

## การประยุกต์ใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้สำหรับทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวาน

### Application of near infrared spectroscopy (NIRs) to predict carotenoid contents in sweet corn germplasm

ชลธิชา จินขำ<sup>1</sup>, จีรายุทธ หงษ์เวียงจันทร์<sup>2</sup> และ พรชัย หาระโคตร<sup>1\*</sup>

Chonticha Jeankham<sup>1</sup>, Jeerayut Hongwiangjan<sup>2</sup> and Bhornchai Harakotr<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

<sup>1</sup> Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani, 12120

<sup>2</sup> สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

<sup>2</sup> Department of Agricultural Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

**บทคัดย่อ:** การใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared spectroscopy; NIRs) เพื่อประเมินปริมาณแคโรทีนอยด์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสามารถช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานเพื่อเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ประสบความสำเร็จ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณลูทีน ซีแซนทีน เบตา-คริปโตแซนทีน เบตา-แคโรทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ร่วมกับวิธีทางสถิติแบบ partial least squares (PLS) regression และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการสร้างและทดสอบความแม่นยำของสมการ ผลจากการศึกษาพบว่า เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้สามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างและทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของสมการที่ใช้ทำนาย ( $R^2$  เท่ากับ 0.60-0.84) รวมทั้งมีค่า ratio of standard error of prediction to standard deviation (2.14-2.53) สูง ในขณะที่ค่า standard error of calibration, standard error of prediction และ bias ต่ำ นอกจากนี้ ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ประเมินได้จาก NIRs ไม่มีความแตกต่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการมาตรฐาน ดังนั้น เทคนิค NIRs สามารถนำมาใช้เพื่อประเมินปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรมสำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานได้เป็นอย่างดี

**คำสำคัญ:** แคโรทีนอยด์; เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้; การปรับปรุงพันธุ์; *Zea mays* L. var. *saccharata*

**ABSTRACT:** Adopting a fast and efficient near infrared spectroscopy (NIRs) for assessing carotenoid content in sweet corn germplasm would benefit to the breeding program. This study aimed to evaluate lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -carotene, and total carotenoid content in sweet corn germplasm by using the NIR technique coupled with multivariate analysis of partial least squares (PLS) regression and high performance liquid chromatography for constructing and validating the calibration models. The result indicated that NIRs can be used for screening and predicting carotenoid content in corn germplasm. There were high coefficients of determination ( $R^2 = 0.60-0.84$ ) and a high ratio of standard error of prediction to standard deviation (2.14-2.53). While, the values for standard error of calibration, standard error of prediction, and bias were low. Furthermore, the carotenoid contents predicted by the developed calibration models were not significantly different from the reference values.

\* Corresponding author: [harakotr@tu.ac.th](mailto:harakotr@tu.ac.th)

Therefore, NIRs could be an alternative tool for evaluating carotenoid content in sweet corn germplasm for breeding programs.

**Keywords:** carotenoids; near infrared spectroscopy; crop improvement; *Zea may* L. var. *saccharata*

## บทนำ

ข้าวโพดหวาน (*Zea may* L. var. *saccharata*) เป็นข้าวโพดรับประทานฝักสดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยประเทศไทยมีการส่งออกข้าวโพดหวานและผลิตภัณฑ์เป็นอันดับหนึ่งของโลก และมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2562) ข้าวโพดหวานเป็นธัญพืชที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร รวมถึงมีสารพฤกษเคมีสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดง ส้ม และเหลือง ที่มีบทบาทต่อผู้บริโภคหลายประการ เช่น ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและอุดตัน (Dwyer et al., 2001) และโรคมะเร็งบางชนิด (Cooper, 2004; Krinsky and Johnson, 2005; Niranjana et al., 2015) อย่างไรก็ตาม แคโรทีนอยด์เป็นสารที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ จึงจำเป็นต้องได้รับจากการรับประทานเท่านั้น ซึ่งลูทีนและซีแซนทีนเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหลักในข้าวโพด (Scott and Eldridge, 2005; Parada and Aguilera, 2007; O'Hare et al., 2014) ที่มีบทบาทปกป้องจอประสาทตาจากแสงสีฟ้าที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อดวงตา และลดความเสี่ยงของโรคที่ทำให้เกิดความเสื่อมของดวงตา (Barker et al., 2011; Eggersdorfer and Wyss, 2018) ดังนั้น การพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน (biofortification) จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่จะช่วยเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภค

