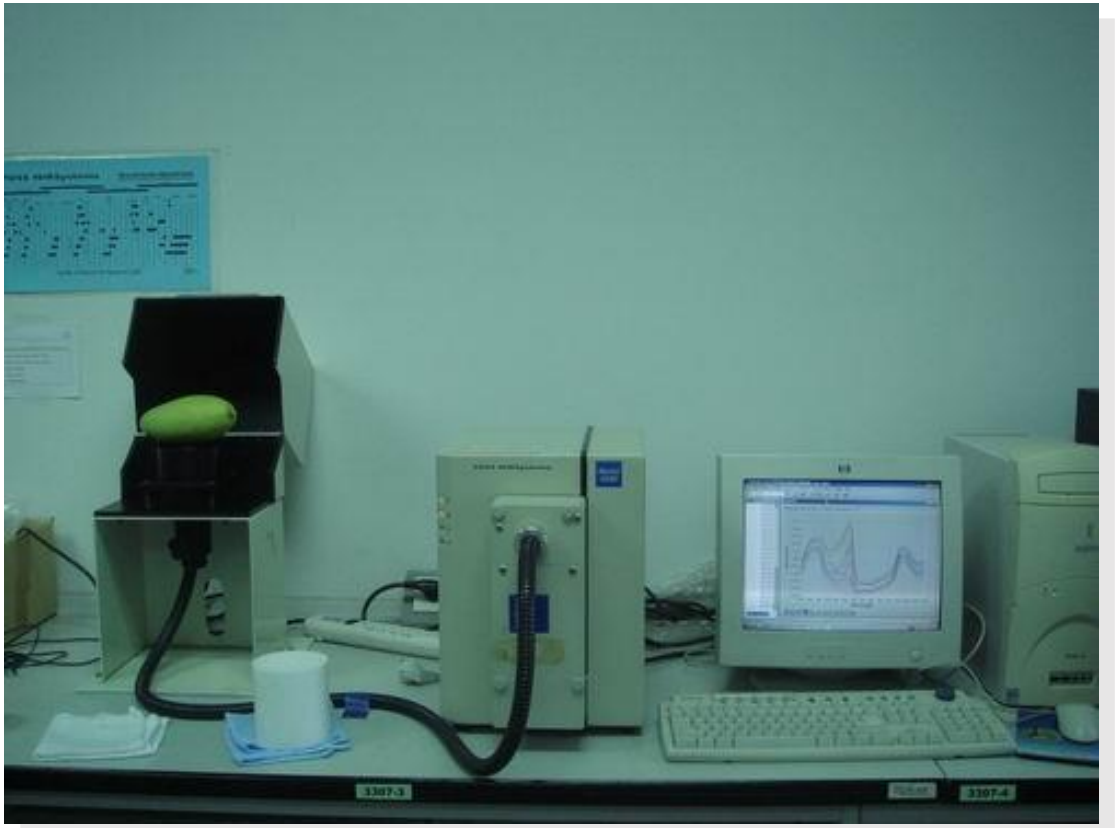


3. Routine analysis

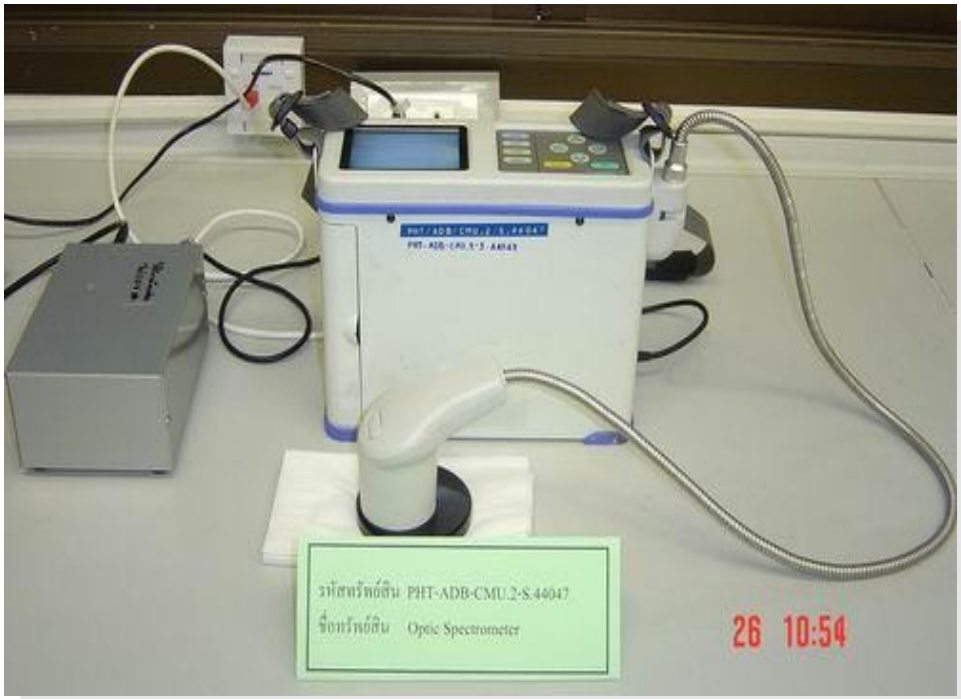


ปัจจัยที่ส่งผลต่อ NIR สเปกตรัม
(Factor affecting NIR spectrum)

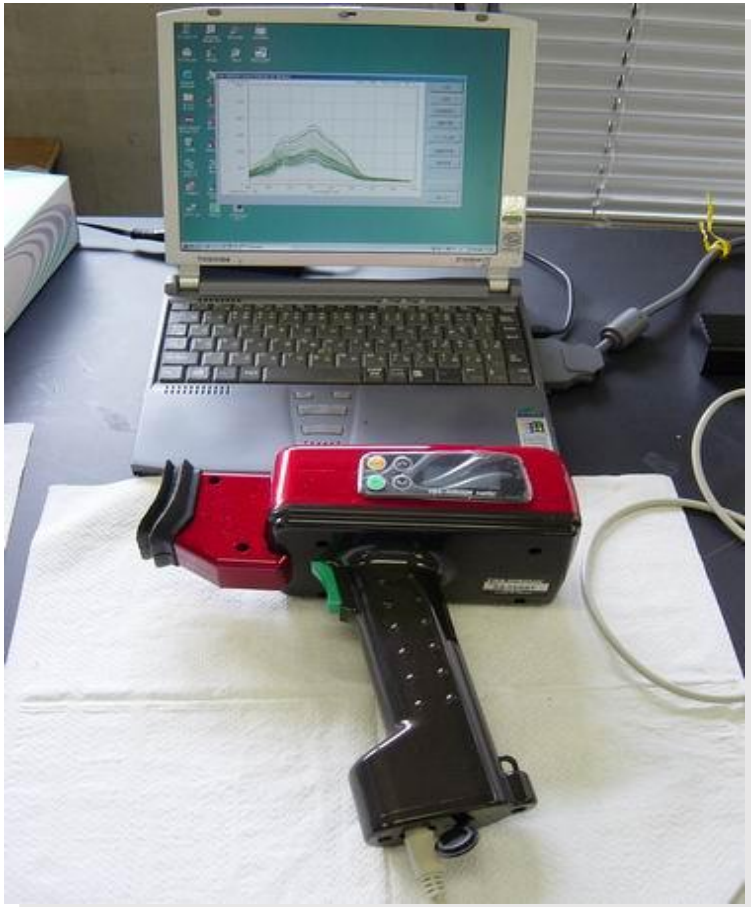
1. เครื่อง NIR (Instruments)



NIRSystem6500



Fruit Tester 20 (FT20)



NIR Gun

XDS

Metrohm NIRSystem

SpectraStar

MPA

- การจัดวางตัวอย่าง (Sample presentation)

(Schaare and Fraser, 2000)

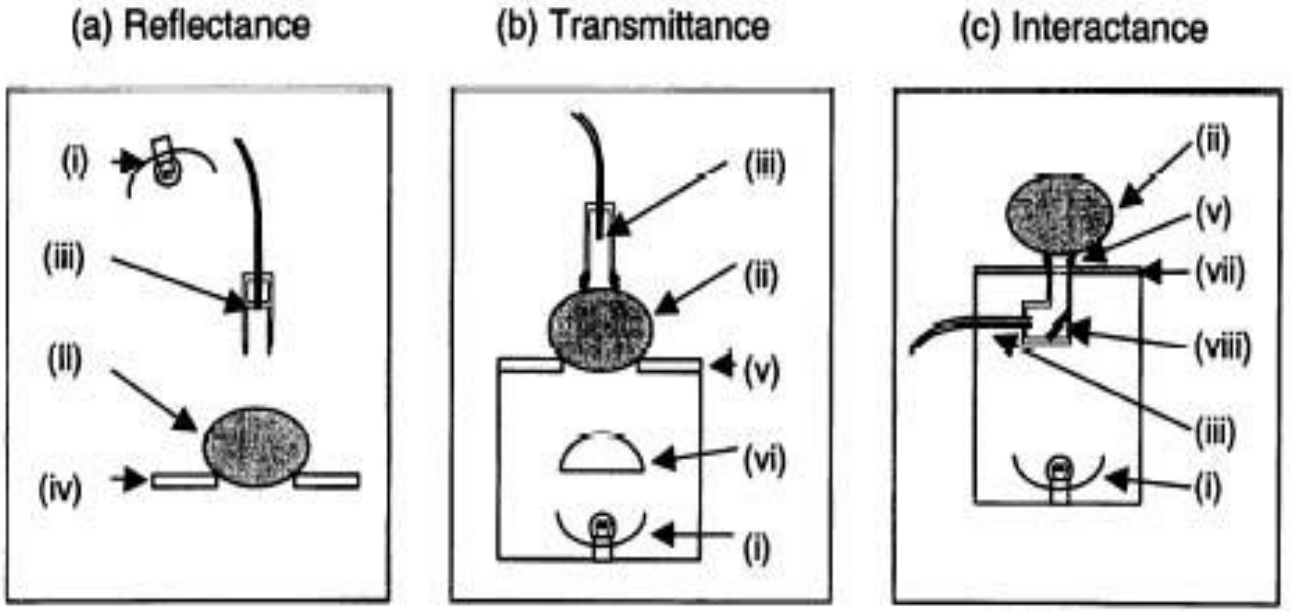
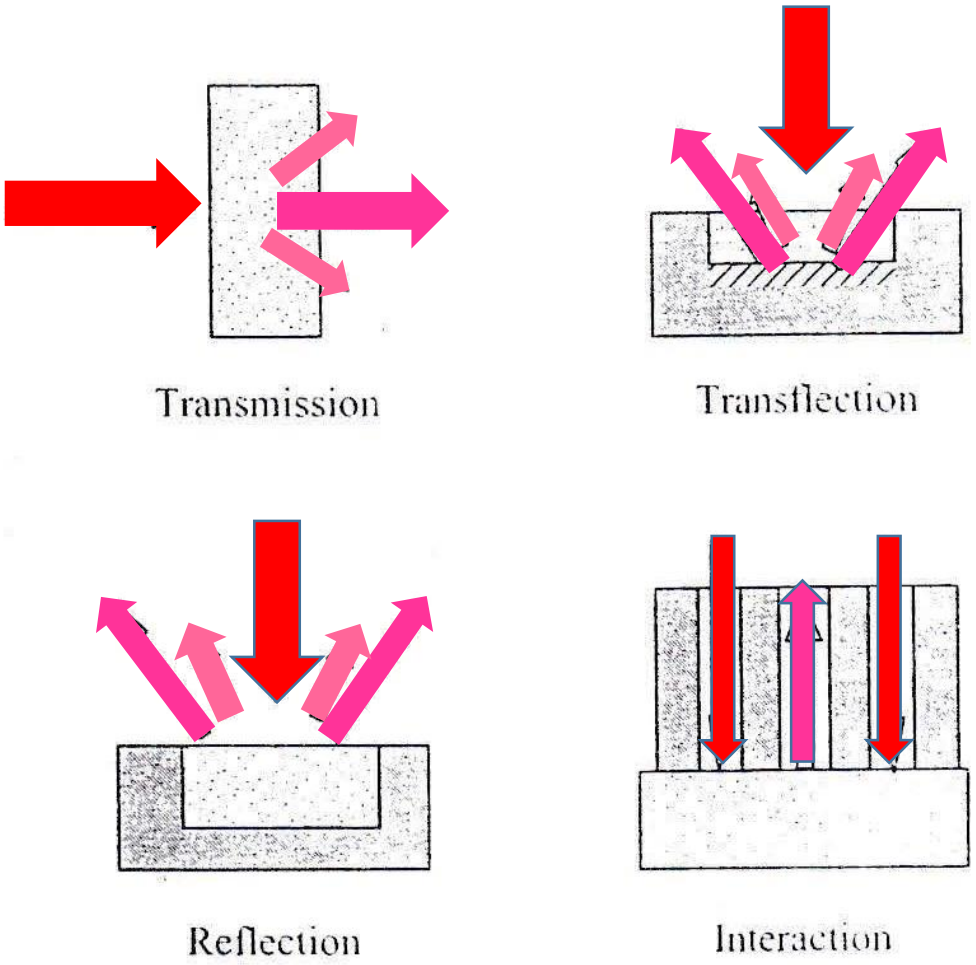


Fig. 1. The apparatus used for measuring (a) reflectance; (b) transmittance; and (c) interactance spectra of kiwifruit, showing (i) the light source; (ii) fruit; (iii) fibre bundle aperture; (iv) black foam holder; (v) light seal; (vi) condensing lens; (vii) glass top; and (viii) mirror.



(Siesler et al., 2002)

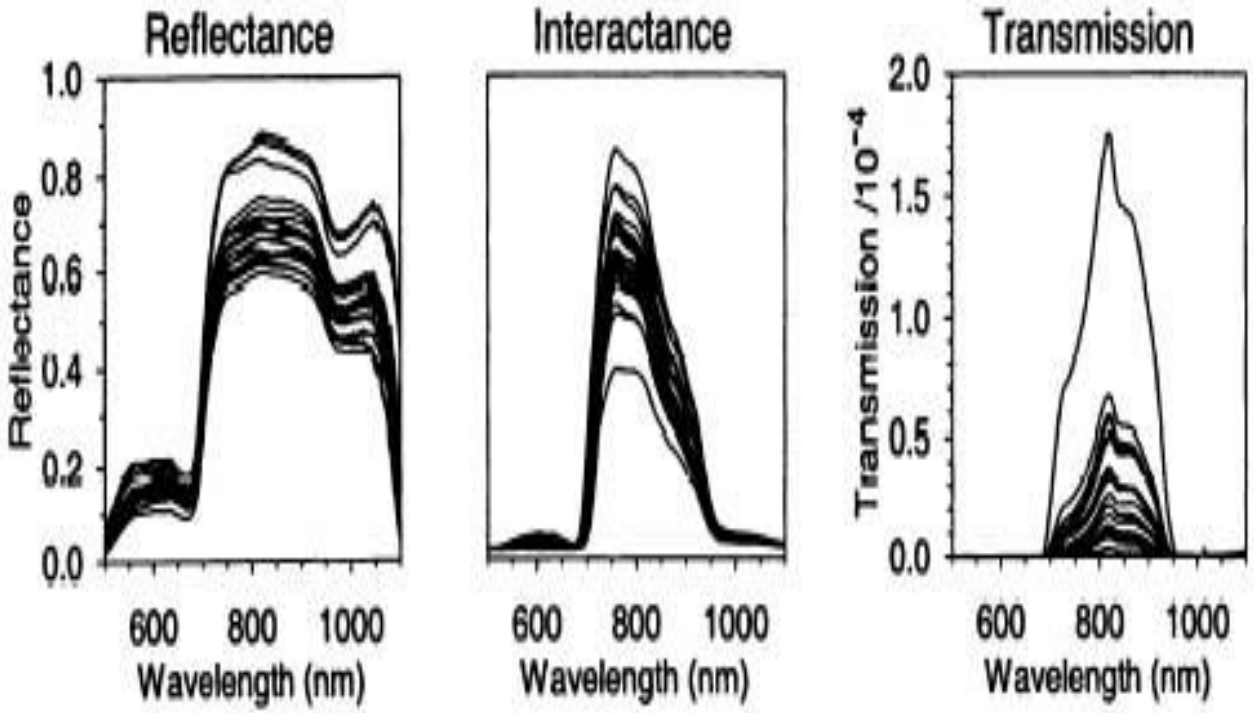


Fig. 5. Typical reflectance interactance, and transmission spectra. The vertical transmission scale is only approximate and the vertical interactance axis shows raw intensity on an arbitrary scale.

Table 2
Optimal algorithms and calibration results for estimating soluble solids content of *A. chinensis*[a]

Spectral acquisition mode	Optimal calibration algorithm(s)	Calibration results	
		R^2_p	SEP (°Brix)
Reflectance	**NSD:PLS(30)**, D2:PLS(30), Smooth:PLS(30), D1:PLS(40)	0.86	1.18
Interactance	**NSD:PLS(20)**, NSD:PCR(40), Area:PLS(30)	0.93	0.80
Transmission	NSD:PLS(10), **NSD:PCR(20)**	0.89	1.01.

[a] Algorithms providing the lowest SEP are shown in bold typeface, and those that could not be distinguished from the best on the basis of Bias or SEP (see text) are also listed. Numbers in brackets indicate terms used in PLS or PCR.

