

การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการตรวจวัดการปนเปื้อนของรา
และอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวกล้อง

นางสาวชลธิชา สีเหนียง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF FUNGAL
AND AFLATOXIN B₁ CONTAMINATION IN BROWN RICE

Miss Chonticha Seenieng



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial
Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการตรวจวัดการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวกล้อง
โดย	นางสาวชลธิชา สีเหนียง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ศุมาพร เกษมสำราญ)

ชลธิชา สีเหนียง : การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการตรวจวัดการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวกล้อง (APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF FUNGAL AND AFLATOXIN B₁ CONTAMINATION IN BROWN RICE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญ, 167 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจสอบปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของราที่มีความสามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวกล้อง แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา สร้างโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้อง (ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง) และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ โดยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.93 ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (root mean square error of prediction, $RMSEP$) เท่ากับ 0.205 เปอร์เซ็นต์ และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เท่ากับ 0.0219 เปอร์เซ็นต์ แบบจำลองทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมดที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดร่วมกับการปรับลบโดยเส้นตรง (first derivative + straight line subtraction (17 Pts.)) ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด ($R^2 = 0.63$, $RMSEP = 5.66$ เปอร์เซ็นต์, bias = 1.81 เปอร์เซ็นต์) แบบจำลองทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด (first derivative (17 Pts.)) ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติและถูกทำให้เป็นเปื้อน เป็นแบบจำลองที่ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด ($R^2 = 0.67$, $RMSEP = 18.4$ เปอร์เซ็นต์, bias = -0.431 เปอร์เซ็นต์) สำหรับแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง สร้างจากความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง 3 แบบ (เมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด เมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว และสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง) แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากการใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดและสร้างแบบจำลองโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด ($R^2 = 0.94$, $RMSEP = 0.921$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, bias = -0.181 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มที่สร้างด้วยวิธี Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี Soft Independent Modeling of Class Analog (SIMCA) โดยผลการทำนายการแบ่งกลุ่มของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด การแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอม และการแบ่งกลุ่มตามปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมที่สูงที่สุด เท่ากับ 78.98, 86.36 และ 85.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5671941123 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: NEAR INFRARED SPECTROSCOPY / AFLATOXIGENIC FUNGI / AFLATOXIN B1 / MOISTURE CONTENT / BROWN RICE

CHONTICHA SEENIENG: APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF FUNGAL AND AFLATOXIN B₁ CONTAMINATION IN BROWN RICE. ADVISOR: ASST. PROF. CHEEWANUN DACHOUPAKAN SIRISOMBOON, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PANMANAS SIRISOMBOON, 167 pp.

The objective of this research was to apply near infrared spectroscopy (NIRS) for the determination of moisture content, aflatoxigenic fungal and aflatoxin B1 contaminations in brown rice. Models for predicting moisture content and fungal contamination were developed from the relationship between the laboratory data of brown rice samples (percentage of moisture content, percentage of total fungal infection and percentage of yellow-green *Aspergillus* infection) and the optical data obtained from brown rice sample scanning with Fourier Transform-Near infrared spectrometer (FT-NIR) by using Partial Least Square Regression (PLSR). The best model for predicting moisture content in brown rice was developed from NIR spectra pretreated by the straight line subtraction. The model gave the coefficient of determination (R^2) of 0.93, a root mean square error of prediction (*RMSEP*) of 0.205% and a bias of 0.0219%. The model for predicting total fungal contamination developed from pretreated spectra by the first derivative (17 Pts.) and straight line subtraction of naturally contaminated brown rice samples provided the greatest prediction ($R^2 = 0.63$, *RMSEP* = 5.66%, bias = 1.81%). The most predictive model for predicting yellow-green *Aspergillus* contamination was generated using the first derivative (17 Pts.) pretreated spectra from naturally and artificially contaminated brown rice samples ($R^2 = 0.67$, *RMSEP* = 18.4%, bias = -0.431%). The model for predicting aflatoxin B1 contamination in brown rice was developed from the relationship between aflatoxin B1 concentrations in brown rice and optical data obtained by NIR scanning of brown rice samples prepared by 3 different sample preparations (whole brown rice grains, grounded brown rice grains and crude extract of brown rice grains). The best model was developed from the first derivative (17 Pts.) pretreated spectra of whole brown rice grains ($R^2 = 0.94$, *RMSEP* = 0.921 $\mu\text{g}/\text{kg}$, bias = -0.181 $\mu\text{g}/\text{kg}$). For qualitative analysis, the classification models developed from Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA), provided a higher percentage of overall correct classification than Soft Independent Modeling of Class Analog (SIMCA). The model to classify brown rice samples according to the percentage of total fungal infection, yellow-green *Aspergillus* contamination and aflatoxin B1 contamination provided the highest percentage of overall correct classification of 78.98, 86.36 and 85.31%, respectively.

Department: Microbiology

Field of Study: Microbiology and Microbial
Technology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 27 และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกาล ศิริสมบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนและงานวิจัยนี้ รวมถึงช่วยตรวจทาน แก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปานมนัส ศิริสมบุรณ์ ในฐานะที่เป็นอาจารย์ที่ ปรึกษา ร่วม ให้ความรู้ความเข้าใจด้านเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ให้การอนุเคราะห์เครื่องมือ ทดสอบเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ อีกทั้ง กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ข้อคิดเห็นต่างๆ เพื่อ ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และ ดร. ศุมาพร เกษมสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำ ต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคุณสุนันท์ รั้งศรีกาญจน์ส่อง ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในการอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานวิจัย ทำให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

กราบขอบพระคุณบริษัท Bruker Corporation ประเทศเยอรมนี และ Bruker Optik ประเทศไทย ในการอนุเคราะห์เครื่องมือเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer รุ่น MPA) สำหรับงานวิจัยนี้

กราบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา นางสาวพัฒนชิตา ธราตลศิริฐิติกุล นางสาวพันธุ์ทิพย์ วงศ์ทิพย์ สมาชิกห้องวิจัย 1904/14 และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีในการทำวิจัยมาโดยตลอด ทำให้ผู้วิจัย รู้สึกประทับใจ มีช่วงเวลาที่ดีและมีความสุขตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณตา คุณยาย และบิดา มารดา ที่คอยเป็นที่ปรึกษาอย่างดี คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ เป็นแรงใจและกำลังใจมาโดยตลอดในการเรียนและการทำวิจัย จนทำให้ วิทยานิพนธ์ของผู้วิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ฐ
สารบัญตาราง.....	ต
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 ปรัชญาวัฒนธรรม	6
2.1 ข้าว.....	6
2.2 องค์ประกอบของข้าว.....	7
2.3 ข้าวกล้อง.....	9
2.4 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวกล้อง.....	10
2.5 สถานการณ์การผลิตและการค้าข้าว.....	12
2.6 สารพิษจากรา.....	14
2.7 อะฟลาทอกซินบี 1	16
2.7.1 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินบี 1.....	17
2.7.2 ราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxigenic fungi).....	18
2.7.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร	20
2.7.4 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว.....	20
2.7.5 การควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการ เกษตร.....	23

2.8 การตรวจหาสารที่ปนเปื้อนในอาหาร	24
2.8.1 วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาพื้นฐาน (conventional techniques).....	24
2.8.2 วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular techniques)	26
2.8.3 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological techniques).....	26
2.9 การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหาร	27
2.9.1 การเก็บตัวอย่าง	28
2.9.2 การเตรียมตัวอย่าง	28
2.9.3 การสกัดสารพิษจากรา	28
2.9.4 การกำจัดสิ่งรบกวน.....	29
2.9.5 การวิเคราะห์สารพิษจากรา.....	30
2.10 เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy, NIRS)	32
2.11 หลักการของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	34
2.11.1 การเกิดอันตรกิริยาของรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสาร.....	34
2.11.2 กฎสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนแสง	35
2.11.2.1 กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's Law).....	35
2.11.2.2 กฎของเบียร์ (Beer's Law).....	35
2.12 เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์.....	37
2.13 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล.....	39
2.13.1 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์.....	39
2.13.2 การวิเคราะห์ข้อมูล	41
2.13.3 ค่าสถิติสำหรับพิจารณาความแม่นยำของแบบจำลอง	46
2.14 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในอุตสาหกรรม.....	48
2.15 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในข้าว.....	50

2.16 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและสารพิษจากราที่ ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร.....	51
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงาน	55
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	55
เคมีภัณฑ์	58
วิธีการดำเนินงานวิจัย	59
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	59
3.2 การเตรียมตัวอย่าง.....	59
3.2.1 ตัวอย่างข้าวกล้องสำหรับใช้ในการตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของ รา.....	59
3.2.2 ตัวอย่างข้าวกล้องสำหรับใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1	60
3.3 การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์	60
3.3.1 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นและการ ปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	60
3.3.2 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลา ทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง	61
3.4 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ.....	64
3.4.1 การตรวจหาปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวกล้อง.....	64
3.4.2 การตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราในสกุล <i>Aspergillus</i> ที่คาดว่า สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่าง.....	64
3.4.2.1 วิธี direct plating.....	64
3.4.2.2 การจัดจำแนกราโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา (morphological characterization).....	65
3.4.2.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราที่คัดแยก ได้.....	65

3.4.3 การตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี HPLC.....	66
3.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	67
3.5.1 การตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outlier).....	67
3.5.2 การสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนาย	68
3.6 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ.....	70
3.6.1 สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา	70
3.6.2 สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1	70
3.7 การทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย (laboratory performance).....	70
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	72
4.1 การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์	72
4.1.1 ลักษณะข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาปริมาณ ความชื้นและการปนเปื้อนของรา.....	72
4.1.2 ลักษณะข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดในการตรวจหาการ ปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1	78
4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ	83
4.2.1 ปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวกล้อง	83
4.2.2 การปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวกล้อง.....	84
4.2.2.1 ผลการตรวจหาการปนเปื้อนของราด้วยวิธี direct plating.....	84
4.2.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราที่คัด แยกได้.....	87
4.2.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง	88
4.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	89

4.3.1	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าว กล้อง.....	89
4.3.1.1	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น.....	92
4.3.1.2	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมด.....	95
4.3.1.3	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคนีสีเขียวอมเหลือง.....	99
4.3.2	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1	106
4.3.2.1	แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่าง เมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด.....	108
4.3.2.2	แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่าง เมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว.....	111
4.3.2.3	แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่าง สารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง	114
4.4	การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ.....	120
4.4.1	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง	120
4.4.2	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	120
4.4.2.1	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด	120
4.4.2.2	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคนี สีเขียวอมเหลือง.....	122
4.4.3	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว กล้อง.....	125
4.5	การทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย (laboratory performance).....	128
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	130
5.1	ลักษณะข้อมูลเชิงแสงหรือสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวกล้อง.....	130

5.1.1	สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา.....	130
5.1.2	สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1.....	131
5.2	สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ	132
5.2.1	ปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวกล้อง.....	132
5.2.2	การปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวกล้อง.....	132
5.2.3	การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง	133
5.3	การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	134
5.3.1	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าว กล้อง.....	134
5.3.1.1	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น.....	134
5.3.1.2	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมด	135
5.3.1.3	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลือง.....	135
5.3.2	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1	138
5.4	การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ.....	140
5.4.1	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	140
5.4.2	แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว กล้อง.....	140
	รายการอ้างอิง	142
	ภาคผนวก.....	160
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	167

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1	โครงสร้างและส่วนประกอบของเมล็ดข้าว (Juliano, 1993)	9
ภาพที่ 2.2	โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1 (Jiang และคณะ, 2015).....	17
ภาพที่ 2.3	<i>A. flavus</i> ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA [ก], ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [ข] (Houbraken และคณะ, 2014), และลักษณะ conidia [ค] และลักษณะ conidia ของ <i>A. parasiticus</i> [ง] (สเกล = 10 ไมโครเมตร) (Varga และคณะ, 2011).....	19
ภาพที่ 2.4	แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหาร	27
ภาพที่ 2.5	สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้าและตำแหน่งของรังสีอินฟราเรด (Santos และคณะ, 2010).....	33
ภาพที่ 2.6	รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาของรังสีอินฟราเรดกับสสาร (ดัดแปลงจาก ศุมาพร เกษมสำราญ (2552))	34
ภาพที่ 2.7	สเปกตรัมอินฟราเรดของแป้งสาลี แสดงในรูปของกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดแสงส่องผ่านกับความยาวคลื่น (850-1050 นาโนเมตร) [ก], กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดแสงสะท้อนกับความยาวคลื่น (400-2400 นาโนเมตร) [ข] (Pojić และคณะ, 2013).....	35
ภาพที่ 2.8	องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ วัดความเข้มแสงแบบแสงส่องผ่าน (transmittance) [ก], และวัดความเข้มแสงแบบสะท้อนแสง (reflectance) [ข] (ดัดแปลงจาก Workman และคณะ (2007))	39
ภาพที่ 2.9	ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี	45
ภาพที่ 3.1	ตัวอย่างข้าวกล้องในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่าง [ก], เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform–Near infrared spectrometer, FT-NIR) รุ่น MPA [ข]	61
ภาพที่ 3.2	ภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างที่มีการวางเครื่องมือที่ทำให้เกิดการสะท้อน (transflection device) [ก], การสแกนตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ [ข]	63

ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นการปนเปื้อนของรา และการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	69
ภาพที่ 4.1 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นแตกต่างกัน 5 ระดับ (8-12 เปอร์เซ็นต์).....	73
ภาพที่ 4.2 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์	73
ภาพที่ 4.3 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> ที่มีโคลิโนสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์.....	74
ภาพที่ 4.4 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ (8-12 เปอร์เซ็นต์)	75
ภาพที่ 4.5 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์	76
ภาพที่ 4.6 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> ที่มีโคลิโนสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์และ 100 เปอร์เซ็นต์.....	76
ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	78
ภาพที่ 4.8 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่บดแล้วที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	79

ภาพที่ 4.9 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างสารสกัดหยาบข้าวกล้องที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) 79

ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)..... 81

ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่บดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)..... 82

ภาพที่ 4.12 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างสารสกัดหยาบข้าวกล้องที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)..... 82

ภาพที่ 4.13 การแจกแจงความถี่ของปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดจำนวน 300 ตัวอย่างย่อย 84

ภาพที่ 4.14 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DG18 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 85

ภาพที่ 4.15 การแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (total fungi) และราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลือง (yellow green fungi) ในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา รวมทั้งสิ้น 372 ตัวอย่างย่อย 87

ภาพที่ 4.16 การแจกแจงความถี่ของปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินปี 1 จำนวน 200 ตัวอย่างย่อย 89

ภาพที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์เมล็ดข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยเส้นตรง 93

ภาพที่ 4.18 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 94

ภาพที่ 4.19 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายปริมาณความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 95

ภาพที่ 4.20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดและการปรับลบโดยเส้นตรง 97

ภาพที่ 4.21 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างเป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 98

ภาพที่ 4.22 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 99

ภาพที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเซียวมเหลืองที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเซียวมเหลืองที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด 101

ภาพที่ 4.24 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเซียวมเหลืองที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR . 102

ภาพที่ 4.25 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเซียวมเหลืองในตัวอย่างเป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 102

ภาพที่ 4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างข้าวกล้องที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (แกน X) และค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด..... 109

ภาพที่ 4.27 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 110

- ภาพที่ 4.28** ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะ ฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 110
- ภาพที่ 4.29** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (แกน X) และค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดและการปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน 112
- ภาพที่ 4.30** ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 113
- ภาพที่ 4.31** ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะ ฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่สร้างด้วยวิธี PLSR 114
- ภาพที่ 4.32** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (แกน X) และค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมจากตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยค่าคงที่..... 115
- ภาพที่ 4.33** ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR.. 116
- ภาพที่ 4.34** ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะ ฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่สร้างด้วยวิธี PLSR..... 117

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของซ็องกล็องและข้าวสารที่มีความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณ 100 กรัม.....	10
ตารางที่ 2.2 ปริมาณวิตามินและแร่ธาตุของข้าวกล็องและข้าวสารที่มีความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณ 100 กรัม.....	11
ตารางที่ 2.3 ประเทศที่มีปริมาณการส่งออกข้าว 10 อันดับแรกทั่วโลก ในปี พ.ศ.2557	12
ตารางที่ 2.4 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกข้าวกล็องของประเทศไทยไปยังทวีปต่างๆ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2556-2558	13
ตารางที่ 2.5 ราและสารพิษจากราที่มีความสำคัญต่อผลผลิตทางการเกษตร.....	15
ตารางที่ 2.6 ความเป็นพิษของสารพิษจากราที่ส่งผลต่อคนและสัตว์	15
ตารางที่ 2.7 รายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าว	22
ตารางที่ 2.8 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ ของคณะกรรมการยุโรป.....	23
ตารางที่ 2.9 การแบ่งช่วงของรังสีอินฟราเรด.....	33
ตารางที่ 2.10 แนวทางการอธิบายความสามารถของแบบจำลองด้วยค่า R และ R^2	46
ตารางที่ 2.11 แนวทางการอธิบายความสามารถของแบบจำลองด้วยค่า RPD.....	48
ตารางที่ 2.12 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในอุตสาหกรรม	49
ตารางที่ 2.13 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร.....	53
ตารางที่ 3.1 จำนวนของตัวอย่างและตัวอย่างย่อย และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล็อง.....	63
ตารางที่ 4.1 การสันสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของฟิสิกที่ปรากฏในสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในภาพที่ 4.4, 4.5 และ 4.6	77

ตารางที่ 4.2 การสั้นสะท้อนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของพีคที่ปรากฏในสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในภาพที่ 4.10 และ 4.11 80

ตารางที่ 4.3 การสั้นสะท้อนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของพีคที่ปรากฏในสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ของตัวอย่างสารสกัดหยาบข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.12)..... 83

ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีเซียวมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยวิธี direct plating..... 86

ตารางที่ 4.5 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง 88

ตารางที่ 4.6 ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการและข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมที่ใช้สร้างแบบจำลอง ... 90

ตารางที่ 4.7 ข้อมูลทางสถิติของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลอง 91

ตารางที่ 4.8 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด 5 อันดับแรก..... 92

ตารางที่ 4.9 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด 5 อันดับแรก 96

ตารางที่ 4.10 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีเซียวมเหลืองในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด 5 อันดับแรก..... 100

ตารางที่ 4.11 การสั้นสะท้อนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของตัวอย่างข้าวกล้อง..... 103

ตารางที่ 4.12 การสั้นสะท้อนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่ได้จากค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองต่างๆ ของตัวอย่างข้าวกล้อง 105

ตารางที่ 4.13 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ได้รับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลอง 107

ตารางที่ 4.14 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก.....	108
ตารางที่ 4.15 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก	111
ตารางที่ 4.16 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก.....	115
ตารางที่ 4.17 การสันนิษฐานของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ	117
ตารางที่ 4.18 การสันนิษฐานของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่ได้จากค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC3) ของแบบจำลองต่างๆ ของตัวอย่างข้าวกล้อง	119
ตารางที่ 4.19 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี SIMCA	121
ตารางที่ 4.20 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี PLS-DA.....	121
ตารางที่ 4.21 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโนสียิววมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี SIMCA.....	123
ตารางที่ 4.22 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโนสียิววมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี PLS-DA	123
ตารางที่ 4.23 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโนสียิววมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี SIMCA.....	124
ตารางที่ 4.24 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโนสียิววมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี PLS-DA	124

ตารางที่ 4.25 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีสารปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี SIMCA	126
ตารางที่ 4.26 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีสารปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี PLS-DA.....	126
ตารางที่ 4.27 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g}/\text{kg}$) โดยวิธี SIMCA	127
ตารางที่ 4.28 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g}/\text{kg}$) โดยวิธี PLS-DA.....	127
ตารางที่ 4.29 ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) ของการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของผู้วิจัย	128
ตารางที่ 4.30 ค่าความสามารถในการวัดเหมือน (reproducibility) ของการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของผู้วิจัย.....	129

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1, AFB1) เป็นสารพิษจากราที่ เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิของราสายใยในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะ *Aspergillus section Flavi* (Riba และคณะ, 2010) อะฟลาทอกซินบี 1 ทำให้เกิดพิษทั้งแบบฉับพลันและเรื้อรังในมนุษย์และสัตว์ (Pleadin และคณะ, 2014) The International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 2012) นอกจากนี้ สารพิษชนิดนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีผลต่อตัวอ่อนในครรภ์ และส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Reddy และคณะ, 2009) อะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนอยู่ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวสาลี และข้าว (Riba และคณะ, 2010; Rustom, 1997)

ข้าวกล้อง คือ ข้าวที่ผ่านการขัดสีเอาเปลือกออก โดยที่เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวและจมูกข้าวที่มีสารอาหารยังคงอยู่ จึงเป็นข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยโปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ มากกว่า 20 ชนิด และมีเส้นใยมากกว่าข้าวขาวถึง 15 เท่า รวมถึงมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกายได้ ข้าวกล้องจึงเป็นอาหารสุขภาพช่วยให้ร่างกายได้สารอาหารที่ครบถ้วน และรักษาสมดุลองค์รวมให้กับร่างกาย (นิตดา หงษ์วิวัฒน์, 2552) ดังนั้น ในปัจจุบันผู้บริโภคจึงหันมาสนใจการบริโภคข้าวกล้องมากขึ้น สำหรับการส่งออกข้าวกล้องของประเทศไทยพบว่าในปี พ.ศ. 2556 มีปริมาณการส่งออกข้าวกล้อง รวมทั้งสิ้น 15419.79 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 557.80 ล้านบาท ตลาดส่งออกข้าวกล้องที่สำคัญ ได้แก่ เอเชีย ยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และแอฟริกา (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2557)

ข้าวกล้องเป็นสินค้าทางการเกษตรที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ได้เช่นเดียวกับข้าว และผลผลิตทางการเกษตรประเภทธัญพืชชนิดอื่นๆ เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น อุณหภูมิสูง และมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 60–90 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราที่สามารถผลิตสารพิษนี้ (Paderes และคณะ, 1997; Rustom, 1997) การปนเปื้อนของราเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว และระหว่างเก็บรักษา ดังนั้น ข้าวสารที่จะนำไปเก็บรักษาจะต้องมีความชื้นไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ ตามข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าการเกษตร (มกษ. 4004–2555) รายงานตัวอย่างการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้อง เช่น ข้าวกล้องหอมมะลิของประเทศไทยที่ส่งไปประเทศสวีเดน ถูกตรวจพบว่า มีอะฟลาทอกซินสูงกว่าที่กำหนด (สมาคมผู้ส่งออก

ข้าวไทย, 2551) ซึ่งจากปัญหาดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์และปริมาณการส่งออกข้าวไทยในอนาคตได้ จากการศึกษาของ Sales และคณะ (2005) พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องในประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0.03–8.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดทั่วโลก แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้หลายประเทศต้องมีข้อกำหนดเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรรวมทั้งข้าวด้วย เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้ระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินปี 1 ในธัญพืช ข้าว และถั่ว เท่ากับ 2.0, 5.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (European Commission, 2010) สำหรับประเทศไทยอนุญาตให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน (กระทรวงสาธารณสุข, 2529)

สินค้าเกษตรประเภทธัญพืชรวมถึงข้าวกล้องมีโอกาสพบการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในปริมาณสูง เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและเพื่อควบคุมคุณภาพและมาตรฐานสินค้าในการส่งออก การตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราดังแต่ช่วงแรกของกระบวนการผลิตหรือก่อนการส่งออกจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง วิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ตรวจหาที่ผลิตสารพิษปนเปื้อนในอาหาร คือ การใช้วิธีจุลชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การนับจำนวนรา การคัดแยกจากตัวอย่างอาหาร การจำแนกและการระบุชนิดของราที่คัดแยกได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือลักษณะโครงสร้างของรกายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Pitt และคณะ, 2009) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาและต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญ นอกจากนี้ อาจเกิดข้อผิดพลาดหรือความคลาดเคลื่อนจากการปนเปื้อนระหว่างการวิเคราะห์ได้ (Dachoupan Sirisomboon และคณะ, 2013) ปัจจุบันวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของราในผลผลิตทางการเกษตร จัดจำแนกและระบุชนิดของราได้ (Niessen, 2007) อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคนี้มีข้อจำกัดบางประการ เช่น วิธีการในการวิเคราะห์มีความซับซ้อน สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ราคาสูง และการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด (Santos และคณะ, 2010)

สำหรับการวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารมีขั้นตอนสำคัญ ได้แก่ 1.) การสกัดสารพิษจากราในตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย เช่น เมทานอล อะซิโตนไตรีล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น ซึ่งหลายชนิดมีความเป็นพิษ 2.) การ clean up เพื่อเพิ่มบริสุทธิ์ของสารพิษที่สกัด ทำให้การวิเคราะห์มีความแม่นยำมากขึ้น นิยมใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น immunoaffinity column (IAC)

ซึ่งสามารถนำมาใช้กับตัวอย่างที่ปริมาณสารพิษจากราคาต่ำ (Jinap และคณะ, 2012) 3.) การวิเคราะห์สารพิษจากรา นิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์และภูมิคุ้มกันวิทยา วิธีทางเคมีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ทั่วไป คือ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) และ แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) เป็นวิธีที่ให้ผลวิเคราะห์ที่แม่นยำและเชื่อถือได้ (Jinap และคณะ, 2012) นอกจากนี้ ยังนิยมใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) ซึ่งสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ (Urusov และคณะ, 2010) แต่ข้อเสียของวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี คือ สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ราคาสูงและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์และใช้เวลานาน จึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง ใช้ตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้อย ทำได้ง่าย และรวดเร็ว จึงเหมาะกับการใช้เป็นวิธีการตรวจแบบรวดเร็ว (rapid method) แต่ข้อเสียของวิธีนี้ คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือหรือชุดสำเร็จที่มีความจำเพาะเจาะจง อีกทั้งน้ำยาที่ใช้ทดสอบไม่มีความเสถียรเมื่อมีการทดสอบเป็นระยะเวลานาน (Fernández-Ibañez และคณะ, 2009; Urusov และคณะ, 2010)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) เป็นเทคนิคที่ใช้การวัดและวิเคราะห์คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่สสารดูดกลืนเข้าไปและปล่อยออกมาในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (จำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร) โดยสสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับคลื่นเนียร์อินฟราเรดได้ คือ สสารที่มีโมเลกุลประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน เช่น C-H, O-H, N-H และ S-H ซึ่งการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดจะส่งผลต่อการสั่นสะเทือนของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล และระดับการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ นี้จะปรากฏในรูปแบบสเปกตรัม เพื่อนำไปประมวลผลในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552) ปัจจุบันมีการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมหลากหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร อุตสาหกรรมเคมีและปิโตรเลียม อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอและพอลิเมอร์ และอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ เพื่อควบคุมคุณภาพของกระบวนการผลิตตั้งแต่วัตถุดิบจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้าย (วารุณี ณะแพสย์, 2552) ข้อดีของการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี คือ ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่ถูกทำลาย การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก จึงสะดวก รวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ค่าทางเคมีต่างๆ ที่ต้องการได้ในเวลาเดียว (Huang และคณะ, 2008)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหารเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมคุณภาพ (วารุณี ณะแพสย์, 2552) เช่น การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล คาร์โบไฮเดรต ความชื้น หรือวิเคราะห์ขนาด สี รูปร่างในผักและผลไม้