การค้นหาแหล่งพันธุกรรม (germplasm) ที่มีความหลากหลาย (diversity) มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variability) รวมทั้งมีลักษณะที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการ ลักษณะเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญของความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืช (กมล, 2536) ดังนั้น ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานเพื่อเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงต้องค้นหาแหล่งพันธุกรรมข้าวโพดที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูง ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเมล็ดข้าวโพด สามารถทำได้โดยใช้วิธีทางเคมีโดยวิธีมาตรฐาน เช่น เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และ spectrophotometry ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเมล็ดข้าวโพดได้อย่างแม่นยำ อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ ใช้เวลานานและมีขั้นตอนที่ต้องอาศัยความชำนาญ เนื่องจาก จำเป็นต้องทำการสกัดตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์ นอกจากนี้ ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชมีตัวอย่างที่ต้องนำมาใช้วิเคราะห์จำนวนมาก และบางสายพันธุ์อาจมีปริมาณตัวอย่างที่จำกัด ส่งผลให้วิธีที่กล่าวมาข้างต้นจึงต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นานหรือตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ไม่เพียงพอ สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared spectroscopy; NIRs) เป็นเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพแบบไม่ทำลายที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้จริงในการประเมินคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร โดยประเมินค่าทางเคมีได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ มีความแม่นยำ ประหยัดเวลา และช่วยลดต้นทุนในการใช้สารเคมีในระยะยาวได้ (รณฤทธิ์, 2560; Agelet and Hurburgh, 2014; Yang et al., 2020) จากการศึกษาของ Berardo et al. (2004) ที่ใช้เทคนิค NIRs ร่วมกับวิธี modified partial least squares (MPLS) และเทคนิค HPLC เพื่อวิเคราะห์ปริมาณลูทีนและซีแซนทีนในเมล็ดข้าวโพด และหาความสัมพันธ์ระหว่างเทคนิคดังกล่าว พบว่า ทั้งสองเทคนิคมีความสัมพันธ์กันทางบวกและมีค่าสูง ( $R^2$  เท่ากับ 0.82 และ 0.94 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ เชื้อพันธุกรรมที่ต่างกัน รวมทั้งความแตกต่างของห้องปฏิบัติการล้วนส่งผลต่อการสร้างและพัฒนาสมการสำหรับการทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งสิ้น (Agelet and Hurburgh, 2014; Kahrman et al., 2019) ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ร่วมกับวิธีทางสถิติแบบ partial least squares (PLS) regression และวิธีมาตรฐาน สำหรับการสร้างและทดสอบความแม่นยำของสมการ เพื่อจะใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สำหรับการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดหวานที่มีคุณค่าทางอาหารสูงต่อไป

## วิธีการศึกษา

### เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดที่นำมาใช้ในการทดลอง

คัดเลือกเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานจากทั้งในและต่างประเทศ ได้แก่ เชื้อพันธุกรรมจากศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 30 สายพันธุ์ ทำการปลูกในฤดูร้อน (กุมภาพันธ์-เมษายน) และฤดูฝน (มิถุนายน-สิงหาคม) ปี พ.ศ. 2562 ได้ตัวอย่าง 60 ตัวอย่าง และเชื้อพันธุกรรมจากโครงการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดหวานพิเศษเพื่อเพิ่มคุณภาพและคุณค่าเชิงอาหารสุขภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 25 สายพันธุ์ ทำการปลูกในฤดูฝน (พฤษภาคม-กรกฎาคม) ปี พ.ศ. 2563 ได้ตัวอย่าง 25 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาทั้งหมด 85 ตัวอย่าง โดยเชื้อพันธุกรรมทั้งหมดผ่านการปลูกประเมิน ณ แปลงทดลอง สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ควบคุมการผสมเกสรภายในสายพันธุ์ด้วยวิธี half sib เก็บข้าวโพดในระยะฝักแห้งที่อายุ 35 วันหลังผสมเกสร แล้วนำมาผึ่งบริเวณที่มีอากาศถ่ายเทนาน 7 วัน จากนั้น นำข้าวโพดไปอบที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างคงที่ หลังจากนั้น บดตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจนละเอียด และร่อนโดยใช้ตะแกรงขนาด 50 mesh สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

### การวัดสเปกตรัมของเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวาน

นำตัวอย่างข้าวโพดที่ผ่านการบดจำนวน 5 กรัม มาใส่ภาชนะที่ใช้บรรจุตัวอย่างเส้นผ่านศูนย์กลาง 43 มิลลิเมตร สูง 55 มิลลิเมตร ภาชนะทำจากควอตซ์ มาวัดสเปกตรัมโดยใช้เครื่อง NIR spectrophotometer (MPA, Bruker) ใช้ระบบการวัดแบบสะท้อนแสง (diffuse reflectance) ความยาวช่วงคลื่น 800 - 2,500 นาโนเมตร สแกนตัวอย่างละ 32 จุด (นิมิตรา, 2559) จากนั้น นำค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

### การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ของเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวาน

นำตัวอย่างที่ผ่านการวัดสเปกตรัมมาวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ตามวิธีการของ Gupta et al. (2015) โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 1 กรัม ทำทั้งหมด 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมเอทานอลความเข้มข้น 99% ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แล้วเติมบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน 1-2 เกล็ด หลังจากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำไปเขย่าให้เข้ากัน และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำหลอดทดลองไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์/ไดเอทิลอีเทอร์ (2:1, v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้รอจนสารละลายแยกชั้น เก็บสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายชั้นบนไม่มีสี ปิดปากหลอดทดลองด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำปิโตรเลียมอีเทอร์/ไดเอทิลอีเทอร์ (2:1, v/v) เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งสารละลายใส่ขวดแก้วสีชา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เหลือในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และนำสารละลายในขวดแก้วสีชาไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นทำการชะของแข็งที่ได้ด้วยเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์/เมทานอล (3:1, v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองตัวอย่างด้วย syringe filter (0.45 ไมครอน) ก่อนการวิเคราะห์

### การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

นำสารละลายแคโรทีนอยด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากขั้นตอนการสกัดแคโรทีนอยด์ มาวัดปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Benchtop, MB-800) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์รวม จากสมการ

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม} = \frac{A \times V \times 10^4}{2500 \times P}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

V = ปริมาณสารละลายแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)

P = ปริมาณตัวอย่างที่นำมาสกัด (กรัม)

### การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ลูทีน ซีแซนทีน เบตา-คริปโตแซนทีน และเบตา-แคโรทีนด้วยเทคนิค HPLC โดยการฉีดสารละลายที่สกัดได้ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ C30 YMC (4.6 x 250 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน) (Waters, USA) เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล (สารละลาย A) เมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเธอร์ (สารละลาย B) และน้ำกำจัดอ็อกซิเจน (สารละลาย C) เริ่มนาที่ที่ 0 ใช้สารละลาย A:C (80:20, %v/v) เปลี่ยนความเข้มข้นในนาที่ที่ 2.00 เป็นสารละลาย A:C (60:40, %v/v) ใช้อัตราการไหล 1.40 มิลลิตร/วินาที เมื่อนาที่ที่ 2.01 เปลี่ยนอัตราการไหลเป็น 1.00 มิลลิตร/วินาที และเปลี่ยนความเข้มข้นเป็นสารละลาย B:C (60:40, % v/v) จนถึงนาที่ที่ 12.00 จึงเปลี่ยนความเข้มข้นเป็นสารละลาย B (100%) และนาที่ที่ 13.00 เปลี่ยนความเข้มข้นเป็นความเข้มข้นแรก สารละลาย A:C (60:40, % v/v) จนถึงนาที่ที่ 20 โดยใช้ photodiode array detector (PAD) เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดกับพื้นที่ของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

รายงานผลปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (microgram per gram of dry weight; µg/g dry weight)

### การสร้างและการตรวจสอบความถูกต้องของสมการทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวาน

คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (NIR spectra) และปริมาณแคโรทีนอยด์ในเมล็ดข้าวโพดด้วยวิธี partial least squares (PLS) regression โดยใช้โปรแกรม OPUS version 7.0.129 ตลอดการทดลอง โดยแบ่งเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ กลุ่มที่ใช้สร้างสมการเทียบมาตรฐาน (calibration set) จำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (validation set) จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO 12099 (รณฤทธิ์, 2560) โดยพิจารณาประสิทธิภาพสมการจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination,  $R^2$ ) มีค่าเข้าใกล้ 1 ค่า ratio of standard error of prediction to standard deviation (RPD) สูง ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายตัวอย่าง กลุ่มการสร้างสมการ (standard error of calibration, SEC) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของสมการ (standard error of prediction, SEP) และค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายได้จากสมการกับค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ได้จริง (bias) มีค่าต่ำ (Shao and He, 2007) นอกจากนี้ นำข้อมูลค่าจริงและค่าทำนายของสมการที่ดีที่สุดมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี Paired - samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS (IBM, USA)

### ผลการศึกษาและวิจารณ์

#### ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวาน

การเตรียมตัวอย่างชุดที่ใช้สร้างสมการ (calibration set) เพื่อการทำนายจำเป็นต้องมีพิสัย (range) ของลักษณะที่ทำการศึกษาที่ครอบคลุมตัวอย่างในชุดที่ใช้ทดสอบความแม่นยำของสมการ (validation set) นอกจากนี้ ชุดที่ใช้สร้างสมการควรมีจำนวนตัวอย่างมากกว่าเพื่อให้สมการที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำมากที่สุด (รณฤทธิ์, 2560) การศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างผลการวิเคราะห์ทางเคมีของเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดทั้งหมด (n=85) ออกเป็นกลุ่มที่ใช้ในการสร้างสมการ (n=65) และตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (n=20) พบว่า ปริมาณลูทีนในตัวอย่างชุดที่ใช้สร้างสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 0.06-14.15 µg/g dry weight ในขณะที่ชุดตรวจสอบความถูกต้องของสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 0.31-6.01 µg/g dry weight ปริมาณซีแซนทีนในตัวอย่างชุดที่ใช้ในการสร้างสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 1.37-16.38 µg/g dry weight และตัวอย่างชุดที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 3.31-13.10 µg/g dry weight ปริมาณเบตา-คริปโตแซนทีนในตัวอย่างชุดที่ใช้สร้างสมการมีค่าตั้งแต่ 0.63-2.63 µg/g dry weight และชุดตรวจสอบความถูกต้องของสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 0.70-3.37µg/g dry weight ปริมาณเบตา-แคโรทีนในตัวอย่างชุดที่ใช้สร้างสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 0.63-2.63 µg/g dry weight ในขณะที่ชุดตรวจสอบความถูกต้องของสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 0.76-1.53 µg/g dry weight และปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของชุดที่ใช้สร้างสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 1.82-54.51 µg/g dry weight และชุดตรวจสอบความถูกต้องของสมการมีค่าอยู่ระหว่าง 5.23-40.81 µg/g dry weight (Table 1)