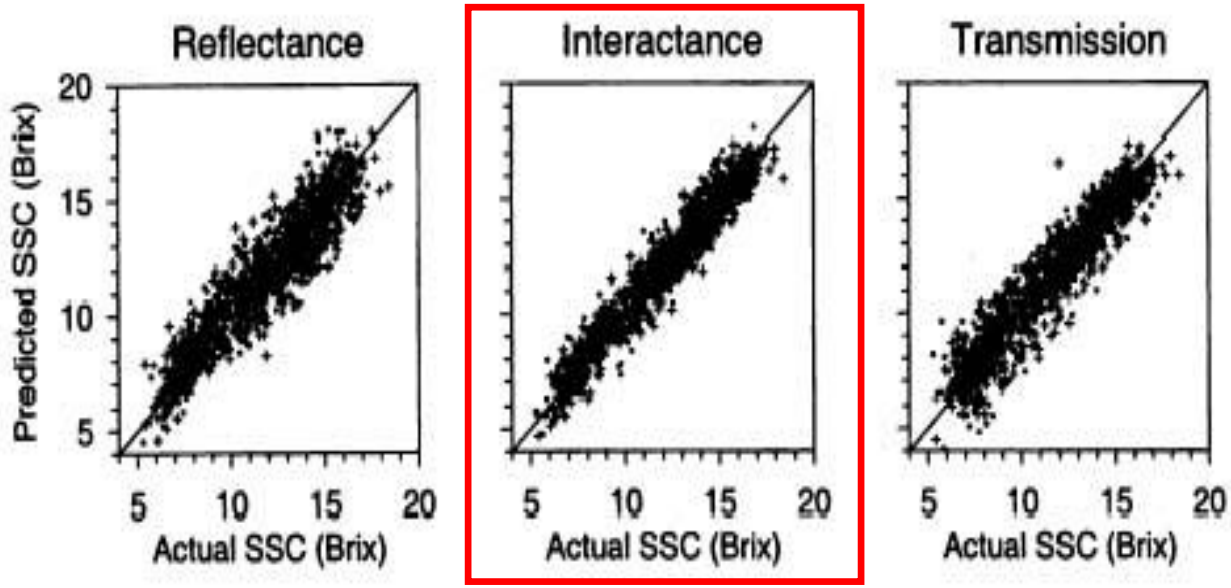


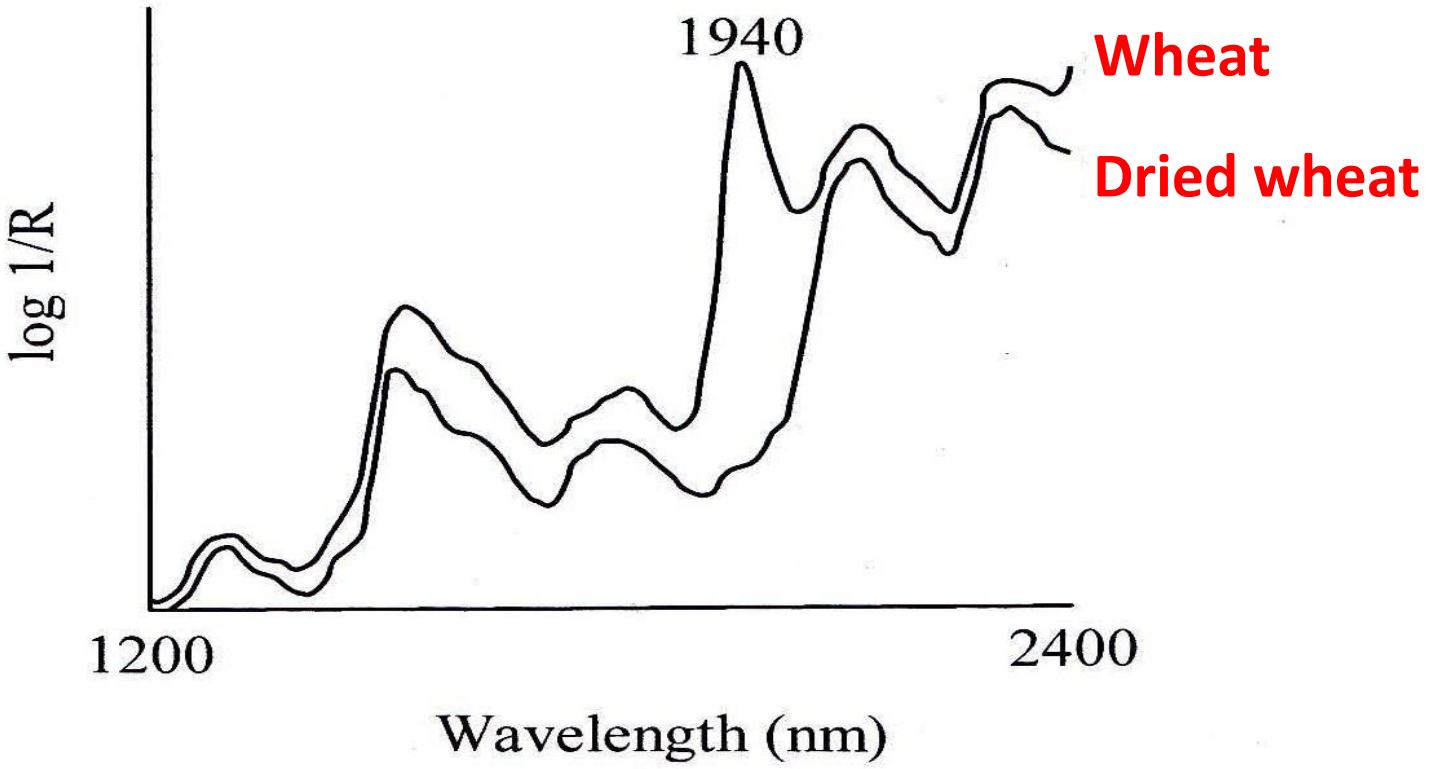
Fig. 6. Comparison of predicted to actual SSC content for the three different spectral modes. Calibration samples are indicated by + and validation data by ●. Some vertical axis labels have been omitted for clarity.

2. ตัวอย่าง (Sample)

- องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition)
- ลักษณะทางกายภาพ (Physical of sample)
- ความหนาแน่น (Bulk density)
- อุณหภูมิของตัวอย่าง (Sample temperature)
- อื่น ๆ

- องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition)

ความชื้น



(Siesler et al., 2002)

ความชื้น

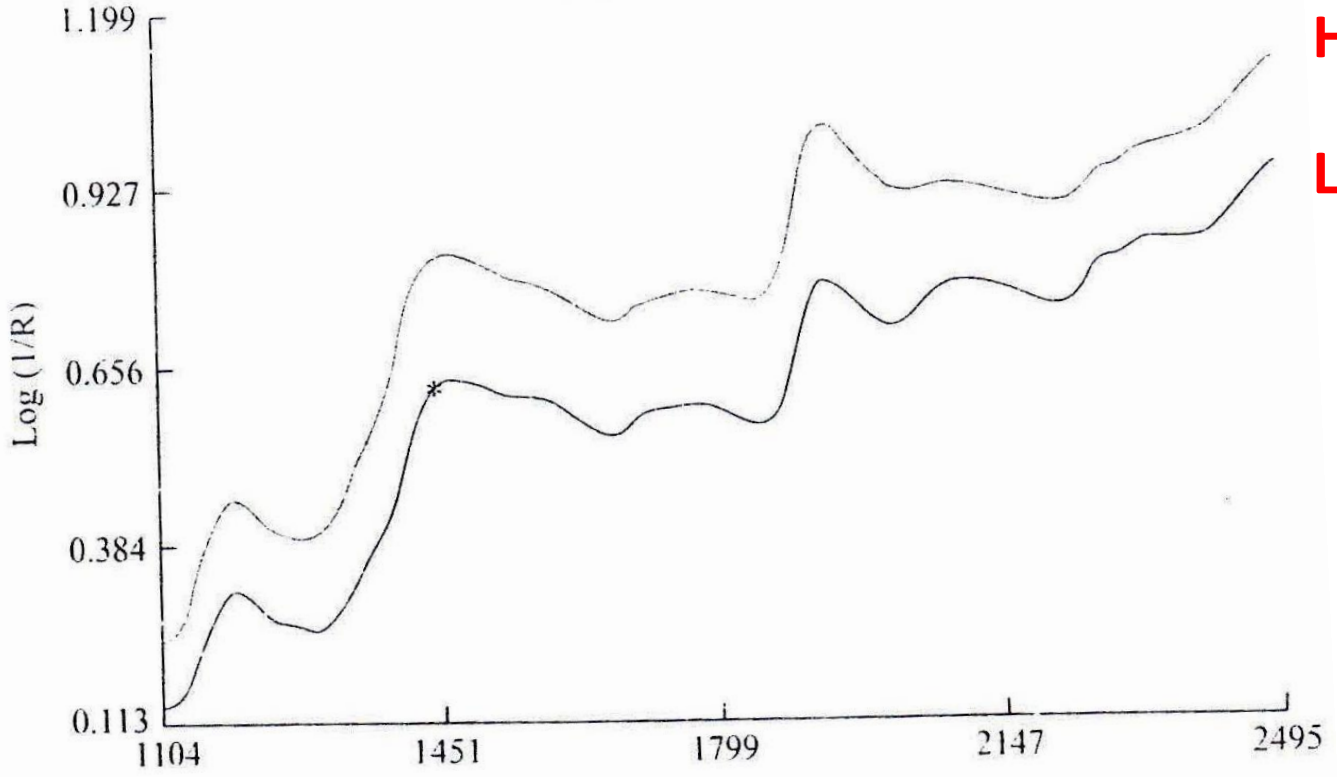


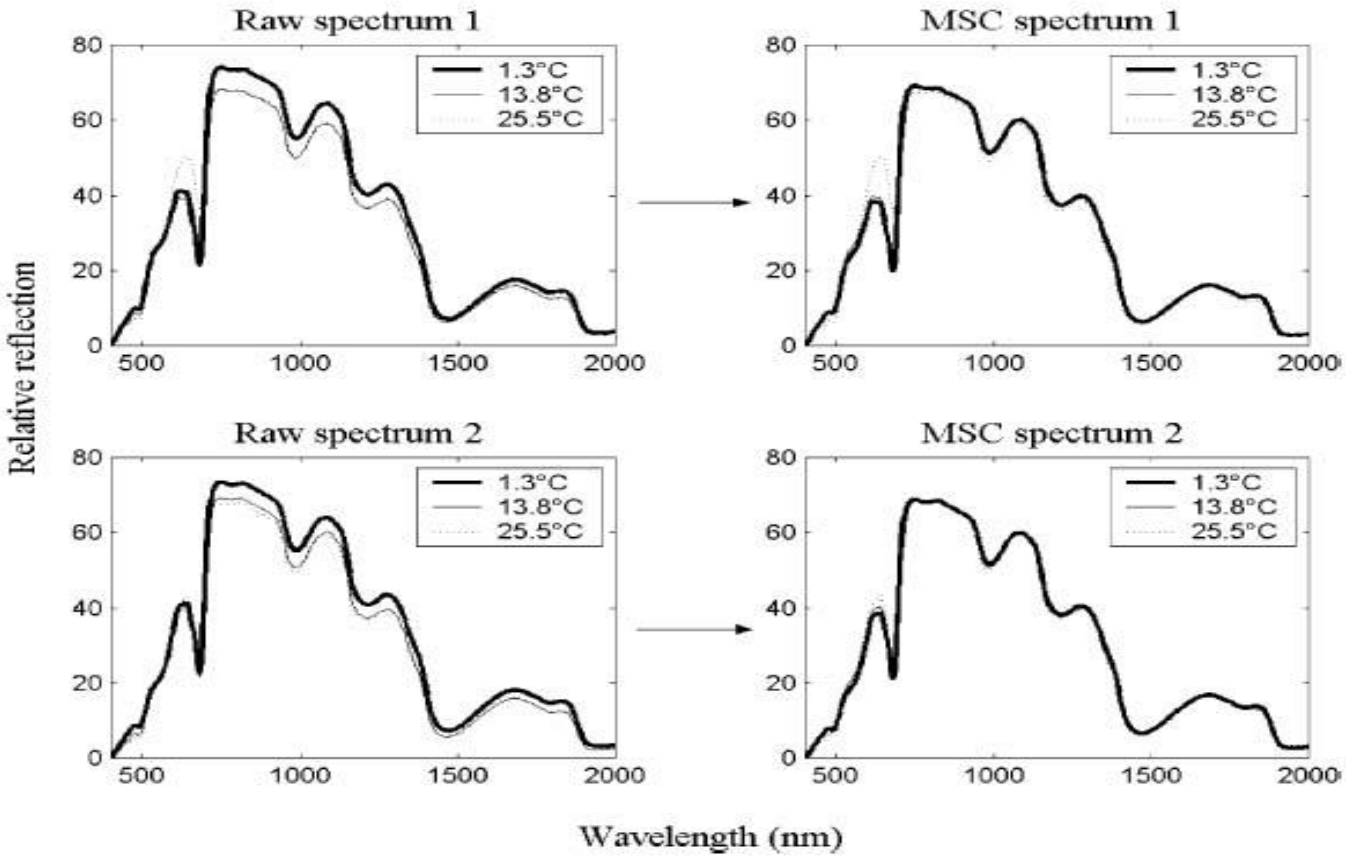
Figure 7.1.17. Influence of moisture content on whole wheat spectra.

High MC

Low MC

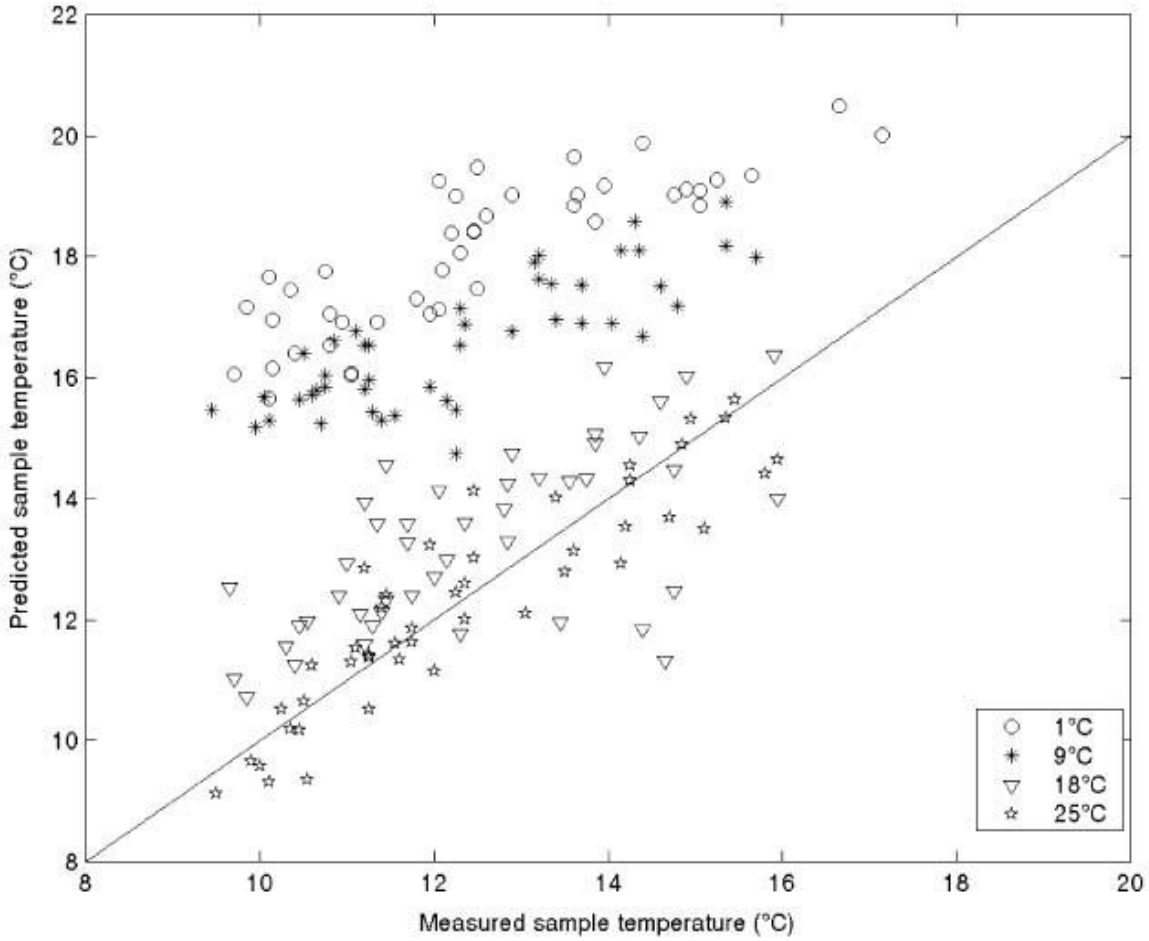
(Siesler et al., 2002)

- อุณหภูมิของตัวอย่าง (Sample temperature)

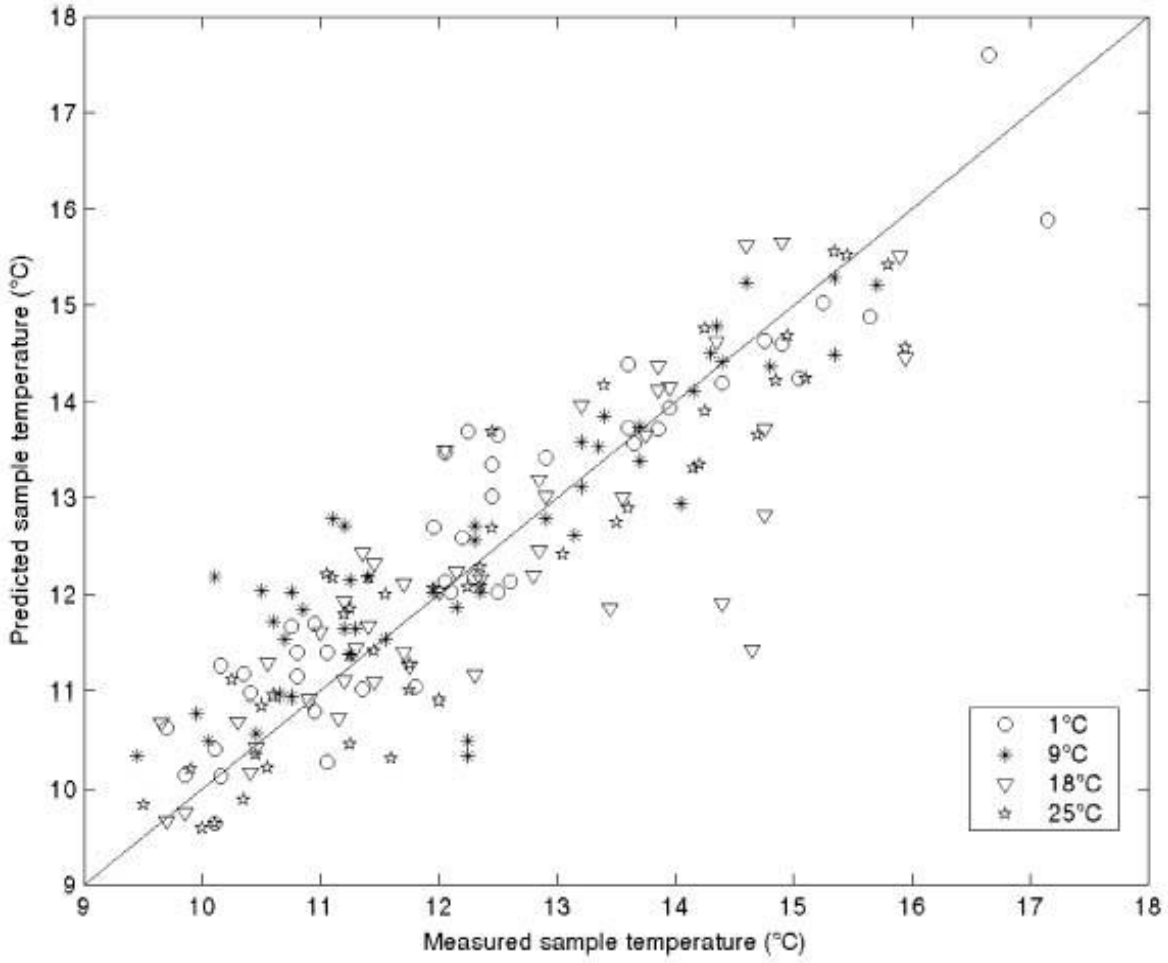


Apples spectra measured at three different temperatures.