ปริมาณไขมัน น้ำ และโปรตีนในเนื้อสัตว์ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือค่าความแข็งของธัญพืช ต่างๆ หรือปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน และแลคโทสในนมและผลิตภัณฑ์จากนม (Huang และ คณะ, 2008) นอกจากนี้ มีการศึกษาการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาประยุกต์เพื่อตรวจหา การปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น Berardo และคณะ (2005) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดและ *Fusarium verticilloides* ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดและข้าวโพดปน พบว่าแบบจำลองที่ได้ผลดีที่สุดให้ค่า สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.75 และ 0.79 และค่า ความผิดพลาดมาตรฐานในการพิสูจน์แบบไขว้ (standard error of cross validation, $SECV$) เท่ากับ 7.43 และ 10.95 สำหรับเมล็ดข้าวโพดและข้าวโพดปน ตามลำดับ Fernández-Ibañez และ คณะ (2009) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ใน ข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ โดยใช้เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์แบบเกรตติ้ง (grating) และ เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIRS) ที่ความยาวคลื่นในช่วง 1112–2500 นาโนเมตร พบว่า แบบจำลองสำหรับข้าวโพดที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วย วิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานและการปรับแนวโน้ม (standard normal variate and detrending, SNVD) ผลทำนายที่ดีที่สุดให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.80 และ 0.82 ค่า $SECV$ เท่ากับ 0.211 และ 0.200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์แบบเกรตติ้งและ FT-NIRS ตามลำดับ สำหรับข้าวบาร์เลย์ แบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมจากเครื่องเนียร์อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์แบบเกรตติ้งและผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการ SNVD ผลทำนายที่ดีที่สุดให้ ค่า R^2 เท่ากับ 0.85 และค่า $SECV$ เท่ากับ 0.176 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ แบบจำลองที่สร้าง โดยใช้สเปกตรัมจาก FT-NIRS โดยเส้นสเปกตรัมไม่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.84 และค่า $SECV$ เท่ากับ 0.183 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เพื่อตรวจสอบ ปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของรา โดยเฉพาะราที่คาดว่าสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และการ ปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้อง โดยการสร้างแบบจำลองในการตรวจหาปริมาณ ความชื้น การปนเปื้อนของรา และการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้อง จากการหา ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และค่าที่ได้จากการ วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีการที่จะพัฒนาขึ้นมามีคุณสมบัติเด่น คือ ตัวอย่างที่ใช้ไม่ถูกทำลาย เนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีในการทดสอบ ทำให้ช่วยลดต้นทุนในการใช้สารเคมีและยังช่วยลดความ เป็นพิษของสิ่งแวดล้อม สามารถวัดค่าคุณภาพและปริมาณสารที่ต้องการภายในเวลาอันรวดเร็ว และ

ทราบผลหลายตัวแปรในเวลาเดียวกัน เหมาะสำหรับนำไปพัฒนาใช้กับอุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร เพื่อลดต้นทุนในการใช้สารเคมีและประหยัดเวลาได้มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจสอบปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของราที่มีความสามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวกล้อง



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชหรือพืชที่นำเมล็ดไปรับประทานเป็นอาหารจำพวกแป้ง เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์เกรมินีอี (Family Gramineae) หรือ วงศ์หญ้า ซึ่งเป็นวงศ์ของพืชที่ใหญ่ที่สุดที่ประกอบด้วยพืชประมาณ 650 สกุล (Genera) มีลักษณะเด่นชัดตรงที่มีใบยาว แฉก เกิดเป็นสองแถวตามแนวตั้งสลับกัน ลำต้นรูปทรงกระบอก มีข้อและปล้องเห็นเด่นชัด ภายในกลวง หรือมีเนื้อเยื่ออ่อนๆ และช่อดอกมักเกิดที่ยอดของลำต้น (Kellogg, 2009; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.), 2544)

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญที่สุดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และได้รับความนิยมในการบริโภคและเพาะปลูกในอีกหลายภูมิภาคทั่วโลก ข้าวสายพันธุ์ที่รู้จักและนิยมนำมาเพาะปลูกสำหรับบริโภคมี 2 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ *Oryza glaberrima* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปแอฟริกาตะวันตก และ *Oryza sativa* L. ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะและพื้นที่เพาะปลูก ดังนี้

1) ข้าวอินดิกา (Indica) ลักษณะเมล็ดข้าวเรียวยาว ยาวรี ลำต้นสูงและค่อนข้างอ่อน ใบกว้าง มีสีเขียวอ่อน มีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ง่าย นิยมเพาะปลูกในประเทศเขตร้อนในทวีปเอเชีย เช่น เวียดนาม ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย จีน อินเดีย ศรีลังกา และไทย ซึ่งนิยมเพาะปลูกในบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา (กล้า เมธากานต์, 2552; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2558)

2) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) ลักษณะเมล็ดป้อม กลมรี ลำต้นเตี้ยและแข็ง ใบแคบ สีเขียวเข้ม ทนต่ออากาศหนาวเย็น ให้ผลผลิตสูง มีการตอบสนองต่อปุ๋ยดีมาก ปลูกมากในประเทศเขตอบอุ่นหรือกึ่งร้อน เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และสหรัฐอเมริกา (กล้า เมธากานต์, 2552; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2558)

3) ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่างข้าวอินดิกาและจาปอนิกา มีลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่ ลำต้นสูงและแข็ง ใบกว้าง สีเขียวอ่อน นิยมเพาะปลูกในประเทศอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ได้รับความนิยมนักเนื่องจากให้ผลผลิตต่ำ (กล้า เมธากานต์, 2552; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2558)

2.2 องค์ประกอบของข้าว

ข้าว หรือเมล็ดข้าว (rice fruit, rice grain หรือ rice seed) มีลักษณะเป็นผลเดี่ยว (single fruit) เกิดจากรังไข่อันเดี่ยวชนิดลอยตัว (superior ovary) ของดอกเดี่ยวในแต่ละดอกย่อย โดยผลเดี่ยวจะติดอยู่กับผนังรังไข่หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) เมื่อผลสุกหรือแก่จะเป็นผลแห้งที่ไม่แตกเรียกว่า เมล็ด (caryopsis grain) ที่มีเยื่อหุ้มผลและเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat, testa) เชื่อมรวมกันตลอด เมล็ดข้าว ซึ่งมีขนาด รูปร่าง และสีแตกต่างกันตามพันธุ์ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

เมล็ดข้าว ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว (หรือผล) เรียกว่า แกลบ (hull, husk) และส่วนเนื้อผล หรือผลแท้ (caryopsis grain) (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556) โครงสร้าง และส่วนประกอบของเมล็ดข้าวกว้างแสดงในภาพที่ 2.1

1) แกลบ (hull, husk) เป็นส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ดทั้งหมด (Juliano, 1993) ประกอบด้วย เปลือกใหญ่ (lemma) ที่หุ้มเนื้อผลด้านท้อง (dorsal side) ห่อหุ้มเปลือกเล็ก (palea) ซึ่งหุ้มผลด้านหลัง (ventral side) ไว้ทั้งสองด้านในลักษณะขบอยู่ข้างบน ทำให้เปลือกทั้งสองติดกันอย่างแน่นสนิท โดยส่วนของเซลล์ผิวนอก (epidermal cell) จะเจริญกลายเป็นขน (pubescence) ขึ้นอยู่บนเปลือกทั้งสอง ทำหน้าที่ลดการระเหยของน้ำและกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ หาง (awn) เป็นส่วนปลายของเปลือกใหญ่ที่ยาวออกมา ทำหน้าที่ในการกระจายพันธุ์คล้ายขน ข้าวเมล็ด (rachilla) เป็นก้านสั้นอยู่ระหว่างกลีบรองเมล็ด (sterile lemmas) กับเปลือกใหญ่และยังติดกับเมล็ดข้าวเปลือก และกลีบรองเมล็ดเป็นกลีบเล็ก 2 กลีบ อยู่ใต้สุดของเมล็ด (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

2) เนื้อผล หรือผลแท้ (caryopsis grain) ประกอบด้วย

2.1) เยื่อหุ้มผล (pericarp) เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอก ห่อหุ้มผลอยู่ภายใน เป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์เส้นใย 6 ชั้น มีสารสีหรือรงควัตถุปนอยู่ ทำให้ข้าวกล้องมีสี แบ่งเป็น 3 ชั้นย่อย คือ เอพิคาร์พ หรือ เอกโซคาร์พ (epicarp หรือ exocarp) เป็นผนังหรือเปลือกที่อยู่นอกสุด เมโซคาร์พ หรือ ไฮโปเดิร์ม (mesocarp หรือ hypoderm) เป็นผนังผลชั้นกลาง และเอนโดคาร์พ (endocarp) เป็นเยื่อชั้นใน เยื่อหุ้มผลนี้มีองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ โปรตีน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

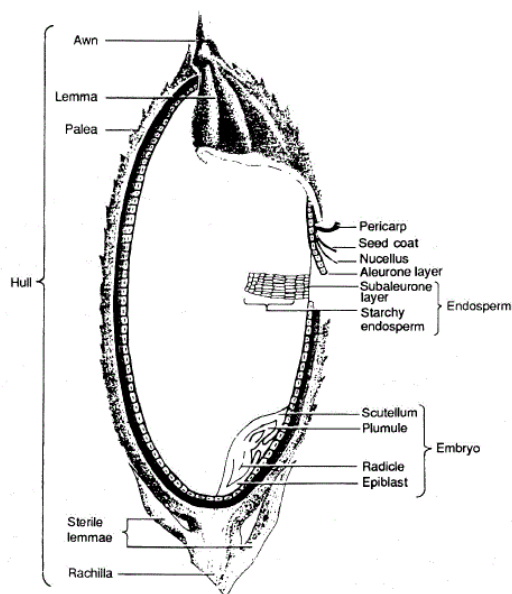
2.2) เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผล เป็นเซลล์ 2 ชั้น รูปยาวเรียงตามขวาง มีผนังบางกั้น ภายในเซลล์มีไขมันและสารสีเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มผล (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

2.3) เยื่อคั่น หรือนิวเซลลัส (nucellus) เป็นชั้นที่ติดกับเยื่อหุ้มเมล็ด แต่ไม่ติดแน่นจึงแยกจากกันได้ง่าย (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

2.4) เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด หรือเยื่อชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) เป็นเยื่อชั้นถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ด มีโปรตีน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แบ่งออกได้ 2 ลักษณะ คือ เซลล์แอลิวโรนที่ห่อหุ้มรอบเนื้อของเมล็ดจะมีรูปร่างเป็นลูกบาศก์และมีไซโทพลาซึม (cytoplasm) อยู่หนาแน่น และเซลล์แอลิวโรนที่ห่อหุ้มคัพภะจะบางและมีไซโทพลาซึมน้อย (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

2.5) คัพภะ (embryo) หรือเชื้อชีวิต จะอยู่ที่โคนเมล็ดด้านเปลือกใหญ่ เป็นแหล่งสะสมอาหารอุดมไปด้วยโปรตีน และไขมันต่างๆ นอกจากนี้ คัพภะยังเป็นส่วนที่เจริญไปเป็นต้นอ่อน ดังนั้น ส่วนท้องของเมล็ดจึงมีส่วนประกอบเป็นต้นอ่อน (plumule) รากอ่อน (radicle) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) เยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) ท่อน้ำท่ออาหาร (epiblast) และใบเลี้ยง (scutellum) ซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547; ออรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

2.6) เนื้อเมล็ด หรือเนื้อข้าว (endosperm) มีประมาณ 80% ของน้ำหนักเมล็ดทั้งหมดซึ่งมีมากที่สุดที่โคนเมล็ดข้าว แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคือ ส่วนชั้นซับแอลิวโรน (subaleurone layer) อยู่ถัดจากชั้นเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด ประกอบด้วยโปรตีนและไขมันปริมาณมาก (Juliano, 1993) ส่วนที่สอง คือ ส่วนแป้งในเนื้อของเมล็ด (starchy endosperm) องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นอะไมโลพลาสต์ (amyloplasts) ที่มีเม็ดแป้ง (starchy granules) (Juliano, 1993) มีโปรตีนปริมาณน้อย เนื่องจากมีเพียงกลุ่มโปรตีนลักษณะกลมใหญ่แทรกอยู่ระหว่างเม็ดแป้งเท่านั้น (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างและส่วนประกอบของเมล็ดข้าว (Juliano, 1993)

2.3 ข้าวกล้อง

ข้าวกล้อง (brown rice, cargo rice, husked rice, loonzain rice) คือ ข้าวที่กะเทาะเอาเปลือกนอกหรือแกลบออกเพียงชั้นเดียว จึงทำให้เมล็ดข้าวมีสีเหลืองอมน้ำตาล หรือมีสีตามสีของชั้นเยื่อรำที่หุ้มเมล็ดไว้ (สิทธรา พรรณสมบุรณ์, 2552) มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 4004-2555) ได้ให้นิยามหรือความหมายของข้าวกล้อง หมายถึง เมล็ดข้าวที่ผ่านการกะเทาะเปลือกออกเท่านั้น ทั้งนี้ กระบวนการกะเทาะเปลือกอาจทำให้เยื่อรำบางส่วนหลุดออก (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) โดยมีคัพภะและส่วนแบ่งในเนื้อของเมล็ดเป็นส่วนใหญ่ที่ใช้บริโภค (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) ส่วนประกอบของเมล็ดข้าวกล้องประกอบด้วย เยื่อหุ้มข้าวกล้อง (caryopsis coat) (เยื่อหุ้มผลหรือเนื้อเยื่อชั้นนอก เยื่อหุ้มเมล็ด และเยื่อคั่นหรือนิวเซลลัส) เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด คัพภะ และเนื้อเมล็ด (Juliano, 1993; กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547; อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

เนื่องจากชั้นเยื่อหุ้มผลและเยื่อหุ้มเมล็ดของเมล็ดข้าวกล้องมีสารสีหรือรงควัตถุปนอยู่ ทำให้ข้าวกล้องมีสีน้ำตาลโทนต่างๆ เช่น น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ น้ำตาลแดง น้ำตาลม่วง น้ำตาลจนเกือบดำ เป็นต้น (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556) หรือมีสีแดง เช่น ข้าวกล้องหอมมะลิแดง ซึ่งเป็นข้าวที่มีชั้นเยื่อหุ้มสีแดงจากสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สร้างความแข็งแรงของหลอดเลือดและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ข้าวกล้องสีนิลหรือข้าวหอมนิล เป็น

ข้าวที่มีชั้นเยื่อหุ้มสีม่วงเข้มจนเกือบดำ มีสารแอนโทไซยานินและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่นเดียวกับข้าวกล้องหอมมะลิแดง (สิทธรา พรรณสมบูรณ์, 2552) เป็นต้น

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวกล้อง

ข้าวจัดเป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานหลักของประชากรทั่วโลกถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะประชากรในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.), 2544) เป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด สารอาหารหรือองค์ประกอบทางเคมีที่พบในข้าว ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ วิตามิน แร่ธาตุ และคาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก โดยเฉพาะโปรตีนในข้าวเป็นโปรตีนที่ดีกว่าโปรตีนในธัญพืชชนิดอื่น เนื่องจากมีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2552) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate analysis) เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีในข้าว ซึ่งอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว สภาพการปลูก การเก็บเกี่ยว ตลอดจนกระบวนการแปรรูปจากข้าวเปลือกเป็นข้าวกล้องและข้าวสารขาว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556) องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของข้าวกล้องและข้าวสารหรือข้าวขาว แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของข้าวกล้องและข้าวสารที่มีความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณ 100 กรัม

องค์ประกอบทางเคมี	ชนิดข้าว	
	ข้าวกล้อง	ข้าวสาร
โปรตีน (กรัม)	7.1-8.3	6.3-7.1
ไขมัน (กรัม)	1.6-2.8	0.3-0.5
เส้นใยหยาบ (กรัม)	0.6-1.0	0.2-0.5
เถ้า (กรัม)	1.0-1.5	0.3-0.8
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	73-87	77-89
เส้นใยอาหาร (กรัม)	2.9-3.9	0.7-2.3
พลังงาน (กิโลจูล)	1520-1610	1460-1560
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	363-385	349-373

ที่มา: ดัดแปลงจาก อรอนงค์ นัยวิกุล (2556)

จากตาราง แสดงให้เห็นว่าข้าวกล้องมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ แล้ เส้นใยอาหาร และพลังงานสูงกว่าข้าวสาร เนื่องจากข้าวสารผ่านการขัดสี ทำให้ส่วนของเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิวเคลียส ชั้นแอลิวโรน รวมทั้งคัพภะหลุดออกไป เมล็ดข้าวสารจึงมีสีขาวขึ้น มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ในขณะที่องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ มีปริมาณลดลง (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

นอกจากนี้ ข้าวกล้องยังอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุที่ส่งเสริมให้ร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทำให้ร่างกายแข็งแรง แม้ในข้าวกล้องจะไม่มีวิตามินเอ วิตามินซี หรือวิตามินดี (Juliano, 1993) แต่ข้าวกล้องเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยกลุ่มวิตามินบี เช่น วิตามินบี 1 (thiamine) ช่วยป้องกันโรคเหน็บชา ซึ่งพบมากกว่าข้าวสารถึง 4 เท่า วิตามินบี 2 (riboflavin) ป้องกันโรคปากนกกระจอก บำรุงผิวหนัง วิตามินบี 3 (niacin) ช่วยบรรเทาอาการอ่อนเพลีย ปวดกล้ามเนื้อ บำรุงสมอง และวิตามินบี 6 (pyridoxine) ช่วยบำรุงสมองและระบบประสาท นอกจากนี้ ข้าวกล้องยังมีวิตามินอี (α -tocopherol) กรดฟอลิก รวมถึงแร่ธาตุที่สำคัญ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และสังกะสี เป็นต้น (สิทธรา พรรณสมบุญ, 2552) ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณวิตามินและแร่ธาตุในข้าวกล้องและข้าวสาร พบว่า ข้าวกล้องมีปริมาณวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ สูงกว่าข้าวสาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิตามินและแร่ธาตุนั้นมีอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิวเคลียส ชั้นแอลิวโรน และคัพภะซึ่งเป็นแหล่งของวิตามินอีและวิตามินบี 3 (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณวิตามินและแร่ธาตุของข้าวกล้องและข้าวสารที่มีความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณ 100 กรัม

วิตามินและแร่ธาตุ	ชนิดข้าว	
	ข้าวกล้อง	ข้าวสาร
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.29-0.61	0.02-0.11
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.04-0.14	0.02-0.06
วิตามินบี 3 (มิลลิกรัม)	3.5-5.3	1.3-2.4
วิตามินอี (มิลลิกรัม)	0.90-2.50	0.075-0.03
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	10-50	10-30
ฟอสฟอรัส (กรัม)	0.17-0.43	0.08-0.15
ไฟทีนฟอสเฟต (กรัม)	0.13-0.27	0.02-0.07
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.2-5.2	0.2-2.8
สังกะสี (มิลลิกรัม)	0.6-2.8	0.6-2.3

ที่มา: ดัดแปลงจาก อรอนงค์ นัยวิกุล (2556)

2.5 สถานการณ์การผลิตและการค้าข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักที่ประชากรมากกว่าครึ่งโลกใช้ในการบริโภคโดยเฉพาะในทวีปเอเชียซึ่งมีการบริโภคข้าวมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ข้าวยังเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและอบอุ่น ตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 50 องศาเหนือ ถึง 40 องศาใต้ ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงประมาณ 3000 เมตร และทนต่อสภาพดินที่หลากหลายได้ดี ดังนั้น ประเทศต่างๆ ทั่วโลกมากกว่า 100 ประเทศจึงสามารถเพาะปลูกข้าวเพื่อการบริโภคได้ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556) จากการสำรวจสถานการณ์การผลิตข้าวของโลกโดยกระทรวงเกษตร ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า ปี 2556/57 มีพื้นที่เก็บเกี่ยวรวม 1005.50 ล้านไร่ และได้ผลผลิตเฉลี่ย 707 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 10 ของประเทศผู้ผลิตข้าวที่สำคัญของโลก และมีสถิติการส่งออกข้าวในปี 2557 เป็นอันดับ 1 ของโลก รองลงมา คือ ประเทศอินเดีย และเวียดนาม ซึ่งส่งออกเป็นอันดับ 2 และ 3 ตามลำดับ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2558) (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ประเทศที่มีปริมาณการส่งออกข้าว 10 อันดับแรกทั่วโลก ในปี พ.ศ.2557

ประเทศผู้ส่งออก	ปริมาณการส่งออก (เมตริกตัน)
ไทย	10.97
อินเดีย	10.91
เวียดนาม	6.33
ปากีสถาน	3.60
สหรัฐอเมริกา	3.00
พม่า	1.69
กัมพูชา	1.00
อูรุกวัย	0.96
บราซิล	0.85
อียิปต์	0.60

ที่มา: ดัดแปลงจาก สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย (2558)

จากสถิติในปี 2558 พบว่า ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกข้าวกล้องโดยรวมเท่ากับ 566.77 ล้านบาท ซึ่งตลาดส่งออกข้าวกล้องสำคัญที่มีปริมาณการส่งออกสูงอันดับต้นๆ ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา อิตาลี สิงคโปร์ เนเธอร์แลนด์ ฮองกง โปแลนด์ ฝรั่งเศส และสวิตเซอร์แลนด์ ตามลำดับ (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) ในช่วงปี 2556-2558 ประเทศไทยมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกข้าวกล้องไปยังทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ และเอเชียสูงเป็น 3 อันดับแรก รองลงมา ได้แก่ ทวีปออสเตรเลียและโอเชียเนีย อเมริกากลาง แอฟริกา และอเมริกาใต้ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกข้าวกล้องของประเทศไทยไปยังทวีปต่างๆ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2556-2558

ทวีป	ปี 2556		ปี 2557		ปี 2558	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
ยุโรป	9053.18	319.79	6879.60	276.52	6265.85	245.35
อเมริกาเหนือ	3652.29	136.93	5305.05	186.63	5843.71	200.51
เอเชีย	2164.45	83.32	2826.99	108.29	3096.18	113.49
ออสเตรเลียและ โอเชียเนีย	479.42	14.99	153.33	107.37	122.75	4.84
อเมริกากลาง	40.90	1.63	42.22	1.53	27.92	1.07
แอฟริกา	28.71	1.09	38.96	1.45	32.21	1.38
อเมริกาใต้	0.84	0.04	-	-	3.75	0.13
รวม	15419.79	557.80	15246.14	681.78	15392.37	566.77

ปริมาณ: เมตริกตัน

มูลค่า: ล้านบาท

ที่มา: ดัดแปลงจาก (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2557, 2558, 2559)

ข้าวเป็นสินค้าเกษตรที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกที่สำคัญของโลก ดังนั้น เพื่อให้ข้าวมีคุณภาพได้มาตรฐานและความปลอดภัย เป็นที่ยอมรับมากขึ้นทั้งในประเทศและการค้าระหว่างประเทศ คณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรจึงได้มีการจัดทำมาตรฐานสินค้าเกษตรเรื่องข้าว (มกษ. 4004-2555) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) เพื่อดูแลความปลอดภัยและคุ้มครองผู้บริโภค

การจัดการและการปฏิบัติที่ดีระหว่างการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว เป็นขั้นตอนที่สำคัญ ขั้นตอนหนึ่งที่จะช่วยควบคุมคุณภาพของข้าว การขาดการจัดการที่ดีในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ถูกต้อง ส่งผลต่อการสูญเสียข้าวทั้งทางด้านปริมาณและด้านคุณภาพ เช่น การเก็บเกี่ยวในขณะที่เมล็ดข้าวมีความชื้นสูงเกินไป (ประมาณ 28-33 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ยากต่อการลดความชื้นของเมล็ดข้าวหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษา อัตราการเสื่อมคุณภาพ (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) รวมถึงการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชที่สามารถนำไปสู่การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ และราที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษจากรา (mycotoxin) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศไทย ที่มีสภาพอากาศแบบร้อนชื้นซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารพิษของรา (Reiter และคณะ, 2010) การลดความชื้นของเมล็ดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเก็บรักษาทั้งระยะสั้นและระยะยาว ดังนั้น หลังการเก็บเกี่ยวจึงจำเป็นต้องมีการลดความชื้นของเมล็ดให้แห้งโดยเร็ว เพื่อลดอัตราการหายใจของเมล็ด และลดการปนเปื้อนของราซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพเร็วยิ่งขึ้น (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 4004-2555) กำหนดให้ข้าวสารทุกชนิดรวมทั้งข้าวกล้องที่จะนำไปเก็บรักษานั้นจะต้องมีความชื้นไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) ความชื้น 13 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับความชื้นที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อการเก็บรักษาข้าวสารภายในเวลา 6 เดือน ซึ่งถ้าลดความชื้นของข้าวสารลงที่ 12 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2556)

2.6 สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (mycotoxin) เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยราสายใย (filamentous fungi) ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (Jarvis และคณะ, 2005) ราที่ผลิตสารพิษจากราที่สำคัญ ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* และ *Claviceps* (Zain, 2011) ซึ่งพบปนเปื้อนอยู่ในผลผลิตทางการเกษตรได้หลายชนิด ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว และระหว่างการเก็บรักษา องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) ได้ระบุว่า สินค้าทางการเกษตรจากทั่วโลกมีการปนเปื้อนสารพิษจากราประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจอย่างมีนัยสำคัญ (Jard และคณะ, 2011; Jarvis และคณะ, 2005; Zain, 2011) ตัวอย่างสารพิษจากราที่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ แสดงในตารางที่ 2.5 การบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษเหล่านี้ ทำให้เกิดอาการเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังทั้งในคนและสัตว์ ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 ราและสารพิษจากราที่มีความสำคัญต่อผลผลิตทางการเกษตร

สารพิษจากรา	ราที่ผลิต
อะฟลาทอกซินบี 1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
โอคราทอกซินเอ	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> <i>Penicillium verrucosum</i>
ไทรโคทีซินส์	<i>Fusarium</i> sp., <i>Myrothecium</i> sp., <i>Stachybotrys</i> sp., <i>Trichothecium</i> sp.,
ซีราลีโนน	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
ฟูโมนิซินบี 1	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
เออร์โกต แอลคาลอยด์	<i>Claviceps</i> sp.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bennett และคณะ (2003)

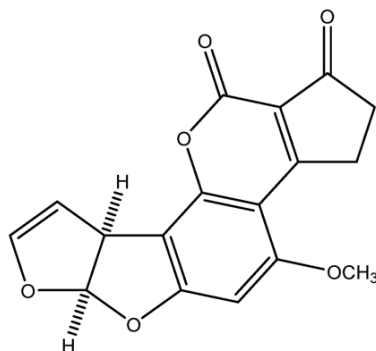
ตารางที่ 2.6 ความเป็นพิษของสารพิษจากราที่ส่งผลต่อคนและสัตว์

สารพิษจากรา	ความเป็นพิษ	อ้างอิง
อะฟลาทอกซินบี 1	ภาวะตับอักเสบ สารก่อมะเร็งตับ กดระบบภูมิคุ้มกัน	Jarvis และคณะ (2005) Zain (2011)
โอคราทอกซินเอ	ภาวะไตอักเสบ สารก่อมะเร็ง กดระบบ ภูมิคุ้มกัน พิษต่อทารกและตัวอ่อนในครรภ์ พิษต่อตับ	Jarvis และคณะ (2005)
ไทรโคทีซินส์	อาเจียน ท้องร่วง ภูมิแพ้	Bennett และคณะ (2003)
ซีราลีโนน	สารออกฤทธิ์แบบเอสโทรเจน ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์	Jarvis และคณะ (2005)
ฟูโมนิซินบี 1	พิษต่อระบบประสาท (ม้าและกระต่าย) บวมน้ำในปอด (สุกร) มะเร็งตับ (หนู) อาจทำให้เกิดมะเร็งหลอดอาหารในมนุษย์	Jarvis และคณะ (2005)
เออร์โกต แอลคาลอยด์	ปวดท้อง อาเจียน แสบร้อนที่ผิวหนัง นอนไม่หลับ ประสาทหลอน	Arroyo-Manzanares และคณะ (2014)

2.7 อะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เป็นกลุ่มของสารพิษจากราที่สำคัญ ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพและเศรษฐกิจทั่วโลก เป็นเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ถูกผลิตตามธรรมชาติโดยราสายใยในสกุล *Aspergillus* ในธรรมชาติจะพบอะฟลาทอกซิน 4 ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1) อะฟลาทอกซินบี 2 (aflatoxin B2) อะฟลาทอกซินจี 1 (aflatoxin G1) และอะฟลาทอกซินจี 2 (aflatoxin G2) ที่พบปนเปื้อนได้ในอาหารและอาหารสัตว์ โดยอะฟลาทอกซินกลุ่มบีจะเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ในขณะที่อะฟลาทอกซินกลุ่มจีจะเรืองแสงสีเขียว (Markaki, 2010) นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินบางชนิดสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้สารเกิดอนุพันธ์ เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 (aflatoxin M1) และอะฟลาทอกซินเอ็ม 2 (aflatoxin M2) ที่เกิดจากวัวได้รับอาหารสัตว์ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 เข้าสู่ร่างกายและเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และอะฟลาทอกซินเอ็ม 2 ตามลำดับ ซึ่งมักพบปนเปื้อนในนมและผลิตภัณฑ์จากนม (Bianco และคณะ, 2012; Yunus และคณะ, 2011) ในบรรดาอะฟลาทอกซินทั้งหมด อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษที่พบได้บ่อยและมีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมา ได้แก่ อะฟลาทอกซินจี 1 อะฟลาทอกซินบี 2 และอะฟลาทอกซินจี 2 ตามลำดับ (McLean และคณะ, 1995)

อะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1, AFB1) มีโครงสร้างประกอบด้วย บิสฟูราโน คูมาริน (bisfurano coumarins) และไซโคลเพนทาโนน (cyclopentanone) (Markaki, 2010) (ภาพที่ 2.2) มีชื่อ IUPAC คือ 2,3,6aR,9aS-tetrahydro-4-methoxy-1H,11H-cyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione (Pubchem, 2016) สูตรทางเคมี $C_{17}H_{12}O_6$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 312 กรัมต่อโมล ลักษณะทางกายภาพของอะฟลาทอกซินบี 1 เป็นผลึกไม่มีสี จุดหลอมเหลวเท่ากับ 268-269 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในสารละลายมีขั้วปานกลางหรือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เมทานอล และไดเมทิลซัลไฟด์ และละลายน้ำได้ที่ 1-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อะฟลาทอกซินบี 1 ในรูปของผลึกจะมีความเสถียรเมื่ออยู่ในภาวะไม่มีแสงและรังสีอัลตราไวโอเล็ต และทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่า 100 องศาเซลเซียส ในขณะที่ในรูปของสารละลายในคลอโรฟอร์มหรือเบนซีน ต้องเก็บในที่เย็นและมีดีจะมีความเสถียรและเก็บได้เป็นปี (Deshpande, 2002)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1 (Jiang และคณะ, 2015)

2.7.1 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นพิษร้ายแรงต่อมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดอาการได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง อาการเฉียบพลันเกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในปริมาณสูง ทำให้เกิดอาการตกเลือด ตับวายเฉียบพลัน บวม น้ำ จนถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Khlanguiset และคณะ, 2011) ปริมาณของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่เมื่อบริโภคแล้วจะทำให้เกิดอาการเฉียบพลันหรือเสียชีวิตร้อยละ 50 (lethal dose, LD₅₀) ในหนูและหนูแฮมสเตอร์ เท่ากับ 9.0 และ 10.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ขณะที่ในเป็ดและลิง มีค่า LD₅₀ อยู่ระหว่าง 0.34-0.56 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Deshpande, 2002) ในปี 2004 มีรายงานการพบผู้ป่วยตับวายเฉียบพลันจำนวน 317 คน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งสาเหตุคาดว่าเกิดจากการบริโภคข้าวโพดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 สูงถึง 4400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Azziz-Baumgartner และคณะ, 2005)

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นพิษต่อตับซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายแรกเมื่อร่างกายได้รับเข้าไป สารพิษนี้จะกระตุ้นให้เซลล์ตับกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะในคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งสูงกว่าคนปกติ (Khlanguiset และคณะ, 2011) International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในกลุ่ม 1 คือ เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 2012) Li และคณะ (2001) ได้ศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ของข้าวโพดในมณฑลกุ้ยโจว (Guangxi) ประเทศจีน พบว่า ตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 สูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (9-2496 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่ง 76 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ปนเปื้อนทั้งหมดมีความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินเกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นจึงคาดว่า การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดนี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับของประชากรในมณฑลกุ้ยโจว นอกจากนี้ จากการรายงานของ Asim และคณะ (2011) พบว่า การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งตับของประชากรใน

ประเทศกำลังพัฒนาอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ประเทศเคนยา ไทย และโมซัมบิก พบอัตราการเกิดมะเร็งตับ (ต่อประชากร 100000 คน) เท่ากับ 4-2, 6-0 และ 25-4 ตามลำดับ โดยปริมาณของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ได้รับในแต่ละวันของประเทศเหล่านี้เท่ากับ 10-0, 45-0 และ 222-4 นาโนกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ตามลำดับ

อะฟลาทอกซินปี 1 ส่งผลต่อทารกหรือตัวอ่อนในครรภ์ Kihara และคณะ (2000) ศึกษาผลของอะฟลาทอกซินปี 1 ต่อลูกของหนูที่เกิดขึ้น โดยการฉีดอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ละลายใน dimethylsulfoxide ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน บริเวณใต้ผิวหนังของหนูที่วันที่ 11-14 และ 15-18 ของการตั้งครรภ์ พบว่า น้ำหนักแรกเกิดของหนูทั้งเพศผู้และเพศเมียมีค่าเฉลี่ยลดลง และหนูที่ได้รับอะฟลาทอกซินปี 1 ที่วันที่ 15-18 ของการตั้งครรภ์มีการรอดชีวิตของลูกแรกเกิดลดลง นอกจากนี้ ยังทำให้หนูมีพัฒนาการช้าลงทั้งทางด้านกายภาพและด้านพฤติกรรมของหนูในช่วงเวลาก่อนที่จะเลิกนม (preweaning period) และความสามารถในการเคลื่อนที่ร่วมกันบกพร่อง Wangikar และคณะ (2005) ศึกษาผลของอะฟลาทอกซินปี 1 ต่อตัวอ่อนในครรภ์ของกระต่าย โดยให้กินน้ำมันข้าวโพดผสมอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นเวลา 6-18 วัน พบว่า อะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ส่งผลต่อความผิดปกติภายในของตัวอ่อนกระต่าย

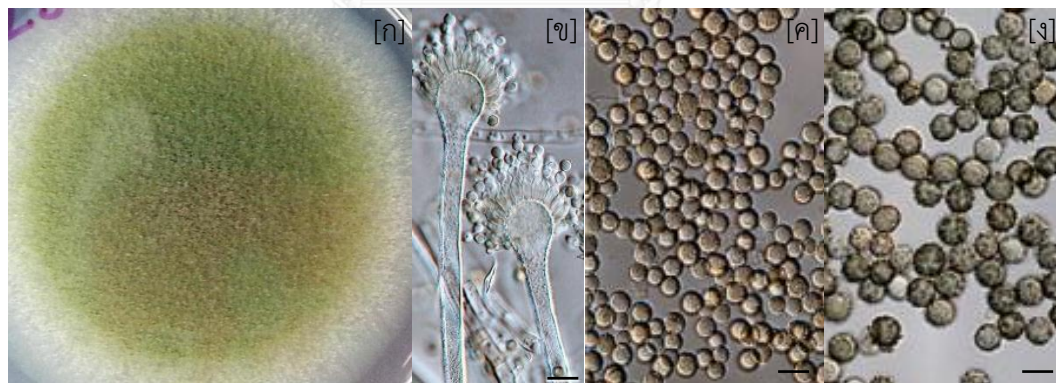
นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินปี 1 ยังกดระบบภูมิคุ้มกัน (Bluma และคณะ, 2008) จากศึกษาผลกระทบบของอะฟลาทอกซินปี 1 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า อะฟลาทอกซินปี 1 ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวและยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์รวมถึงกระบวนการอื่นๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน (Bodine และคณะ, 1984) และยังทำให้เกิดการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งแบบ apoptosis และ necrosis (Al-Hammadi และคณะ, 2014)

2.7.2 ราที่ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 (aflatoxigenic fungi)

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และเจริญได้บนสารอินทรีย์เกือบทุกชนิด ราบางชนิดสามารถผลิตสารพิษจากรา ทำให้เกิดการปนเปื้อนทั้งในอาหารคนและสัตว์ได้ (Kamika และคณะ, 2011) ราที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 คือ ราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamaraii* และ *A. bombysis* (Bluma และคณะ, 2008; Riba และคณะ, 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. flavus* และ *A. parasiticus* เป็นราที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดในเขตร้อน (tropical) และกึ่งร้อน (subtropical) ทั่วโลก เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย และธัญพืชอื่นๆ (Cary

และคณะ, 2011; Khlangwiset และคณะ, 2011; Riba และคณะ, 2010) ในขณะที่ *A. nomius*, *A. tamaris* และ *A. bombysis* พบการปนเปื้อนน้อยกว่า (Bennett และคณะ, 2003; Zain, 2011) ราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ เช่น เส้นผ่านศูนย์กลางของ vesicles มีขนาดตั้งแต่ 10-65 ไมโครเมตร โคโลนีและ conidial head มีสีเขียวอมเหลือง สีเหลือง หรือสีน้ำตาล conidia มีรูปร่างกลม กลมรี มีทั้งผนังบาง หนา เรียบและขรุขระ โดยลักษณะและขนาดของ conidia จะขึ้นอยู่กับชนิดของรา เช่น *A. flavus* มีโคโลนีและ conidial head สีเขียวอมเหลือง ลักษณะของ conidia มีรูปร่างกลม ผนังหนา เรียบ และมีขนาด 3-8 ไมโครเมตร ขณะที่ลักษณะ conidia ของ *A. parasiticus* มีรูปร่างกลม ผนังหนา ขรุขระ และมีขนาด 4-7 ไมโครเมตร (Bhatnagar และคณะ, 2014; Pitt และคณะ, 2009) (ภาพที่ 2.3)

ราเหล่านี้สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรได้ ตั้งแต่ขั้นตอนก่อนการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว และระหว่างการเก็บรักษา โดยมีอุณหภูมิและความชื้นของสิ่งแวดล้อม รวมถึงปริมาณความชื้นของซับสเตรตที่เหมาะสม เป็นปัจจัยหลักที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารพิษของรา (Bennett และคณะ, 2003; Bluma และคณะ, 2008; Khlangwiset และคณะ, 2011) *A. flavus* และ *A. parasiticus* เจริญและผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25–35 องศาเซลเซียส และที่ความชื้น 85–95 เปอร์เซ็นต์ (Rustom, 1997; Rustom และคณะ, 1993)



ภาพที่ 2.3 *A. flavus* ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA [ก], ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [ข] (Houbraken และคณะ, 2014), และลักษณะ conidia [ค] และลักษณะ conidia ของ *A. parasiticus* [ง] (สเกล = 10 ไมโครเมตร) (Varga และคณะ, 2011)

2.7.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษจากราที่พบปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดทั่วโลกทั้งในรัฐพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง (Abbas, 2005; Bhatnagar-Mathur และคณะ, 2015) เมล็ดพืชน้ำมัน เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย (Bhatnagar-Mathur และคณะ, 2015; Riba และคณะ, 2010) ถั่วต่างๆ เช่น อัลมอนต์ พิตาชิโอ (Abbas, 2005; Yao และคณะ, 2015) รวมถึงผลไม้อบแห้ง และเครื่องเทศ (Afssa, 2006) จากการศึกษาของ Riba และคณะ (2010) ในประเทศแอลจีเรียพบว่า ข้าวสาลีและผลิตภัณฑ์แปรรูปจำนวน 108 ตัวอย่าง ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 คิดเป็น 56.6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ระหว่าง 0.13–37.42 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Kamika และคณะ (2011) ศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในถั่วลิสงจากสาธารณรัฐประชาธิปไตยคองโกพบว่า ถั่วลิสงที่เก็บช่วงฤดูแล้งมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนระหว่าง 1.5–390 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ถั่วลิสงที่เก็บช่วงฤดูฝนมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนสูงขึ้น (12–937 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง ถั่วลิสงที่เก็บจากทั้งสองฤดูมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนสูงเกินที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดไว้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Set และคณะ (2010) ศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในพิตาชิโอและพริกป่นประเทศตุรกีพบว่า พิตาชิโอปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 48 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 95 ตัวอย่าง คิดเป็น 50.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0.007–7.72 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่นมีจำนวน 19 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 82 ตัวอย่าง คิดเป็น 23.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนสูงสุด 89.99 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

2.7.4 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว

ข้าวเป็นหนึ่งในรัฐพืชที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในปริมาณสูง (Kumar และคณะ, 2008) เนื่องจากข้าวมีสารอาหารและองค์ประกอบที่ส่งเสริมการเจริญของรา โดยเฉพาะ *A. flavus* ที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนในข้าว (Liu และคณะ, 2006; Reddy และคณะ, 2009) ซึ่งการปนเปื้อนราและอะฟลาทอกซินบี 1 สามารถเกิดได้ตั้งแต่ช่วงก่อนเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ข้าวที่อยู่ในแปลงปลูกที่มีบาดแผลหรือถูกทำลายจากแมลงศัตรูพืชเอื้อต่อการเจริญของราและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้นอกจากนี้ กระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสมทำให้มีความชื้นสูงเกินไป จะช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราให้สูงขึ้น (Bhatnagar-Mathur และคณะ, 2015; Kumar และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2.7 แสดงตัวอย่างรายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวจากหลายพื้นที่ทั่วโลก เช่น ประเทศเกาหลี Park และคณะ (2004) รายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าว โดยพบการปนเปื้อนเพียง 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 88 ตัวอย่าง (6 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณปนเปื้อน 2.1–7.7 นาโนกรัมต่อกรัม และปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 4.8 นาโนกรัมต่อกรัม Nguyen และคณะ (2007) พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ของข้าวในประเทศเวียดนามจำนวน 35 ตัวอย่างจากทั้งหมด 51 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยและสูงสุด เท่ากับ 3.31 และ 29.8 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากการศึกษาของ Reiter และคณะ (2010) พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวบาสมาดิ ข้าวกล้อง ข้าวเมล็ดยาว ข้าวเมล็ดสั้น และข้าวพองที่ซื้อจากตลาดในเมืองเวียนนา ประเทศออสเตรเลียจำนวน 15 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 81 ตัวอย่าง มีปริมาณการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0.45–9.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดย 3 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนสูงสุดมีปริมาณเท่ากับ 2.16, 2.85 และ 9.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Sales และคณะ (2005) ได้ตรวจพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ของข้าวกล้องในประเทศฟิลิปปินส์จำนวน 9 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณการปนเปื้อนและการปนเปื้อนเฉลี่ย เท่ากับ 0.03-8.33 และ 2.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวที่นำเข้าจากประเทศไทยจำนวน 9 ตัวอย่างจากทั้งหมด 12 ตัวอย่าง (75 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ยและสูงสุดเท่ากับ 0.12 และ 1.08 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ Asghar และคณะ (2014) ตรวจพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ของข้าวกล้องในประเทศปากีสถาน จำนวน 250 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 262 ตัวอย่าง (95.4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณการปนเปื้อนและการปนเปื้อนเฉลี่ยของอะฟลาทอกซินปี 1 เท่ากับ 1.07-24.65 และ 3.80 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ Nisa และคณะ (2016) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม (อะฟลาทอกซินปี 1, ปี 2, จี 1, และจี 2) ในข้าวกล้องจากภายในประเทศปากีสถานและนำเข้าจากต่างประเทศ พบว่า ข้าวกล้องภายในประเทศปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมจำนวน 23 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 25 ตัวอย่าง (92 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีจำนวนมากกว่าข้าวกล้องที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งปนเปื้อนเพียง 12 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 25 (48 เปอร์เซ็นต์)

สำหรับปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องของประเทศไทยนั้น ได้มีรายงานจากสมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย ในปี พ.ศ. 2551 ว่า Swedish Nation Food Administration ตรวจพบอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวกล้องหอมมะลิของไทยที่ส่งออกไปยังประเทศสวีเดน เท่ากับ 7.4 ± 1.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าสูงเกินที่กำหนดไว้ (2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ทำให้มีการเรียกคืนสินค้าดังกล่าวออกจากท้องตลาด และ European Union (EU) ได้ออกประกาศเตือนในระบบ

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) จากปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์และการส่งออกข้าวของไทยในอนาคตได้ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2551)

ตารางที่ 2.7 รายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าว

ประเทศ	ชนิดข้าว	ปริมาณปนเปื้อน*	อ้างอิง
เอกวาดอร์	ข้าว	6.8-40	Mühlemann และคณะ (1997)
สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์	ข้าว	1.2-16.5	Osman และคณะ (1999)
เกาหลี	ข้าว	2.1-7.7	Park และคณะ (2004)
ฟิลิปปินส์	ข้าวกล้อง	0.03-8.33	Sales และคณะ (2005)
	ข้าวสาร	ND-1.97	
เวียดนาม	ข้าวสาร	ND-0.04	Sales และคณะ (2005)
ไทย	ข้าว	ND-1.08	Sales และคณะ (2005)
อินเดีย	ข้าวนี้้ง	<5-361	Toteja และคณะ (2006)
ไนจีเรีย	ข้าว	20-1,642	Makun และคณะ (2007)
เวียดนาม	ข้าว	3.31	Nguyen และคณะ (2007)
อินเดีย	ข้าว	0.1-308	Reddy และคณะ (2009)
อิหร่าน	ข้าวสาร	1.89	Mazaheri (2009)
ออสเตรเลีย	ข้าวบาสมати	0.45-9.86	Reiter และคณะ (2010)
	ข้าวกล้อง		
	ข้าวเมล็ดยาว		
	ข้าวเมล็ดสั้น		
แคนาดา	ข้าว	1.44-7.14	Bansal และคณะ (2011)
เม็กซิโก	ข้าวสาร	4.5-8.1	Suarez-Bonnet และคณะ (2013)
สเปน	ข้าวสาร	0.8-91.7	Suarez-Bonnet และคณะ (2013)
ปากีสถาน	ข้าวกล้อง	1.07-24.65	Asghar และคณะ (2014)

*หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ND: not detected

2.7.5 การควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร

จากรายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดทั่วโลก คนและสัตว์มีความเสี่ยงที่จะได้รับสารพิษโดยตรงจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 และส่งผลร้ายแรงต่อสุขภาพ อีกทั้ง อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษที่เสถียรและทำลายได้ยาก ดังนั้น หลายประเทศทั่วโลกจึงมีข้อกำหนดควบคุมปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น ในทวีปยุโรป คณะกรรมาธิการยุโรป (The commission of the European Communities, CEC) กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 สูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรต่างๆ (ตารางที่ 2.8) เช่น ถั่วลิสง ข้าว และผลไม้อบแห้ง เท่ากับ 8.0, 5.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (European Commission, 2010) ประเทศเกาหลีกำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ตกค้างในอาหารได้ไม่เกิน 10 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม (Park และคณะ, 2004) และอีกกว่า 61 ประเทศทั่วโลก ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 สูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารอยู่ระหว่าง 1–20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Wood, 2015)

นอกจากนี้ องค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration, FDA) รวมไปถึงประเทศเม็กซิโก และจีน ได้กำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (อะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1 และ จี 2) ปนเปื้อนในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Liu และคณะ, 2006) สำหรับประเทศไทย อนุญาตให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน (กระทรวงสาธารณสุข, 2529)

ตารางที่ 2.8 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรต่างๆ ของคณะกรรมาธิการยุโรป

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ถั่วลิสง และเมล็ดพืชน้ำมัน	8
อัลมอนด์ พิตาชิโอ	8
ผลไม้อบแห้ง	5
ธัญพืช	2
ข้าวโพด ข้าว	5
เครื่องเทศ	5

ที่มา: ดัดแปลงจาก European Commission (2010)

2.8 การตรวจหาที่ปนเปื้อนในอาหาร

เราสามารถปนเปื้อนในอาหารได้ตั้งแต่เป็นวัตถุดิบไปจนถึงกระบวนการแปรรูป ดังนั้น เมื่อภาวะเหมาะสมราจะเจริญและผลิตสารพิษจากราทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร (fungal spoilage) โดยเฉพาะอาหารที่มีองค์ประกอบหลักเป็นแป้ง เช่น ธัญพืชต่างๆ รวมถึงข้าว การตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดการเสื่อมเสียดังกล่าวได้ วิธีที่นิยมใช้ในตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหาร ได้แก่ วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาพื้นฐาน วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

2.8.1 วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาพื้นฐาน (conventional techniques)

1) Direct examination

เป็นวิธีเบื้องต้นที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของราโดยการสังเกตการเจริญของราบนผิวอาหารด้วยตาเปล่า หรือกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) ซึ่งควรตรวจสอบทันทีหลังจากมีการเจริญของราบนอาหาร เพราะการสัมผัสหรือเคลื่อนย้ายอาหารอาจทำให้โครงสร้างที่สำคัญของราหลุดไป จากนั้น อาจตรวจสอบเพิ่มเติมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และคัดแยกยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เหมาะสมต่อไป (Samson และคณะ, 2004)

2) Direct plating

เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจหาหรือบอกปริมาณของจุลินทรีย์หรือราที่ยังมีชีวิตที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ซึ่งขั้นตอนการคัดแยกที่ปนเปื้อนในอาหารที่มีลักษณะเป็นอนุภาคเล็กๆ (food particles) เช่น ธัญพืช และถั่วต่างๆ ทำได้โดยการวางตัวอย่างอาหารลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยตรง ซึ่งส่วนมากตัวอย่างอาหารที่ใช้สำหรับวิเคราะห์จะผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface disinfection) เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่นที่ไม่ต้องการออก โดยการแช่ตัวอย่างอาหารลงใน 0.4 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายคลอรีนเป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้น นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ จำนวน 6-20 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ ขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นับเมล็ดที่มีการเจริญหรือติดเชื้อของรา รายงานผลจากการคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราของตัวอย่างอาหาร (Hocking และคณะ, 2006; Pitt และคณะ, 2009; Samson และคณะ, 2004)

3) Dilution plating

เป็นวิธีนับจำนวนราที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลวหรือผสมรวมถึงตัวอย่างอาหารที่เป็นอนุภาคเล็กๆ เช่น เมล็ดธัญพืช การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ทำได้โดยเจือจางตัวอย่างใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเพปโทนในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ราที่ปนเปื้อนในตัวอย่างกระจายตัวได้ดีขึ้น ในกรณีที่ตัวอย่างอาหารมีลักษณะแข็ง เช่น เมล็ดธัญพืช และถั่วต่างๆ ควรแช่ตัวอย่างในสารละลายเพปโทนเป็นเวลา 30–60 นาที ก่อนนำไปตีบด อาจนำตัวอย่างไปเจือจางต่อให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้น ดูดตัวอย่างในสารละลายเพปโทนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อจนแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีของราที่เจริญบนจานเพาะเชื้อในช่วง 10–150 โคโลนี รายงานผลเป็น Colony Forming Units (CFU) ต่อ มิลลิลิตรหรือต่อกรัมของอาหาร (Hocking และคณะ, 2006; Pitt และคณะ, 2009; Samson และคณะ, 2004)

4) การจำแนกและการระบุชนิดของราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การปนเปื้อนของราในอาหารเป็นการเจริญร่วมกันของราหลายชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคัดแยกให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ของราที่ต้องการ ก่อนนำไปจำแนกและระบุชนิดของรา ทำได้โดยเปียสลายใยหรือสปอร์ของราที่ต้องการจากจานเพาะเชื้อที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อน แล้วถ่ายเชื้อลงบนจานเพาะเชื้ออันใหม่โดยจุดลงบริเวณตรงกลาง เพื่อให้รามีการเจริญของโคโลนีและสร้างสปอร์ได้ดี (Bellí Martí, 2006) จากนั้น นำโคโลนีบริสุทธิ์ของราที่แยกได้ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) และลักษณะโครงสร้างของรารายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic characters) เช่น ลักษณะ conidia, conidiophores และ conidial heads ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกและการระบุชนิดของรา (Pitt และคณะ, 2009; Samson และคณะ, 2004)

การตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาพื้นฐาน เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีขั้นตอนและอาศัยเครื่องมือที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตาม ยังเป็นวิธีที่ใช้เวลาและต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญ นอกจากนี้ อาจเกิดข้อผิดพลาดหรือความคลาดเคลื่อนจากการปนเปื้อนระหว่างการวิเคราะห์ได้ (Atkins และคณะ, 2004)

2.8.2 วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular techniques)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นวิธีที่ได้รับ ความนิยมสำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของราในผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผล รวดเร็ว ราชที่ต้องการตรวจสอบไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีประสิทธิภาพใน การตรวจสอบแม้อยู่ในองค์ประกอบซับซ้อน โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับราที่ ต้องการตรวจสอบได้ (Schena และคณะ, 2004) จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถ จัดจำแนกและระบุชนิดของราได้ เช่น การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสเพื่อตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ *A. flavus* (Niessen, 2007) และ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ (Real-time PCR) เป็นวิธีที่ใช้ฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจจับดี เอ็นเอ สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอได้แบบทราบผลอย่างรวดเร็ว ซึ่งเทคนิคนี้มีความแม่นยำและ นำเชื่อถือ (Schena และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคนี้มีข้อจำกัดบางประการ เช่น วิธีการในการวิเคราะห์มีความซับซ้อน สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ราคาสูง และการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด (Santos และคณะ, 2010)

2.8.3 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological techniques)

1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

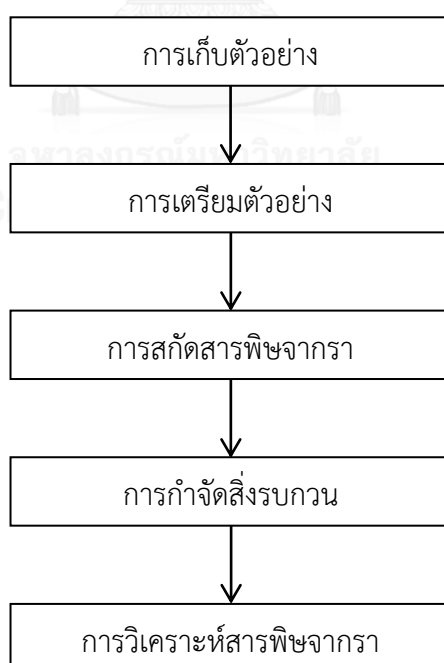
เป็นวิธีที่อาศัยหลักการพื้นฐานการจับกันของแอนติเจน (antigen) และ แอนติบอดี (antibody) ซึ่งตรวจจับแอนติเจนที่ผลิตโดยโปรตีนบนผนังเซลล์ของรา โดยมีทั้ง แอนติเจนที่มาจากองค์ประกอบพื้นฐานของราสามารถบ่งชี้ราได้ทั่วไป เช่น ราในสกุล *Penicillium*, *Mucor* และ *Fusarium* ที่พบทั่วไปในอาหาร และแอนติเจนที่มีความจำเพาะกับราในบางชนิดหรือ บางราสกุลเท่านั้น เช่น *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* และ *Rhizopus stolonifer* ในมะเขือเทศ รวมทั้งสามารถตรวจหาการปนเปื้อนของราได้ทั้งในอาหารที่ผ่านและไม่ ผ่านกระบวนการให้ความร้อน วิธี ELISA ยังใช้ตรวจหาการที่ผลิตอะฟลาทอกซิน (aflatoxigenic fungi) โดยใช้แอนติบอดีจาก *A. flavus* และ *A. parasiticus* (Pitt และคณะ, 2009) นอกจากนี้ ยังมี รายงานการใช้ ELISA ตรวจหาการปนเปื้อนของราสกุล *Fusarium* ในแป้งข้าวโพด (Iyer และคณะ, 2003) ธัญพืช (Rohde และคณะ, 2005) และข้าวโพด (Meirelles และคณะ, 2006) วิธีนี้มี ความจำเพาะสูง รวดเร็วและง่ายต่อการใช้งาน แต่ผลการทดลองอาจถูกรบกวนจากสิ่งปนเปื้อนและ เกิดการข้ามไปจับกับเป้าหมายอื่น (cross reactivity) ได้ (Pitt และคณะ, 2009)

2) Latex agglutination

เป็นวิธีที่ใช้แอนติบอดีเคลือบลงบนเม็ดบีดส์ที่ทำจากน้ำยาง (latex beads) เพื่อตรวจหาสารพิษในอาหาร ซึ่งพบว่า เม็ดบีดส์ขนาด 0.8 ไมโครเมตรที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่ผลิตจาก *Penicillium digitatum* มีความจำเพาะกับราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (detection limits) เท่ากับ 5-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของแอนติเจนบริสุทธิ์ โดยชุดทดสอบทางการค้าของวิธีนี้ นิยมใช้สำหรับการตรวจคัดเลือกราทิปนเปื้อนในธัญพืชและอาหารแปรรูปเชิงคุณภาพ (Pitt และคณะ, 2009)

2.9 การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหาร

ในการตรวจหาสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารหรือผลผลิตทางการเกษตร บางครั้งตัวอย่างที่วิเคราะห์อาจมีการปนเปื้อนของสารพิษในปริมาณต่ำ ดังนั้น ความไว ความน่าเชื่อถือและความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์จึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากความผิดพลาดในการวิเคราะห์อาจส่งผลให้อาหารและผลผลิตทางการเกษตรไม่เป็นที่ยอมรับ (Rahmani และคณะ, 2009) โดยทั่วไปสารพิษจากราจะปนเปื้อนในอาหารอย่างไม่สม่ำเสมอ จึงต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ ซึ่งขั้นตอนหลักในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารประกอบด้วย การสกัดสารพิษจากรา การกำจัดสิ่งรบกวน และการวิเคราะห์สารพิษจากรา (Pascale, 2009) ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหาร

2.9.1 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจหาการปนเปื้อนของสารพิษจากกราเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษจากกราได้ โดยตัวอย่างที่เก็บมาต้องเป็นตัวแทนที่แท้จริงของตัวอย่างทั้งหมด นอกจากนี้ลักษณะของตัวอย่างยังส่งผลต่อการกระจายตัวที่ต่างกันของสารพิษจากกรา ตัวอย่างที่เป็นของเหลวสามารถอนุมานได้ว่ามีการกระจายตัวของสารพิษจากกราที่สม่ำเสมอ ในขณะที่ ตัวอย่างที่เป็นของแข็งและมีอนุภาคขนาดใหญ่ โดยเฉพาะผลผลิตทางการเกษตรอาจมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอและแตกต่างกันมากของสารพิษจากกรา ดังนั้น การกระจายตัวของสารพิษจากกราในตัวอย่างจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่นำมาใช้เป็นตัวกำหนดเกณฑ์ในการควบคุมการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ วิธีการหรือแบบแผนในการเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดนั้นยังมีความจำเพาะต่อวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยมีหลายองค์กรทั่วโลกได้พัฒนาวิธีการขึ้นเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากกราในตัวอย่าง โดยเฉพาะอาหารและอาหารสัตว์ เช่น The Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration (GIPSA) of the United States Department of Agriculture (USDA) ได้พัฒนาแนวทางโดยทั่วไปของการเก็บตัวอย่างธัญพืช (GIPSA, 1995) ข้าว (GIPSA, 1994) และฮอปส์ (GIPSA, 1998) (Krska และคณะ, 2008; Yao และคณะ, 2015)

2.9.2 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ช่วยให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลา เนื่องจาก ต้องมีการลดขนาดอนุภาคตัวอย่างโดยการบดหรือป่น การทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) และการเตรียมสารละลาย ก่อนนำไปสกัด โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ขนาดของตัวอย่างจะส่งผลต่อปริมาณสารพิษจากกราที่จะสกัดออกมาได้ ซึ่งปัจจัยที่จะส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความแม่นยำนั้นขึ้นอยู่กับ ความรวดเร็วในการวิเคราะห์ ทักษะด้านเทคนิคต่างๆ ที่จำเป็นในการวิเคราะห์พื้นฐานทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ และขนาดของตัวอย่าง ขั้นตอนการสกัดและการกำจัดสิ่งรบกวน (Gilbert, 1999; Krska และคณะ, 2008)

2.9.3 การสกัดสารพิษจากกรา

การสกัดเป็นขั้นตอนเอาสารพิษจากกรารออกจากตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนโดยใช้ตัวทำละลาย ซึ่งการเลือกใช้ตัวทำละลายนั้นขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีของสารพิษจากกราที่ต้องการวิเคราะห์ องค์ประกอบของตัวอย่างอาหาร และความปลอดภัยในการเลือกใช้ (Yao และคณะ, 2015) ตัวทำละลายที่ใช้สกัดสามารถใช้ได้ทั้งแบบชนิดเดียวหรือแบบตัวทำละลายผสม ตัวทำละลายที่นิยมใช้

ในการสกัดส่วนมากเป็นตัวทำละลายมีขี้้ว เช่น เมทานอล อะซิโตน อะซิโตนไตรล์ โทลูอิน และ คลอโรฟอร์ม เทคนิคที่ใช้ในการสกัดสารพิษจากรา ได้แก่ liquid-liquid extraction เป็นวิธีการสกัดสารพิษจากราออกจากตัวอย่างที่เป็นของเหลว เช่น น้ำนม และ solid-liquid extraction เป็นวิธีการสกัดสารพิษจากราออกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น ธัญพืช (Rahmani และคณะ, 2009; Turner และคณะ, 2009)

2.9.4 การกำจัดสิ่งรบกวน

การกำจัดสิ่งรบกวนเป็นขั้นตอนที่จำเป็นหลังจากขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลาย เพื่อกำจัดสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่าง ทำให้สารพิษจากราที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก่อนการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟี เนื่องจากสารพิษจากราที่สกัดได้นั้นอาจยังมีสารอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องปนเปื้อนอยู่ ซึ่งอาจรบกวนความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์ (Rahmani และคณะ, 2009) วิธีที่นิยมใช้ในการกำจัดสิ่งรบกวน เช่น solid phase extraction (SPE) และ immunoaffinity column (IAC)

solid phase extraction (SPE) เป็นคอลัมน์ที่มีตัวดูดซับเป็นของแข็ง เช่น ซิลิกา เกาะอยู่ภายใน ทำหน้าที่จับกับสารพิษจากราที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ จะถูกชะออกจากคอลัมน์ จากนั้น จึงชะสารพิษจากราที่จับกับตัวดูดซับออกด้วยตัวทำละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์ สารพิษจากราที่ผ่านคอลัมน์ SEP จึงมีความบริสุทธิ์มากขึ้น (Yao และคณะ, 2015) SPE เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและสามารถใช้ได้กับสารพิษจากราที่มีช่วงความเข้มข้นที่กว้าง แต่อย่างไรก็ตาม SPE มีข้อจำกัดในเรื่องของภาวะสำหรับการสกัดสารพิษจากราแต่ละชนิด รวมถึงความเป็นกรดเบส ตัวทำละลาย และความเข้มข้นไอออนของตัวอย่างที่ส่งผลต่อสมรรถนะการทำงานของ SPE (Rahmani และคณะ, 2009; Turner และคณะ, 2009)

immunoaffinity column (IAC) เป็นวิธีการกำจัดสิ่งรบกวนที่อาศัยการจับกันของ แอนติบอดีและแอนติเจนซึ่งเป็นหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับสารพิษจากราจะถูกตรึงอยู่บนของแข็งยึดเกาะ เช่น อะกาโรส ที่อยู่ในคอลัมน์ เมื่อสารสกัดหยาบผ่านคอลัมน์ สารพิษจากราจะจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงไว้ องค์ประกอบรบกวนอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะกับแอนติบอดีจะไหลผ่านคอลัมน์ออกไป สารพิษจากราที่ติดกับแอนติบอดีจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (Rahmani และคณะ, 2009; Urusov และคณะ, 2010) IAC เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะสูง สารพิษจากราที่ได้มีความบริสุทธิ์ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ IAC ในทางการค้าสำหรับสารพิษจากราหลายชนิดได้รับการยอมรับจากองค์กรระดับโลก โดยถูกนำมาประยุกต์ใช้

เพื่อกำจัดสิ่งรบกวนในการตรวจหาสารพิษจากยาที่ปนเปื้อนในอาหารและอาหารสัตว์ตามวิธีมาตรฐาน เช่น Association of Analytical Communities (AOAC International) และ European Committee for Standardization (CEN) (De Saeger, 2011; Krska และคณะ, 2008) แต่อย่างไรก็ตาม IAC มีข้อจำกัดในเรื่องของราคาและไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เนื่องจากแอนติบอดีภายในคอลัมน์ถูกทำลายด้วยตัวทำละลาย (Rahmani และคณะ, 2009; Şenyuva และคณะ, 2010; Turner และคณะ, 2009)

2.9.5 การวิเคราะห์สารพิษจากยา

ในปัจจุบัน วิธีการวิเคราะห์สารพิษจากยานิยมใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีมาตรฐาน และใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นวิธีวิเคราะห์แบบรวดเร็ว วิธีมาตรฐานที่นิยม เช่น โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography หรือ TLC) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography หรือ HPLC) และโครมาโทกราฟีของเหลว/แมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography/mass spectrometry หรือ LC-MS) ในขณะที่วิธีวิเคราะห์แบบรวดเร็วที่นิยม เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1) วิธีมาตรฐาน

โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง เป็นวิธีแบบดั้งเดิมที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารพิษจากยา สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณ สารตัวอย่างจะถูกจุดลงบนเฟสคงที่ซึ่งนิยมใช้แผ่นกระดาษหรือแผ่นอลูมิเนียมที่ถูกเคลือบด้วยตัวดูดซับ เช่น ซิลิกา อลูมินา และเซลลูโลส จากนั้น นำเฟสคงที่วางลงในตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ ตัวทำละลายจะถูกดูดซึมและเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับพาสารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่ขึ้นไปด้วย ทำให้เกิดการแยกกันของสารและนำไปตรวจดูโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือฟลูออเรสเซนซ์ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว วิธีอ่านผลวิเคราะห์ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและราคาถูก จึงเหมาะสำหรับตรวจตัวอย่างที่มีจำนวนมากเพื่อคัดกรองเบื้องต้น (Rahmani และคณะ, 2009; Turner และคณะ, 2009)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษจากยาในเชิงปริมาณ ตัวอย่างสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ที่มีตัวดูดซับหรือเฟสคงที่บรรจุอยู่ จากนั้นตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่จะเป็นตัวพาให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับภายในคอลัมน์ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีอัตราการเคลื่อนที่แตกต่างกัน ทำให้สารแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน สารที่แยกได้ถูกตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจจับสัญญาณที่เป็นรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือฟลูออเรสเซนซ์ ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด ซึ่งสารพิษจากยาส่วนใหญ่มีองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ จึงทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยม

มากที่สุดในการตรวจหาสารพิษจากราที่ปนเปื้อนทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือมากกว่า เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Rahmani และคณะ, 2009; Turner และคณะ, 2009)

โครมาโทกราฟีของเหลว/แมสสเปกโตรเมทรี เป็นการวิเคราะห์สารโดยใช้วิธีร่วมกันระหว่างการแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว ซึ่งสารแต่ละชนิดจะถูกแยกตามคุณสมบัติทางเคมี จากนั้น โมเลกุลของสารจะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออน และระบุชนิดของสารโดยการวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี นิยมใช้เป็นวิธียืนยันการวิเคราะห์สารพิษจากราเนื่องจากมีจำเพาะและความไวสูง นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำๆ และตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราหลายชนิดพร้อมกันได้ (Rahmani และคณะ, 2009; Yao และคณะ, 2015)

การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีข้างต้น เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับจาก The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) และ The European Standardization Committee (CEN) เนื่องจากมีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์ (Pascale, 2009) แต่อย่างไรก็ตาม การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ราคาสูง อีกทั้ง ต้องอาศัยเจ้าหน้าที่หรือผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบรวดเร็วโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา สะดวกรวดเร็ว ประหยัดเวลา มีขั้นตอนที่เข้าใจได้ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูง จึงเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน (Rahmani และคณะ, 2009; Turner และคณะ, 2009; Yao และคณะ, 2015)

2) วิธีวิเคราะห์แบบรวดเร็ว

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีวิเคราะห์สารพิษจากราแบบรวดเร็วโดยใช้หลักการพื้นฐานการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ และวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องมืออ่านค่าของสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยาซึ่งขึ้นกับปริมาณของสารพิษจากราที่ต้องการวิเคราะห์ ปัจจุบันชุดทดสอบ ELISA เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและมีหลายรูปแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราทั้งเชิงปริมาณ เชิงกึ่งปริมาณ และเชิงคุณภาพ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง สามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำๆ ได้ รวดเร็วและง่ายต่อการใช้งาน และจำกัดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ แต่อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาของชุดทดสอบ ELISA อาจถูกรบกวนจากสารปนเปื้อนและเกิดการข้ามไปจับกับเป้าหมายอื่น (cross reactivity) ทำให้ผลการวิเคราะห์แบบผลบวกที่ผิดพลาด (false positives) หรือผลลบที่ผิดพลาด (false

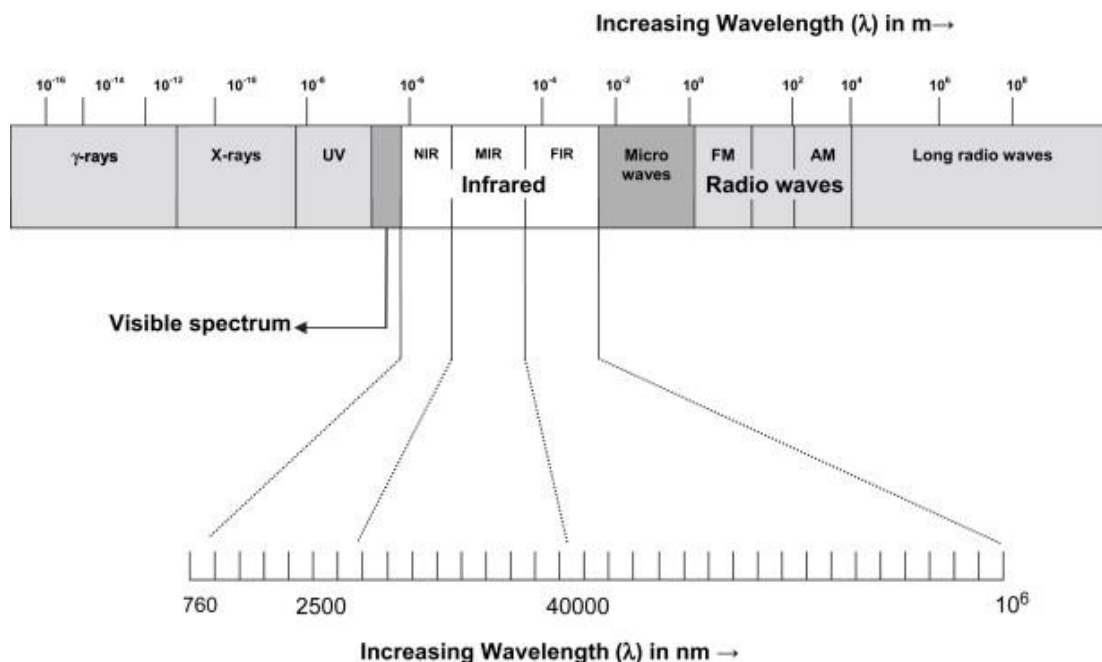
negatives) เกิดขึ้นได้ และสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารพิษจากราได้ในช่วงปริมาณที่จำกัด (Turner และคณะ, 2009; Urusov และคณะ, 2010; Yao และคณะ, 2015)

2.10 เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy, NIRS)

สเปกโทรสโกปี เป็นการศึกษาการวัดและวิเคราะห์รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) ที่สสารดูดกลืนเข้าไปหรือเปล่งออกมา สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic spectrum) ประกอบด้วยช่วงคลื่นที่มีความยาวคลื่นต่างๆ ตั้งแต่คลื่นวิทยุ (radio waves) จนถึงรังสีแกมมา (gamma rays) (ภาพที่ 2.5) รังสีแม่เหล็กไฟฟ้ามีคุณสมบัติเป็นคลื่น (wave) และอนุภาค (particle) ด้วยคุณสมบัติที่เป็นคลื่นของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าจึงสามารถเกิดปรากฏการณ์การสะท้อน (reflection) การหักเห (refraction) การเลี้ยวเบน (diffraction) หรือการกระเจิง (scattering) ได้นอกจากนี้ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมหรือโมเลกุลของสสารกับรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานในรูปแบบต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการวิเคราะห์ทางเคมีได้ (Pojić และคณะ, 2013; ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรังสีเนียร์อินฟราเรดที่มีช่วงความยาวคลื่น 800–2500 นาโนเมตร (12500-4000 ต่อเซนติเมตร) (ภาพที่ 2.5) กับสสารที่มีโมเลกุลประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน เช่น C-H, O-H, N-H หรือ S-H การดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดของโมเลกุลจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดของสสารที่มีความยาวคลื่นต่างๆ จะปรากฏในรูปแบบของเส้นสเปกตรัม เพื่อนำไปประมวลผลในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป (Agelet และคณะ, 2010; ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

รังสีเนียร์อินฟราเรด ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1800 โดย Sir William Herschel จากการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของความร้อน (heating effect) ในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ ของแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการแยกแสงด้วยแท่งแก้วปริซึมพบว่า ผลกระทบของความร้อนเกิดขึ้นสูงสุดในแถบแสงที่อยู่ถัดไปจากแสงสีแดง (red end) แต่ไม่สามารถมองเห็นสเปกตรัมได้ จึงเรียกช่วงรังสีที่ค้นพบว่า รังสีอินฟราเรด (infrared radiation หรือ IR) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ รังสีเนียร์อินฟราเรดหรืออินฟราเรดย่านใกล้ (near IR) รังสีอินฟราเรดย่านกลาง (mid IR) และรังสีอินฟราเรดย่านไกล (far IR) (ตารางที่ 2.9) (Hindle, 2007; ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)



ภาพที่ 2.5 สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้าและตำแหน่งของรังสีอินฟราเรด (Santos และคณะ, 2010)

ตารางที่ 2.9 การแบ่งช่วงของรังสีอินฟราเรด

ช่วงรังสีอินฟราเรด	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)
อินฟราเรดย่านใกล้ (near IR, NIR)	800-2500	12500-4000
อินฟราเรดย่านกลาง (mid IR, MIR)	2500-25000	4000-400
อินฟราเรดย่านไกล (far IR, FIR)	25000-100000	400-10

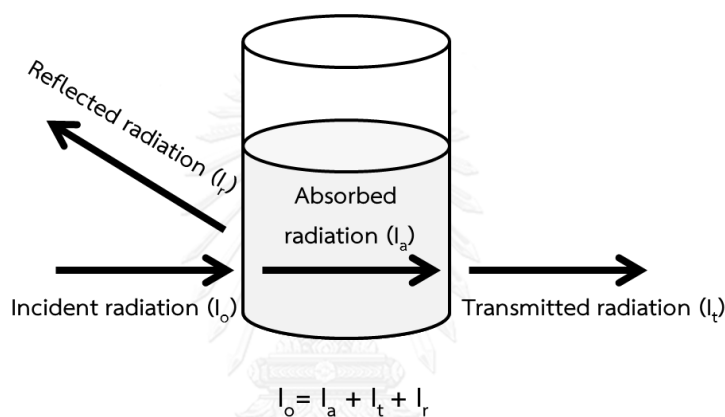
ที่มา: ศุมาพร เกษมสำราญ (2552)

รังสีอินฟราเรดแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วงตามระดับพลังงาน ได้แก่ รังสีอินฟราเรดช่วงคลื่นสั้น (short wavelength NIR, SWNIR) ความยาวคลื่นระหว่าง 800-1100 นาโนเมตร มีพลังงานสูงประมาณ 109-159 กิโลจูลต่อโมล สามารถทะลุทะลวงเข้าไปในเนื้อของตัวอย่างได้ถึง 1 เซนติเมตร จึงนิยมใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการข้อมูลลึกเข้าไปภายใน โดยลำแสงจะผ่านเข้าไปยังเนื้อใน ทำให้ได้ข้อมูลสเปกตรัมเนื้อในของตัวอย่างสูง เช่น การวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทผลไม้เปลือก โดยเฉพาะผลไม้เปลือกหนา รังสีอินฟราเรดช่วงคลื่นยาว (long wavelength NIR, LWNIR) ความยาวคลื่นระหว่าง 1100-2500 นาโนเมตร มีพลังงานต่ำประมาณ 48-109 กิโลจูลต่อโมล โดยลำแสงช่วงคลื่นยาวมีความสามารถทะลุทะลวงได้ไม่เกิน 5 มิลลิเมตร เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างทั่วไปทั้งของเหลวและของแข็ง (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

2.11 หลักการของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

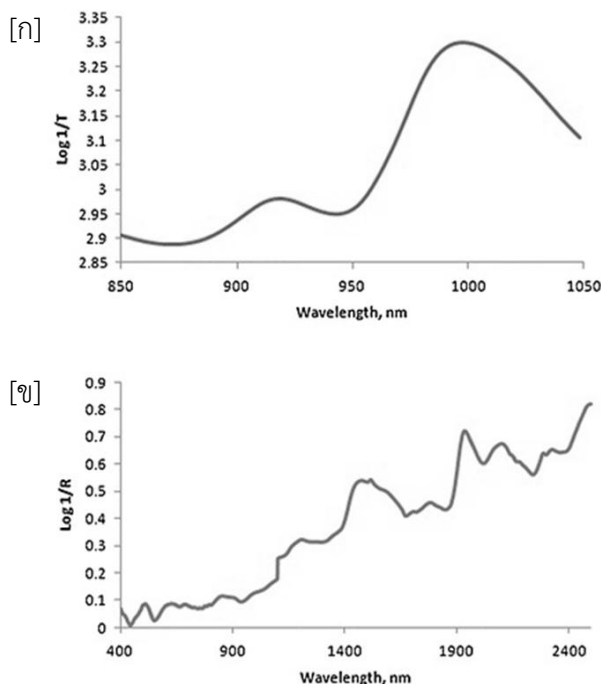
2.11.1 การเกิดอันตรกิริยาของรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร

เมื่อรังสีเนียร์อินฟราเรดเดินทางผ่านสสารหรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ จะเกิดอันตรกิริยา (interaction) กับอะตอมและโมเลกุลของสสารนั้น โดยทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของพันธะภายในโมเลกุล รังสีบางส่วนถูกดูดกลืน (absorption) บางส่วนผ่านออกมา (transmission) และบางส่วนเกิดการสะท้อน (reflection) (ภาพที่ 2.6) ปรากฏการณ์เหล่านี้อาจเกิดเพียงอันใดอันหนึ่งหรือเกิดขึ้นพร้อมกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง องค์ประกอบ หรือคุณสมบัติที่ต้องการวิเคราะห์ (Pojić และคณะ, 2013; ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)



ภาพที่ 2.6 รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาของรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร (ดัดแปลงจาก ศุมาพร เกษมสำราญ (2552))

เมื่อสสารเกิดอันตรกิริยากับรังสีเนียร์อินฟราเรด ความเข้มในการดูดกลืนเนียร์อินฟราเรดสเปกตรัม นิยมแสดงในรูปกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ในแกนตั้ง ซึ่งอาจแสดงเป็น $\log(1/T)$ ในกรณีวัดแบบแสงส่องผ่าน (transmittance) หรือ $\log(1/R)$ เป็นแกนแนวตั้ง ในกรณีวัดแบบแสงสะท้อน (reflectance) โดยมีความยาวคลื่น (wavelength) หรือจำนวนคลื่น (wavenumber) ในแกนแนวนอน (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของแบ็งซาลี แสดงในรูปของกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดแสงส่องผ่านกับความยาวคลื่น (850-1050 นาโนเมตร) [ก], กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดแสงสะท้อนกับความยาวคลื่น (400-2400 นาโนเมตร) [ข] (Pojić และคณะ, 2013)

2.11.2 กฎสำคัญที่เกี่ยวข้องกับค่าการดูดกลืนแสง

2.11.2.1 กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's Law)

กฎของแลมเบิร์ต กล่าวว่า เมื่อมีแสงเดี่ยวหรือแสงความยาวคลื่นเดียว (monochromatic light) ผ่านตัวกลางเนื้อเดียว (homogeneous) เป็นสัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้ไม่ขึ้นกับความเข้มของแสงที่ตกกระทบตัวกลางนั้นและความเข้มของแสงจะถูกแต่ละชั้นของตัวกลางดูดกลืนไว้ในสัดส่วนที่เท่ากัน สรุปได้ว่าเมื่อแสงความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียวกัน ความเข้มของลำแสงจะลดลงขึ้นกับความหนาของตัวกลาง (Osborne และคณะ, 1993; นิพนธ์ ตั้งคณาภิรักษ์, 2545)

2.11.2.2 กฎของเบียร์ (Beer's Law)

กฎของเบียร์ กล่าวว่า เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางดูดกลืนไว้จะแปรโดยตรงกับปริมาณของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงนั้น สรุปได้ว่า เมื่อโมเลกุลของสารแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน และไม่มีอิทธิพลจากตัวทำละลายจะทำให้สารดูดกลืนความเข้มแสงเท่ากัน (Osborne และคณะ, 1993; นิพนธ์ ตั้งคณาภิรักษ์, 2545)

ปริมาณความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่ลำแสงผ่าน จึงมีการรวมกฎทั้งสองเข้าไว้ด้วยกัน เป็นกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert's Law) ดังสมการ

$$A = \epsilon bc = \log \frac{I_0}{I}$$

เนื่องจาก T (transmittance) เท่ากับ $T = \frac{I_t}{I_0}$

ดังนั้น กรณีวัดแสงส่องผ่าน $A = \epsilon bc = \log \frac{I_0}{I_t} = \log \frac{1}{T}$

เมื่อ	A	คือ ค่าการดูดกลืนแสง
	ϵ	คือ สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงในระดับโมเลกุล เป็นค่าคงที่ของแต่ละสาร
	b	คือ ความหนาของตัวอย่าง
	c	คือ ความเข้มข้นของสารละลาย
	T	คือ ค่าแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่าง
	I_0	คือ ความเข้มแสงที่ตกกระทบตัวอย่าง
	I_t	คือ ความเข้มแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่าง

ทั้งนี้ กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต ตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ไม่มีแสงสะท้อนจากสารละลาย (แสงที่สะท้อนออกมาจากตัวอย่างเป็นศูนย์) จึงไม่สามารถนำมาประยุกต์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากตัวอย่าง (reflectance) ได้โดยตรง และ Kubelka-Munk พบว่า วัสดุที่มีความหนาเป็นอนันต์ (ไม่มีแสงทะลุผ่าน) ค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับแสงและการกระเจิงของแสงของวัสดุนั้น (Osborne และคณะ, 1986) ดังสมการ

$$\frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{k}{s} = \frac{\epsilon c}{s}$$

เมื่อ	R_∞	คือ ค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากตัวอย่างที่มีความหนาเป็นอนันต์
	k	คือ สัมประสิทธิ์การดูดซับแสง
	s	คือ สัมประสิทธิ์การกระเจิงแสง
	ϵ	คือ สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงในระดับโมเลกุล เป็นค่าคงที่ของแต่ละสาร
	c	คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

ต่อมา Norris ได้ทดลองวัดค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากสารละลายเปรียบเทียบกับค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากวัสดุมาตรฐานที่ไม่มีการดูดซับคลื่นแสง (non-absorbing standard) พบว่า ค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของสารละลาย (Osborne และคณะ, 1986) ดังสมการ

$$\log\left(\frac{R'}{R}\right) = \log\frac{1}{R} + \log R' = \frac{\varepsilon c}{s}$$

และเนื่องจากวัสดุมาตรฐานไม่มีการดูดซับคลื่นแสง ค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากวัสดุมาตรฐาน (R') จึงมีค่าเข้าใกล้ 1 ทำให้ $\log R' \rightarrow 0$ (Osborne และคณะ, 1986)

$$\log\frac{1}{R} = \frac{\varepsilon c}{s}$$

ดังนั้น กรณีวัดแสงสะท้อน $A = \log\frac{1}{R} = \frac{\varepsilon c}{s}$

เมื่อ	R	คือ ค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากตัวอย่าง
	R'	คือ ค่าแสงที่สะท้อนออกมาจากวัสดุมาตรฐาน
	A	คือ ค่าการดูดกลืนแสง
	ε	คือ สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงในระดับโมเลกุล เป็นค่าคงที่ของแต่ละสาร
	c	คือ ความเข้มข้นของสารละลาย
	s	คือ สัมประสิทธิ์การกระเจิงแสง

2.12 เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ อาศัยหลักการดูดกลืนพลังงานแสงในแต่ละช่วงความยาวคลื่นของสารแต่ละชนิดที่ไม่เท่ากัน จึงสามารถในการแยกค่าแสงออกเป็นทีละความยาวคลื่น เพื่อใช้ลำแสงความยาวนั้นส่องผ่านไปยังตัวอย่าง และวัดความเข้มแสงที่ผ่านออกมาเปรียบเทียบกับความเข้มแสงที่ส่องเข้าไป วิธีการวัดความเข้มแสงที่นิยมใช้ ได้แก่ การวัดความเข้มแสงแบบแสงส่องผ่านตัวอย่าง (transmittance mode) นิยมใช้กับรังสีเนียร์อินฟราเรดที่ความยาวคลื่นไม่เกิน 1800 นาโนเมตร และการวัดความเข้มแสงแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) นิยมใช้กับรังสีเนียร์อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 1200–2500 นาโนเมตร โดยวัดความเข้มแสงทีละความยาวคลื่นและนำค่าความเข้มแสงที่ได้ในแต่ละความยาวคลื่นมาเขียนกราฟการดูดกลืนแสงของตัวอย่างวิเคราะห์ โดยให้แกนแนวตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง แกนแนวนอนเป็นความยาวคลื่น (Agelet และคณะ, 2010; ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ, 2552)