**Table 1** Carotenoid distribution of sweet corn germplasm used in calibration and validation sets

Carotenoids <sup>1/</sup>	Calibration set (n = 65)				Validation set (n = 20)			
	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD
Lutein	0.06	14.15	3.77	2.50	0.31	6.01	3.80	1.57
Zeaxanthin	1.37	16.38	7.04	3.15	3.31	13.10	6.10	2.67
β-cryptoxanthin	0.63	6.13	1.70	0.98	0.70	3.37	1.72	0.93
β-carotene	0.63	2.63	1.07	0.40	0.76	1.53	1.10	0.26
Total carotenoid content	1.82	54.51	20.09	9.82	5.23	40.81	20.92	9.89

<sup>1/</sup> Values are expressed in µg/g dry weight

### การปรับแต่งสเปกตรัม

เมื่อความยาวคลื่นสูงขึ้นสเปกตรัมมีการเลื่อนขึ้นในแนวแกน Y เรียกว่า เบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น (linear baseline shift) ซึ่งเกิดจากความขึ้นในตัวอย่างข้าวโพด (Figure 1a) โดยพีคของความขึ้นปรากฏที่ 1,450 และ 1,940 นาโนเมตร และมีความสัมพันธ์กับพันธะ O-H ในโมเลกุลของน้ำของตัวอย่าง (Rambla et al., 1997; Yang et al., 2020) ซึ่งพีคดังกล่าวใกล้เคียงกับพีคของลูทีนและซีแซนทีน ส่งผลให้เกิดการบดบัง นอกจากนี้ พีคยังเกิดการทับซ้อนกันทำให้แยกพีคได้ยาก โดยปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสเปกตรัม ได้แก่ ปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง ปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเครื่องมือ เช่น การกระเจิงของแสง การวางตัวอย่าง ตำแหน่งของการสแกน รูปร่างและขนาดของตัวอย่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น (กรุณรัตน์ และคณะ, 2559; ธารรัตน์ และคณะ, 2560) ดังนั้น จึงต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้น (spectral preprocessing) ก่อนการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน เช่น การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง (Savitzky-Golay second derivative; 2<sup>nd</sup> derivative) การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scattering correction; MSC) วิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (standard normal variate; SNV) การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณร่วมกับการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองวิธี และการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานร่วมกับการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะช่วยลดปัจจัยต่าง ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องให้มีค่าน้อยลง และลดข้อมูลรบกวน (noises) ที่มีผลกระทบต่อการศึกษาสเปกตรัมอินฟราเรดย่านใกล้หรือข้อมูลที่มีลักษณะเป็นสเปกตรัมทั่วไป และเพื่อให้องค์ประกอบทางเคมีที่สนใจมีความเด่นชัดขึ้น (อารีรัตน์ และคณะ, 2555; กรุณรัตน์ และคณะ, 2559; Yang et al., 2020) โดยทั่วไปนิยมเลือกใช้การปรับสเปกตรัมด้วยวิธีการกระเจิงแบบผลคูณร่วมกับวิธีอนุพันธ์อันดับสอง (สกุณรัตน์ และคณะ, 2559; Brenna and Berardo, 2004)

### การสร้างสมการทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวโพดด้วยวิธี partial least squares (PLS) regression

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์และปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวโพดหวานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มาสร้างความสัมพันธ์ partial least squares (PLS) regression ซึ่งสมการที่สร้างขึ้นจากสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 800-2,500 นาโนเมตร และปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC พบว่า ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 940 – 1,100 นาโนเมตร เกิดโอเวอร์โทนอันดับ 2 และ 3 โดยมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงของพันธะ C-H นอกจากนี้ เกิดการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับ 1 ของพันธะ C-H และ O-H และคอมบิเนชันของ C-H ที่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 1,300 – 1,600 นาโนเมตร และเกิดการสั่นแบบคอมบิเนชันของ C-H และ O-H ที่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 1,720 – 2,480 นาโนเมตร (Figure 1b) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปรับแต่งสมการด้วยวิธีการดังกล่าว มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ชนิดเบตา-แคโรทีน เนื่องจาก พีคของเบตา-แคโรทีนในช่วง 950-1,300 นาโนเมตร เกิดเป็นโอเวอร์โทนอันดับ 3 ซึ่งมีความสูงของพีคต่ำมาก (ศุมาพร และคณะ, 2552; Tilahun et al., 2018) นอกจากนี้ เมื่อทำการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธีอนุพันธ์อันดับ