(Peirs et al., 2003)



Temperature effects on the prediction results.



Temperature effects on the prediction results were corrected.

3. การจัดการ (Operation)

- การเลือกตัวอย่าง (Sample selection)
- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)
- การเก็บรักษาตัวอย่าง (Sample storage)
- การบรรจุตัวอย่าง (Sample cell loading)
- วิธีวิเคราะห์ทางเคมี (Reference analysis method)
- อื่น ๆ

- การเลือกตัวอย่าง (Sample selection)

ขนาดของตัวอย่าง

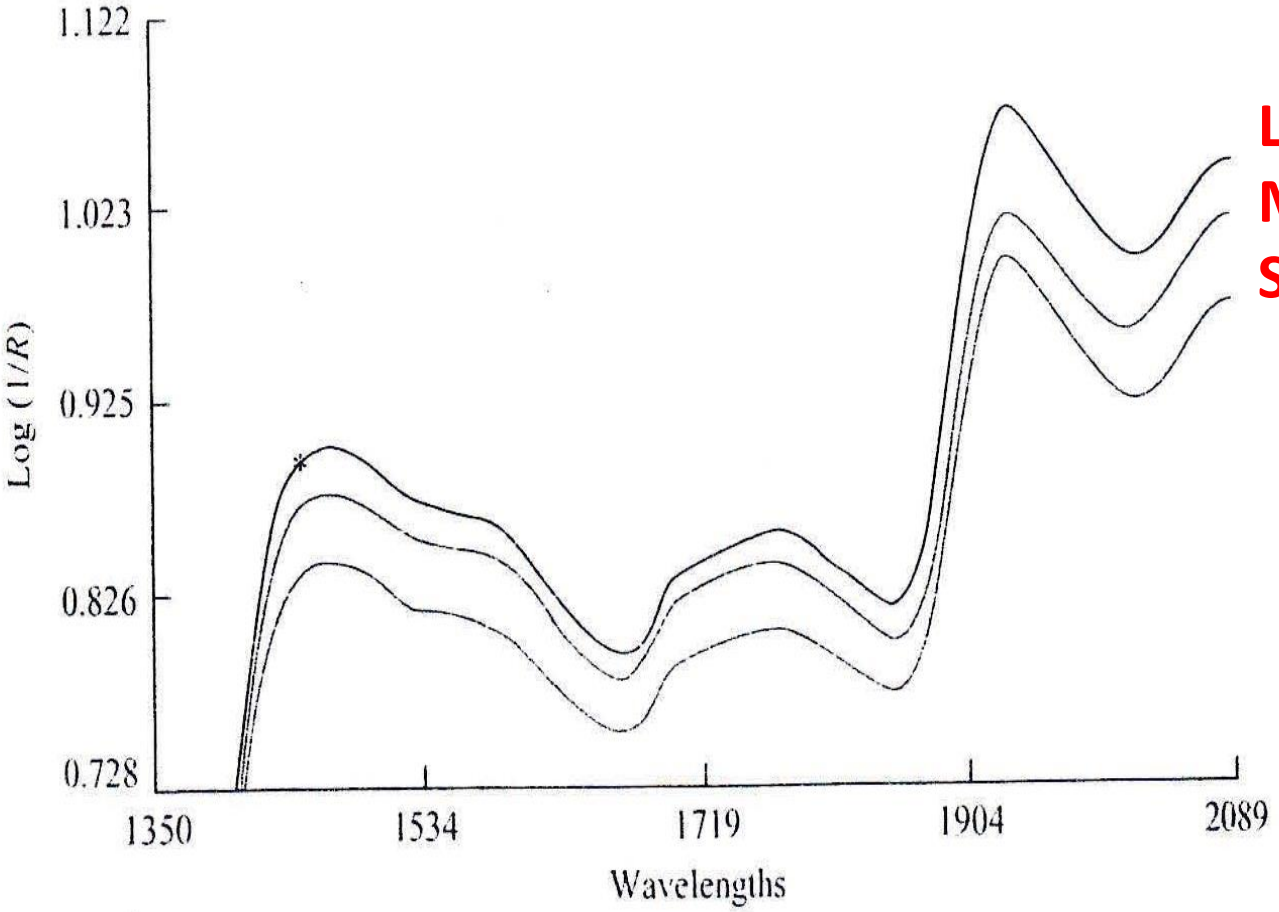
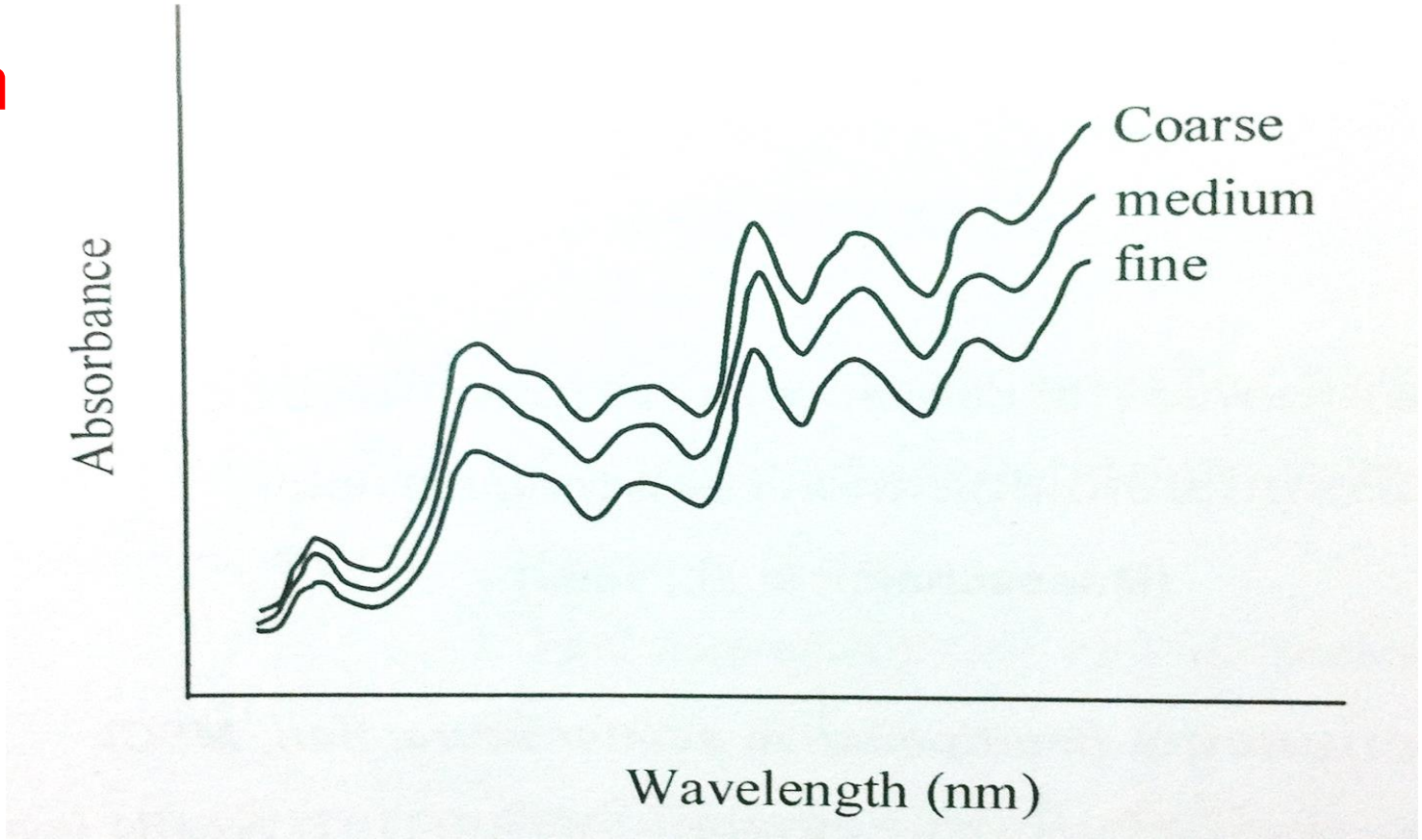


Figure 7.1.5. Influence of kernel size of wheat on spectra: effect of sizing within a sample.

(Siesler et al., 2002)

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

ขนาดของอนุภาค



Wheat flour spectra were prepared at different particle size.

(Siesler et al., 2002)

- การบรรจุตัวอย่าง (Sample cell loading)

การบรรจุตัวอย่าง

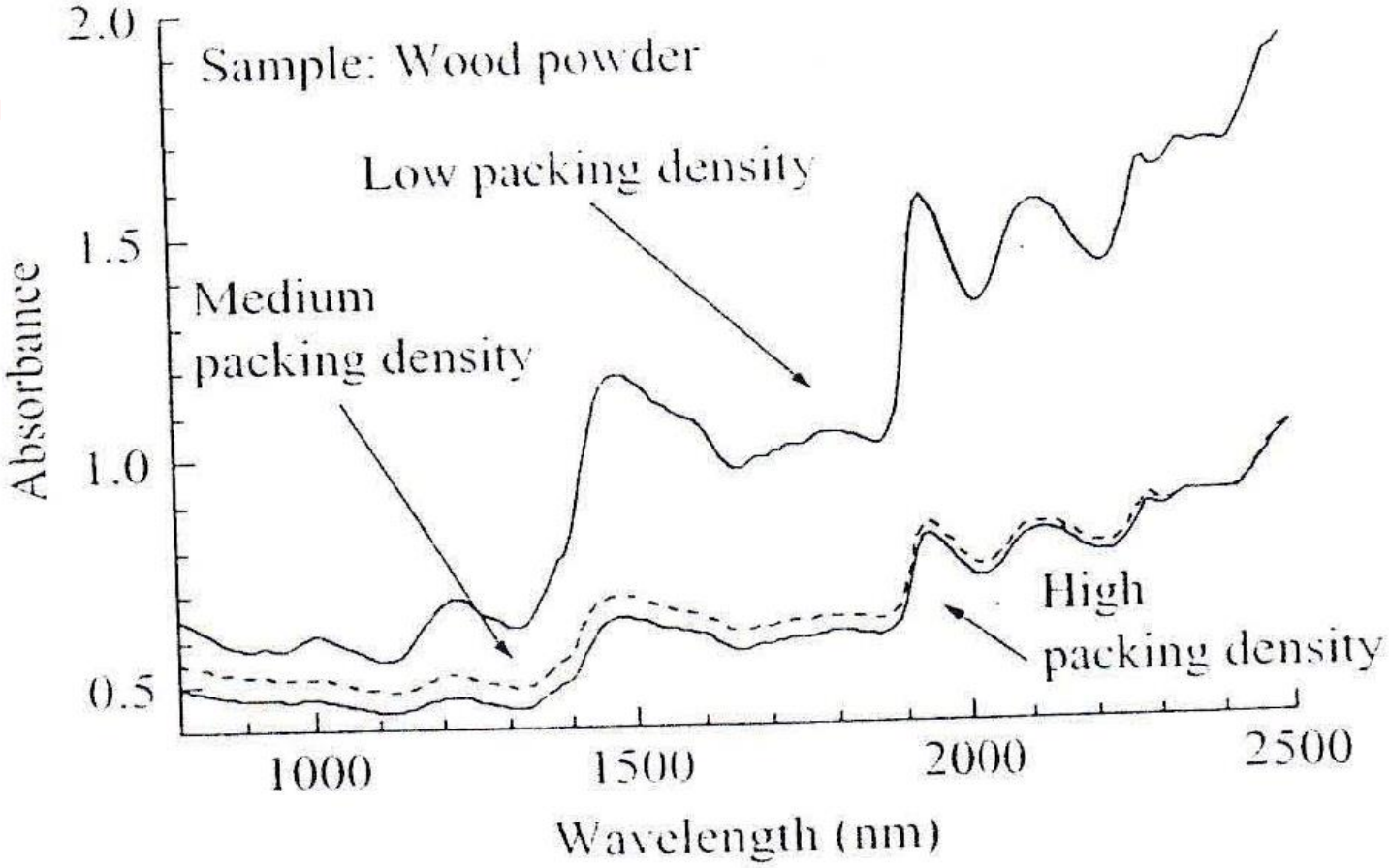
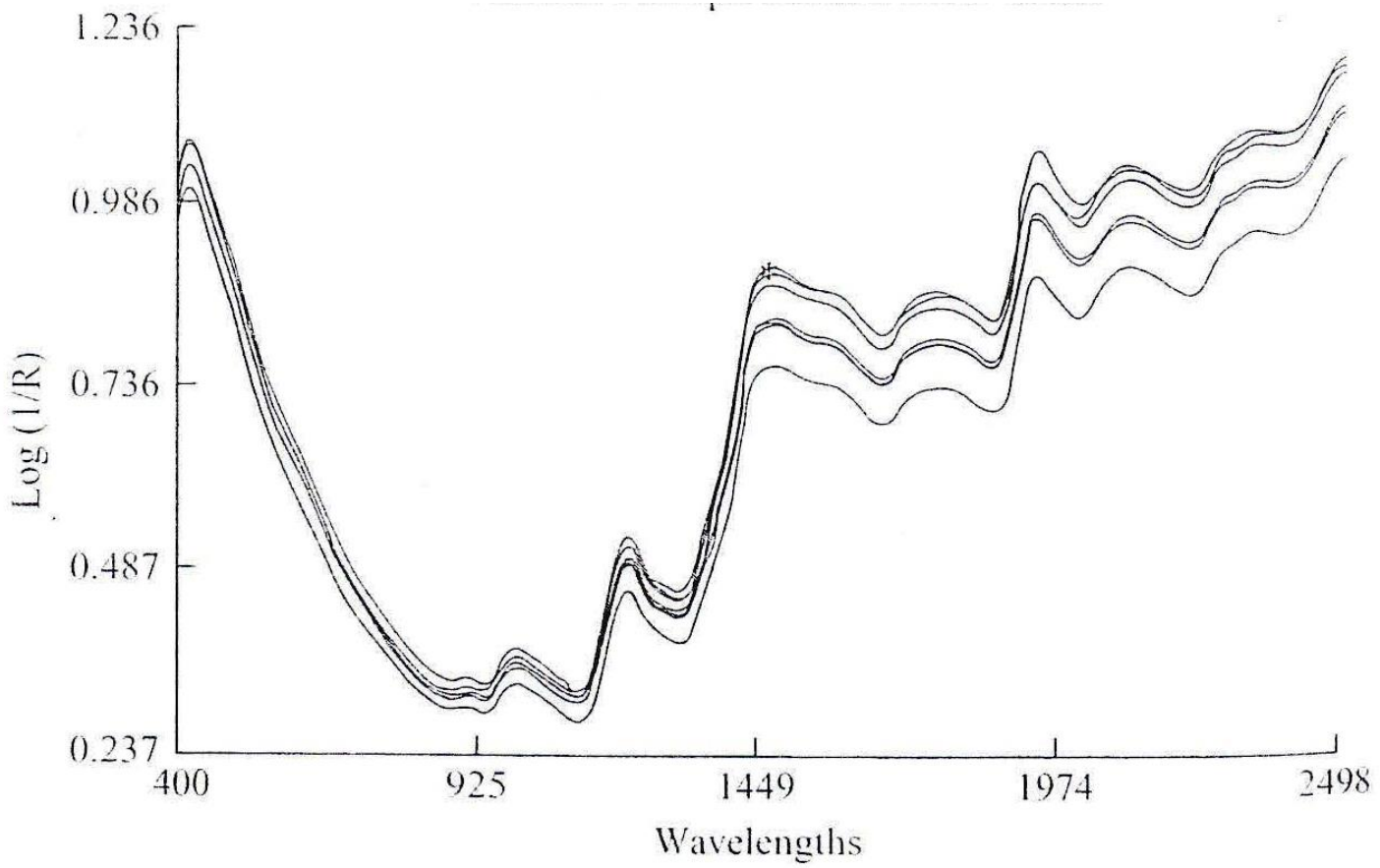


Figure 5.2. Effect of packing density on NIR spectra.