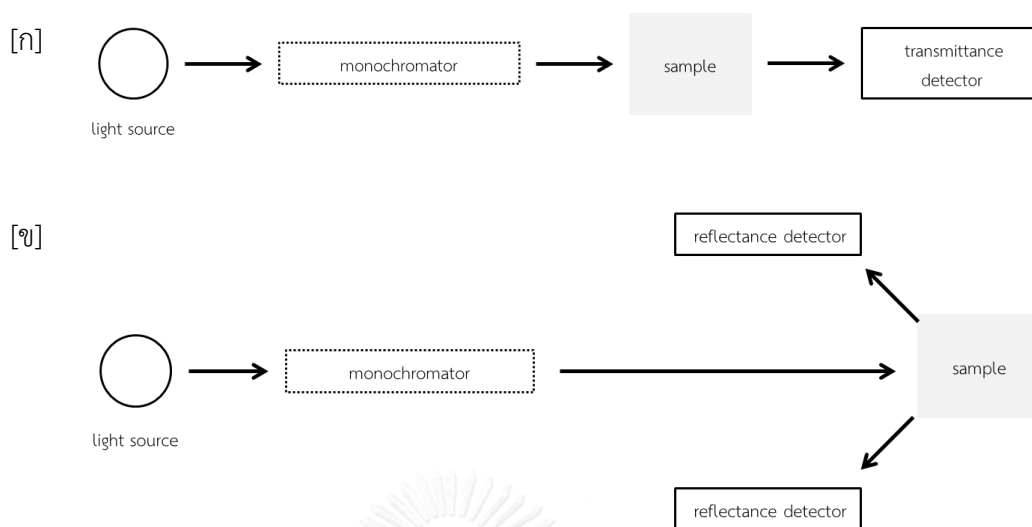
เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ ประกอบด้วย แหล่งกำเนิดแสง (light source) อุปกรณ์แยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นหรือโมนโครมาเตอร์ (monochromator) ช่องใส่ตัวอย่าง (sample cell) และตัวรับแสง (detector) ดังแสดงในภาพที่ 2.8

แหล่งกำเนิดแสง (light source) ที่นิยมใช้มี 2 แบบ ได้แก่ หลอดทังสเตนฮาโลเจน (tungsten halogen lamp) ซึ่งให้ความยาวคลื่นในช่วง 320–2500 นาโนเมตร มีฟิลเตอร์ช่วยกรองแสงในช่วงความถี่ที่ไม่ต้องการออกและป้องกันตัวอย่างไม่ให้ตัวอย่างร้อนเกินไป และมีอายุการใช้งานนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดทังสเตนแบบไม่มีแก๊สฮาโลเจน สำหรับหลอดแอลอีดี (light emitting diodes, LED) ให้ความยาวคลื่นในช่วงแคบกว่าหลอดทังสเตนฮาโลเจน นิยมใช้กับเครื่องมือขนาดเล็กสำหรับพกพา เนื่องจากมีกำลังไฟน้อย ขนาดเล็กและราคาถูก (Agelet และคณะ, 2010)

โมนโครมาเตอร์ (monochromator) เป็นอุปกรณ์สำหรับแยกคลื่นแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นที่มีช่องผ่านแสง (slit) เข้าและออก เพื่อควบคุมให้คลื่นแสงอยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการก่อนส่องผ่านไปที่ตัวอย่างและวัดความเข้มของแสงในช่วงที่ทำการศึกษา โดยช่องผ่านแสงขนาดเล็ก (ประมาณ 0.1 มิลลิเมตร) ซึ่งให้ช่วงความเข้มของแถบรังสีที่ต่ำ ทำให้เกิดการกระจายมากเหมาะสมสำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ขณะที่ช่องผ่านแสงขนาดใหญ่ (ประมาณ 2 มิลลิเมตร) ให้ความเข้มของแถบรังสีที่มากกว่าจึงเหมาะสำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Agelet และคณะ, 2010)

ช่องใส่ตัวอย่าง (sample cell) และอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างซึ่งต้องออกแบบให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง ปริมาณของอนุภาคที่ใช้วิเคราะห์ และรูปแบบการวิเคราะห์ ทั้งการวิเคราะห์แบบอยู่นิ่ง เคลื่อนที่ หรือหมุนขณะสแกนตัวอย่าง อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างควรมีลักษณะฝาเปิดด้านบน ทำจากวัสดุที่ยอมให้แสงในช่วงรังสีเนียร์อินฟราเรดทะลุผ่านได้ เช่น ซิลิกา หรือควอทซ์ เป็นต้น (Agelet และคณะ, 2010)

ตัวรับแสง (detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดปริมาณแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างออกมาทั้งในรูปแบบแสงส่องผ่าน (transmittance) หรือแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) ตัวรับแสงทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า จากนั้น สัญญาณไฟฟ้าจะถูกขยายและเปลี่ยนเป็นดิจิทัลเพื่อใช้สำหรับประมวลผลบนเครื่องคอมพิวเตอร์ ตัวรับแสงมีหลายชนิด เช่น ซิลิกอน (silicon, Si), เลดซัลไฟด์ (lead sulfide, PbS), และอินเดียมแกลเลียมอาร์เซไนด์ (indium gallium arsenide, InGaAs) เป็นต้น (Agelet และคณะ, 2010)



ภาพที่ 2.8 องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ วัดความเข้มแสงแบบแสงส่องผ่าน (transmittance) [ก], และวัดความเข้มแสงแบบสะท้อนแสง (reflectance) [ข] (ดัดแปลงจาก Workman และคณะ (2007))

2.13 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

2.13.1 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์

เนื่องจากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างที่วิเคราะห์ เกิดจากการรวมกันของโอเวอร์โทนและคอมบินชันของกลุ่มฟังก์ชันต่างๆ ทำให้สเปกตรัมมีความซับซ้อนมาก อีกทั้งสเปกตรัมยังเกิดการเหลื่อมซ้อนทับกันเนื่องจากการกระเจิงแสงที่ส่งผลต่อการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันตามความยาวคลื่น ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง สัญญาณรบกวนในเครื่องมือ สภาพแวดล้อม และแหล่งความแปรปรวนอื่นๆ ทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลของสเปกตรัมทำได้ยาก ดังนั้น การดึงข้อมูลที่อยู่ในสเปกตรัมจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) ซึ่งอาศัยหลักทางเคมีร่วมกับหลักทางสถิติในการจัดการสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดก่อนนำไปวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อลดความคลาดเคลื่อนลงให้เหลือน้อยที่สุด (อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล, 2552) ตัวอย่างวิธีการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์ เช่น

1) การแปลงค่าด้วยวิธีอนุพันธ์ (derivative transformation) เป็นวิธีการแก้ปัญหา การซ้อนทับกันของจุดยอดในสเปกตรัมและการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมทั้งแบบเบสไลน์ออฟเซต (baseline offset) ซึ่งทำให้สเปกตรัมเลื่อนขึ้นตามแนวตั้ง และแบบเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น (linear baseline shift) ซึ่งทำให้สเปกตรัมเอียงขึ้นไปทางขวาที่ความยาวคลื่นสูง โดยการคำนวณค่าอนุพันธ์ อันดับหนึ่ง (first derivative) หรือค่าความชัน (slope) ของสเปกตรัมที่แต่ละความยาวคลื่น เพื่อแยก จุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันของสเปกตรัมออกจากกัน และลดผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมมีขนาดเพิ่มขึ้น ตลอดช่วงความยาวคลื่น และค่าอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) หรือการคำนวณหาการ เปลี่ยนแปลงความชันของสเปกตรัม ทำโดยคำนวณผลลบของค่าที่ได้จากอนุพันธ์อันดับหนึ่งที่ติดกัน ทำให้จุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันแยกตัวออกจากกันเช่นเดียวกับการคำนวณอนุพันธ์อันดับหนึ่ง แต่จุด ยอดจะกลับหัวและมีความชัดเจนมากกว่า การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับสองได้รับความนิยมมากกว่า อนุพันธ์อันดับหนึ่ง เนื่องจากอนุพันธ์อันดับสองให้จุดยอดตรงกับจุดยอดของสเปกตรัมดั้งเดิม (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

2) การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scattering correction, MSC) เป็นวิธีการที่ช่วยลดผลที่เกิดจากการกระเจิงแสง (scattered light) ต่อสเปกตรัมเนียร์ อินฟราเรดที่ได้จากการวัดแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) และแบบส่องผ่าน (transmittance) ซึ่งโดยปกติการกระเจิงแสงจะทำให้ความชันโดยรวมของสเปกตรัมเปลี่ยนไป เสมือนว่าสเปกตรัมถูกทำให้หมุนรอบจุดที่ความยาวคลื่นต่ำสุดของสเปกตรัม (multiplicative effect) การปรับแก้ด้วยวิธี MSC ทำโดยนำสเปกตรัมของตัวอย่างทั้งหมดมาเฉลี่ยเพื่อให้ได้สเปกตรัม เฉลี่ย จากนั้น หมุนสเปกตรัมของแต่ละตัวอย่างให้ตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ย โดยรูปร่างสเปกตรัมที่ได้ จากการปรับแก้ด้วยวิธี MSC จะมีรูปร่างไม่แตกต่างจากสเปกตรัมก่อนการปรับแก้มาก (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

3) การปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (vector normalization, SNV) เป็นวิธีการกำจัดอิทธิพลของการกระเจิงแสงออกจากสเปกตรัมโดยการปรับความแปรปรวนให้เป็น มาตรฐาน เนื่องจากการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอของอนุภาคตัวอย่างทำให้เกิดสเปกตรัมที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเกิดการกระเจิงแสงที่สูงและเป็นสาเหตุให้เกิดความแปรปรวนส่วนใหญ่ในข้อมูลที่วัดได้ การปรับแก้แบบ SNV จะแตกต่างจากวิธี MSC โดยไม่จำเป็นต้องใช้สเปกตรัมอ้างอิงเหมือนในวิธี MSC ที่ใช้สเปกตรัมเฉลี่ยเป็นค่าอ้างอิง วิธี SNV สเปกตรัมแต่ละเส้นจะถูกปรับแก้โดยปรับค่าการ ดูดกลืนให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (normalization) (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

4) การปรับเป็นค่ามาตรฐาน (normalization) เป็นการปรับแก้กลุ่มของสเปกตรัม เพื่อให้ได้สเปกตรัมมีจุดที่สำคัญเด่นชัด และเป็นการกำจัดความแปรปรวนอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ที่ไม่ต้องการออกไป ช่วยให้สามารถเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมกับค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ได้ดีขึ้น หรือเป็นการลดความซับซ้อนของข้อมูลช่วยให้นำข้อมูลสเปกตรัมไปทำสมการแคลิเบรชันได้ง่ายขึ้น วิธีในการปรับเป็นค่าปกติ คือ การนำค่า $\log(1/R)$ ที่ความยาวคลื่นหนึ่งในสเปกตรัม (เป็นความยาวคลื่นอ้างอิง หรือเป็นค่า $\log(1/R)$ ที่มากที่สุด) มาลบออกจากค่า $\log(1/R)$ ในสเปกตรัมเดียวกับที่ความยาวคลื่นอื่นๆ ทั้งหมด ซึ่งจะทำให้ได้สเปกตรัมใหม่มีค่า $\log(1/R)$ ที่ความยาวคลื่นนั้นเป็นศูนย์ หรืออาจเป็นการนำค่า $\log(1/R)$ ที่สูงสุดในสเปกตรัมมาหารค่า $\log(1/R)$ อื่นๆ ทั้งหมด ทำให้ได้สเปกตรัมใหม่ที่มีค่าสูงสุดเป็นหนึ่ง เป็นต้น (อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล, 2552)

5) การปรับลบโดยค่าคงที่ (constant offset elimination) เป็นวิธีการแก้ปัญหาการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมแบบเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น โดยเส้นสเปกตรัมจะถูกปรับแบบเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่มีค่าต่ำที่สุดมีค่าเท่ากับศูนย์ (Conzen, 2006)

6) การปรับลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) ในแต่ละช่วงความถี่ที่เลือกไว้ เส้นตรงเส้นหนึ่งจะถูกพิตเส้นสเปกตรัมโดยใช้วิธี partial least squares (PLS) จากนั้นเส้นตรงนี้จะถูกลบออกจากสเปกตรัมดังกล่าว ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการแก้ปัญหาการเอียงของเส้นสเปกตรัมที่มีการเลื่อนขึ้นแบบเบสไลน์ชิฟต์ (Conzen, 2006)

2.13.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ยังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำนายค่าองค์ประกอบของตัวอย่างที่ต้องการทราบได้ทันที จำเป็นต้องใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ในการวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัมหรือค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดตัวอย่างด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ และสร้างแบบจำลองหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่ได้กับค่าองค์ประกอบของตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (reference หรือ standard method) (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552) ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แสดงในภาพ 2.9

ในการสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายค่าองค์ประกอบของตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีนั้น จะต้องใช้กลุ่มตัวอย่างที่ทราบปริมาณองค์ประกอบที่ต้องการทำนายและข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างเหล่านั้น การสร้างแบบจำลองจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ 1) ขั้นตอนการทำแคลิเบรชัน (calibration) หรือการสร้างแบบจำลองที่ใช้ทำนาย เป็นการสร้างสมการมาตรฐานที่ใช้ในการทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการ

ทราบของตัวอย่าง แบบจำลองที่สร้างขึ้นได้เรียกว่า “แบบจำลองแคลิเบรชัน” (calibration model) และ 2) ขั้นตอนการทำแวลิดชัน (validation) เป็นขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของแบบจำลองแคลิเบรชันหรือสมการมาตรฐานที่สร้างขึ้นมา เมื่อได้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือ จึงนำแบบจำลองที่ได้ไปใช้ทำนายค่าองค์ประกอบของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาจากสเปกตรัมที่วัดได้จากเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ต่อไป (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

1) การทำแคลิเบรชัน (calibration)

ในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ค่าที่อ่านได้จากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่าง (ค่า $\log(1/R)$) หรือข้อมูลเชิงแสง (NIR data) ถูกกำหนดให้เป็นตัวแปรอิสระ (independent variables) หรือตัวแปร X และค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (reference data) ถูกกำหนดให้เป็นตัวแปรตาม (dependent variables) หรือตัวแปร Y จากนั้นสร้างแบบจำลองจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร X และ Y โดยค่าของตัวแปร X อาจนำมาจากทุกค่าของความยาวคลื่นที่ทำการศึกษา (full spectrum) หรือค่าที่อ่านจากความยาวคลื่นใดคลื่นหนึ่ง (fixed wavelength) หรือค่าจากบางความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ (selected wavelength) ซึ่งค่าของตัวแปร X หรือค่าสเปกตรัมที่นำมาใช้อาจไม่ผ่านการปรับแต่ง (raw spectra data) หรือผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectral data) เพื่อให้ข้อมูลของตัวแปร X มีความสัมพันธ์กับตัวแปร Y มากขึ้น โดยการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ วิธีการทางสถิติที่นิยมใช้สร้างแบบจำลอง ได้แก่ การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal components analysis, PCA) การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principal components regression, PCR) และการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) (Sirisomboon และคณะ, 2012; ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal components analysis, PCA) เป็นวิธีการหนึ่งทางสถิติในการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัว (multivariate analysis) โดยใช้เทคนิคการลดจำนวนตัวแปรอิสระ (ตัวแปร X) ด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรขึ้นมาใหม่ที่เรียกว่า ปัจจัย (factors) หรือองค์ประกอบ (principal components, PC) ซึ่งปัจจัยหรือองค์ประกอบหลักนี้จะต้องมีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับจำนวนตัวแปรเดิม (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principal components regression, PCR) จะเริ่มจากการทำ PCA ของข้อมูลตัวแปรอิสระ (ตัวแปร X) ที่ได้จากข้อมูลของสเปกตรัมเพื่อลด

จำนวนตัวแปรเดิมลงโดยการสร้างตัวแปรใหม่ (ปัจจัยหรือองค์ประกอบ) จากนั้น นำค่าของตัวแปรใหม่ที่สร้างขึ้นมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (ตัวแปร Y) ที่ได้จากวิธีมาตรฐาน เพื่อสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันโดยใช้หลักการของการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multivariate regression analysis) (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) เป็นวิธีที่ใช้การวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) โดยการลดจำนวนตัวแปร เช่นเดียวกับวิธี PCR แต่แตกต่างจาก PCR ในช่วงการจัดกลุ่มลดจำนวนตัวแปร โดยการสร้างตัวแปรใหม่ด้วยวิธี PLSR นั้นจะมีการนำข้อมูลตัวแปรตาม (ตัวแปร Y) เข้ามาร่วมในการสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า ค่าคะแนนปัจจัย (factor loading) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม จะเห็นได้ว่า PLSR เป็นกระบวนการขั้นตอนเดียวไม่จำเป็นต้องทำขั้นตอน regression อีก ในขณะที่วิธีการ PCR นั้น ค่าคะแนนปัจจัยที่สร้างขึ้นมามีความเกี่ยวข้องกับข้อมูลตัวแปรเดิมในสเปกตรัมเท่านั้น จำเป็นต้องนำค่าคะแนนปัจจัยที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตามโดยการทำ regression อีกครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการทำนายค่าตัวแปรตาม การประยุกต์ใช้ PLSR เพื่อสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน สามารถทำได้ 2 วิธี คือ PLS1 เป็นการสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายค่าตัวแปรตามเพียง 1 ตัว โดยใช้แบบจำลอง 1 แบบจำลอง และ PLS2 เป็นการสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายค่าตัวแปรตามหลายตัวแปรโดยใช้สมการเดียวกัน ซึ่งการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS1 นั้นจะให้ค่าความถูกต้องของการทำนายดีกว่าวิธี PLS2 (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

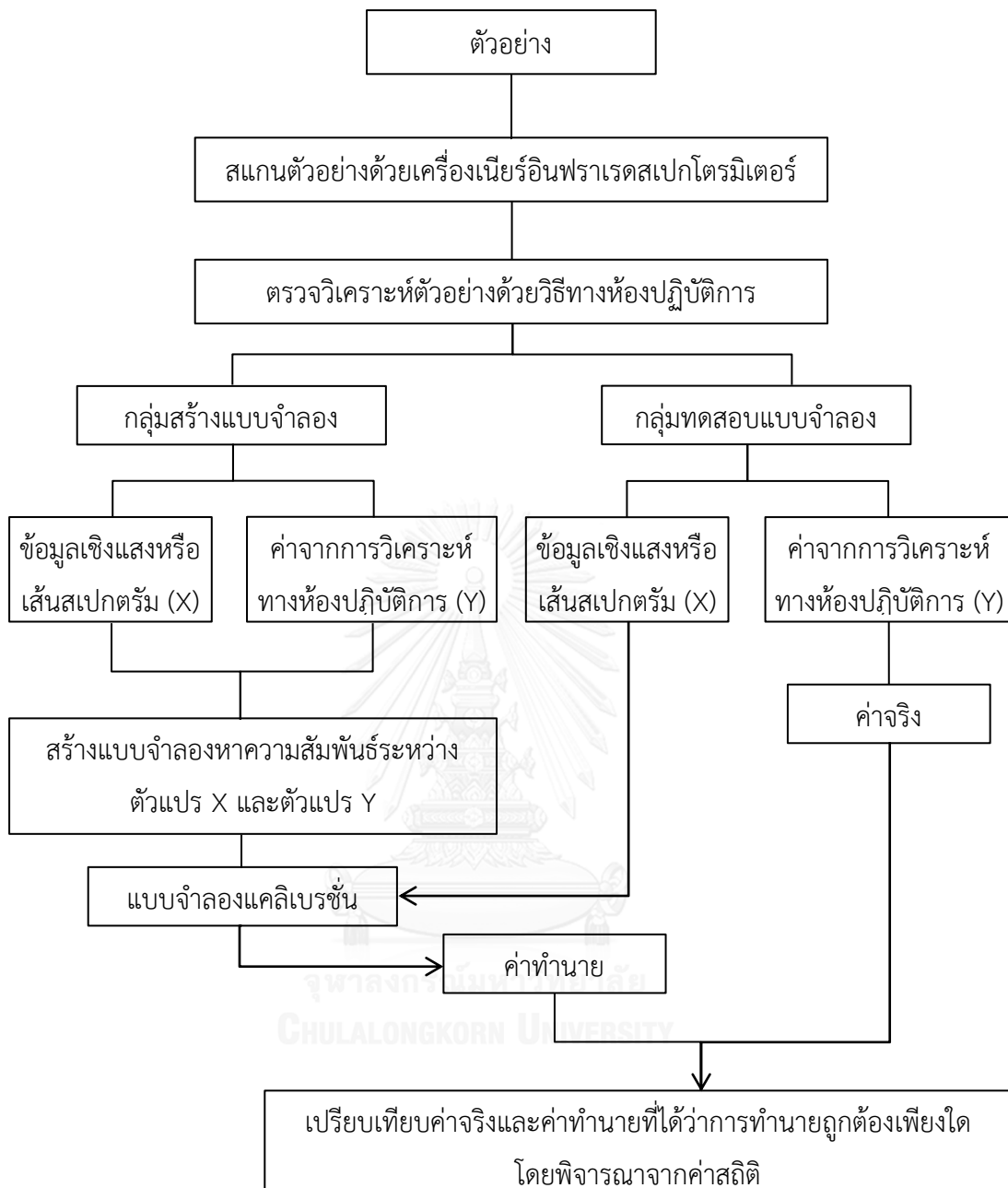
การรู้จำแบบรูปภายใต้การควบคุมดูแล (supervised pattern recognition) เป็นวิธีทางสถิติหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพ โดยการจำแบบรูป (pattern recognition) ที่ต้องทราบรายละเอียด เช่น กลุ่ม ชนิด หรือเกรด ของตัวอย่างก่อนนำมาสร้างแบบจำลองสำหรับแบ่งกลุ่ม (classification model) โดยวิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดในการสร้างแบบจำลองสำหรับแบ่งกลุ่ม ได้แก่ partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) และ soft independent modeling of class analogy (SIMCA) (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

2) การทำแวลิดะชัน (validation)

หลังจากได้แบบจำลองแคลิเบรชันที่เหมาะสมแล้ว ต้องทดสอบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ทำนายข้อมูลชุดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้หรือไม่ การทำแวลิดะชันหรือการทดสอบที่นิยมใช้ คือ การทำ full cross validation และการทดสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) (Williams, 2007)

การทำ full cross validation เป็นการทดสอบแบบจำลองภายใน (internal validation) เหมาะกับการใช้ทดสอบกลุ่มตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ที่มีจำนวนน้อย เช่น น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่นำมาทดสอบแบบจำลองเป็นตัวอย่างเดียวกับตัวอย่างชุดมาตรฐานทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน การทดสอบเริ่มจากตัดตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างมาตรฐานทั้งหมดที่ใช้สร้างแบบจำลอง แล้วนำตัวอย่างที่เหลือสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน นำแบบจำลองที่ได้มาประเมินค่าทางองค์ประกอบของตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 ที่ตัดออก จากนั้น ใส่ตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 กลับคืนแล้วตัดตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 2 ออกจากชุดตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เหลือสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันและนำแบบจำลองที่ได้มาประเมินค่าทางองค์ประกอบของตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 2 ที่ตัดออก ทำขั้นตอนซ้ำเช่นเดียวกับตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 และ 2 จนครบทุกตัวอย่างมาตรฐาน แล้วพิจารณาค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation, *RMSECV*) (Williams, 2007)

การทดสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) เป็นการทดสอบแบบจำลองภายนอก (external validation) ว่าแบบจำลองแคลิเบรชันที่สร้างขึ้นจากข้อมูลของตัวอย่างชุดมาตรฐานนั้นสามารถทำนายข้อมูลของตัวอย่างชุดอื่นที่เป็นประชากรกลุ่มเดียวกันได้หรือไม่ โดยใช้ตัวอย่างชุดใหม่ (testing set) ในการทดสอบ ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวต้องมีการเตรียมตัวอย่าง การวัดสเปกตรัม สภาวะในการศึกษา รวมถึงการปรับแต่งสเปกตรัมเหมือนกับตัวอย่างชุดมาตรฐานที่ใช้สร้างแบบจำลอง ตัวอย่างชุดใหม่ที่นำมาทดสอบจะถูกสแกนด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อให้ได้ค่าสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด (NIR spectra) นำค่าที่ได้แทนลงในแบบจำลองแคลิเบรชันที่สร้างขึ้นเพื่อทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการทราบ ได้ค่าทำนาย (predicted value) จากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบที่ต้องการทราบด้วยวิธีมาตรฐาน ได้ค่าจริง (actual value) เปรียบเทียบค่าจริงและค่าทำนายที่ได้ว่าการทำนายมีความถูกต้องมากน้อยเพียงใด โดยพิจารณาจากค่าสถิติ (Burns และคณะ, 2007; ธงชัย สุวรรณสีชนน์ และคณะ, 2552)



ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.13.3 ค่าสถิติสำหรับพิจารณาความแม่นยำของแบบจำลอง

1) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation, R) แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของตัวแปร X และตัวแปร Y ถ้าข้อมูลทั้งสองชุดมีความสอดคล้องกันมาก ผลของค่า R ที่ได้จะเข้าใกล้ 1.00 ในกรณีที่ค่า R เท่ากับ 1.00 แสดงว่าข้อมูลทั้งสองชุดมีความสอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ถ้าค่า R เข้าใกล้ 0 แสดงว่าข้อมูลทั้งสองชุดไม่มีความสัมพันธ์หรือความสอดคล้องกัน ทั้งนี้ ตัวแปร X และตัวแปร Y อาจมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกหรือลบก็ได้ (Williams, 2007) การแปลความหมายของค่า R แสดงดังตารางที่ 2.10

2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) แสดงถึงสัดส่วนความแปรปรวนของตัวแปร X (ค่าจริง) ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของตัวแปร Y (ค่าทำนาย) ซึ่งจะมีค่าเป็นบวกเสมอ เช่น ถ้าค่า R^2 เท่ากับ 1.00 หมายความว่า ความแปรปรวนของตัวแปร X อธิบายความแปรปรวนของตัวแปร Y ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือในกรณีที่ค่า R^2 เท่ากับ 0.50 หมายความว่า ความแปรปรวนของตัวแปร X อธิบายความแปรปรวนของตัวแปร Y ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนของตัวแปร X ที่เหลือมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น วิธีการเตรียมตัวอย่าง หรือวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน โดยที่ค่า R^2 นั้นจะมีค่าเป็นบวกเสมอ (ตารางที่ 2.10) (Jerome, 2007; Williams, 2007)

ตารางที่ 2.10 แนวทางการอธิบายความสามารถของแบบจำลองด้วยค่า R และ R^2

ค่า R	R^2	ความหมาย
± 0.50	0-0.25	ไม่สามารถนำไปใช้ได้
$\pm 0.51-0.70$	0.26-0.49	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ ควรหาเหตุผล
$\pm 0.71-0.80$	0.50-0.64	สามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบ
$\pm 0.81-0.90$	0.66-0.81	สามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบและประมาณค่าเบื้องต้น
$\pm 0.91-0.95$	0.83-0.90	ควรใช้งานอย่างระมัดระวังในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัย
$\pm 0.96-0.98$	0.92-0.96	ใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ
± 0.99 ขึ้นไป	0.98 ขึ้นไป	ดีเยี่ยม สามารถนำไปใช้ได้กับทุกงาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Williams (2007)

3) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) คือ ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างค่าจริง (actual value) และค่าทำนาย (predicted value) เป็นค่าที่ใช้วัดความแม่นยำโดยรวมของแบบจำลองที่สร้างได้ ค่าที่ได้ควรมีค่าน้อย (Williams, 2007)

4) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มสร้างแบบจำลอง (standard error of calibration, *SEC*) คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, *SD*) ของความแตกต่างระหว่างค่าจริงและค่าทำนายของกลุ่มตัวอย่างสำหรับสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ค่าที่ได้ควรมีค่าต่ำที่สุด แต่อย่างไรก็ตามค่า *SEC* ที่มีค่าต่ำที่สุด อาจดีสำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันเท่านั้น อาจไม่ดีสำหรับตัวอย่างอื่น (Williams, 2007)

5) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (standard error of prediction, *SEP*) คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าจริงและค่าทำนายในกลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบแบบจำลอง โดยค่า *SEP* จะเป็นอิสระจากค่า bias ซึ่งต่างจากค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (*RMSEP*) ที่มีการนำค่า bias มาใช้ในการคำนวณ ดังนั้น เมื่อรายงานผลโดยใช้ค่า *SEP* จำเป็นต้องรายงานผลคู่กับค่า bias เสมอ ซึ่งค่าที่ควรมีค่าน้อยเช่นเดียวกับค่า bias (Williams, 2007)

6) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของกลุ่มสร้างแบบจำลอง (root mean square error of calibration, *RMSEC*) เป็นการหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าจริงและค่าทำนายของกลุ่มตัวอย่างสำหรับสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน โดยค่า *RMSEC* นั้นเป็นค่าที่นำค่า bias มาใช้คำนวณร่วมด้วย ดังนั้น เมื่อรายงานผลจึงไม่จำเป็นต้องเป็นรายงานค่า bias และค่าที่ได้ควรมีค่าน้อยเช่นเดียวกัน (Williams, 2007)

7) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (root mean square error of prediction, *RMSEP*) เป็นการหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าจริงและค่าทำนายของกลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบแบบจำลอง โดยค่า *RMSEP* นั้นเป็นค่าที่นำค่า bias มาใช้คำนวณร่วมด้วย ดังนั้น เมื่อรายงานผลจึงไม่จำเป็นต้องเป็นรายงานค่า bias และค่าที่ได้ควรมีค่าน้อยเช่นเดียวกัน (Williams, 2007)

8) ค่า RPD หรืออัตราส่วนระหว่างค่า *SEP* ต่อค่า *SD* (ratio of standard error of prediction validation to standard deviation, RPD) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของแบบจำลองที่ได้ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าจริงของข้อมูลกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบแบบจำลองและค่า *SEP* โดยค่าที่ได้ควรมีค่ามาก (ตารางที่ 2.11) (Williams, 2007)

ตารางที่ 2.11 แนวทางการอธิบายความสามารถของแบบจำลองด้วยค่า RPD

ค่า RPD	การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง	การนำไปประยุกต์ใช้
0.0-2.3	ไม่ดีมาก	ไม่แนะนำให้ใช้
2.4-3.0	ไม่ดีพอ	การแบ่งกลุ่มแบบหยาบ
3.1-4.9	พอใช้	การแบ่งกลุ่ม
5.0-6.4	ดี	การประกันคุณภาพ
6.5-8.0	ดีมาก	การควบคุมกระบวนการ
8.1 ขึ้นไป	ดีเยี่ยม	ใช้ได้กับทุกงาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Williams (2007)

2.14 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในอุตสาหกรรม

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกศึกษาและพัฒนาจนเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ประโยชน์หรือข้อได้เปรียบของการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการวิเคราะห์ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ไม่ถูกทำลาย การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ปริมาณตัวอย่างในปริมาณน้อย จึงเป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ประหยัดเวลา สามารถใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้ ช่วยลดการใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ จึงปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ อีกทั้ง การวัดสเปกตรัมของตัวอย่างในแต่ละครั้งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อทำนายค่าองค์ประกอบต่างๆ ของตัวอย่างได้หลายค่าในเวลาเดียวกัน ดังนั้นเทคนิคนี้จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในหลากหลายอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นผลมาจากความต้องการของอุตสาหกรรมที่ต้องการจะประหยัดเวลา ลดการใช้สารเคมี และลดต้นทุนในระยะยาว ในการควบคุมคุณภาพของกระบวนการผลิตตั้งแต่วัตถุดิบจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วารุณี ณะแพสย์, 2552)

ปัจจุบันเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาประยุกต์เพื่อวิเคราะห์หาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่สำคัญทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น ด้านการเกษตรและอาหาร ด้านเภสัชกรรม ด้านปิโตรเคมีและพลังงาน ด้านยางและพอลิเมอร์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการแพทย์ รวมถึงอุตสาหกรรมไม้และเยื่อกระดาษ ดังแสดงในตารางที่ 2.12 (Blanco และคณะ, 2002; อนุรักษ์ สุกวิจิตรภักดี, 2552) สำหรับอุตสาหกรรมในประเทศไทย เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ (qualitative analysis) ในลักษณะของวิธีประจำในการวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid analytical routine method) โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหารที่เกี่ยวข้อง (วารุณี ณะแพสย์, 2552)

ตารางที่ 2.12 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทสโกปีในอุตสาหกรรม

การประยุกต์ใช้	องค์ประกอบที่วัด	อ้างอิง
การเกษตรและอาหาร	ค่าบรีกซในแอปเปิ้ล	Xiaobo และคณะ (2007)
	ปริมาณไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรตในนมผง	Wu และคณะ (2008)
	ความสุกและลักษณะเนื้อสัมผัสของมะเขือเทศ	Sirisomboon และคณะ (2012)
	ปริมาณแอลกอฮอล์และความเป็นกรดของไวน์ แอปเปิ้ลระหว่างกระบวนการหมัก	Peng และคณะ (2016)
เภสัชกรรม	การเปลี่ยนรูปผลึกของสาร	Blanco และคณะ (2006)
	ปริมาณการเปลี่ยนรูปของ Ranitidine hydrochloride	McGoverin และคณะ (2006)
	ปริมาณการรวมตัวของยาแบบเม็ด	Sulub และคณะ (2008)
การแพทย์	ปริมาณคอร์คูมินในยาสมุนไพรขมิ้นชัน	Kasemsumran และคณะ (2014)
	กลูตาไทโอนีนในเซลล์มะเร็ง	Bao และคณะ (2015)
	การเปลี่ยนความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในสมอง	Tellis และคณะ (2015)
ยางและพอลิเมอร์	ปฏิกิริยาการเกิดการเชื่อมกันของสายพอลิเมอร์	Masaki และคณะ (2003)
	สมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิเมอร์	Heigl และคณะ (2008)
	ปริมาณการเกิดพอลิเมอร์	Blanco และคณะ (2010)
	ปริมาณเนื้อยางและของแข็งทั้งหมดในน้ำยาง	Sirisomboon และคณะ (2013)
ปิโตรเคมีและพลังงาน	ปริมาณซัลเฟอร์ในน้ำมันดีเซล	Breitkreitz และคณะ (2003)
	ปริมาณไบโอดีเซลในน้ำมันดีเซลผสม	Fernanda Pimentel และคณะ (2006)
	คุณสมบัติของน้ำมันผสมระหว่างดีเซลและไบโอดีเซล	de Fátima Bezerra de Lira และคณะ (2010)
	ปริมาณน้ำมันจากผลปาล์มน้ำมัน	Kasemsumran และคณะ (2012)
ไม้และเยื่อกระดาษ	ปริมาณเซลลูโลสในยูคาลิปตัส	Raymond และคณะ (2002)
	ปริมาณลิกนินในไม้สน	Hodge และคณะ (2004)
	ความขาวของเยื่อฟอกขาว	Nilsson และคณะ (2005)

2.15 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในข้าว

ปัจจุบันเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการประเมินคุณภาพของเมล็ดพืชที่เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญทุกประเภทรวมถึงอุตสาหกรรมในการผลิตข้าว โดยนำมาใช้ประเมินองค์ประกอบทางเคมี เช่น โปรตีน อะไมโลส กรดไขมัน เกลือแร่ และความชื้น และคุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ดข้าว เช่น ความขาว ความแข็ง และความเหนียว เป็นต้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและรสชาติของข้าว (รณฤทธิ ฤทธิธรรม, 2552)

Kawamura และคณะ (1999) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบแสงส่องผ่านในการตรวจหาปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน และปริมาณอะไมโลสของเมล็ดข้าวหลังจากเก็บเกี่ยวและยังไม่ผ่านกระบวนการตากแห้ง โดยแบบจำลองสำหรับทำนายปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.96 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสำหรับทำนายแบบจำลอง (SEP) เท่ากับ 0.70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น เมล็ดข้าวถูกนำไปทำให้เปลือกหลุดออกได้เป็นข้าวกล้องสำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีน ซึ่งให้ค่า R^2 และ SEP เท่ากับ 0.70 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ และข้าวกล้องจะถูกนำไปขัดสีได้เป็นข้าวสารสำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีนและอะไมโลส โดยค่า R^2 และ SEP เท่ากับ 0.76 และ 0.22 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณโปรตีนและ 0.00 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณอะไมโลสในข้าวสาร ซึ่งแบบจำลองที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำมาใช้คัดคุณภาพของเมล็ดข้าวที่ยังไม่ผ่านกระบวนการตากแห้งได้

Delwiche และคณะ (1996) ประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสำหรับตรวจสอบคุณลักษณะด้านคุณภาพต่างๆ ของเมล็ดข้าวสาร ได้แก่ ปริมาณอะไมโลส ปริมาณโปรตีน ความขาว ลักษณะโปร่งแสง และระดับการขัดสี โดยแบบจำลองให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.89, 0.97, 0.97, 0.93, และ 0.97 ตามลำดับ นอกจากนี้ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปียังใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีน อะไมโลสในเมล็ดข้าวกล้อง และองค์ประกอบของรำข้าว ได้แก่ ปริมาณโปรตีน น้ำมันดิบ ความชื้น เถ้าและไฟเบอร์ ซึ่งการมีแบบจำลองสำหรับทำนายที่เหมาะสมทำให้สามารถทำนายองค์ประกอบและคุณภาพของเมล็ดข้าวได้อย่างแม่นยำ (Bagchi และคณะ, 2015)

นอกจากนี้ Qiang และคณะ (2014) ประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาว 918–1045 นาโนเมตร ตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าวเปลือกที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 5, 15, และ 25 องศาเซลเซียส ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.943 และ 0.897 สำหรับแบบจำลองแคเรียบรันและแบบจำลองแวลิตเดชั่น (กลุ่มทดสอบแบบจำลอง) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของราในเปลือกข้าวได้ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าวเปลือกทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและระหว่างเก็บรักษา

2.16 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

ปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรมีมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะในธัญพืช รวมทั้งในข้าว ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2.13

Berardo และคณะ (2005) สร้างแบบจำลองสำหรับทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดและการปนเปื้อนของ *Fusarium verticillioides* ในเมล็ดข้าวโพด โดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบสะท้อนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.80 และ 0.78 ตามลำดับ ซึ่งผลการสร้างแบบจำลองแสดงให้เห็นว่าเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวโพดหลังการเก็บเกี่ยวได้

Del Fiore และคณะ (2010) จำแนกเมล็ดข้าวโพดที่มีการปนเปื้อนของราที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษ เช่น *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* และ *Fusarium* spp. จากเมล็ดข้าวโพดที่มีการปนเปื้อน โดยใช้วิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 400-1000 นาโนเมตร โดยเทคนิค hyperspectral imaging พบว่า ความยาวคลื่นในช่วง 500-600 นาโนเมตร สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของราได้ ในขณะที่ความยาวคลื่นในช่วง 500-700 และ 850-950 นาโนเมตร คุณสมบัติของการสะท้อนแสงเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญซึ่งสัมพันธ์กับการปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวโพดที่เกิดขึ้น

Singh และคณะ (2011) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบ hyperspectral และ digital colour imaging ที่ช่วงความยาวคลื่น 700-1100 นาโนเมตร ในการจัดกลุ่มเมล็ดข้าวสาลีที่สมบูรณ์และเมล็ดที่ติดเชื้อของราในสกุล *Penicillium*, *Aspergillus glaucus* และ *A. niger* ด้วยวิธี linear discriminant analysis (LDA) ซึ่งผลการจัดกลุ่มให้ค่าเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มที่ถูกต้องสูงถึง 97.3-100 เปอร์เซ็นต์

Dachoupakan Sirisomboon และคณะ (2013) ประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ในเมล็ดข้าว พบว่า แบบจำลองสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.668 และ 0.437 ตามลำดับ

Petterson และคณะ (2003) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบแสงส่องผ่านที่ช่วงความยาวคลื่น 570-1100 นาโนเมตร สร้างแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของดีออกซินิวาลีนอลในตัวอย่างข้าวสาลี โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.984 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการพิสูจน์แบบไขว้ (standard error of cross validation, $SECV$) เท่ากับ 381 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแบบจำลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในอนาคตในการพัฒนาแบบจำลองแคลิเบรชันสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนของดีออกซินิวาลีนอลในข้าวสาลี

Hernández-Hierro และคณะ (2008) ประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบสะท้อนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 1100-2000 นาโนเมตร ตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 โอคราทอกซินเอ และอะฟลาทอกซินรวม ในพริกหยวกแดง ประเทศสเปน โดยแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนที่ดีที่สุดของอะฟลาทอกซินบี 1 โอคราทอกซินเอ และอะฟลาทอกซินรวม ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พหุคูณ (multiple correlation coefficients, RSQ) เท่ากับ 0.955, 0.853 และ 0.938 และค่า RPD เท่ากับ 5.2, 2.8 และ 4.4 ตามลำดับ

Fernández-Ibañez และคณะ (2009) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบสะท้อนแสงตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบ grating และแบบ FT-NIRS ซึ่งทั้งสองแบบให้ค่าการทำนายที่ดีใกล้เคียงกัน โดยการใช้เครื่องแบบ grating ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.80 และ 0.85 และเครื่องแบบ FT-NIRS ให้ค่า R เท่ากับ 0.82 และ 0.84 สำหรับข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ ตามลำดับ

Tripathi และคณะ (2009) สร้างแบบจำลองสำหรับตรวจหาอะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนในพริกปนที่ความเข้มข้นระหว่าง 15-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในแบบสะท้อนแบบแพร่ ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.97 ซึ่งแบบจำลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 2.13 การประยุกต์เรียนรู้อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

อาหาร/ผลผลิตทางการเกษตร	สิ่งปนเปื้อน	เทคนิค	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	อ้างอิง
ข้าวสาลี	ดีออกซินิวาลินอล	แบบแสงส่องผ่าน	570-1100	Pettersson และคณะ (2003)
ถั่วเหลือง	รา	แบบสะท้อนแสง	400-1700	D. Wang และคณะ (2004)
เมล็ดข้าวโพด	ราทั้งหมดและ <i>F. verticillioides</i>	แบบสะท้อนแสง	400-2500	Berardo และคณะ (2005)
ข้าวบาร์เลย์	เออร์โกสเทอรอล	แบบสะท้อนแสง	400-2500	Böjresson และคณะ (2007)
พริกหยวกแดง	อะฟลาทอกซินบี 1, โครราทอกซินเอ, อะฟลาทอกซินรวม	แบบแสงส่องผ่าน	850-1050	Hernández-Hierro และคณะ (2008)
ข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์	อะฟลาทอกซินบี 1	แบบสะท้อนแสง	1100-2000	Fernández-Ibañez และคณะ (2009)
พริกป่น	อะฟลาทอกซินบี 1	แบบสะท้อนแบบแพร่	1112-2500	Tripathi และคณะ (2009)
ข้าวโพด	ราที่ผลิตสารพิษ	hyperspectral imaging	800-2500	Del Fiore และคณะ (2010)
เมล็ดข้าวสาลี	<i>Fusarium</i> sp	hyperspectral imaging	400-1000	Delwiche และคณะ (2011)
เมล็ดข้าวสาลี	<i>Penicillium</i> sp., <i>A. glaucus</i> และ <i>A. niger</i>	hyperspectral และ digital colour imaging	400-1700	Singh และคณะ (2011)
เมล็ดข้าวโพดเมล็ดเดี่ยว	รา	แบบสะท้อนแสง	700-1100	Tallada และคณะ (2011)
			904-1685	

ตารางที่ 2.13 (ต่อ) การประยุกต์ใช้รีโมตเซนซิงเพื่อตรวจสอบโรคพืชจากภาพถ่ายดาวเทียมในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

อาหาร/ผลผลิตทางการเกษตร	สิ่งปนเปื้อน	เทคนิค	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	อ้างอิง
ข้าวสาลี	ด็อกซีนิวาตินอล	แบบสะท้อนแบบแพร่	1000-2500	Dvoráček และคณะ (2012)
ข้าวโพด	ฟูโมนิซินปี 1 และฟูโมนิซินปี 2	แบบสะท้อนแบบแพร่	650-2500	Gaspardo และคณะ (2012)
คาโนลา	<i>A. glaucus</i>	hyperspectral imaging	1000-1600	Senthilkumar และคณะ (2012)
เมล็ดข้าว	ราทั้งหมดและราที่ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1	แบบสะท้อนแบบแพร่	950-1650	Dachoupakan Sirisomboon และคณะ (2013)
ข้าวโพด	ฟูโมนิซิน	แบบสะท้อนแบบแพร่	650-2500	Giacomo และคณะ (2013)
องุ่นสำหรับหมักไวน์	เออร์โกสเตอรอล	แบบสะท้อนแสง	450-1650	Porep และคณะ (2014)
ข้าวเปลือก	รา	แบบสะท้อนแบบแพร่	918-1045	Qiang และคณะ (2014)
เมล็ดข้าวโพด	อะฟลาทอกซินปี 1	hyperspectral imaging	1000-2500	W. Wang และคณะ (2014)
เมล็ดข้าวสาลี	<i>Fusarium</i> sp.	แบบแสงส่องผ่าน	1100-1700	Kautzman และคณะ (2015)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงาน

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยแก้ว ขนาด 50 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
2. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 22 x 28 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Menzel-Glaser, Germany
3. กระดาษกรอง ขนาด 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman No.1, England
4. กระดาษกรอง ชนิด regenerated cellulose ขนาด 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Sarorius Biolab Products, Germany
5. กระทั่งพอยล์บรรจุอาหาร บริษัท ยูเนียน อินตา จำกัด, Thailand
6. กระบอกฉีดยา ขนาด 1, 10 และ 20 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอ์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
8. ขวดแก้วใสสารละลาย ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
9. ขวดรูปชมพู ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
10. ขวดวัดปริมาตร 10, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
11. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
12. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ รุ่น Maxima บริษัท Elga, England
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 ยี่ห้อ Tomy, Japan
14. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform–Near infrared spectrometer, FT-NIR) รุ่น MPA บริษัท Bruker, Germany
15. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
16. เครื่องปั่นอนุภาคสูงรุ่น HR 2102 และรุ่น HR 2115 บริษัท Philips, Indonesia
17. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak, Scotland UK
18. จานเพาะเชื้อแก้ว ขนาด 100x15 มิลลิเมตร บริษัท Sac Science-Eng, Thailand

19. งานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด 94×16 มิลลิเมตร บริษัท Greiner bio-one, Austria
20. ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ
 - คีมลือคอลลูมิเนียม (aluminium clamp) บริษัท Pyrex, England
 - fritted glass support base ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
 - กรวยแก้ว ขนาด 300 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
 - ขวดลดความดัน (suction flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
 - ปีมลดความดัน บริษัท Sibata Scientific Technology, Japan
21. ชุดเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
 - คอลัมน์ C18, 5 ไมโครเมตร ขนาด 150 × 4.6 มิลลิเมตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
 - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
 - เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (liquid chromatography) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
 - ปีม autosampler รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
22. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service, Thailand
23. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 × 4 ฟุต บริษัท Lab micro, Thailand
24. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sandenintercool, Thailand
25. ตู้ป่นเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
26. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Sandenintercool, Thailand
27. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
28. ตู้อบแห้ง บริษัท Contherm Scientific, New Zealand

29. ถุงมือยาง ยี่ห้อ SemperGuard บริษัท สยามเซมเพอร์เมจ จำกัด, Thailand
30. โถดูดความชื้น (desiccator) บริษัท เบคไทย กรุงเทพมหานครเคมิภัณฑ์ จำกัด, Thailand
31. ปีกเกอร์ ขนาด 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Pyrex, Germany
32. ปีเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร บริษัท Qualicolor, France
33. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
34. แผ่นสไลด์ ขนาด 25.6 × 76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sail Brand, China
35. พาสเจอร์ปีเปตต์แก้ว ขนาด 230 มิลลิเมตร รุ่น D812 บริษัท Volac, England
36. ไมโครปีเปตต์ ขนาด 2.5, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
37. ไมโครปีเปตต์ ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
38. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16 × 150 มิลลิเมตรและ 13 × 100 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Pyrex, Germany
39. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 0.6 และ 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, USA
40. หัวกรองสำเร็จรูป ชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Fortune Scientific, Thailand
41. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 ยี่ห้อ Memmert, Germany
42. อ่างอัลตราโซนิก รุ่น SOROREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
43. ฮีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Precicolor, German

เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
2. กลีเซอรอล 85% (glycerol 85%) บริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃) บริษัท Merck, Germany
5. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na₂HPO₄) บริษัท Ajax, Australia
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄) บริษัท Merck, Germany
8. เมทานอล (CH₃OH) บริษัท Merck, Germany
9. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 จาก *Aspergillus flavus* บริษัท Sigma, USA
10. อะซิโตนไนไตรล์ (CH₃CN) บริษัท Labscan, Thailand
11. อิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (immunoaffinity column) รุ่น AflaTest, บริษัท VICAM, USA
12. เอทานอล (C₂H₅OH) บริษัท J.T. Baker, USA
13. Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) บริษัท Merck, Germany
14. Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Difco Laboratories, USA
15. Tween 20 บริษัท Merck, Germany
16. Tween 80 บริษัท Merck, Germany

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างข้าวกล้อง 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวกล้องหอมนิล และข้าวกล้องหอมแดง จากห้างสรรพสินค้า ร้านสะดวกซื้อ ตลาดสด และโรงสีข้าวหรือโกดัง ภายในพื้นที่กรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง (ภาคผนวก จ) ในช่วงปี พ.ศ. 2556-2557 ตัวอย่างละ 1-2 กิโลกรัม บรรจุตัวอย่างข้าวกล้องในถุงซิปลาสติก แล้วเก็บในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดสนิทเพื่อรักษาความชื้นเริ่มต้น โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 150 ตัวอย่าง (ข้าวกล้องหอมมะลิ 65 ตัวอย่าง ข้าวกล้องหอมนิล 35 ตัวอย่าง และข้าวกล้องหอมแดง 50 ตัวอย่าง) เพื่อใช้สำหรับตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา และตัวอย่างจำนวน 50 ตัวอย่าง (ข้าวกล้องหอมมะลิ 17 ตัวอย่าง ข้าวกล้องหอมนิล 16 ตัวอย่าง และข้าวกล้องหอมแดง 17 ตัวอย่าง) เพื่อใช้สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 ตัวอย่างข้าวกล้องสำหรับใช้ในการตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา

1) ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ (naturally contaminated sample) เป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 3.1 จำนวนทั้งสิ้น 150 ตัวอย่าง ซึ่งจะใช้สำหรับตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา

2) ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificially contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ไม่พบการปนเปื้อนของรา แล้วถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราจากสารแขวนลอยสปอร์ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่แยกได้จากข้าวและมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 (โนทัย กิตติคำแหง, 2554) เตรียมโดยนำ *A. flavus* M3T8R4G3 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก [2]) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บสปอร์และเจือจางสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^2 , 10^4 , และ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 (ภาคผนวก ข [1]) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่มีการปนเปื้อนของราจำนวน 12 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ความเข้มข้น รวมทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน ตัวอย่างในข้อนี้ ใช้สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนของรา

3.2.2 ตัวอย่างข้าวกล้องที่ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

1) ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ตามธรรมชาติ (naturally contaminated sample) เป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 3.1 จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง

2) ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 (artificially contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อน โดยเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ภาคผนวก ข [3]) ปริมาตรที่เติมคำนวณจากความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ ลงในตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ตัวอย่างละ 100 กรัม จำนวน 10 ตัวอย่าง ให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ภาคผนวก ค [5]) จำนวนรวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ตัวอย่างมีความชื้นใกล้เคียงกับตัวอย่างธรรมชาติ

3.3 การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

3.3.1 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตัวอย่างข้าวกล้อง 1 ตัวอย่างถูกแบ่งเป็น 2 ตัวอย่างย่อย (sub-sample) จากนั้นนำตัวอย่างย่อย 150 กรัม ใส่ในอุปกรณ์สำหรับสแกนตัวอย่างซึ่งกันของภาชนะทำด้วยควอทซ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 85 มิลลิเมตร ลึก 89 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.1 [ก]) แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) (MPA, Bruker, Germany) (ภาพที่ 3.1 [ข]) โดยวางบนตำแหน่งรับคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ในแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) ที่ความละเอียดจำนวนคลื่นทุกๆ 16 จำนวนคลื่นต่อเซนติเมตร แต่ละตัวอย่างย่อยถูกสแกน 3 ครั้ง ได้เส้นสเปกตรัม 3 เส้น จำนวนข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมจากการสแกนตัวอย่างแสดงในตารางที่ 3.1 เก็บข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงด้วยโปรแกรม OPUS v.7.0.129 (Bruker Optik GmbH, Germany) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) จากนั้น นำตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดที่ผ่านการสแกนแล้วไปตรวจหาปริมาณความชื้น การปนเปื้อนราทั้งหมด และราในสกุล *Aspergillus* ตามวิธีทางห้องปฏิบัติการทันที

[ก]



[ข]



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างข้าวกล้างในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่าง [ก], เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer, FT-NIR) รุ่น MPA [ข]

3.3.2 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้าง

สำหรับการสแกนตัวอย่างเพื่อใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 แบ่งการสแกนตัวอย่างเป็น 3 แบบ ตามการเตรียมตัวอย่างก่อนการสแกนที่ต่างกัน คือ ไม่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างด้วยการบด และเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัด จะได้การสแกนตัวอย่าง 3 แบบ ได้แก่

แบบที่ 1 การสแกนตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด

แบบที่ 2 การสแกนตัวอย่างเมล็ดข้าวที่บดแล้ว

แบบที่ 3 การสแกนตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้าง

การสแกนตัวอย่างแบบที่ 1 ทำได้โดยนำตัวอย่างข้าวกล้างที่เตรียมจากข้อ 3.2.2 มาสแกนตัวอย่างตามวิธีในข้อ 3.3.1

การสแกนตัวอย่างแบบที่ 2 นำตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้างที่ผ่านการสแกนแบบที่ 1 จากบริเวณก้นภาชนะสำหรับสแกนไปบดโดยใช้เครื่องปั่นความเร็วสูง เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นบรรจุตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้างที่ผ่านการบดละเอียดแล้วลงในภาชนะสำหรับสแกน โดยปริมาณของตัวอย่างที่บรรจุลงในภาชนะนั้นต้องเพียงพอเพื่อป้องกันไม่ให้คลื่นเนียร์อินฟราเรดผ่านออกมาจากตัวอย่างได้ แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ในแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) โดยใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000

ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ที่ความละเอียดจำนวนคลื่นทุกๆ 16 จำนวนคลื่นต่อเซนติเมตร

การสแกนตัวอย่างแบบที่ 3 นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนตัวอย่างแบบที่ 2 บริเวณก้นภาชนะสำหรับสแกน 50 กรัม บรรจุลงในภาชนะสำหรับปั่นตัวอย่างเพื่อสกัดอะฟลาทอกซินบี 1 ตามวิธีสกัดของ VICAM (2003) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับจาก AOAC International, United States Federal Grain Inspection Service (FGIS) และ European Committee for Standardization (CEN) (Leslie และคณะ, 2014) โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม และสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำปลอดประจุ (เมทานอล:น้ำปลอดประจุ ในอัตราส่วน 80:20) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แบ่งส่วนน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงภาชนะสำหรับสแกนของเหลวที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร ความลึก 4.8 เซนติเมตร จากนั้น วางเครื่องมือที่ทำให้เกิดการสะท้อน (transflection device) ที่มีทางเดินของแสง (pathlength) ขนาด 2 มิลลิเมตร ลงในภาชนะเพื่อกักตักส่วนน้ำใสที่ใช้สำหรับสแกน (ภาพที่ 3.2 [ก]) นำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (ภาพที่ 3.2 [ข]) ในแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) โดยใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ที่ความละเอียดจำนวนคลื่นทุกๆ 16 จำนวนคลื่นต่อเซนติเมตร หลังจากนั้น นำส่วนน้ำใสที่ผ่านสารสกัดที่เหลือไปตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ

จากการสแกนตัวอย่างทั้ง 3 แบบข้างต้น ทำให้ได้ข้อมูลเชิงแสงทั้งหมด 3 ชุด ได้แก่ ข้อมูลเชิงแสงจากตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด ข้อมูลเชิงแสงจากตัวอย่างเมล็ดข้าวที่บดแล้ว และข้อมูลเชิงแสงจากตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง จำนวนข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างแสดงในตารางที่ 3.1 เก็บค่าการดูดกลืนแสงด้วยโปรแกรม OPUS v.7.0.129 (Bruker Optik GmbH, Germany) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางเคโมเมทริกซ์ (chemometrics)

[ก]



[ข]



ภาพที่ 3.2 ภาพสำหรับสแกนตัวอย่างที่มีการวางเครื่องมือที่ทำให้เกิดการสะท้อน (transflection device) [ก], การสแกนตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ [ข]