สอง ส่งผลให้สเปกตรัมมีความเรียบมากขึ้น (Figure 1c) อย่างไรก็ตาม การปรับแต่งด้วยวิธีดังกล่าวทำให้พีคของเบตา-แคโรทีนหายไป ดังนั้น การปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้วิธี MSC เพียงอย่างเดียวจึงเพียงพอต่อการสร้างสมการสำหรับการทำนายปริมาณเบตา-แคโรทีนในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด โดยสมการที่สร้างขึ้นมีการจัดกลุ่มตัวแปรเดิมเป็นตัวแปรใหม่ได้ 6 แพกเตอร์ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) และค่า RPD ค่อนข้างสูง (0.70 และ 2.60 ตามลำดับ) ในขณะที่ค่า SEC SEP และ bias ต่ำ (0.22, 0.10 และ 0.07  $\mu\text{g/g}$  dry weight ตามลำดับ) (Table 2)

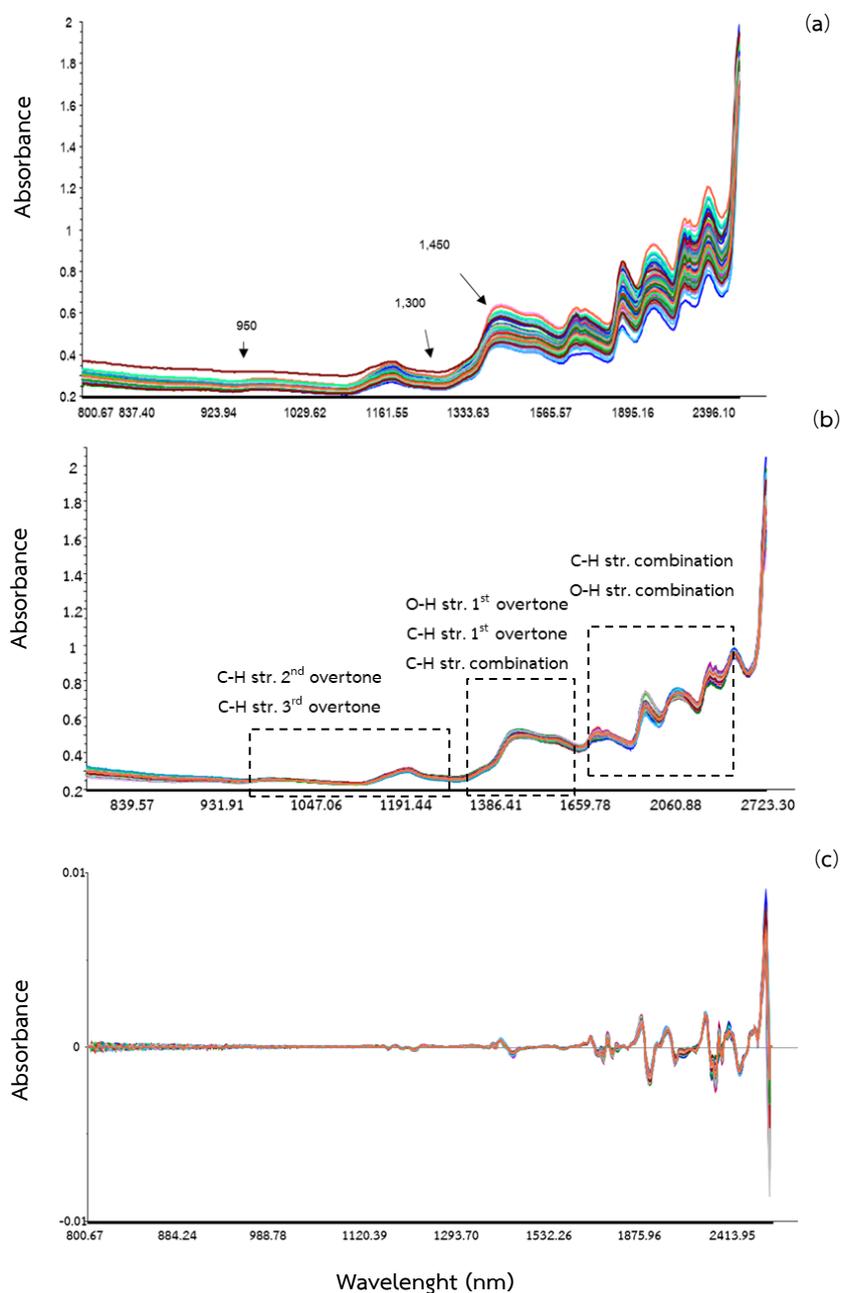


Figure 1 Original near infrared spectra (a), preprocessed spectra using MSC (b), and MSC with 2<sup>nd</sup> derivative spectra (c) of sweet corn germplasm used in the calibration set.