(Siesler et al., 2002)

- ฤดูกาลเพาะปลูก (Growing season)

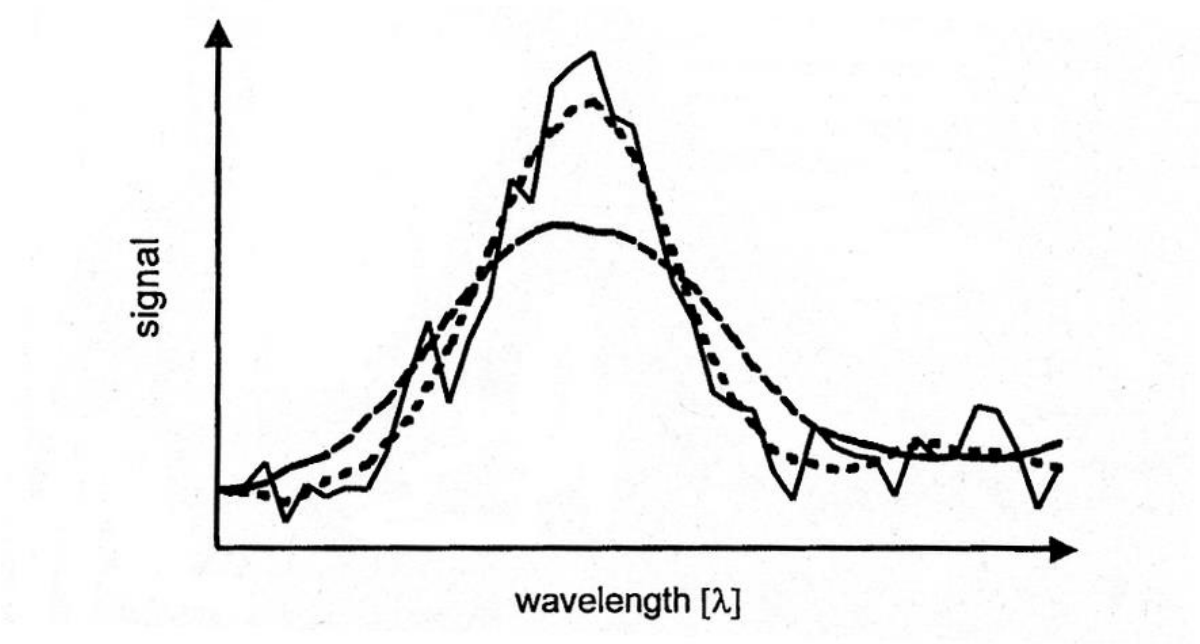


Influence of growing season on CWRS wheat spectra

เทคนิคการแปลงข้อมูลสเปกตรัม

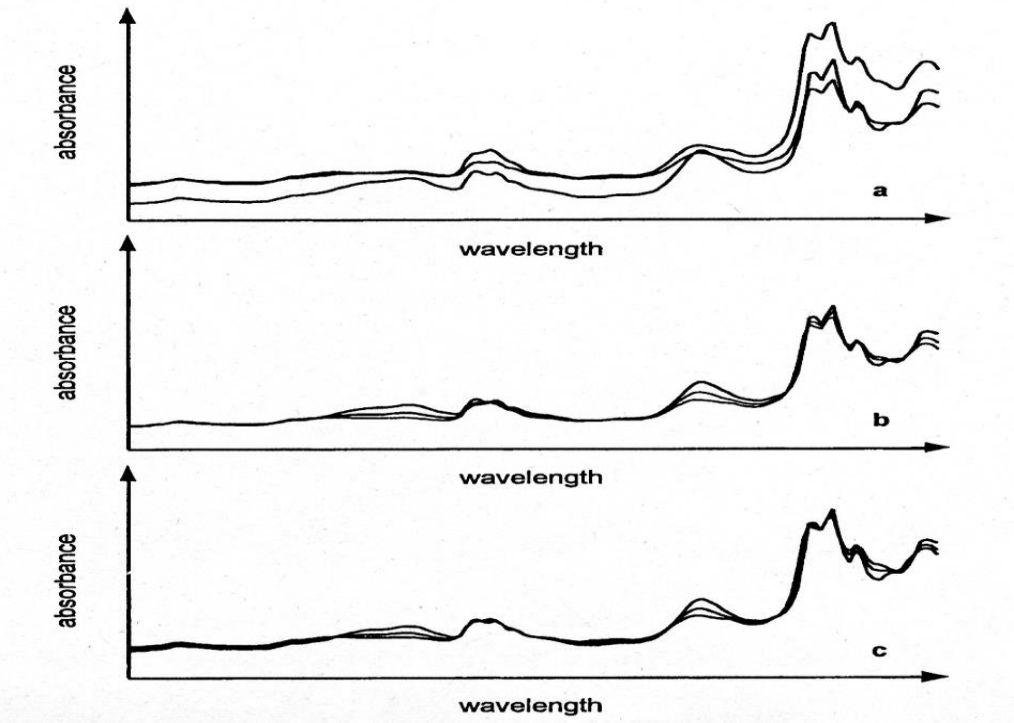
(Spectrum pretreatment)

1. Smoothing



Noisy signal of and absorption band (solid line), smoothed with a moving average filter (dash line) and a Savitzky–Golay filter (short dashed line)(Heise and Winzen, 2002).

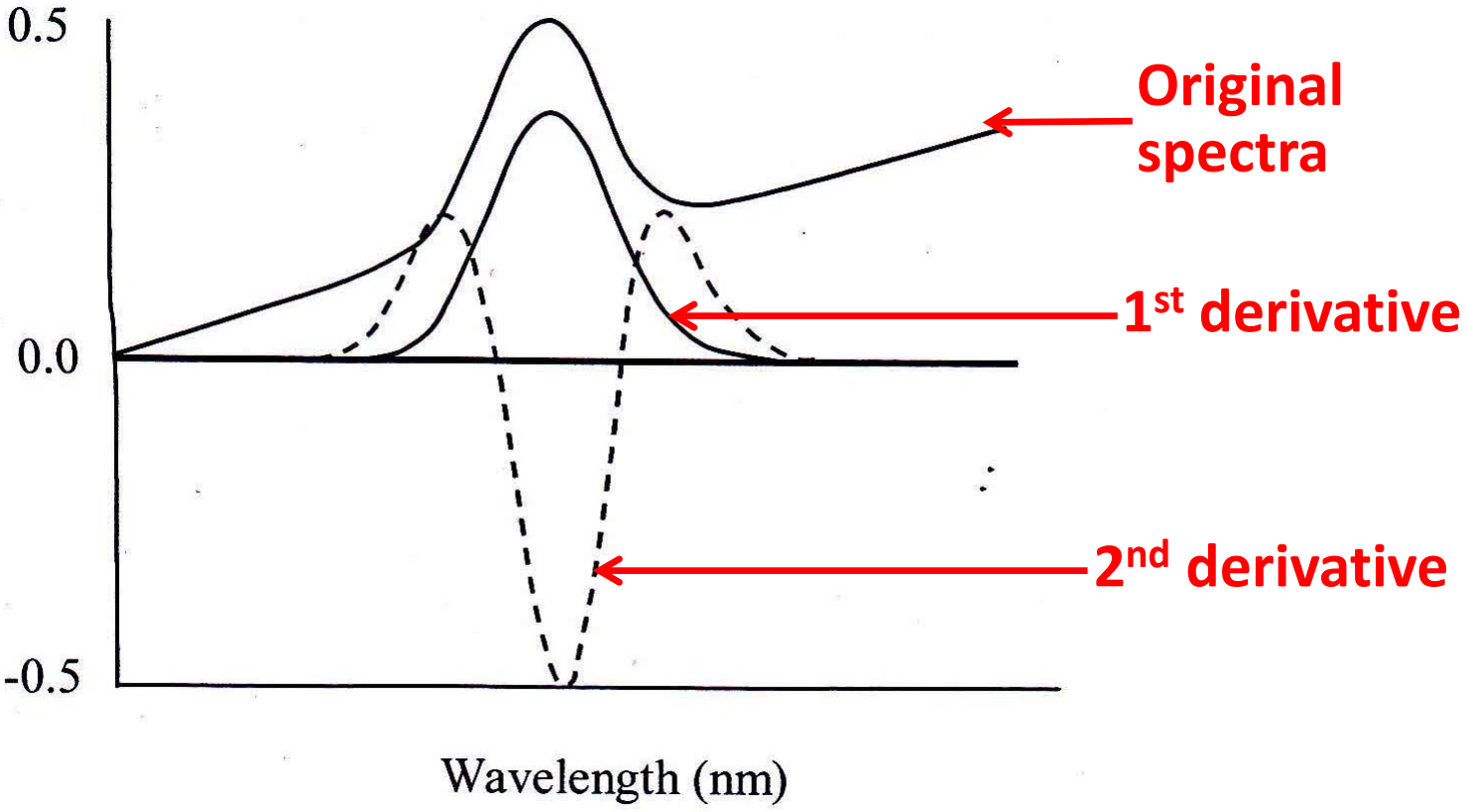
2. Multiplicative scatter correction (MSC)



a) raw spectral data after multiplication by random scalars to simulate different optical sample pathlength
b) original spectra
c) corrected spectra obtained after MSC–processing

(Heise and Winzen, 2002)

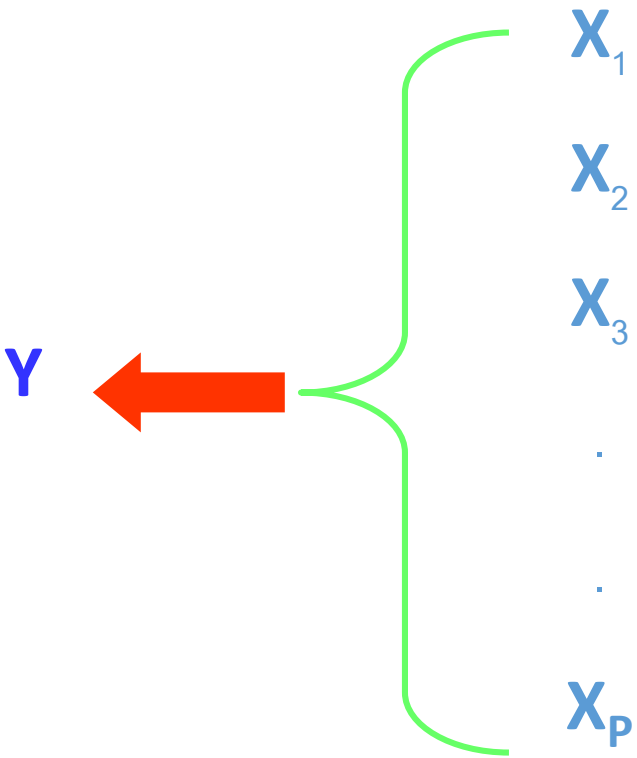
3. Derivative

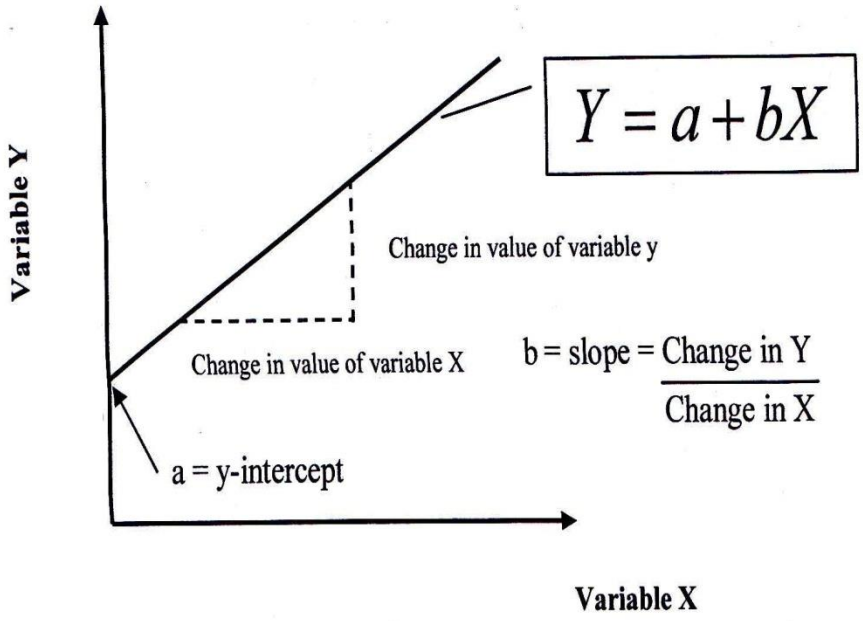


Derivative spectra (Williams and Norris, 2001)

วิธีการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน
(Calibration equation development)

1. การเลือกความยาวคลื่น
(Selected wavelengths method) : MLR





$$C = K_0 + K_1 A_1 + K_2 A_2 + K_3 A_3 + \ldots\ldots$$

TSS of apple = 15.14 – 703.10 L (904) +
1,053.43 L (876)
+273.65 L (914)

Where; L (λ_ι) is $d^2 \log (1/R(\lambda_i))$.
λ_ι is wavelength in nm.

Protein calibration model

$$protein = 12.68 + 493.7 \log(1/R_{2180}) - 323.1 \log(1/R_{2100}) + 243.4 \log(1/R_{1680})$$

2. Full spectrum method: PLSR

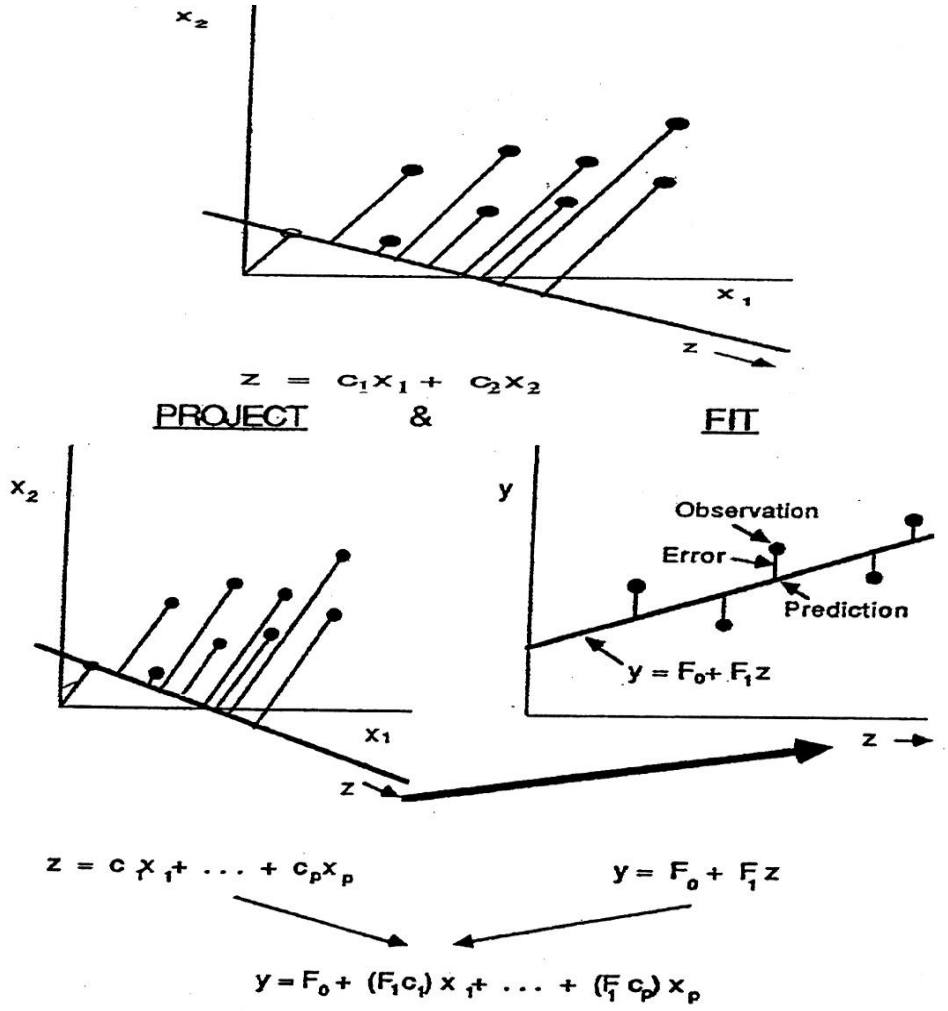
$$C = K_0 + K_1F_1 + K_2F_2 + K_3F_3 + \ldots\ldots$$

where;

C is the concentration of constituent of interest.

$F_1, F_2, F_3 \ldots$ are the PCR or PLS score at each factor.

$K_0, K_1, K_2, K_3 \ldots$ are regression coefficients.



A projection from two dimensions to one(Osborne *et al*., 1993)

PLSR calibration results

TABLE 7.1.8. Influence of Wavelength Range for Prediction of Wheat Protein and Canola Oil Content at Log 1/*R* with No Mathematical Pretreament of Spectral Log 1/*R* Data

	Wheat Protein Content			Canola Oil Content		
Wavelengths	r^2	*SEP**	*RPD*	r^2	*SEP*	*RPD*
408–1092	0.912	0.237	3.37	0.889	0.981	3.00
408–2492	0.927	0.217	3.68	0.959	0.597	4.93
696–1792	0.962	0.156	5.12	0.967	0.535	5.50
708–2492	0.940	0.196	4.07	0.958	0.608	4.84
908–1692	0.968	0.144	5.54	0.964	0.560	5.25
1108–2492	0.947	0.184	4.34	0.955	0.622	4.73
1108–1392	0.957	0.166	4.81	0.960	0.596	4.94
1224–2224	0.924	0.220	3.63	0.956	0.619	4.75

* SEP = standard error of prediction; RPD = ratio of SEP to standard deviation of reference data for test-set samples.