ตารางที่ 3.1 จำนวนของตัวอย่างและตัวอย่างย่อย และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้อง

การสแกนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่าง ย่อย)	ข้อมูลเชิงแสง (เส้น)
1. ตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้น	150 (300)	900
2. ตัวอย่างเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของรา	186 (372)	1116
3. ตัวอย่างเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1		
แบบที่ 1 ตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด	100 (200)	600
แบบที่ 2 ตัวอย่างเมล็ดข้าวที่บดแล้ว	100 (200)	600
แบบที่ 3 ตัวอย่างสารสกัดหยาบ	100 (200)	600

3.4 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ

3.4.1 การตรวจหาปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวกล้อง

เนื่องจากความชื้น เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของรา เพื่อส่งเสริมสินค้าเกษตรให้มีคุณภาพ ได้มาตรฐานและปลอดภัย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงมีประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรเรื่อง ข้าว โดยกำหนดความชื้นของข้าวกล้องไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ (มกษ. 4004-2555) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงตรวจหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งหมด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งหมด ตามวิธีมาตรฐานในมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 4004-2555) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555)

นำถั่วยอบอลูมิเนียมที่มีฝาปิดมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นใส่ตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการสแกนแล้วในข้อ 3.3.1 ปริมาณ 5 ± 1 กรัม แล้วนำไปชั่งน้ำหนักก่อนอบ จากนั้น นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ± 5 นาที แล้วทำให้ถั่วยอบอลูมิเนียมและตัวอย่างเย็นลง ด้วยการใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30-45 นาที แล้วชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังอบอีกครั้ง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละสองซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (moisture content) ของตัวอย่าง (ภาคผนวก ค [1])

3.4.2 การตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการสแกนแล้วในข้อ 3.3.1 ตรวจหาการปนเปื้อนของราด้วยวิธี direct plating จากนั้น คัดแยกและจัดจำแนกราที่คาดว่าสามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา และนำราที่คัดแยกได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1

3.4.2.1 วิธี direct plating

วิธี direct plating เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ นับจำนวน และคัดแยกราที่ปนเปื้อนในอาหารที่มีลักษณะเป็นอนุภาคเล็กๆ (food particles) เช่น ธัญพืช และถั่วต่างๆ (Pitt และคณะ, 2009) ทำโดยสุมหีบเมล็ดข้าวกล้องที่ผ่านการสแกนแล้วจากบริเวณก้นภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างในข้อ 3.3.1 ตัวอย่างละ 50 เมล็ด วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) (ภาคผนวก ก [1]) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการคัดแยกและนับจำนวนราจากอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีค่า water activity (a_w) ต่ำกว่า 0.90 (Samson และคณะ, 2004) โดยวาง 10 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อด้วยวิธีการปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดข้าวกล้องที่พบการเจริญของราทั้งหมด และราที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลือง คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา (ภาคผนวก ค [2]) จากนั้น แยกราที่มี

ลักษณะโคโลนีสีเขียวอมเหลืองลงในอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อทำการทดลอง
ขั้นต่อไป

3.4.2.2 การจัดจำแนกรากโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา (morphological
characterization)

นารากที่คัดแยกโดยวิธี direct plating ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวอมเหลือง
ซึ่งคาดว่าสามารถผลิตอะพลาทอกซินปี 1 มาจัดจำแนก โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่
ลักษณะที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของ
โคโลนี และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic characters) ได้แก่ ลักษณะของ
conidia, conidiophores และ conidial heads ตามวิธีของ Samson และคณะ (2004) และ Pitt
และคณะ (2009) คัดเลือกรากที่จำแนกในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.4.2.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะพลาทอกซินปี 1 ของรากที่คัดแยก
ได้

(1) การผลิตอะพลาทอกซินปี 1 ของรากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นารากลักษณะโคโลนีสีเขียวอมเหลืองที่คัดแยกและจัดจำแนกแล้ว เลี้ยงบน
อาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยเก็บ
สปอร์และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียม
คลอไรด์ ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ที่ปลอดเชื้อ จากนั้น หยดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร
5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(2) การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะพลาทอกซินปี 1 จากอาหารเลี้ยง
เชื้อแข็ง

หลังจากบ่มครบ 7 วัน เจาะวุ้นจำนวน 3 ชื้นบริเวณกลางโคโลนี ใส่ลงใน
ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ชั่งน้ำหนักวุ้นที่เจาะ จากนั้น สกัดอะพลาทอกซินปี 1 โดยเติมเมทานอล
ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงในขวดแก้ว สกัดโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที กรองสารที่สกัด
ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารที่สกัดได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยเมทานอล
ด้วยแก๊สไนโตรเจนในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทแล้วเติมเฟส
เคลื่อนที่ (อะซีโทไนไตรล์:น้ำปลอดประจุ:เมทานอล ในอัตราส่วน 20:60:20) (ภาคผนวก ข [2])
ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กรองสารที่สกัดได้ด้วยหัวกรองสำเร็จรูป (syringe filter) ขนาด 0.22
ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณอะพลาทอกซินปี 1 ทันทันด้วยวิธี
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

(ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยใช้คอลัมน์ C18 (150x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น excision (λ_{exc}) 365 นาโนเมตร และ emission (λ_{em}) 435 นาโนเมตร ควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่สารอะฟลาทอกซินบี 1 เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time, RT) เท่ากับ 7 นาที

3.4.3 การตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี HPLC

การสกัดอะฟลาทอกซินบี 1 จากตัวอย่างข้าวกล้องโดยใช้อิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (immunoaffinity column) สำหรับตรวจหาอะฟลาทอกซิน (AflaTest, VICAM, USA) ตามวิธีสกัดของ VICAM (2003) เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับจาก AOAC International, United States Federal Grain Inspection Service (FGIS) และ European Committee for Standardization (CEN) (Leslie และคณะ, 2014)

นำสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่ผ่านการสแกนแบบที่ 3 ในข้อ 3.3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ตูดสารละลายตัวอย่างเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมนลงในกระบอกฉีดยา ขนาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ต่ออยู่กับอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (AflaTest, VICAM, USA) ปรับให้มีอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อล้างคอลัมน์ จากนั้น เติมนเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อชะอะฟลาทอกซินบี 1 ออกจากคอลัมน์ ระเหยเมทานอลด้วยแก๊สไนโตรเจนในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทแล้วเติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตนไนโตรล:น้ำปลอดประจุ:เมทานอล ในอัตราส่วน 20:60:20) (ภาคผนวก ข [2]) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองสารที่สกัดได้ด้วยหัวกรองสำเร็จรูป (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ทันทีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ในภาวะตามวิธีการในข้อ 3.4.2.3

3.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ประกอบด้วย

- 1.) แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้อง
- 2.) แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง
- 3.) แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราที่คาดว่าจะผลิตอะพลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง
- 4.) แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณอะพลาทอกซินปี 1 ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวกล้อง

3.5.1 การตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outlier)

นำค่าการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และค่าความเข้มข้นของอะพลาทอกซินปี 1 มาตรวจสอบค่าผิดปกติโดยใช้เงื่อนไข

$$\frac{x - \bar{x}}{SD} \geq 3$$

เมื่อ x คือ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างทั้งหมด

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมด

ค่าตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ (ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และค่าความเข้มข้นของอะพลาทอกซินปี 1) ที่ผ่านการตรวจสอบตามเงื่อนไขแล้ว จะต้องมามีค่าอยู่ในช่วง ± 3 หากมีค่าอยู่นอกช่วงดังกล่าว จะถูกให้กำหนดเป็นค่าผิดปกติ ซึ่งต้องตัดค่าตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวออกจากกลุ่มตัวอย่างที่จะใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

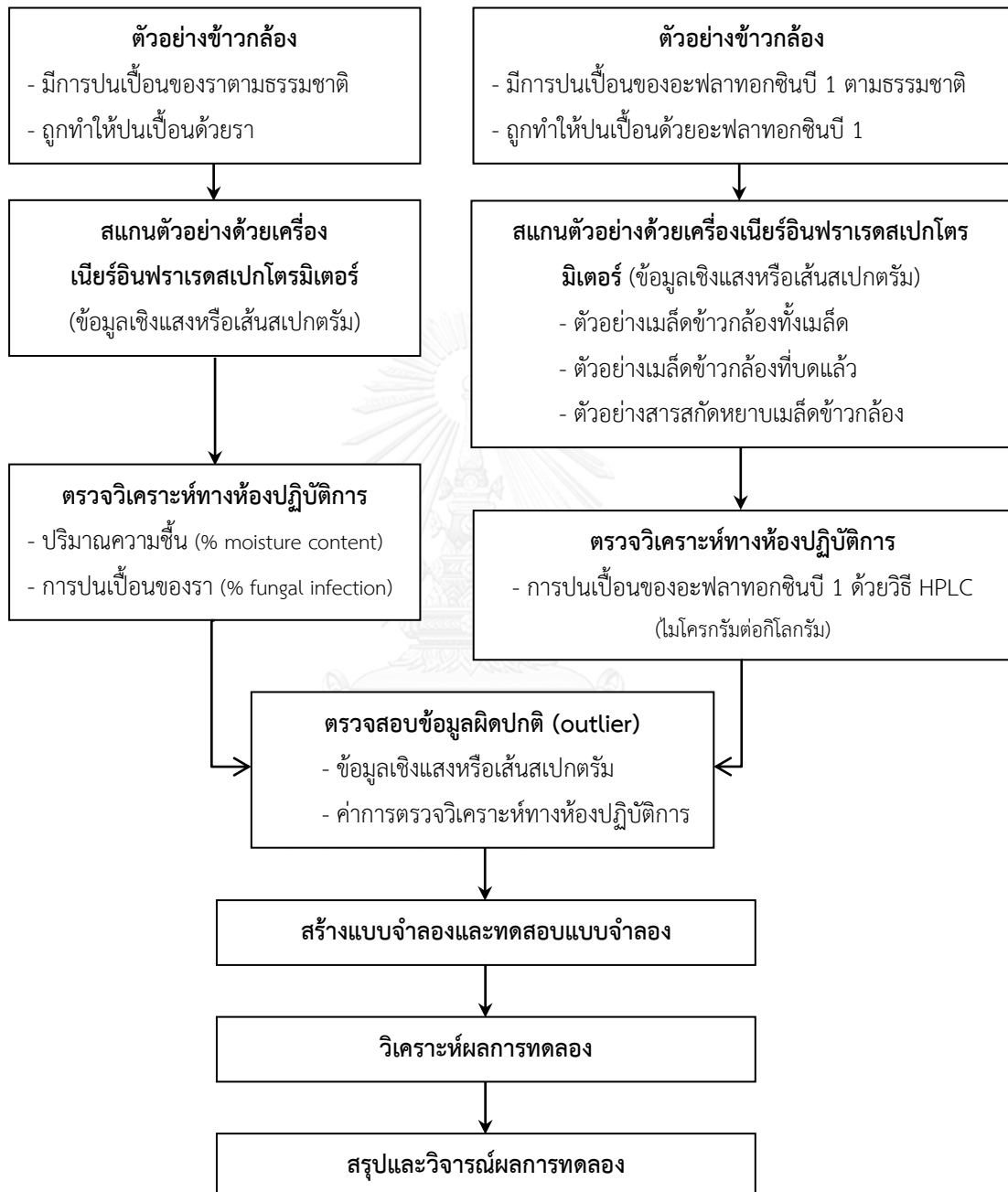
3.5.2 การสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนาย

หาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ตัดข้อมูล ผิดปกติออกแล้วและข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเพื่อสร้างแบบจำลอง โดยวิธีการถดถอย กำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) ข้อมูลถูกแบ่งเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (test set) โดยโปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker Optik GmbH) ทั้งนี้ การใช้ข้อมูลเชิงแสงในการวิเคราะห์จะใช้ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น (raw spectra) และที่มีการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectra) เช่น

- การปรับลบโดยค่าคงที่ (constant offset elimination)
- การปรับลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction)
- การปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (vector normalization, SNV)
- การปรับเป็นค่ามาตรฐาน (min-max normalization)
- การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scattering correction, MSC)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด (first derivative, 17 points)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด (second derivative, 17 points)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด และการปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (first derivative, 17 points + SNV)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด และการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (first derivative, 17 points + MSC)

จากนั้น ทดสอบแบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยวิธีการทดสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) โดยใช้กลุ่มทดสอบแบบจำลอง (test set) แล้วเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าทางสถิติ ได้แก่ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) สูงที่สุด ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (root mean square error of prediction, $RMSEP$) และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) ที่มีค่าต่ำที่สุด

แผนภาพสรุปขั้นตอนการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของราทั้งหมดและราในสกุล *Aspergillus* และการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง แสดงในภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของรา และการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

3.6 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

3.6.1 สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา

สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยการแบ่งกลุ่มจะพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราในสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโคไนส์เขียวอมเหลือง จากนั้น สร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่ม (classification model) ด้วยวิธี Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) และวิธี Partial Least Square-discriminant Analysis (PLS-DA) เมื่อได้แบบจำลอง นำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง คัดเลือกแบบจำลองจากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มที่ถูกต้องที่สุด

3.6.2 สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยการแบ่งกลุ่มจะพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 จากนั้น สร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่ม โดยใช้วิธีการตามข้อ 3.6.1

3.7 การทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย (laboratory performance)

การทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการทำงานในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยนั้นสามารถทดสอบโดยใช้ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความสม่ำเสมอหรือความแม่นยำของการวัดหรือวิเคราะห์ข้อมูลจากตัวอย่างเดียวกัน โดยใช้อุปกรณ์ชุดเดียวกัน ผู้ทดลองคนเดียวกันในภาวะห้องปฏิบัติการที่เหมือนกัน และค่าความสามารถในการวัดเหมือน (reproducibility) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความสม่ำเสมอหรือความแม่นยำของตัวผู้วัด (Tsutsumi และคณะ, 2011)

ดังนั้น ในการทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการทำงานในห้องปฏิบัติการเพื่อหาค่าปริมาณความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของผู้วิจัย ทำโดยอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์สุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่ผู้วิจัยไม่ทราบว่ามีความชื้น ค่าการปนเปื้อนของรา และปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในระดับใด มาแทรกในระหว่างทำการทดลองปกติ เพื่อให้ผู้วิจัยวิเคราะห์หาค่าปริมาณความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยตัวอย่างที่สุ่มมาทดสอบมี 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มตัวอย่าง duplication หมายถึง ตัวอย่างข้าวกล้องที่ซ้ำกับตัวอย่างในการทดลองปกติ โดยในการทดลองนี้มีตัวอย่าง duplication 6 คู่ ใช้สำหรับการคำนวณหาค่า

repeatability ซึ่งคำนวณได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ และ
2) กลุ่มตัวอย่าง blind หมายถึง ตัวอย่างข้าวกล้องที่ผู้วิจัยไม่ทราบว่าเป็นตัวอย่างใด โดยใช้ตัวอย่าง
blind 6 ตัวอย่าง สำหรับการคำนวณหาค่า reproducibility โดยคำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ของค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ระหว่างตัวอย่างจริงและตัวอย่าง blind



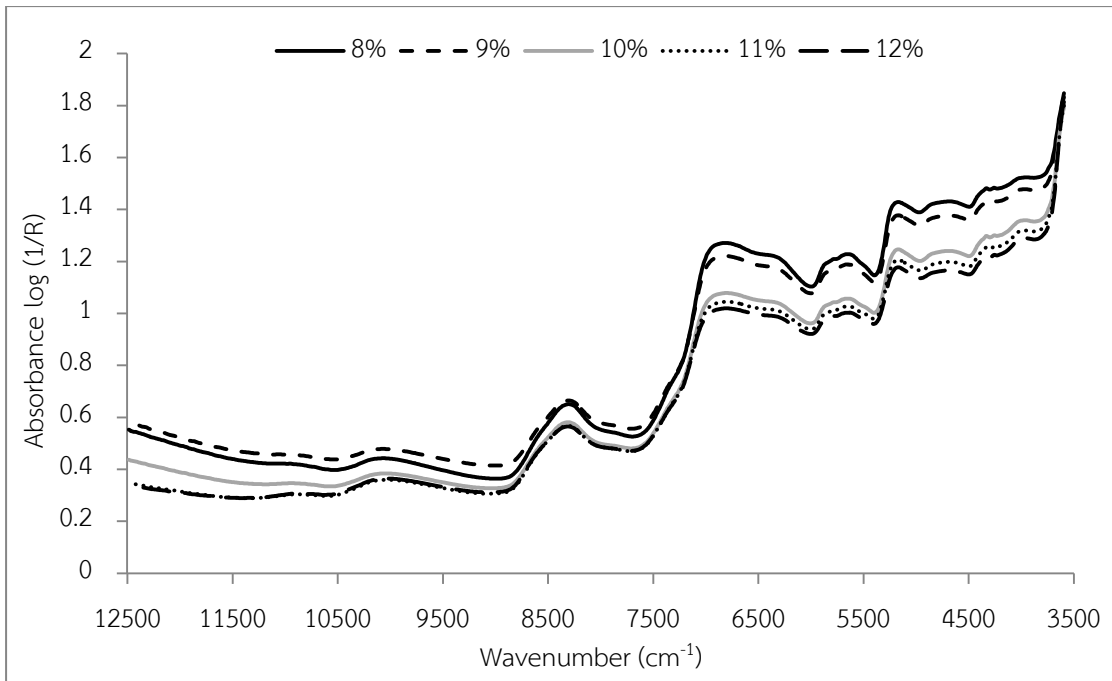
บทที่ 4

ผลการทดลอง

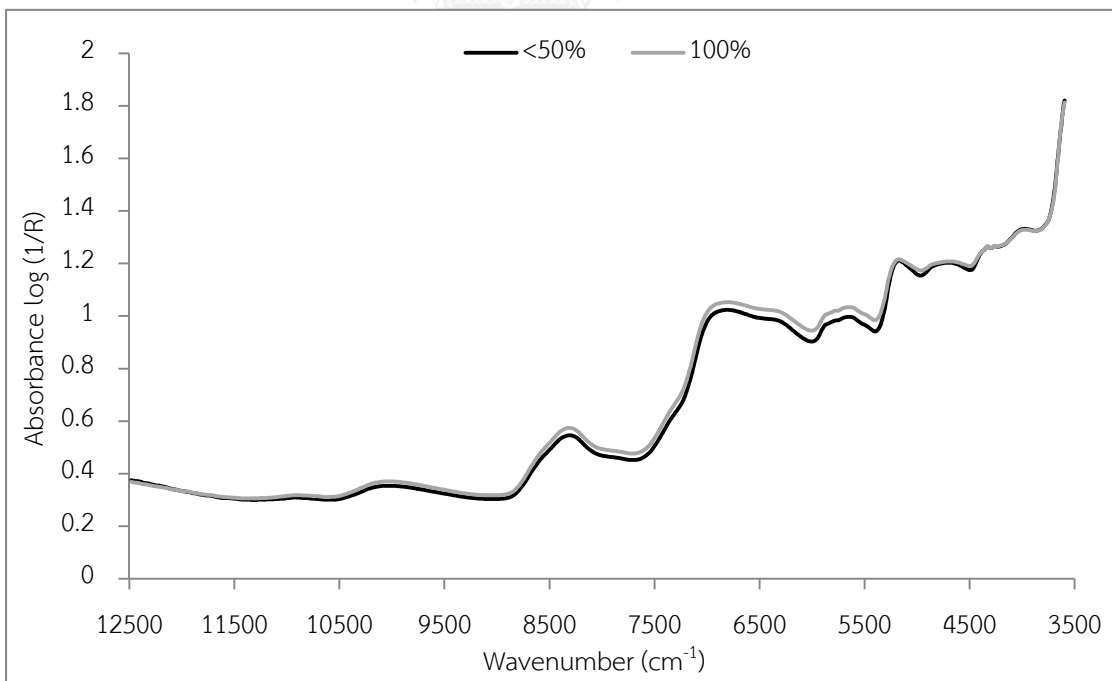
4.1 การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

4.1.1 ลักษณะข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา

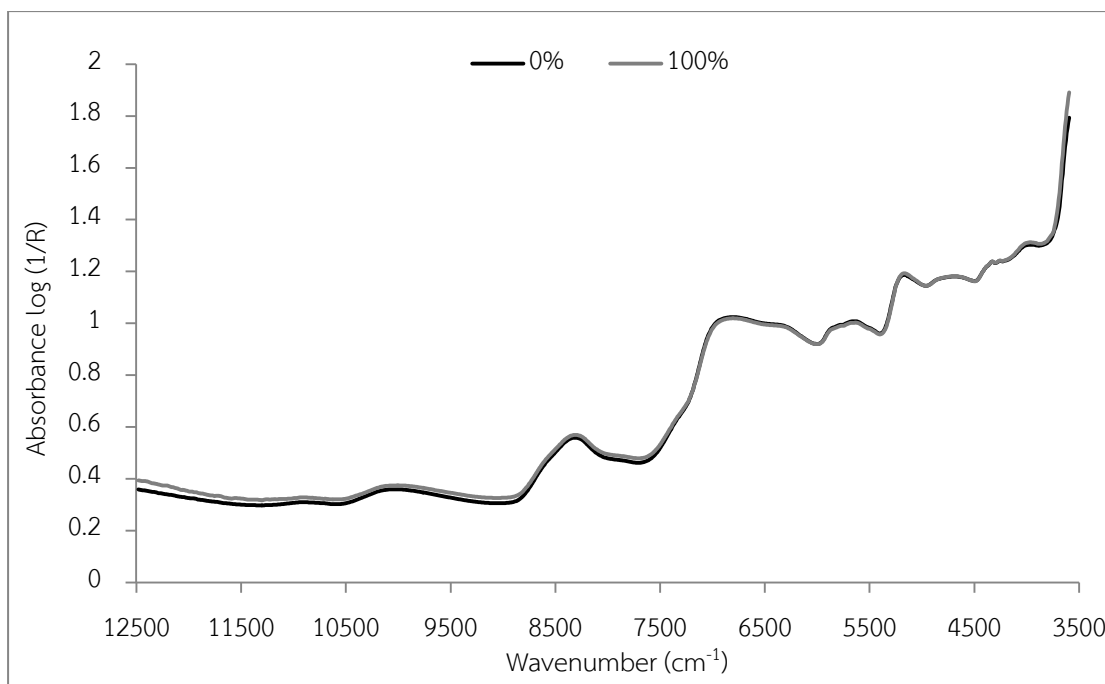
จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนเมล็ดข้าวกล้องเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) (MPA, Bruker, Germany) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ในแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) และเก็บข้อมูลด้วยโปรแกรม OPUS v.7.0.129 (Bruker Optik GmbH, Germany) ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นหรือสเปกตรัมดั้งเดิม (raw spectra) แสดงในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคลื่น (cm^{-1}) ในแนวแกน X กับค่าการดูดกลืนแสง ($\log(1/R)$) ในแนวแกน Y สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่างกันแสดงในภาพที่ 4.1 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโคโคนีสีเขียวมเหลือง แสดงในภาพที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ จากภาพที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 พบว่า ลักษณะของสเปกตรัมมีรูปแบบโดยรวมเหมือนกัน โดยค่า $\log(1/R)$ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อตัวอย่างข้าวกล้องมีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดต่างกัน (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ในขณะที่ ค่า $\log(1/R)$ ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโคโคนีสีเขียวมเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มที่เหมือนกัน (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.1 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นแตกต่างกัน 5 ระดับ (8-12 เปอร์เซ็นต์)



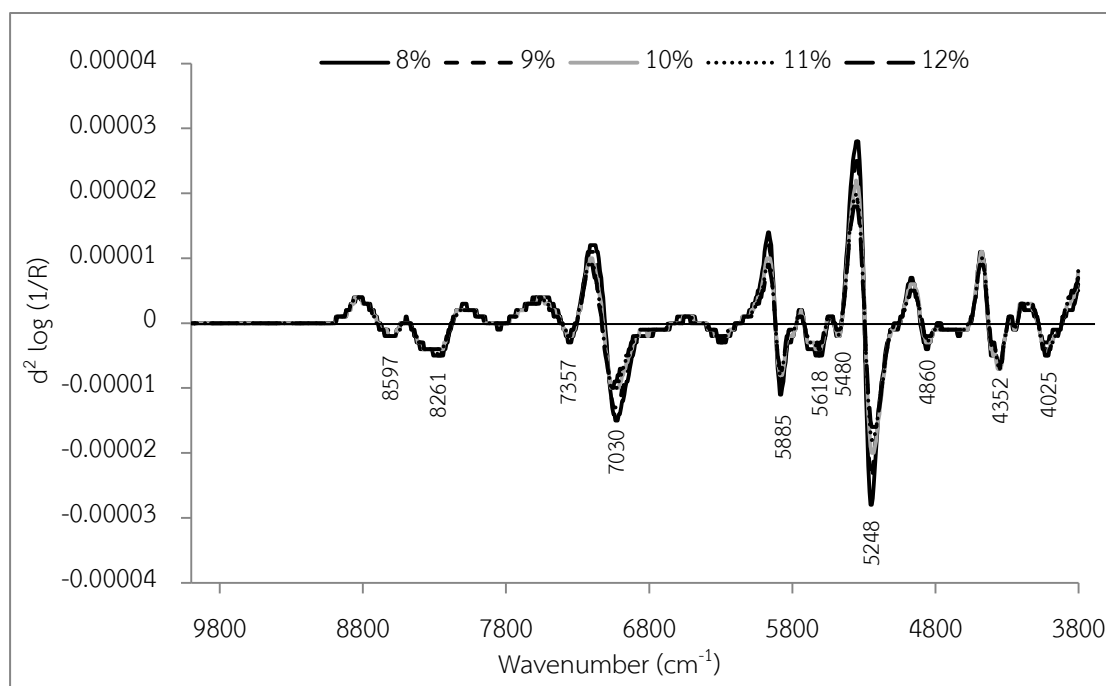
ภาพที่ 4.2 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



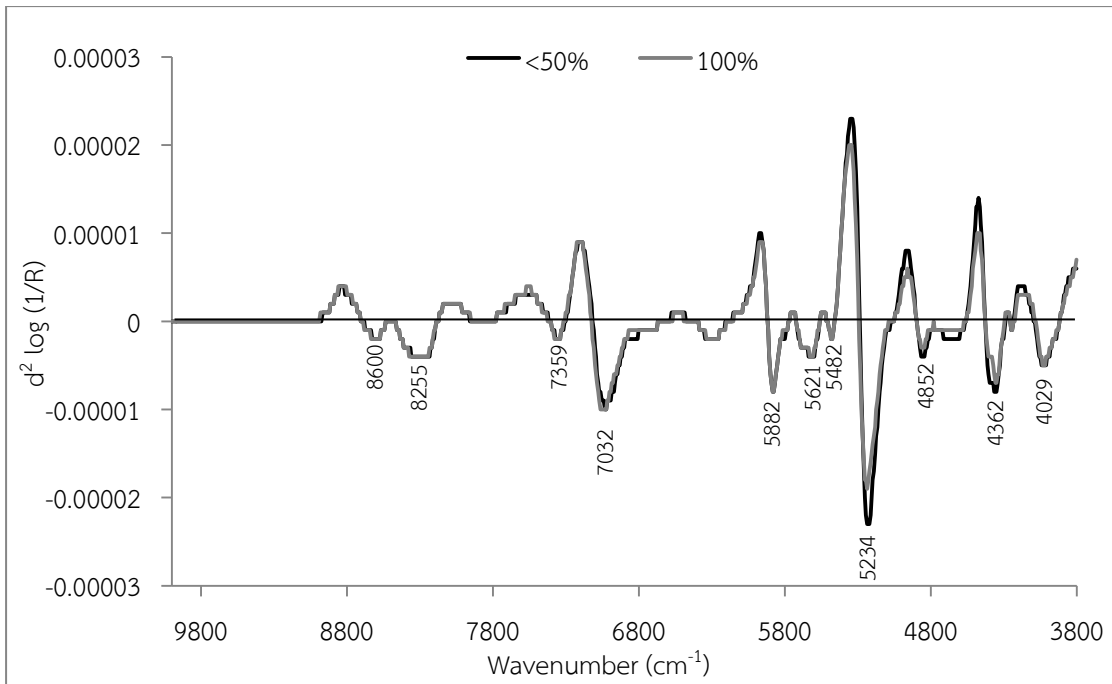
ภาพที่ 4.3 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์