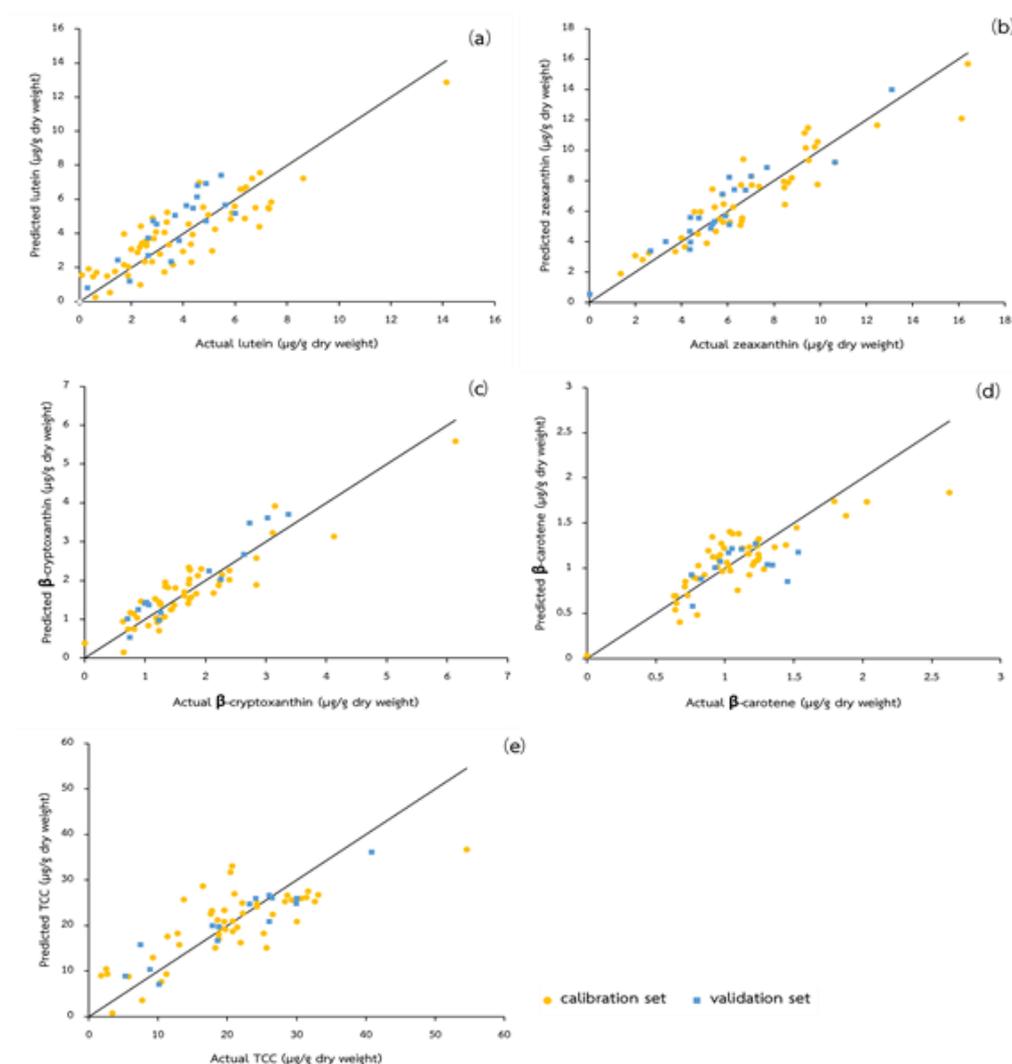
การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับอนุพันธ์อันดับสอง (Figure 1c) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ชนิดลูทีน ซีแซนทีน เบตา-คริปโตแซนทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในเมล็ดข้าวโพด เนื่องจาก สมการที่ใช้ทำนายปริมาณลูทีน มีจำนวนแพกเตอร์ เท่ากับ 6 ค่า  $R^2$  และ RPD เท่ากับ 0.79 และ 2.53 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า SEC SEP และ bias ต่ำ (1.14, 0.62 และ 0.75  $\mu\text{g/g}$  dry weight ตามลำดับ) สำหรับสมการที่ใช้ทำนายปริมาณซีแซนทีนมีจำนวนแพกเตอร์ เท่ากับ 6 เช่นเดียวกัน โดยมีค่า  $R^2$  และ RPD เท่ากับ 0.84 และ 3.56 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า SEC SEP และ bias ต่ำ (2.78, 0.75 และ 2.78  $\mu\text{g/g}$  dry weight ตามลำดับ) สมการที่ใช้ทำนายปริมาณเบตา-คริปโตแซนทีนมีจำนวนแพกเตอร์ เท่ากับ 5 โดยมีค่า  $R^2$  และ RPD เท่ากับ 0.84 และ 3.44 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า SEC SEP และ bias ต่ำ (0.39, 0.27 และ 0.52  $\mu\text{g/g}$  dry weight ตามลำดับ) และสมการที่ใช้ทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีจำนวนแพกเตอร์ เท่ากับ 2 โดยมีค่า  $R^2$  และ RPD เท่ากับ 0.60 และ 2.14 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า SEC SEP และ bias ต่ำ (6.29, 4.62 และ 4.32  $\mu\text{g/g}$  dry weight ตามลำดับ) (Table 2) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ พบว่า ค่าดังกล่าวของปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำที่สุด และสามารถนำไปใช้ประกอบการประเมินแบบหยาบเท่านั้น ( $R^2$  ระหว่าง 0.50 ถึง 0.65) (Williams, 2004) ด้วยเหตุที่จำนวนแพกเตอร์ที่น้อยไปจะทำให้เกิด under-fitting ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างมีความคลาดเคลื่อนในการทำนายสูง ดังนั้น หากต้องการเพิ่มค่า  $R^2$  ควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการเบื้องต้นจะทำให้ได้ค่าปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ครอบคลุมตัวอย่างมากขึ้น และส่งผลให้สมการสามารถทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ สมการสำหรับการทำนายปริมาณเบตา-แคโรทีน และลูทีน ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่สามารถจำแนกลักษณะอย่างหยาบและใช้ประเมินเบื้องต้นได้ ( $R^2$  ระหว่าง 0.66 ถึง 0.81) (Williams, 2004) จึงเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานที่มีตัวอย่างจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง งานปรับปรุงพันธุ์พืชที่ต้องทำการคัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมจำนวนมาก และต้องการความรวดเร็ว ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของซีแซนทีน และเบตา-คริปโตแซนทีน มีค่าสูงและอยู่ในระดับสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่ต้องการความแม่นยำสูงได้ รวมทั้งค่า RPD อยู่ในระดับที่สามารถนำสมการมาใช้ในการแบ่งกลุ่มได้ แสดงให้เห็นว่าสมการที่พัฒนาจากเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้เหมาะสำหรับการทำนายปริมาณซีแซนทีน และเบตา-คริปโตแซนทีน ถึงแม้ว่าค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการศึกษาครั้งนี้ จะให้ผลการทำนายที่ด้อยกว่าการศึกษาที่ผ่านมา (Brenna and Berardo, 2004; Berardo et al., 2004; Kahrman et al., 2019) ซึ่งความแตกต่างอาจมีสาเหตุมาจากศักยภาพของเครื่องมือและวิธีการทางสถิติที่เลือกใช้ (Kahrman et al., 2019)