(Siesler et al., 2002)

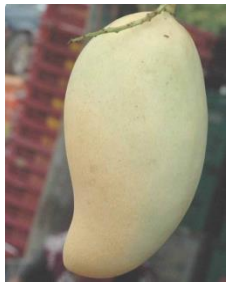
การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS กับผลิตผลเกษตร (Application)

1. สมบัติทางกายภาพ: ความแน่นเนื้อ
2. สมบัติทางเคมี: คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และอื่น ๆ
3. สารตกค้าง
4. อาการผิดปกติทางสรีรวิทยา

ตัวอย่างงานวิจัย

1. การตรวจวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) ความหวานและปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) ในผลมะม่วง

วิธีการทดลอง



Commercial maturity

Stored at 13 °C on 10, 20 and 30 days

Controlled mango fruit temp. at 25 ^{0}C

Measured spectrum by NIRSystem 6500

Determined physic. and chem. properties

Analysed Data

ผลการทดลอง

Initial

10 Days

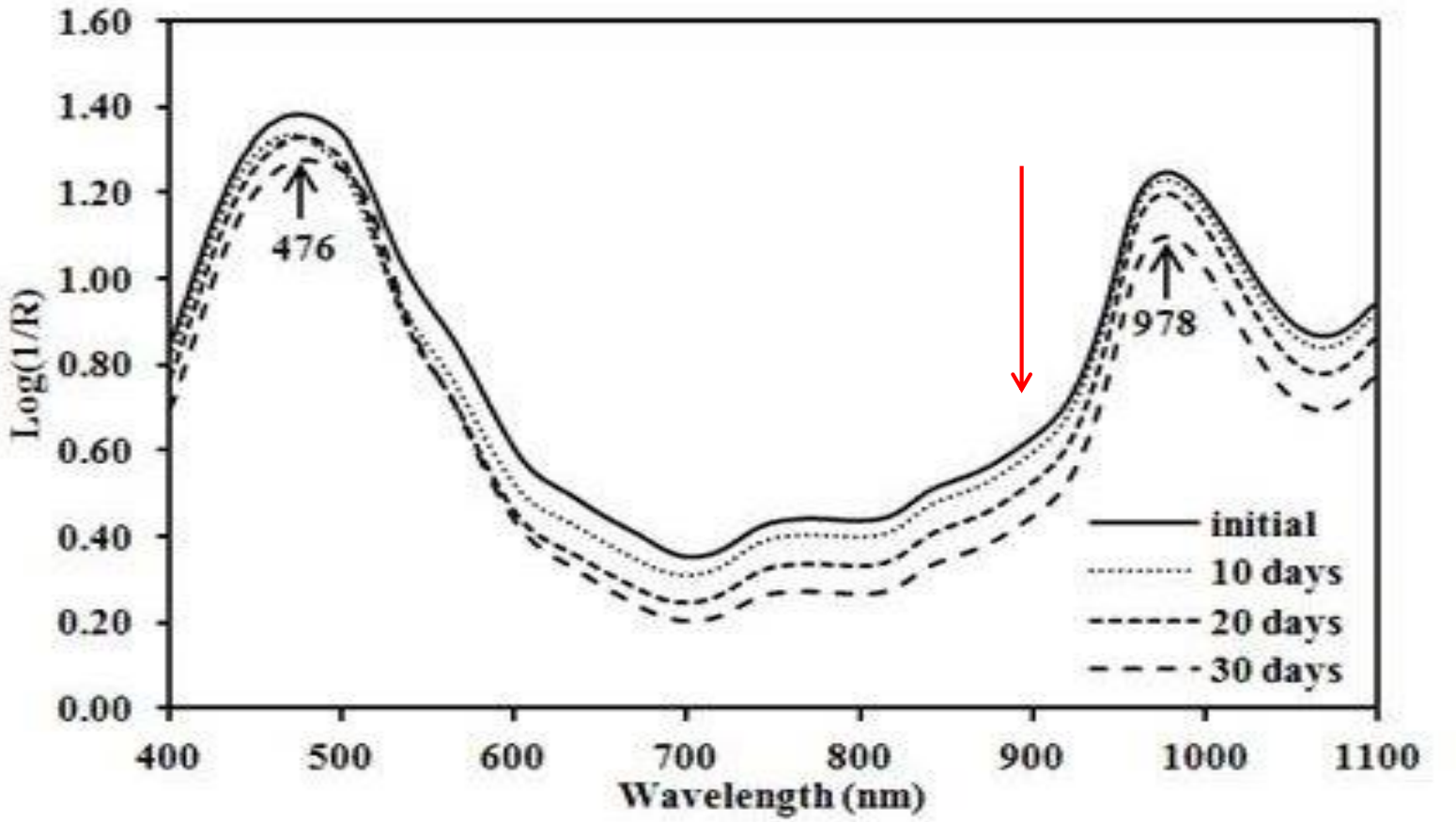
20 Days

30 Days

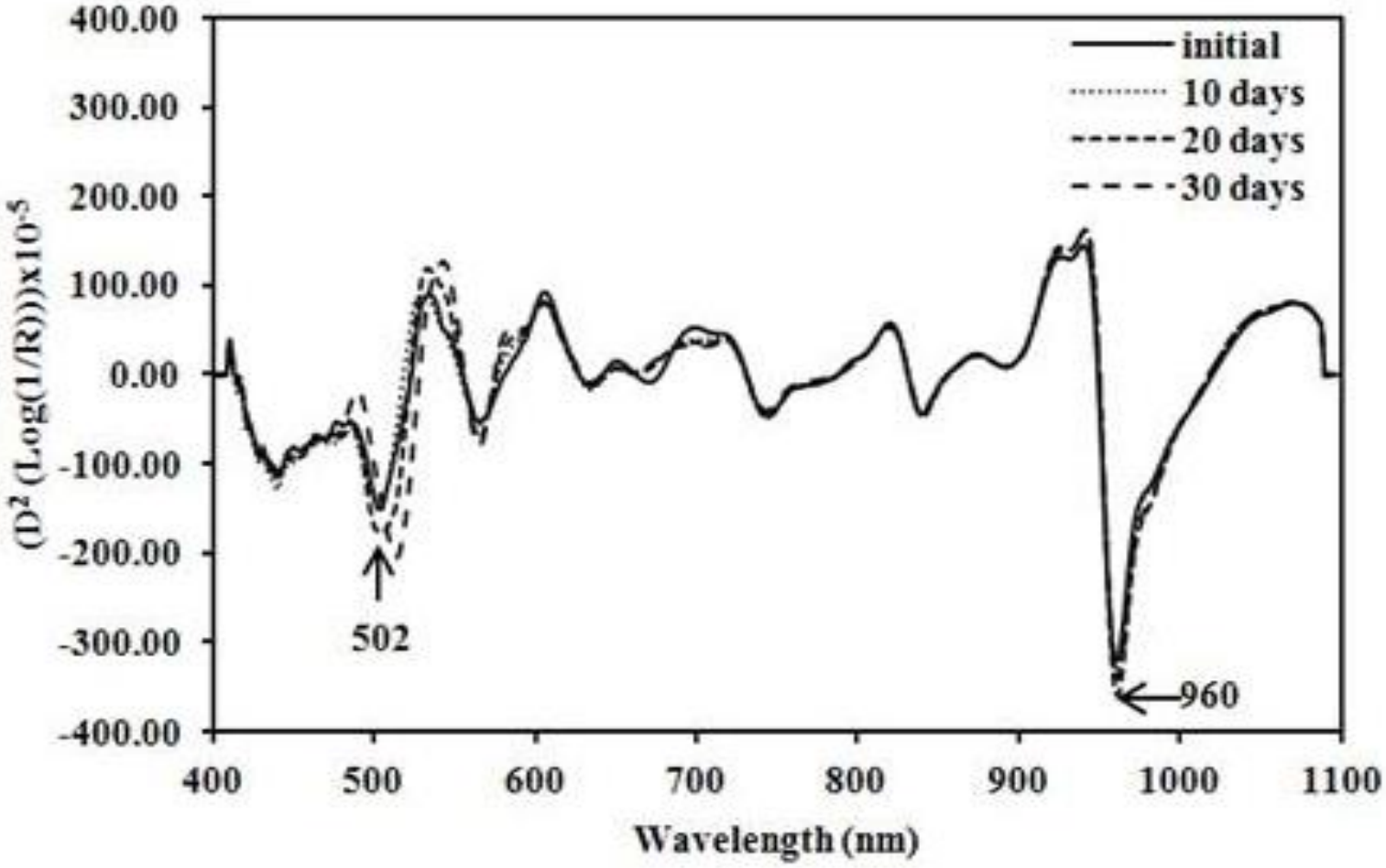
Mango fruits after storage at 13 ^{0}C for 10, 20 and 30 days.

TSS, TA and firmness of mango fruits at initial and after storage at 13 °C, RH 80-90% for 10, 20 and 30 days.

Storage time	TSS (◦ Brix)	TA (%w/v)	Firmness (N)
Initial time	10.16c	1.49ab	71.17a
10 days	11.09c	1.59a	70.75a
20 days	15.45b	1.32b	43.87b
30 days	18.35a	0.78c	6.44c
LSD. (0.05)	1.04	0.17	9.08
CV(%)	10.76	19.52	31.26



Mean original spectra of mango fruit at initial and storage at 13 °C for 10, 20 and 30 days.



Mean treated spectra resulting from the Savitzky-Golay second derivative of mango fruit at initial and storage at 13 °C for 10, 20 and 30 days.

PLSR calibration results for TSS and TA using spectra treated with second derivative.

Constituent	Pre-treatment	Wavelength (nm)	F	R^2	SEC	SEP	Bias	RPD
TSS (%)	Second derivative	800-1080	6	0.97	0.60	0.64	0.04	5.3
TA (%)	Second derivative	850-950	6	0.84	0.16	0.16	-0.01	2.5

F: number of factors used in the calibration equation; R^2: coefficient of determination; SEC: standard error of calibration; SEP: standard error of prediction; Bias: average of the difference between actual value and NIR predicted value; RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP

Correlation of determination (R^2)

$$R^2 = \frac{\Sigma(y'-\bar{y})^2}{\Sigma(y-\bar{y})^2}$$

y' : predicted value
$\bar{y}$: mean of reference analysis value
y : reference analysis value

Standard error of calibration (SEC)

$$SEC = \sqrt{\frac{\Sigma(y'-y)^2}{n-1}}$$

y' : predicted value
y : reference analysis value
n : number of sample in the calibration set

Standard error of validation (SEP)

$$SEP = \sqrt{\frac{\Sigma(y' - y - bias)^2}{n-1}}$$

y' : predicted value
y : reference analysis value
n : number of sample in the validation set

The average of the difference between actual value and NIR predicted value (Bias)

$$Bias = \frac{\Sigma(y' - y)}{n}$$

2. การตรวจวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณกรด ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) ในผลส้มสายน้ำผึ้ง

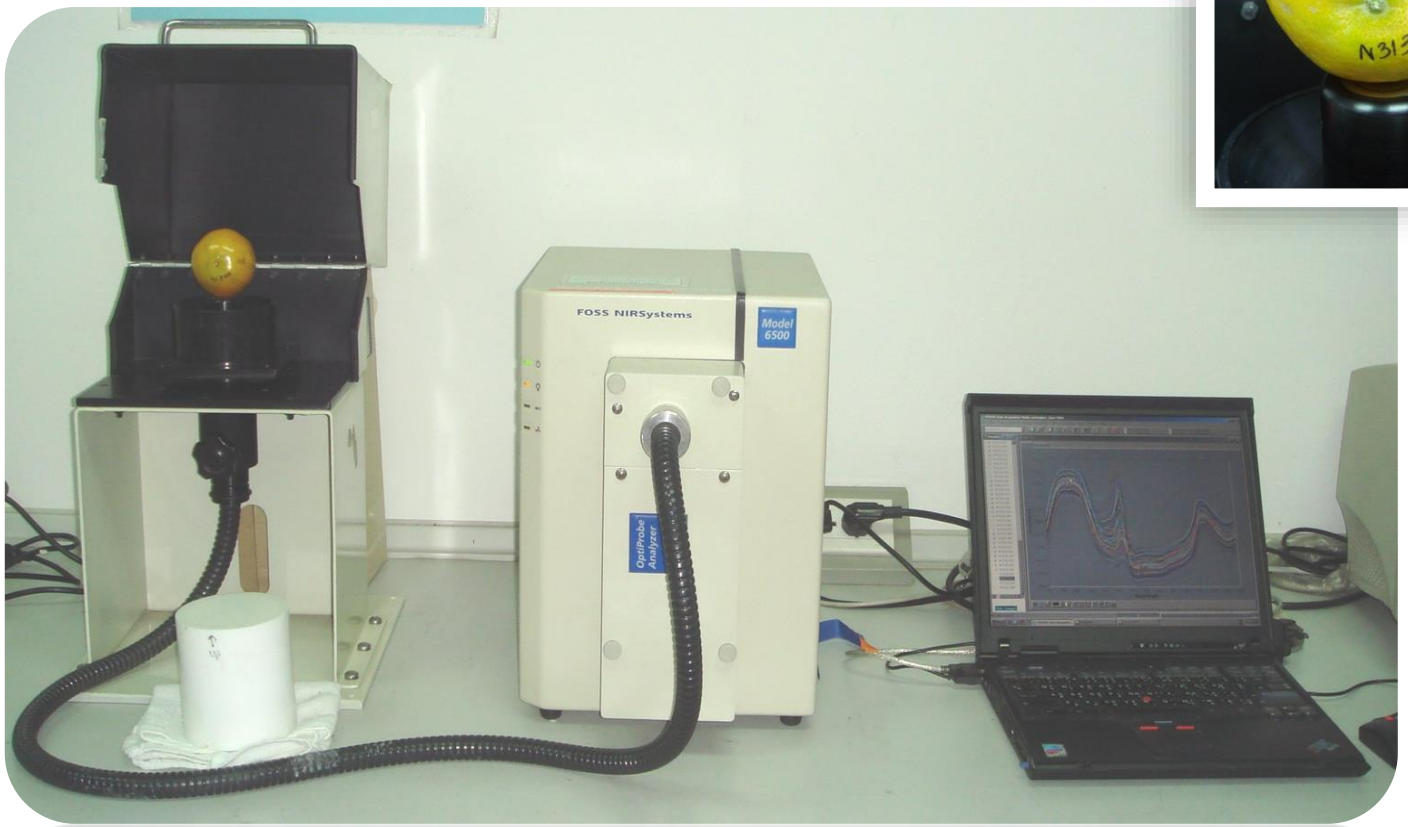
วิธีการทดลอง

1. Harvesting

2. Processing

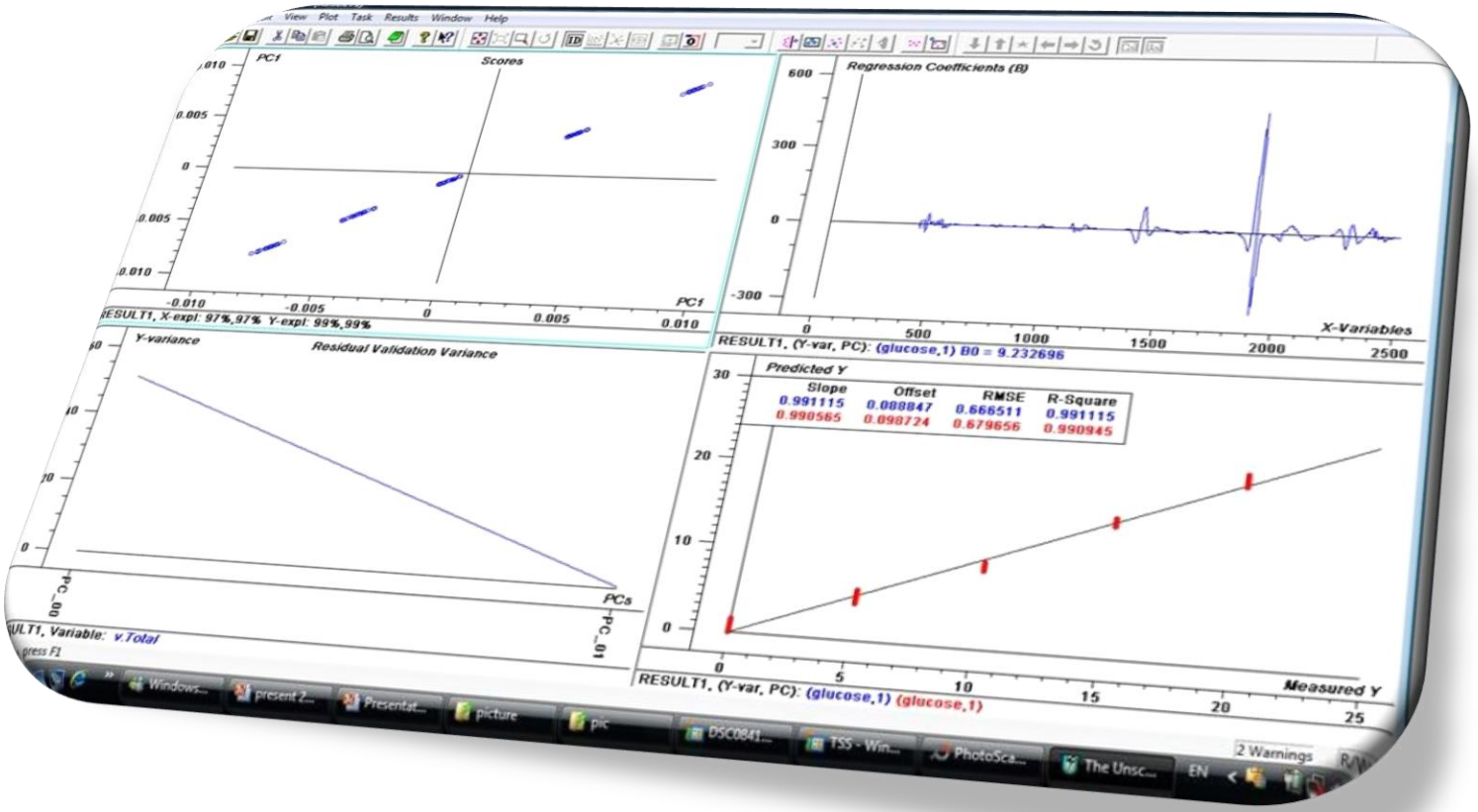
3. Controlling fruit temperature at 25 °C

4. Measuring fruit spectrum by NIRSystem 6500



5. Chemical analysis

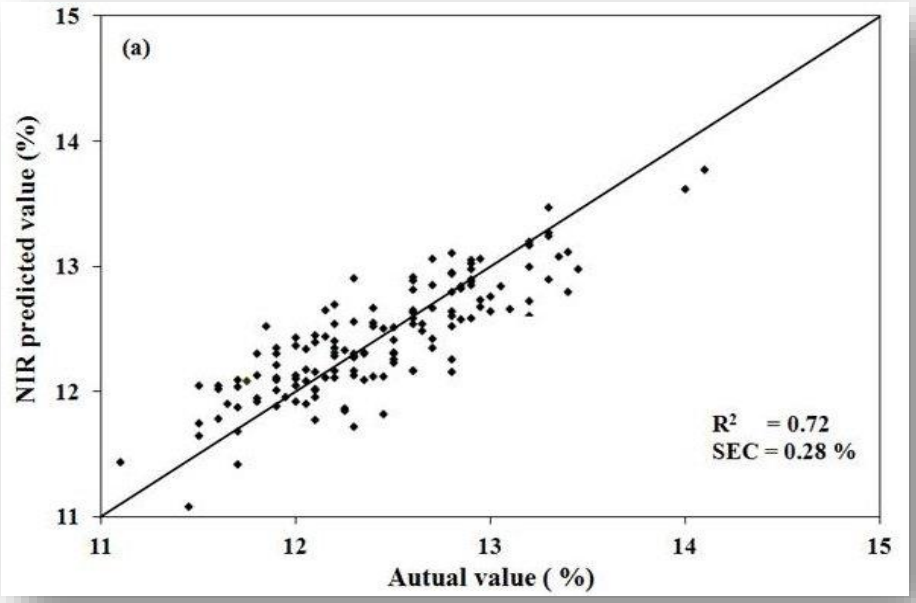
6. Calibration equation development

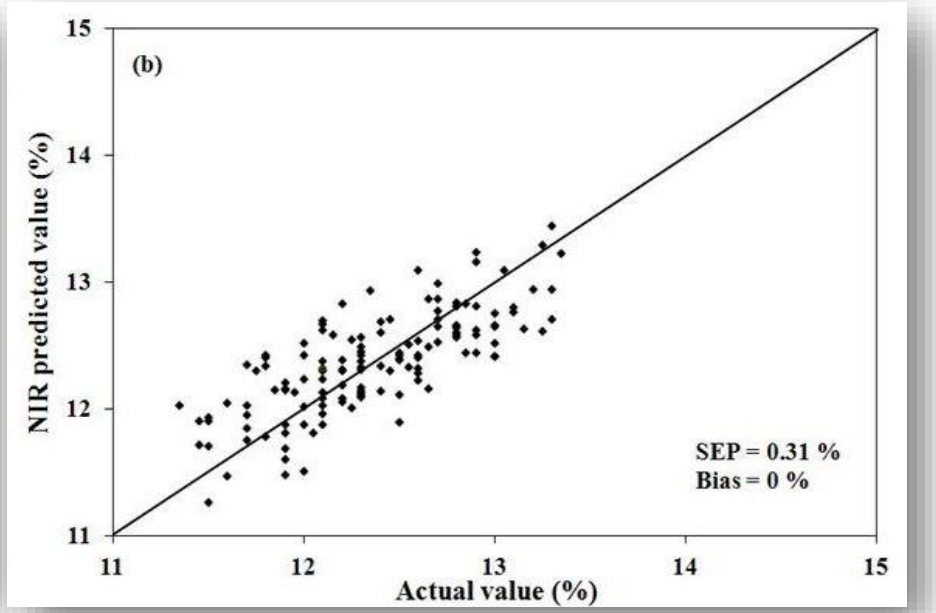


ผลการทดลอง

PLSR calibration result of tangerine fruit

Quality	Pre-treatment	Wavelength (nm)	F	R^2	SEC	SEP	Bias
TSS	MSC + 2 nd derivative (10,10)	850 - 1050	8	0.72	0.28	0.31	0
TA	SM + 2 nd derivative (5,5)	850 - 1000	7	0.70	0.04	0.06	0



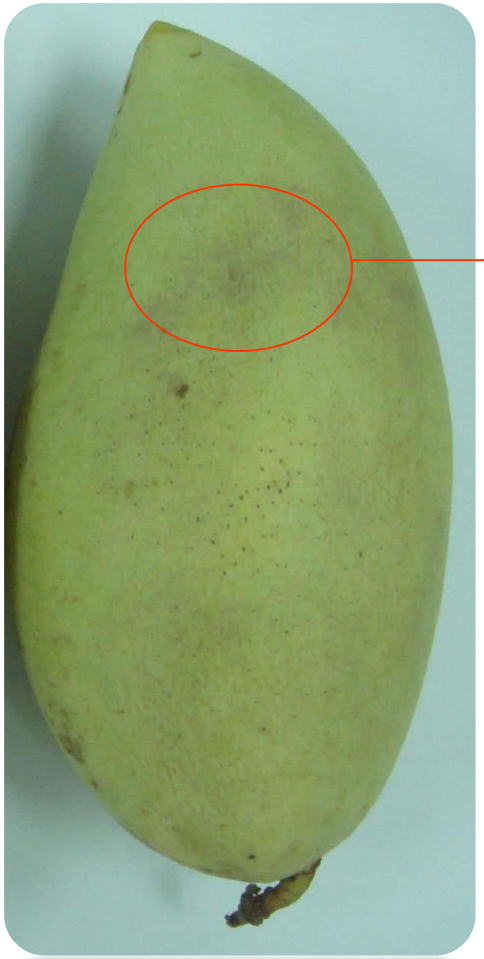


(a) **(b)**

Scatter plots for TSS prediction of tangerine fruit in (a)calibration sample set and (b) validation sample set

3. การตรวจหาอาการผิดปกติทางสรีรวิทยา (Physiological disorder)

3.1 การตรวจหาอาการสะท้านหนาวในผลมะม่วง (Chilling injury)



Chilling injury symptom

dark, scald-like disorderation and pitting or sunken lesions on the peel

วิธีการทดลอง

120 days after flowering

Storage at 5 ^{0}C on 15 and 30 days

Control mango fruit temp. at 25 ^{0}C

Measure spectrum by NIRSystem 6500

Physic. and Chem. Properties determination

Calibration equation development

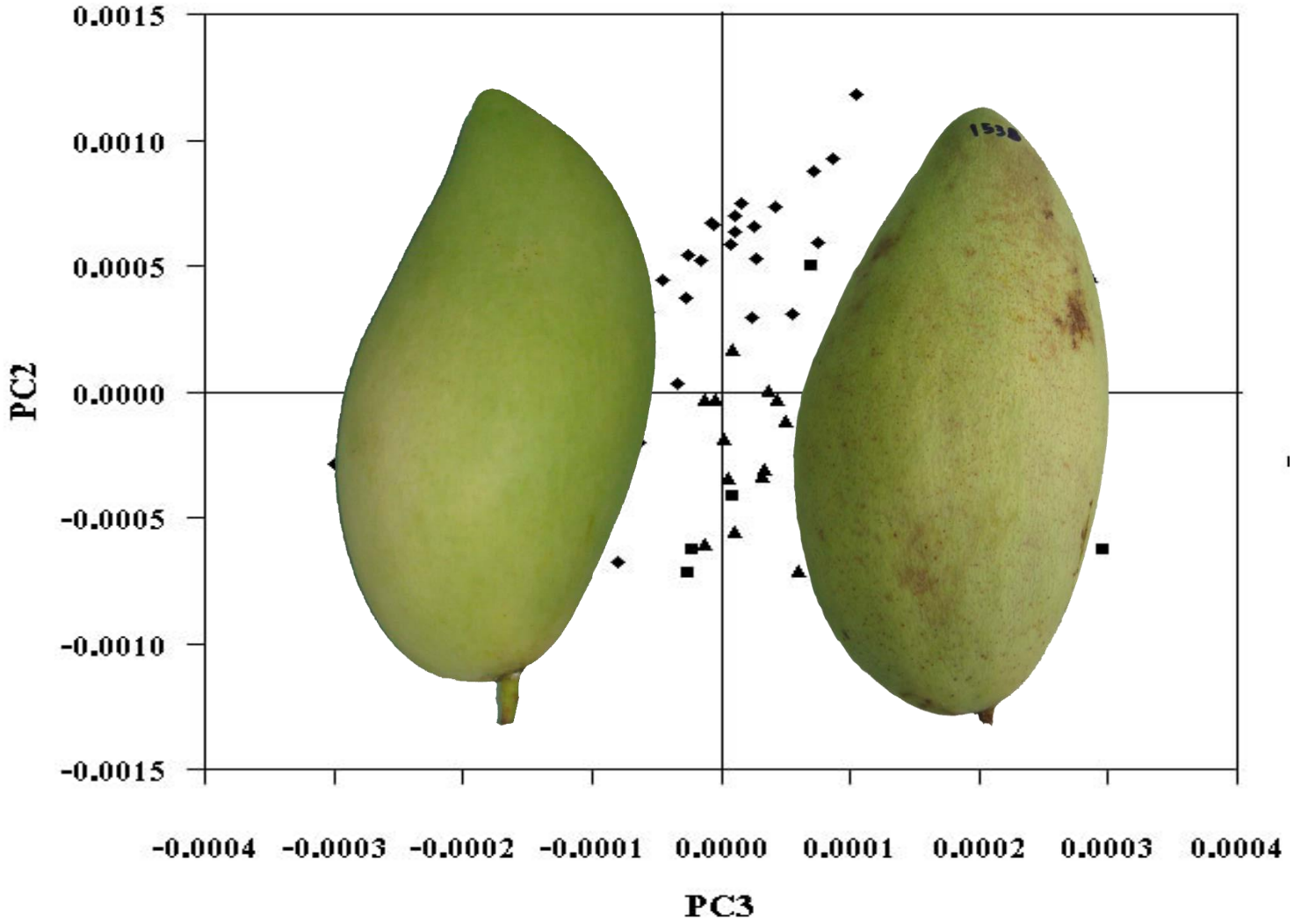
ผลการทดลอง

Initial 15 days 30 days

Mango fruit at initial time, on days 15 and 30 storage at 5±1°C.

The electrolyte leakage of the mango flesh at the initial time, on days 15 (T15) and 30 (T30) storage at 5±1°C.

Storage time	Electrolyte leakage (%)
Initial	8.6
15 days	15.4
30 days	13.0
LSD.(0.05)	1.2
CV(%)	15.6



Principle component score plot (PC2 vs. PC3) of mango fruit at initial time (♦), on days 15 (▲) and 30 (■) storage at 5±1°C.

3.2 การตรวจหาอาการไส้สีน้ำตาลในผลสับปะรด

Internal browning

Harvesting stage

30 ^{0}C, 20 days

5 ^{0}C, 10 days

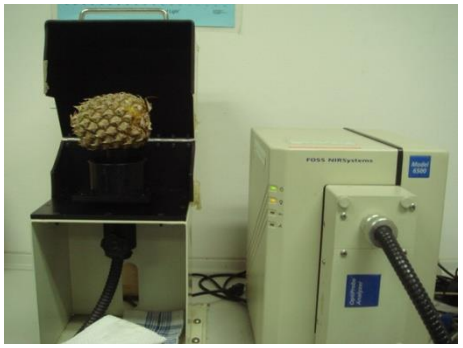
5 ^{0}C, 20 days

5 ^{0}C, 30 days

วิธีการทดลอง

Harvesting

Inducing of internal browning

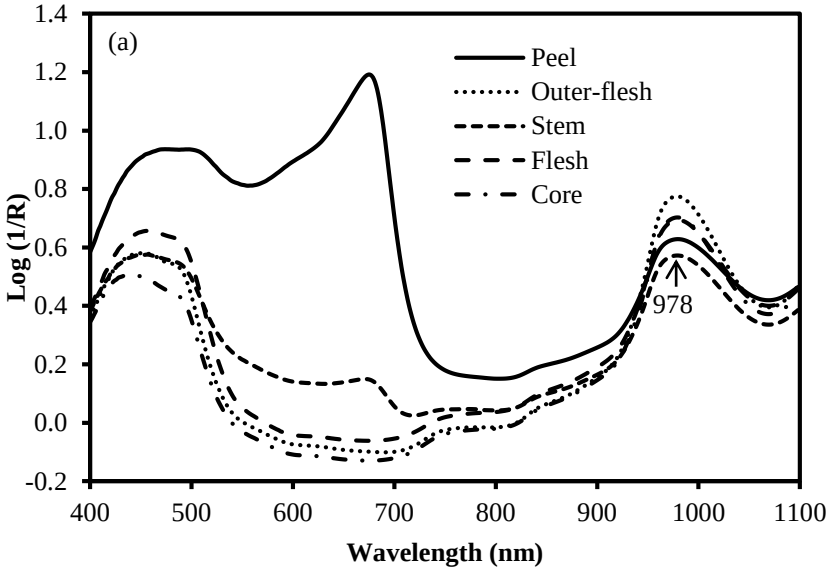


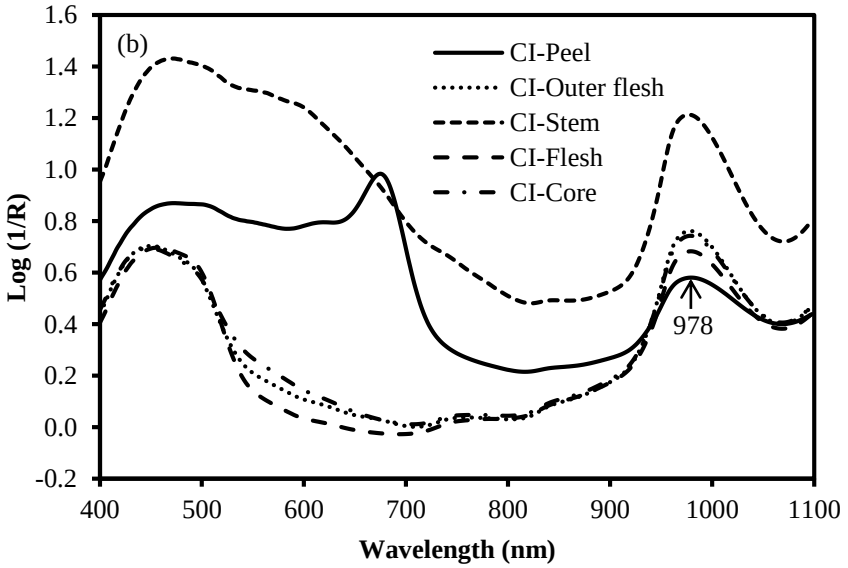
Measuring NIR spectrum by NIRSystem 6500

Physic. and Chem. Properties determination

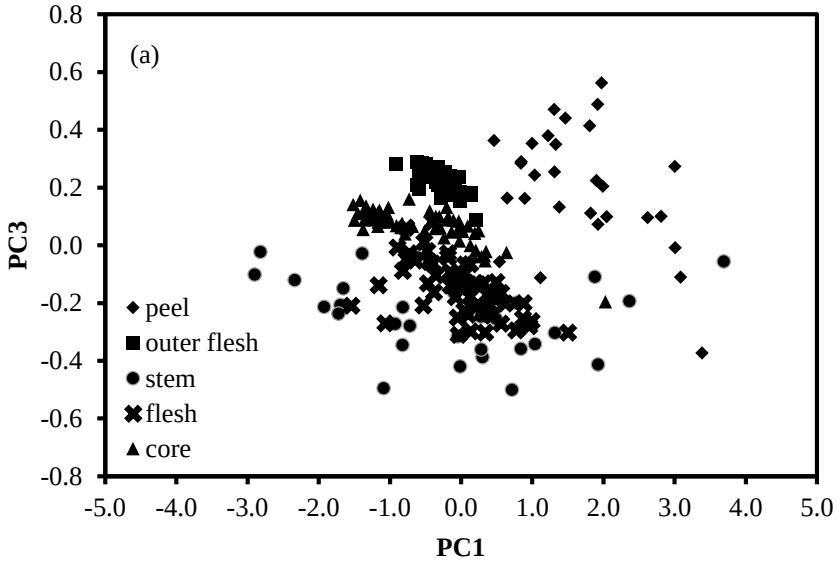
Calibration equation development

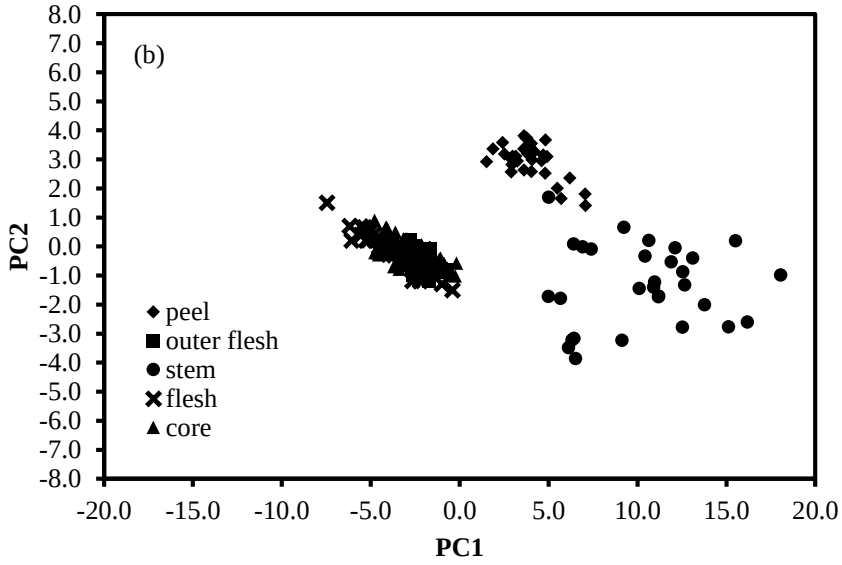
ผลการทดลอง



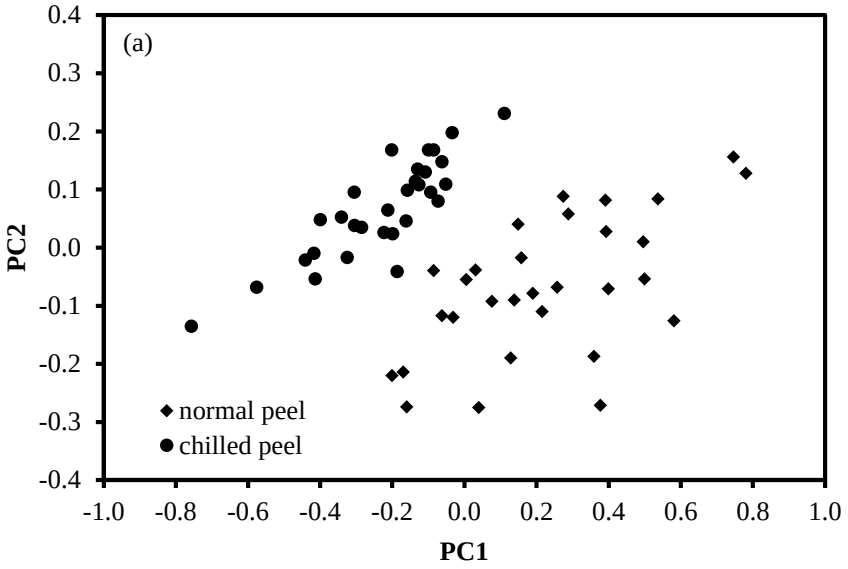


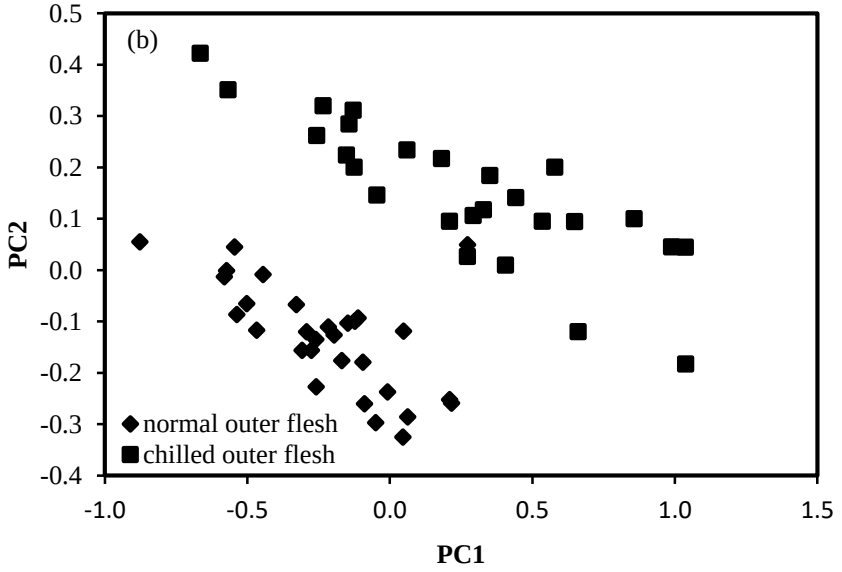
Means original spectra of pineapple fruit : (a) before storage and (b) after storage at 5 ^{0}C for 20 days measured at various parts.