เมื่อพิจารณาแผนภาพการกระจาย (scatter plots) ในกลุ่มสร้างสมการและตรวจสอบสมการ พบว่า ปริมาณแคโรทีนอยด์ประเมินด้วยสมการจากเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ มีการกระจายตัวใกล้เคียงกับเส้น target line ในทุกลักษณะที่ทำการศึกษา (Figure 2) ซึ่งหมายถึง มีค่าความชันใกล้เคียง 1 กล่าวคือ ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ทำนายได้จากเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค HPLC เมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างด้วยวิธี paired samples t-test พบว่า ค่าจริงกับค่าที่ทำนายได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้น สมการที่พัฒนาจากเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้สามารถใช้ทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวโพดได้

**Table 2** Statistics of equation for lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -carotene, and total carotenoid content in calibration and validation sample sets were pretreated with MSC and 2<sup>nd</sup> derivative

Carotenoids	PC	calibration set (n = 65)		validation set (n = 20)		
		$R^2$	SEC	SEP	Bias	RPD
Lutein	6	0.79	1.14	0.62	0.75	2.53
Zeaxanthin	6	0.84	1.27	0.75	2.78	3.56
$\beta$ -cryptoxanthin	5	0.84	0.39	0.27	0.52	3.44
$\beta$ -carotene	6	0.70	0.22	0.10	0.07	2.60
Total carotenoid content	2	0.60	6.29	2.14	4.32	2.14

$R^2$  = coefficient of determination; SEC = standard error of calibration; SEP = standard error of prediction; RPD = ratio of standard error of prediction to standard deviation



**Figure 2** Scatter plots of calibration and prediction results of lutein (a), zeaxanthin (b),  $\beta$ -cryptoxanthin (c),  $\beta$ -carotene (d), and total carotenoid content (e) in sweet corn germplasm (TCC = total carotenoid content)

## สรุป

สมการที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีย่านใกล้ ร่วมกับวิธีทางสถิติแบบ PLS และการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน สามารถใช้ทำนายปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ อย่างไรก็ดี ต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นก่อนการสร้างสมการมาตรฐาน โดยการปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้วิธี MSC ทำให้สมการสำหรับการทำนายปริมาณเบตา-แคโรทีน มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจและค่า RPD สูง (0.70 และ 2.60 ตามลำดับ) ในขณะที่ การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับอนุพันธ์อันดับสอง ทำให้สมการทำนายปริมาณลูทีน ซีแซนทีน เบตา-คริปโตแซนทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจสูง (0.60-0.84) รวมทั้งเมื่อพิจารณาพร้อมกับค่า RPD พบว่ามีค่าสูงตั้งแต่ 2.14-3.56 นอกจากนี้ การปรับแต่งด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้ค่า SEC SEP และ bias ต่ำ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีย่านใกล้สามารถนำมาใช้การประกอบการประเมินปริมาณแคโรทีนอยด์ในเชื้อพันธุกรรม สำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารได้เป็นอย่างดี

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2563 (สัญญาทุนเลขที่ บช.สวก.1/2563) และทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2561 (ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ ทบ 24/2561)