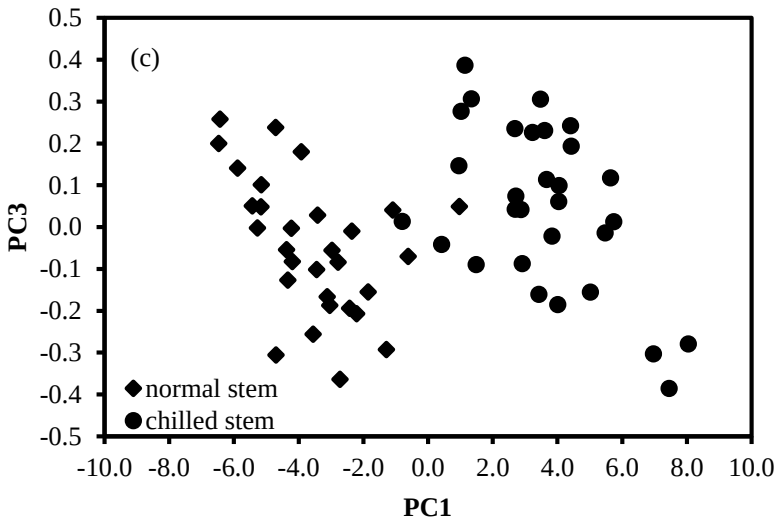


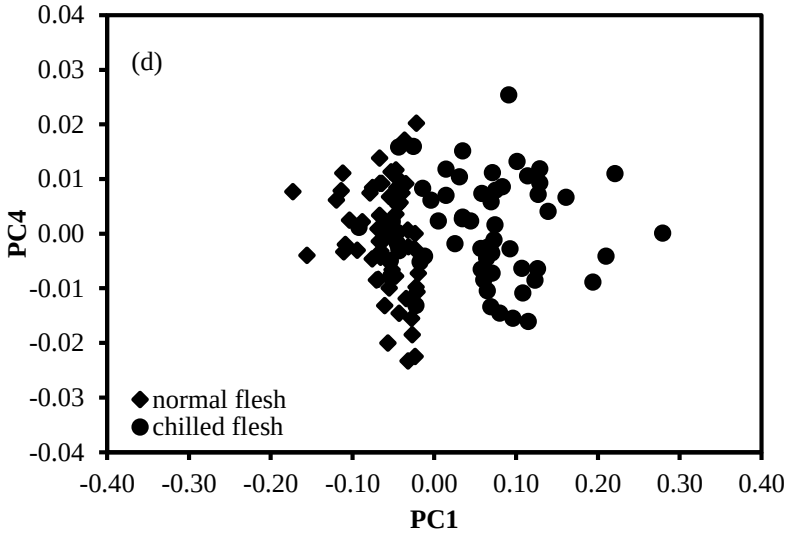
PCA score plot of pineapple fruit spectra : (a) before storage and (b) after storage at 5 ^{0}C for 20 days

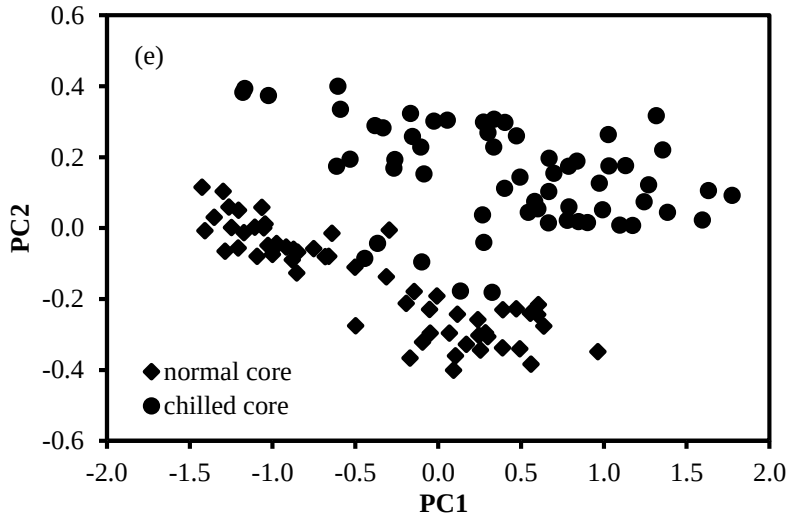




PCA score plots of two types of pineapple fruit spectra , normal and chilled fruits, measured at various parts ,(a) peel, (b) outer flesh,(c) stem, (d) flesh and (e) core after storage at 5 ^{0}C for 20 days







PCA score plots of two types of pineapple fruit spectra , normal and chilled fruits , measured at various parts ,(a) peel, (b) outer flesh,(c) stem, (d) flesh and (e) core after storage at 5 ^{0}C for 20 days

4. การตรวจวัดความชื้นในกาแฟเมล็ด

วิธีการทดลอง

ขั้นตอน
การเตรียมตัวอย่าง

ขั้นตอน
การวัดสเปกตรัม
และการตรวจสอบ
ความชื้น

การสร้างสมการเทียบ
มาตรฐานความชื้น

การเตรียมตัวอย่าง

coarse sample cell

transportation module

pasting cell

transportation module

standard cup

transportation module

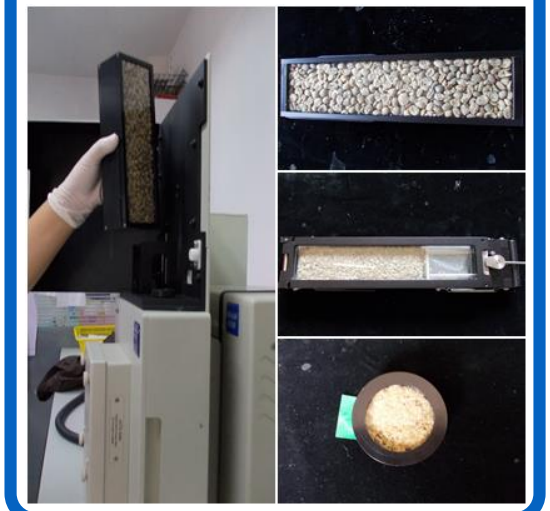
Rotating cup

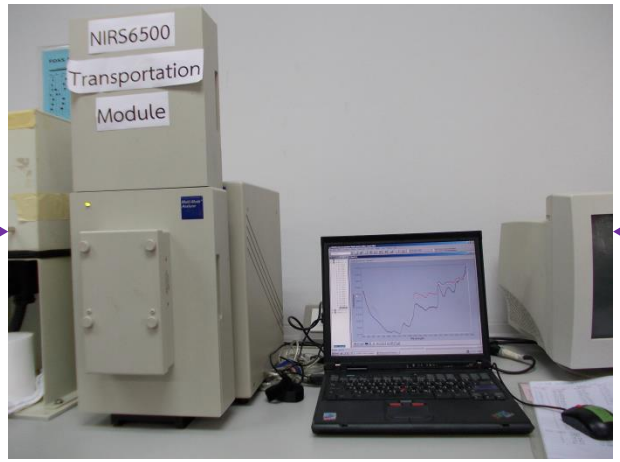
spinning module

การวัดสเปกตรัมและตรวจสอบความชื้น

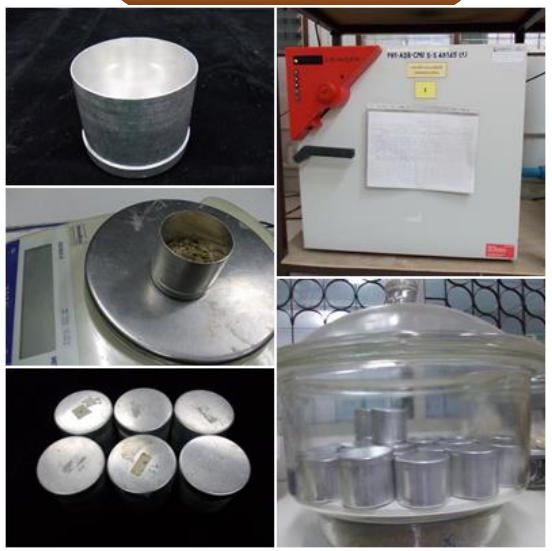
spinning module

transportation module



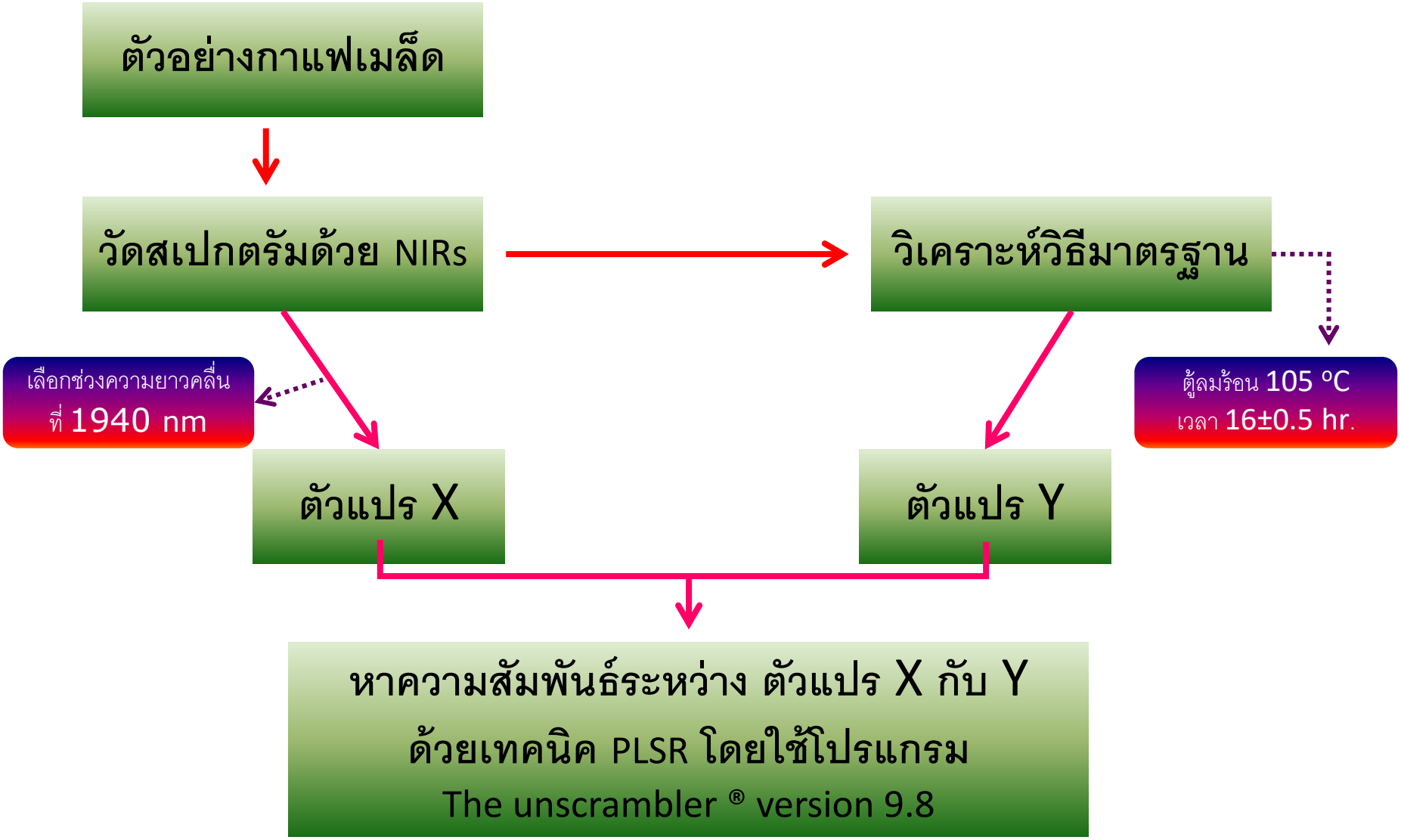


วิธีมาตรฐาน

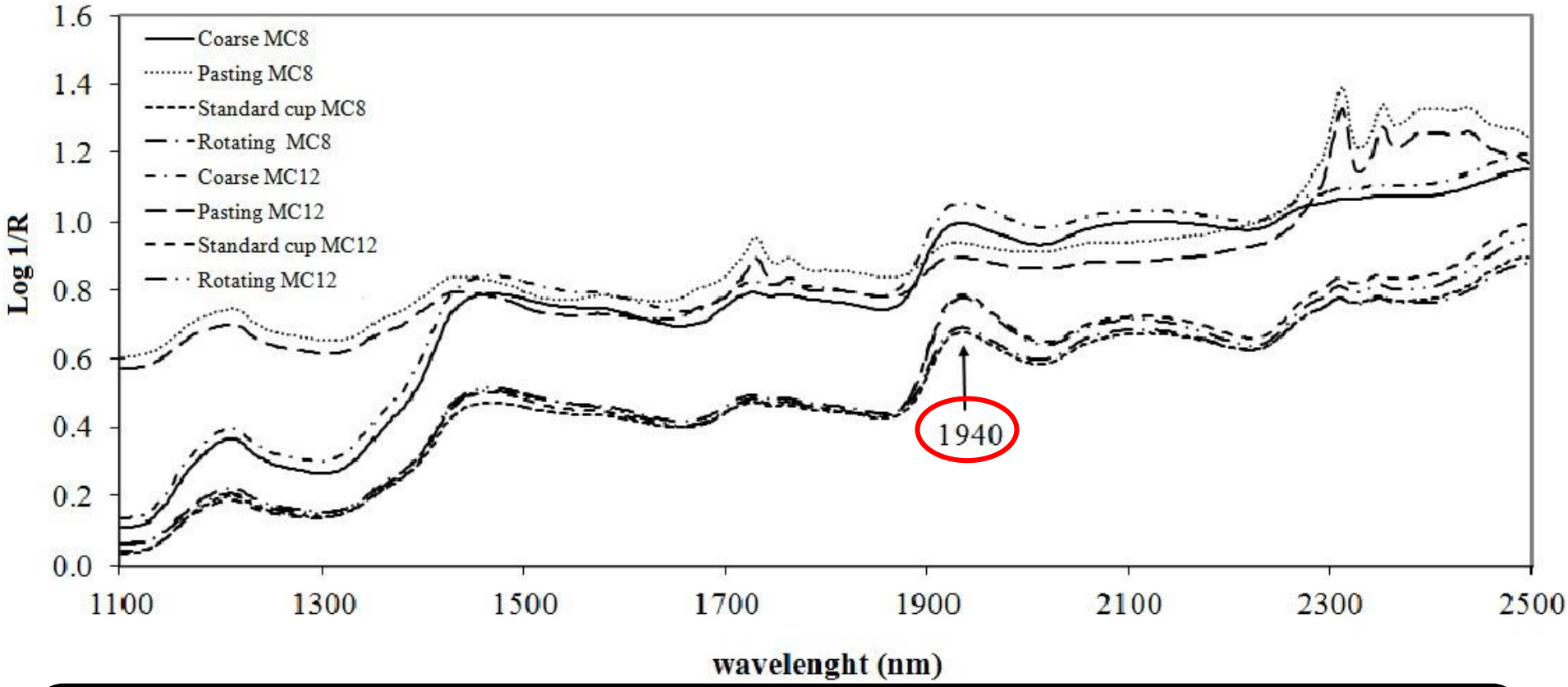


ใช้ตู้อบลมร้อน 105 ^{O}C เป็นเวลา 16±0.5 ชั่วโมง

การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน



ผลการทดลอง



พบพีกฐานกว้างที่เด่นชัดที่ความยาวคลื่น **1940 nm** ซึ่งสอดคล้องกับพันธะ O-H ในโมเลกุล น้ำ

PLSR calibration result for prediction of moisture content of green coffee with 4 types of sample cell

Type of sample cell	Pre-treatment	Wavelength region (nm)	F	R^2	SEC	SEP	RPD	Bias
Coarse sample cell	Log 1/R	1100-2500	3	0.99	0.20	0.21	9.62	0.00
Pasting cell	2^{nd}derivertive	1110-2488	5	0.98	0.20	0.26	8.97	0.00
Standard cup	Log 1/R	1100-2500	3	0.99	0.14	0.15	13.60	0.00
Rotating cup	Log 1/R	1100-2500	3	0.99	0.13	0.15	13.54	0.00

F: number of factors used in the calibration equation, R^2: correlation of determination, SEC: standard error of calibration, SEP: standard error of prediction, Bias: average of difference between actual value and NIR value

coarse sample cell ไม่ทำลายตัวอย่างและไม่ต้องแปลงข้อมูลเปกตรัมก่อนนำไปสร้างสมการ แต่ **pasting cell** ต้องทำลายตัวอย่างและต้องแปลงข้อมูลก่อนนำไปสร้างสมการ ส่วน **standard cup** และ **rotating cup** ไม่ต้องแปลงข้อมูลเปกตรัม แต่ต้องมีการทำลายตัวอย่างเหมือน **pasting cell**

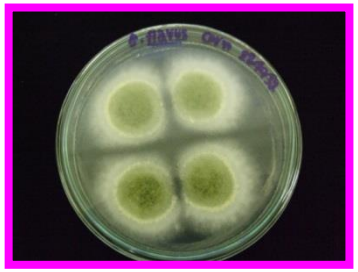
5. การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Aspergillus flavus ในเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

การทดลองที่ 1

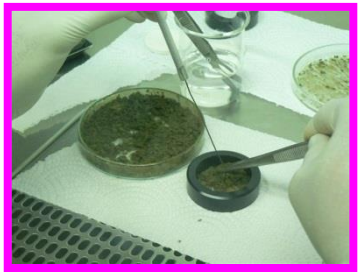
1.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อราด้วยเทคนิคทาง Microbiology

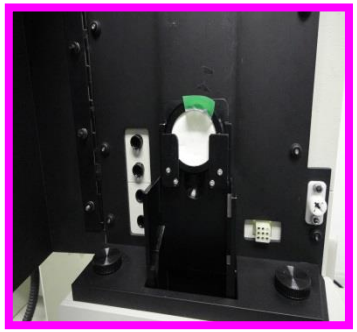
นำเมล็ดข้าวมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเมล็ดข้าวสาร แล้วศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1.2 ศึกษาการตอบสนองของเชื้อราต่อช่วงคลื่น VIS/NIR



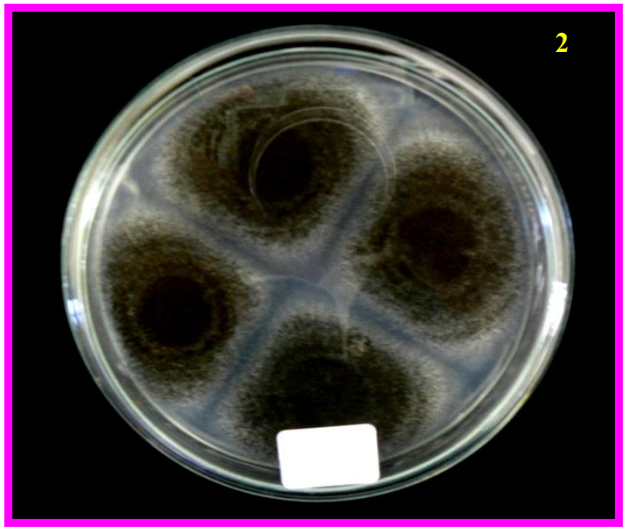
นำส่วนของเส้นใยและสปอร์มาลดความชื้น
ด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



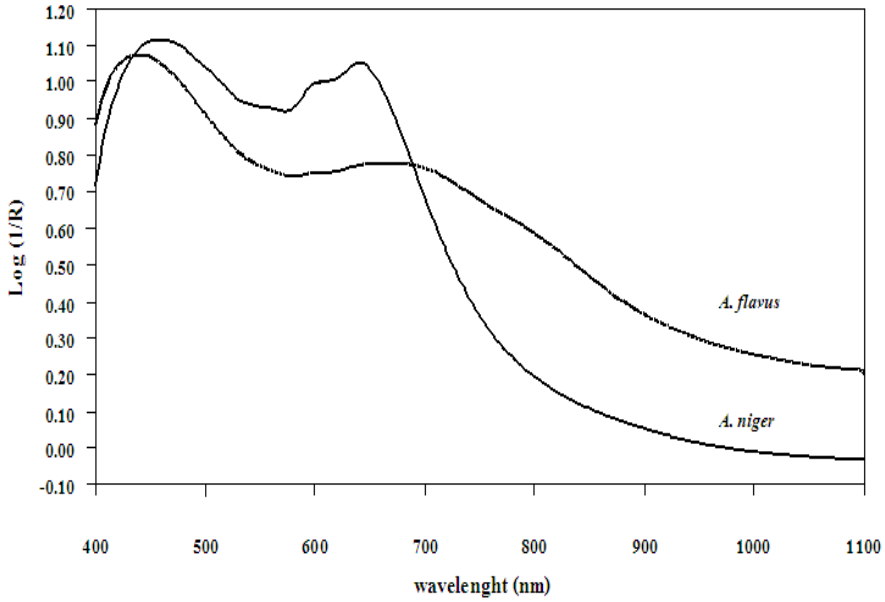


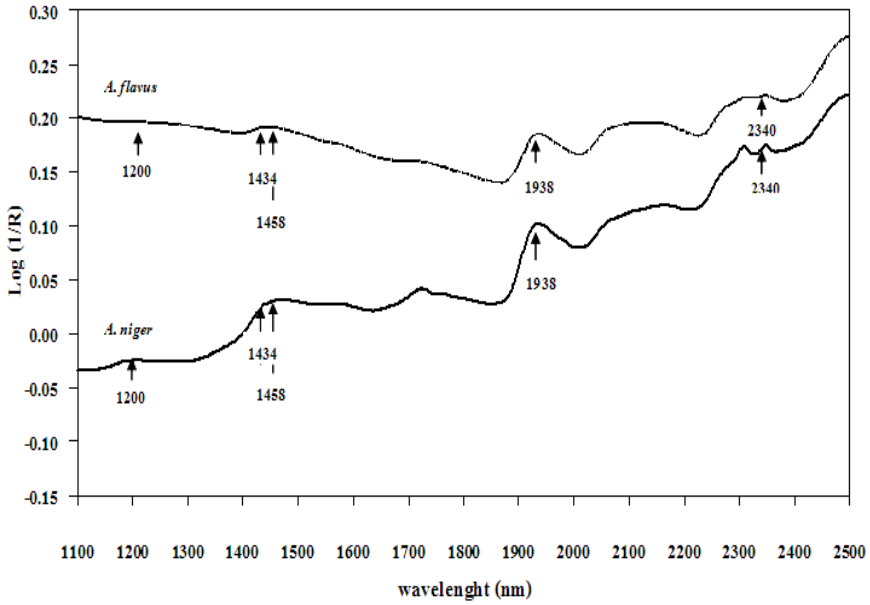
วัดสเปกตรัม ด้วยเครื่อง NIRSystem6500
ความยาวคลื่น 700-2500 nm

ผลการทดลองที่ 1



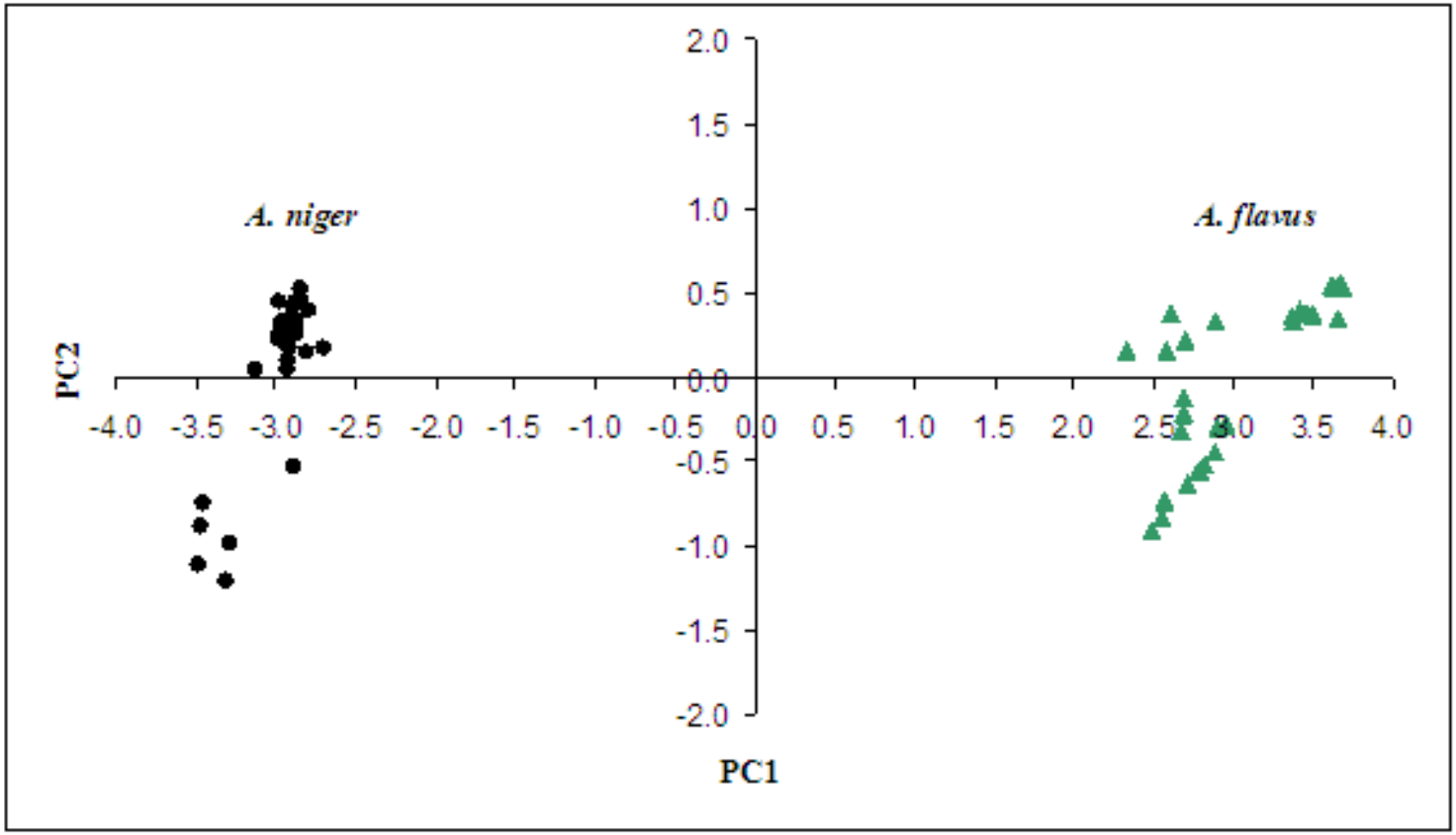
เชื้อรา *Aspergillus flavus* (1) และ *Aspergillus niger* (2)





สเปกตรัมของเชื้อรา *A. flavus* กับเชื้อรา *A. niger* ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-2500 nm

- พีก 1200 nm สัมพันธ์กับพันธะ N-H เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อรา
- พีก 1434 nm สัมพันธ์กับพันธะ O-H ของโมเลกุลของกลูโคส
- พีก 1458 และ 1938 สัมพันธ์กับพันธะ O-H ในโมเลกุลของน้ำ
- พีก 2340 nm เป็นพีกของพันธะ C-N เป็นส่วนประกอบของ เอไมด์ และกลูโคซามีน



ภาพที่ 1.4 Principle component analysis plot (PC1 **และ** PC2) **ของเชื้อรา** *A. flavus* **และ** *A. niger*

การทดลองที่ 2

เมล็ดปกติ (ไม่ได้ปลูกเชื้อรา)

ปลูกเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราให้ทั่วเมล็ด

วางเมล็ดบน PDA บ่มที่ 37°C, 2 วัน (สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อรา)

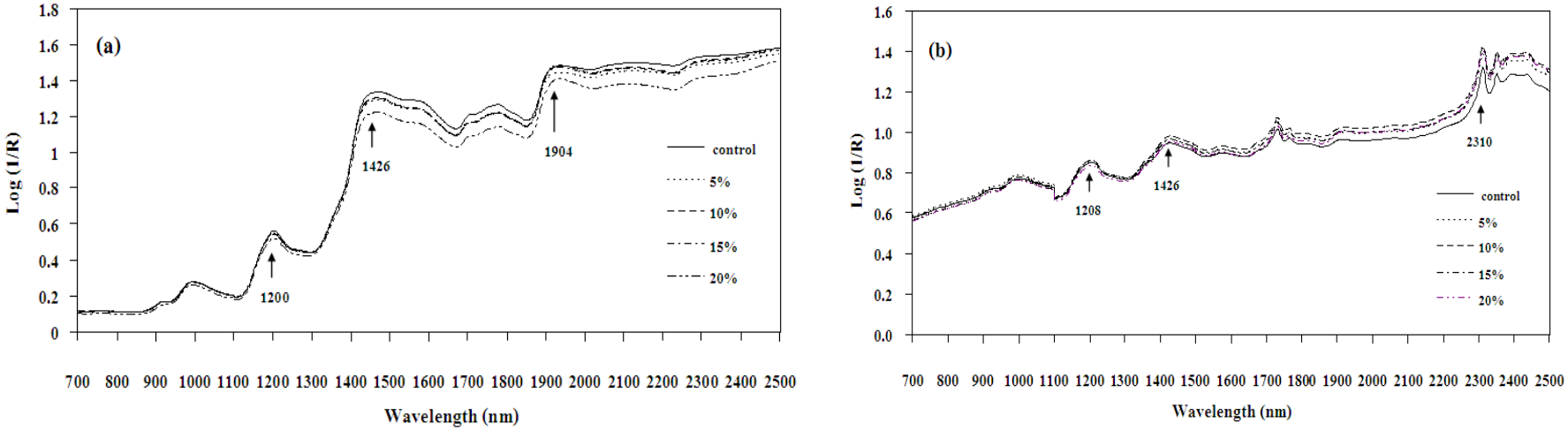
นำเมล็ดที่มีเชื้อราเข้าทำลายมาผสมกับเมล็ดปกติในอัตราส่วน 0, 5, 10, 15 และ 20% w/w

อัตราส่วนละ 30 ตัวอย่าง ๆ ละ 200 กรัม

วัดสเปกตรัม ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ความยาวคลื่น 700-2500 nm

วิเคราะห์ข้อมูลและสร้างสมการเทียบมาตรฐานการผสมของเมล็ดที่มีเชื้อราด้วยโปรแกรม The unscrambler ® version 7.6

ผลการทดลองที่ 2



สเปกตรัมเฉลี่ยดั้งเดิมของเมล็ดข้าวสารปกติและเมล็ดข้าวสารปกติที่ผสมด้วยเมล็ดข้าวสารที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่ระดับ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในช่วงความยาวคลื่น 700-2500 nm เมื่อบรรจุใน coarse sample cell (a) และ pasting cell (b)

ตารางค่าทางสถิติที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานการผสมของเมล็ดข้าวสารปกติที่ผสมด้วยเมล็ดข้าวสารที่มีเชื้อราเข้าทำลายที่ระดับ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเมื่อบรรจุตัวอย่างใน pasting cell

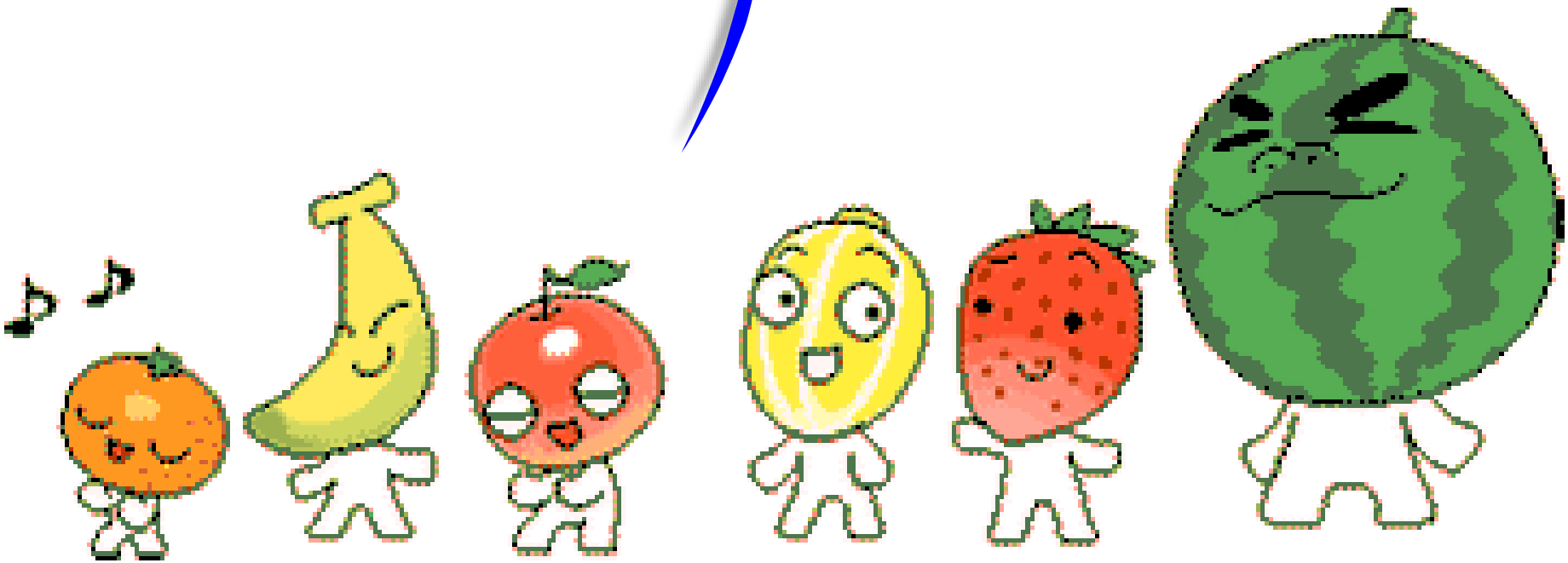
Pre-treatment	Wavelength region (nm)	F	R	SEC (%)	SEP (%)	Bias (%)	RPD
Smoothing 5 + 2nd Derivative 10	1210-2468	7	0.96	1.76	1.94	-0.41	3.67
Smoothing 10 + 2nd Derivative 10	1220-2458	7	0.96	1.83	1.98	-0.29	3.60
Smoothing 10 + 2nd Derivative 5	**1130-2468**	**7**	**0.97**	**1.60**	**1.82**	**-0.28**	**3.91**

F: number of factor used in the calibration equation, R: multiple correlation coefficient, SEC: standard error of calibration,

SEP: standard error of validation, Bias: average of different between actual value and NIR value

ขอขอบคุณ

- ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ

- ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขอบคุณค่ะ