## เอกสารอ้างอิง

- กมล เลิศรัตน์. 2536. การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้าม. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- กรณรัตน์ สกุลนามรัตน์, ปิยะมาศ จานนอก, สุกลักษณ์ คุณเลิศ, สุวนันท์ มิฆเนตร, ดารารัตน์ วงษ์มุข, ศิริลักษณ์ สุดเวียง และกิตติพันธุ์ คำศรี. สมการทำนายความหวานของลูกพลับด้วยเทคนิค NIR spectroscopy. น. 250-256. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 8 22-23 ธันวาคม 2559. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสุรินทร์, สุรินทร์.
- ธารารัตน์ มณีน่วม, วันชัย จันทร์ประเสริฐ, รณฤทธิ์ ฤทธิธรม, อัญชลี ประเสริฐศักดิ์, และสุนันทา วงศ์ปิยชน. 2560. การสร้างสมการเพื่อประเมินสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. น. 168-176. ใน: สัมมนาวิชาการข้าว กลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง ประจำปี 2560 28-30 มีนาคม 2560. โรงแรม ดิ อิมเพรส น่าน, จังหวัดน่าน.
- นิมิตตรา ไชยรัตน์โชติ. 2559. การใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้และเทคนิคการถ่ายภาพเชิงสเปกตรัมในการติดตามคุณภาพภายในและปริมาณเบต้าแคโรทีนในมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม.
- รณฤทธิ์ ฤทธิธรม. 2560. การสร้างระบบ NIR สำหรับการวิเคราะห์ประจำวัน. ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.
- สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. 2562. รายละเอียดภาวะเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th>. ค้นเมื่อ 4 กุมภาพันธ์ 2564.
- ศุมาพร เกษมสำราญ, วารุณี ธนะแพสย์, ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์, อนุพันธ์ เทิดวงศ์วรกุล, ปิติพร ฤทธิเรืองเดช, ธงชัย สุวรรณสิขณน์, และ รณฤทธิ์ ฤทธิธรม. 2552. หลักการพื้นฐานของเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. น. 16-23. ใน: เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- Agelet, L. E., and C. R. Hurburgh Jr. 2014. Limitations and current applications of Near Infrared Spectroscopy for single seed analysis. *Talanta*. 121: 288-299.

- Barker, F. M., D. M. Snodderly, E. J. Johnson, W. Schalch, W. Koepcke, J. Gerss, and M. Neuringer. 2011. Nutritional manipulation of primate retinas, v: effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal sensitivity to blue-light-induced damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52: 3934-3942.
- Berardo, N., O. V. Brenna, A. Amato, P. Valoti, V. Pisacane, and M. Motto. 2004. Carotenoid concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5: 393-398.
- Brenna, O. V., and N. Berardo. 2004. Application of near-infrared reflectance spectroscopy (NIR) to the evaluation of carotenoids content in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 5577-5582.
- Cooper, D. A. 2004. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*. 134: 221-224.
- Dwyer J. H., M. Navab, K. M. Dwyer, K. Hassan, P. Sun, A. Shircore, S. Hama-Levy, G. Hough, X. Wang, T. Drake, C. N. Merz, A. M. Fogelman. 2001. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*. 103: 2922-29227.
- Eggersdorfer, M., and A. Wyss. 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 652: 18-26.
- Gupta, P., Y. Sreelakshimi, and R. Sharma. 2015. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*. 11: 1-12.
- Kahriman, F., i. Onaç, F. M.Türk, F. Öner, and C. Ö. Egesel. 2019. Determination of carotenoid and tocopherol content in maize flour and oil samples using near-infrared spectroscopy. *Spectroscopy Letters*. 8: 473-481.
- Krinsky, N. I., and E. J. Johnson. 2005. Carotenoids actions and their relation to health and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. 26: 459-516.
- Niranjana, R., R. Gayathri, S. Mol, T. Sugawara, T. Hirata, K. Miyashita, and P. Ganesan. 2015. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells. *Journal of functional foods*. 18: 968-985.
- O'Hare, J., K. J. Fanning, and I. F. Martin. 2014. Zeaxanthin biofortification of sweet-corn and factors affecting zeaxanthin accumulation and color change. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 572: 184-187.
- Parada, J., and J. M. Aguilera. 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*. 72: R21-R32.
- Rambla, F. J., S. Garrigues, and M. De La Guardia. 1997. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Analytica Chimica Acta*. 344: 41-53.
- Scott, E. C., and L. A. Eldridge. 2005. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18: 551-559.
- Shao, Y., and Y. He. 2007. Nondestructive measurement of the internal quality of bayberry juice using Vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 79: 1015-1019.
- Tilahun, S., M. H. Seo, I. G. Hwang, S. H. Kim, H. R. Choi, and C. S. Jeong. 2018. Prediction of lycopene and  $\beta$ -carotene in tomatoes by portable chroma-meter and VIS/NIR spectra. *Postharvest Biology and Technology*. 136: 50-56.
- Williams, P. 2004. *Near-Infrared Technology: Getting the Best Out of Light*. Value Added Wheat CRC, Limited, Canada.
- Yang, Q., X. Yang, Q. Zhang, WY. Wang, H. Song, and F. Huang. 2020. Quantifying soluble sugar in super sweet corn using near-infrared spectroscopy combined with chemometrics. *Optik*. 220: 165128.