การสังเกตพิกและลักษณะสเปกตรัมดั้งเดิมที่ปรากฏบางครั้งไม่ชัดเจนเนื่องจากสัญญาณรบกวน ดังนั้น การจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ เช่น การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทำให้สามารถสังเกตพิกและลักษณะสเปกตรัมที่ดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่นได้ง่ายและชัดเจนมากขึ้น (Conzen, 2006; อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล, 2552) ผลการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด (second derivative, 17 points) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่างกัน (ภาพที่ 4.4) ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดต่างกัน (ภาพที่ 4.5) และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลืองต่างกัน (ภาพที่ 4.6) พบว่า ลักษณะของสเปกตรัมปรากฏพิกหรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ชัดเจนขึ้นมากกว่าสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย และทั้ง 3 ภาพมีลักษณะคล้ายคลึงกันซึ่งปรากฏพิกสำคัญจำนวน 11 พิก ที่ช่วงจำนวนคลื่นใกล้เคียงกันที่ประมาณ 8609-8597, 8272-8255, 7361-7357, 7046-7030, 5885-5882, 5621-5618, 5482-5480, 5248-5234, 4861-4852, 4362-4352 และ 4030-4025 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ตัวอย่างพิกที่ปรากฏเด่นชัด เช่น พิกที่ 7046-7030 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H

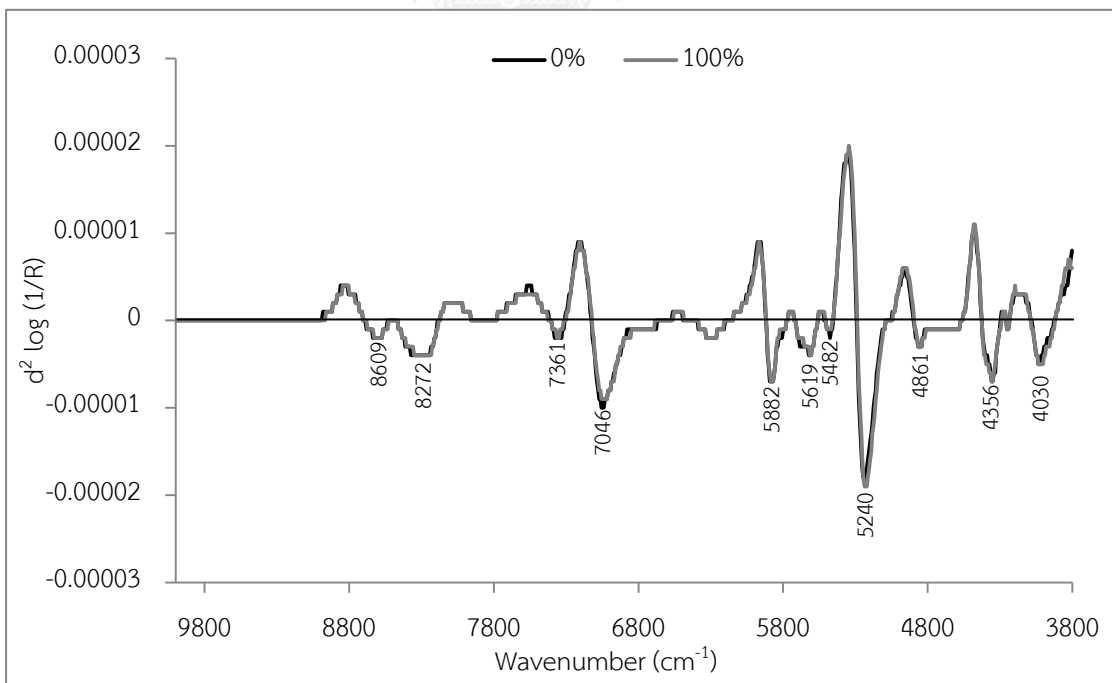
stretching first overtone ของแป้งและน้ำ พีคที่ 5621-5618 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1780 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching first overtone ของเซลลูโลส พีคที่ 5482-5480 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1820 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ 2x C-O stretching ของเซลลูโลส และพีคที่ 4030-4025 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2488 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-C stretching ของแป้ง เป็นต้น



ภาพที่ 4.4 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ (8-12 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4.5 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.6 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคลนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์และ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของพืคที่ปรากฏในสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในภาพที่ 4.4, 4.5 และ 4.6

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
8609 ^c , 8600 ^b , 8597 ^a	1162, 1163, 1163	1152	C-H str. second overtone	CH ₃
8272 ^c , 8261 ^a , 8255 ^b	1209, 1211, 1211	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
7361 ^c , 7359 ^b , 7357 ^a	1359, 1359, 1359	1360	2xC-H str. + C-H def.	CH ₃
7046 ^c , 7032 ^b , 7030 ^a	1419, 1422, 1422	1450	O-H str. first overtone	แป้ง, น้ำ
5885 ^a , 5882 ^{b,c} , 5621 ^b , 5619 ^c , 5618 ^a	1699, 1700, 1779, 1780, 1780	1705 1780	C-H str. first overtone C-H str. first overtone	CH ₃ เซลลูโลส
5480 ^a , 5482 ^{b,c} , 5248 ^a , 5240 ^c , 5234 ^b	1825, 1824, 1905, 1908, 1911	1820 1900	O-H str. + 2xC-O str. O-H str. + 2 × C-O str. C-O str. second overtone	เซลลูโลส แป้ง -CO ₂ H
4816 ^c , 4860 ^a , 4852 ^b	2057, 2058, 2061	2050	N-H sym. str. + amide II N-H asym. str. + amide III	โปรตีน CONH ₂
4362 ^b , 4356 ^c , 4352 ^a	2293, 2296, 2298	2294	N-H str. + C=O str.	กรดอะมิโน
4030 ^c , 4029 ^b , 4025 ^a	2481, 2482, 2484	2488	C-H str. + C-C str.	แป้ง

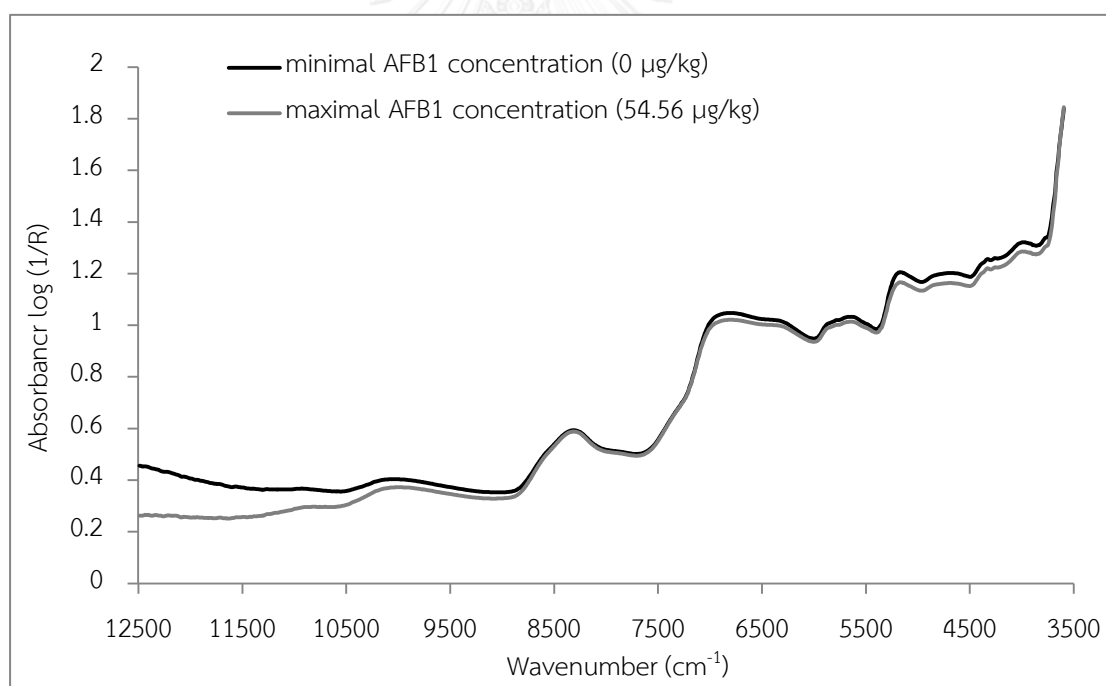
str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พืคสำคัญในภาพที่ 4.4, ^b พืคสำคัญในภาพที่ 4.5, ^c พืคสำคัญในภาพที่ 4.6

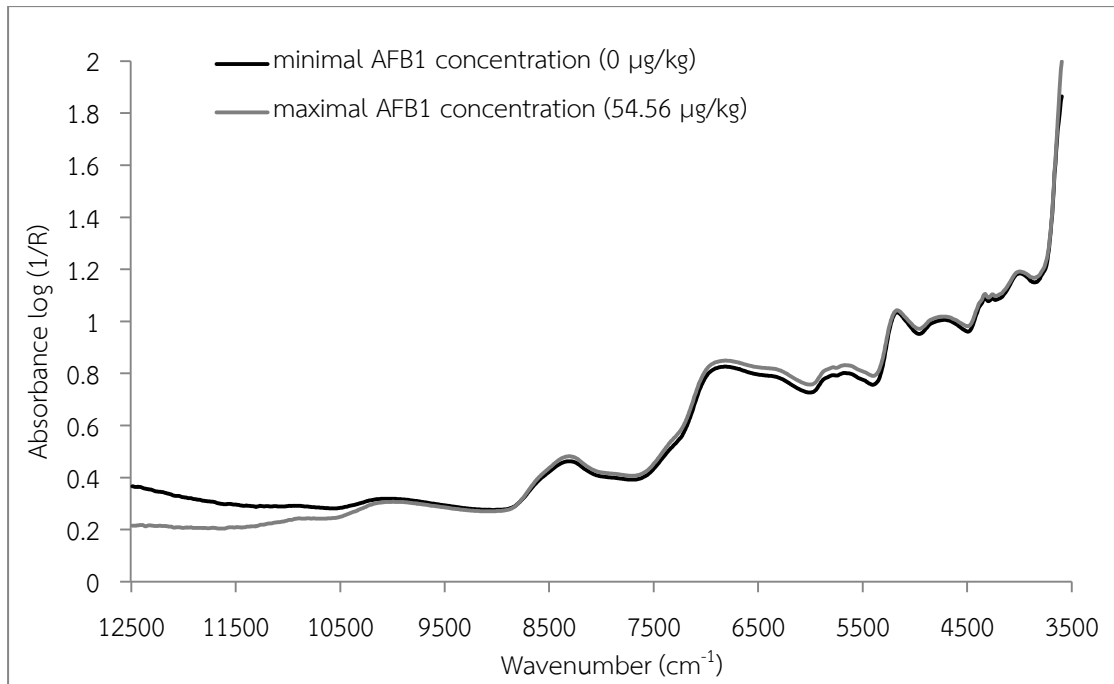
*Osborne และคณะ (1993)

4.1.2 ลักษณะข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

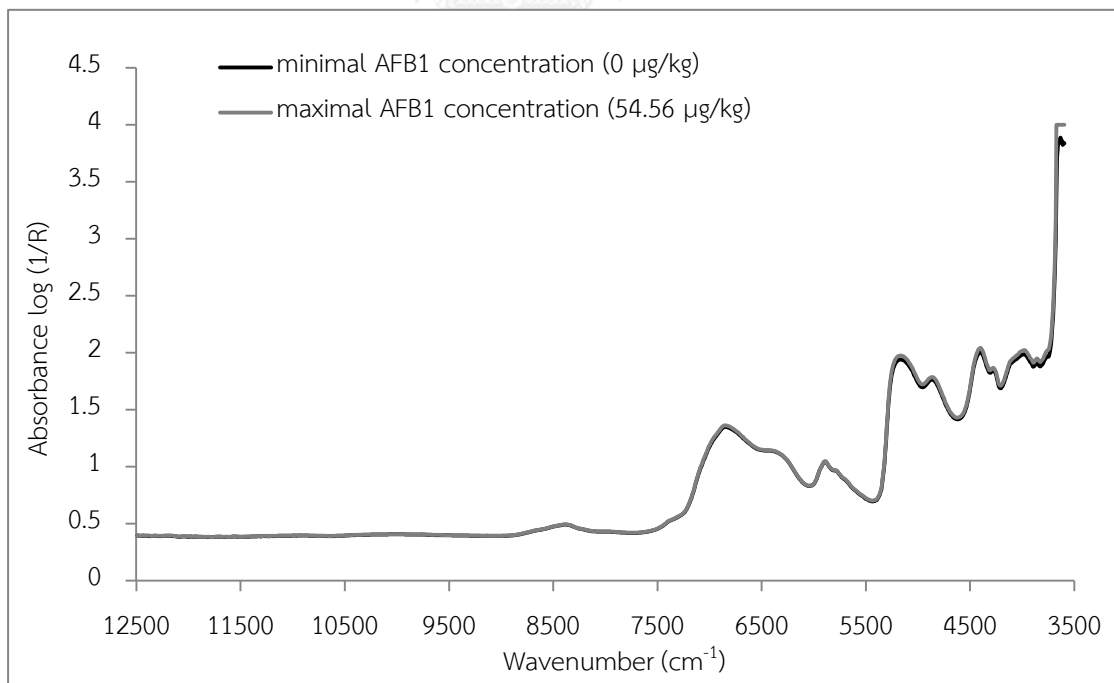
จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องสามแบบ ได้แก่ เมล็ดข้าวทั้งหมด เมล็ดข้าวที่บด และสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 3.3.2 ได้ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น แสดงในภาพที่ 4.7, 4.8, และ 4.9 สำหรับตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด ตัวอย่างเมล็ดข้าวที่บด และตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง ตามลำดับ ซึ่งแยกระหว่างตัวอย่างที่มีและไม่มี การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า ลักษณะสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด (ภาพที่ 4.7) และตัวอย่างข้าวกล้องที่บด (ภาพที่ 4.8) มีรูปแบบที่คล้ายกัน ในขณะที่สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.9) มีรูปแบบที่แตกต่างอย่างชัดเจน และค่า $\log(1/R)$ ของทั้งสามภาพมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงไม่ชัดเจนเมื่อตัวอย่างมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)



ภาพที่ 4.8 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่บดแล้วที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)



ภาพที่ 4.9 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างสารสกัดหยาบข้าวกล้องที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

ผลการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ดและตัวอย่างข้าวกล้องที่บดแล้วที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุดและสูงสุด แสดงดังภาพที่ 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ ซึ่งลักษณะของสเปกตรัมปรากฏพีกที่สำคัญหรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ คล้ายคลึงกับผลการทดลองข้อ 4.1.1 (ภาพที่ 4.4-4.6) รายละเอียดของพีกสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของพีกที่ปรากฏในสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ในภาพที่ 4.10 และ 4.11

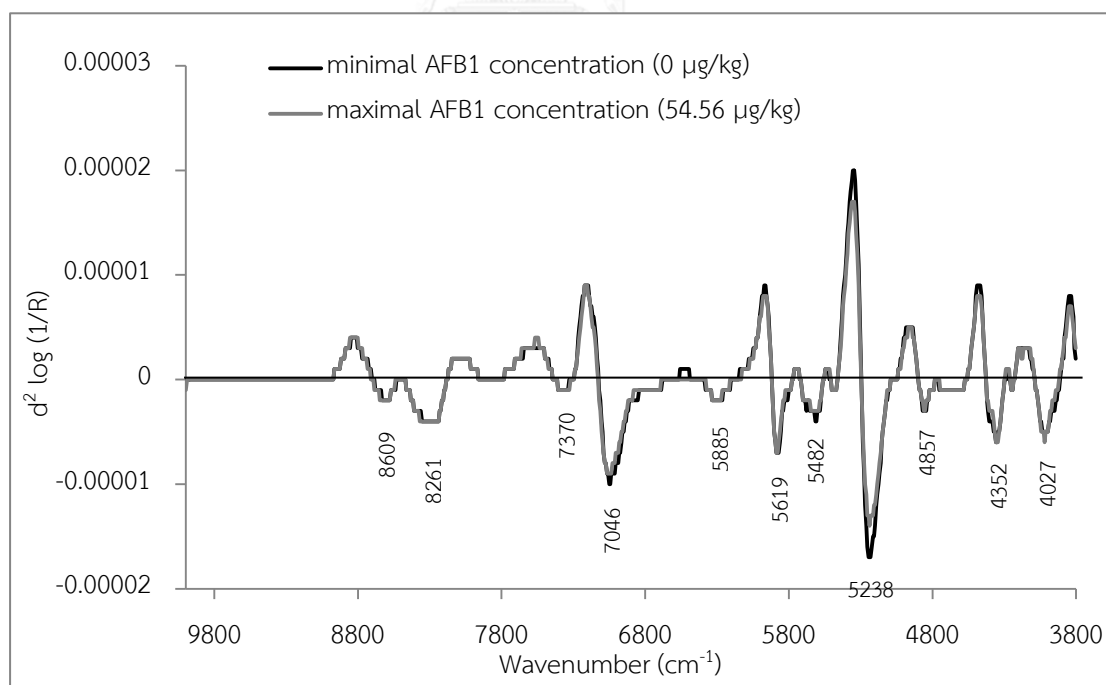
จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
8622 ^b , 8609 ^a	1160, 1162	1152	C-H str. second overtone	CH ₃
8261 ^a , 8259 ^b	1211, 1211	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
7370 ^a , 7361 ^b	1357, 1359,	1360	2×C-H str. + C-H def.	CH ₃
7046 ^a , 7032 ^b	1419, 1422	1450	O-H str. first overtone	แป้ง, น้ำ
5885 ^a , 5882 ^b	1699, 1700	1705	C-H str. first overtone	CH ₃
5679 ^b , 5619 ^a	1761, 1780	1780	C-H str. first overtone	เซลลูโลส
5482 ^{a, b}	1824	1820	O-H str. + 2×C-O str.	เซลลูโลส
5238 ^a , 5213 ^b	1909, 1918	1900	O-H str. + 2 × C-O str.	แป้ง
4857 ^a , 4852 ^b	2059, 2061	2050	C-O str. second overtone	-CO ₂ H
			N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
4354 ^b , 4352 ^a	2297, 2298	2294	N-H asym. str. + amide III	CONH ₂
			N-H str. + C=O str.	กรดอะมิโน
4027 ^a , 4025 ^b	2483, 2484	2488	C-H str. + C-C str.	แป้ง

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

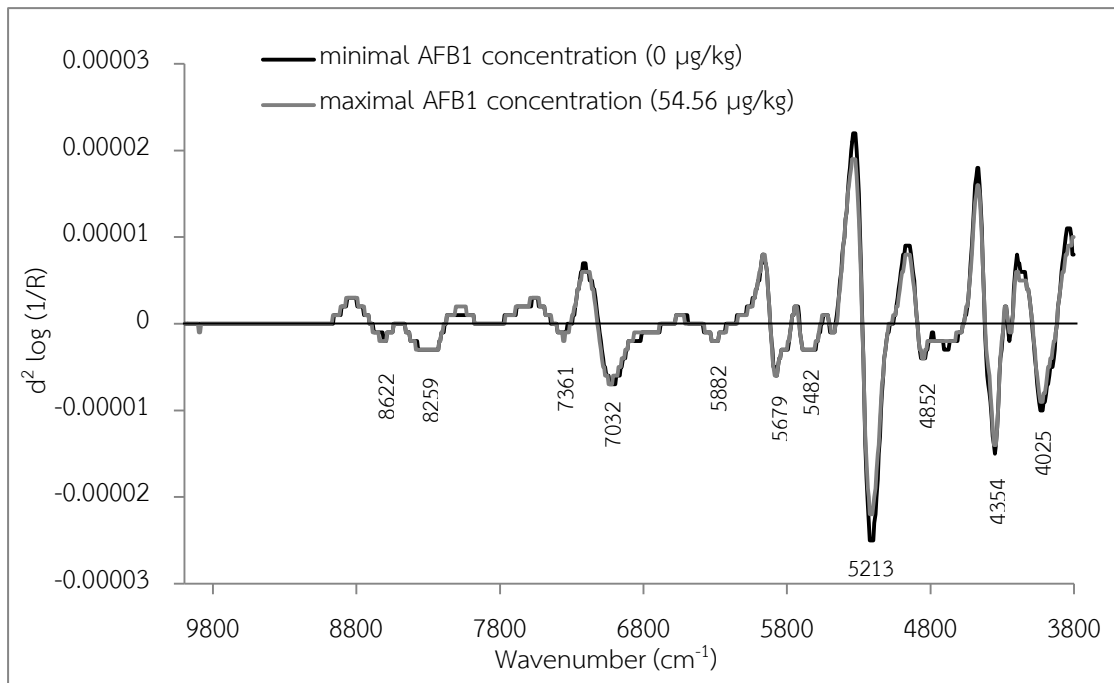
^a พีกสำคัญในภาพที่ 4.10, ^b พีกสำคัญในภาพที่ 4.11

*Osborne และคณะ (1993)

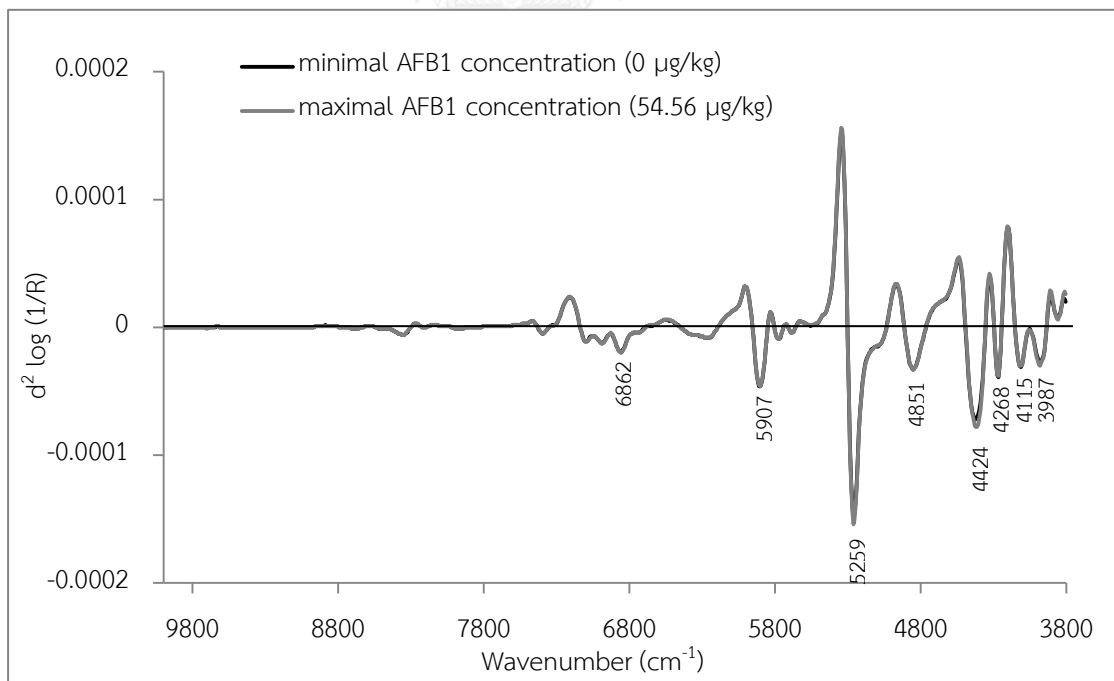
สำหรับลักษณะสเปกตรัมของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุดและสูงสุด ที่ผ่านการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด แสดงในภาพที่ 4.12 โดยปรากฏพีคที่เด่นชัดจำนวน 8 พีค ได้แก่ 6862, 5907, 5259, 4851, 4424, 4268, 4115, และ 3987 ต่อเซนติเมตร แต่ละพีคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พีคที่ 6862 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของแป้งและน้ำ พีคที่ 5259 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ 2x C-O stretching ของแป้ง และ C-O stretching second overtone ของ CONH₂ พีคที่ 4851 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2050 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ N-H symmetrical stretching และ amide II ของโปรตีน และ N-H asymmetrical stretching และ amide III ของ CONH₂ พีคที่ 4424 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2252 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ O-H deformation ของแป้ง พีคที่ 4115 และ 3987 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2461 และ 2500 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-C stretching ของแป้ง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)



ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่บดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)



ภาพที่ 4.12 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างสารสกัดหยาบข้าวกล้องที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (54.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

ตารางที่ 4.3 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของพืคที่ปรากฏในสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ของตัวอย่างสารสกัดหยาบข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.12)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
6862	1457	1450	O-H str. first overtone	แป้ง, น้ำ
5907	1693	1695	C-H str. first overtone	CH ₃
5259	1902	1900	O-H str. + 2 × C-O str.	แป้ง
			C-O str. second overtone	-CO ₂ H
4851	2061	2050	N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
			N-H asym. str. + amide III	CONH ₂
4424	2260	2252	O-H str. + O-H def.	แป้ง
4268	2343	2347	CH ₂ sym. str. + =CH ₂ def.	HC=CHCH ₂
4115	2430	2461	C-H str. + C-C str.	แป้ง
3987	2508	2500	C-H str. + C-C str.	แป้ง

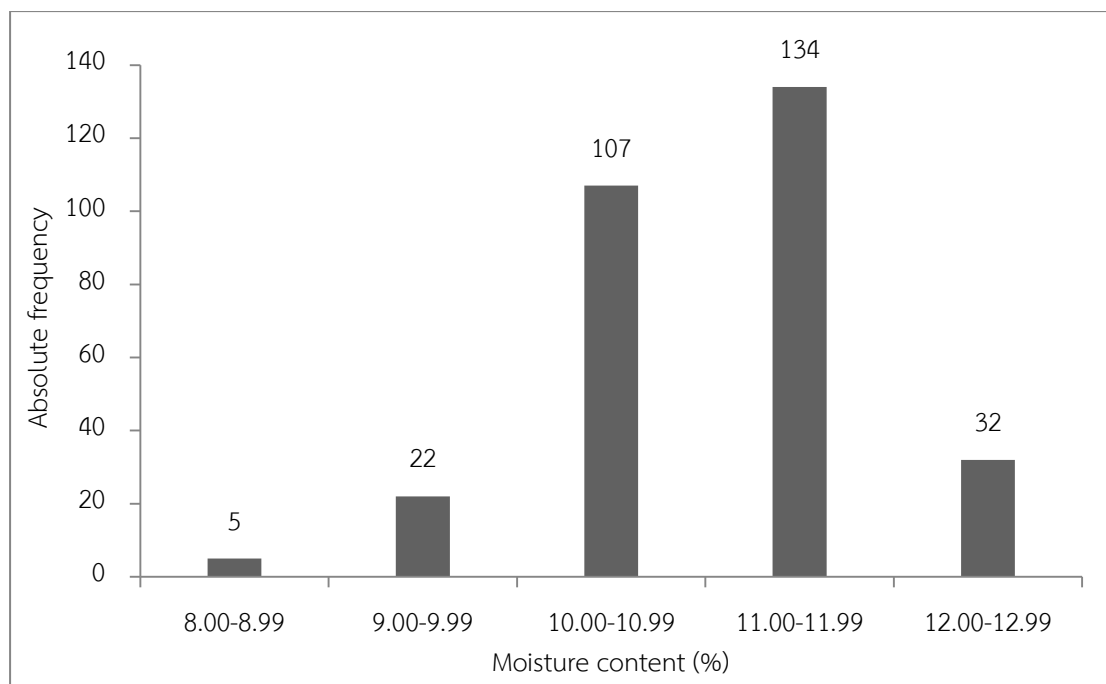
str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

*Osborne และคณะ (1993)

4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ

4.2.1 ปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวกล้อง

จากการตรวจหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่าง (300 ตัวอย่างย่อย) ตามวิธีมาตรฐานในมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 4004-2555) พบว่า ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งหมดมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 8.29-12.64 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตรที่กำหนดให้ความชื้นของข้าวกล้องไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ (มกษ. 4004-2555) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.01±0.81 เปอร์เซ็นต์ ภาพที่ 4.13 แสดงการแจกแจงความถี่ของปริมาณความชื้นฐานเปียกในตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด ซึ่งการกระจายตัวของปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องเป็นแบบไม่สมมาตร ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นอยู่ในช่วง 10.00-11.99 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 4.13 การแจกแจงความถี่ของปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดจำนวน 300 ตัวอย่างย่อย

4.2.2 การปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวกล้อง

4.2.2.1 ผลการตรวจหาการปนเปื้อนของราด้วยวิธี direct plating

จากการตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่าง (300 ตัวอย่างย่อย) จากห้างสรรพสินค้า ร้านสะดวกซื้อ ตลาดสด และโรงสีข้าวหรือโกดัง ภายในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ในช่วงปี พ.ศ. 2556-2557 ด้วยวิธี direct plating (ภาพที่ 4.14) พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของรา (total fungi) โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนของราสูงด้วยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (total fungal infection) เท่ากับ 95.21 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง พบการปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวกล้อง 83 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าวต่ำ (19.17 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.14 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DG18 ป่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

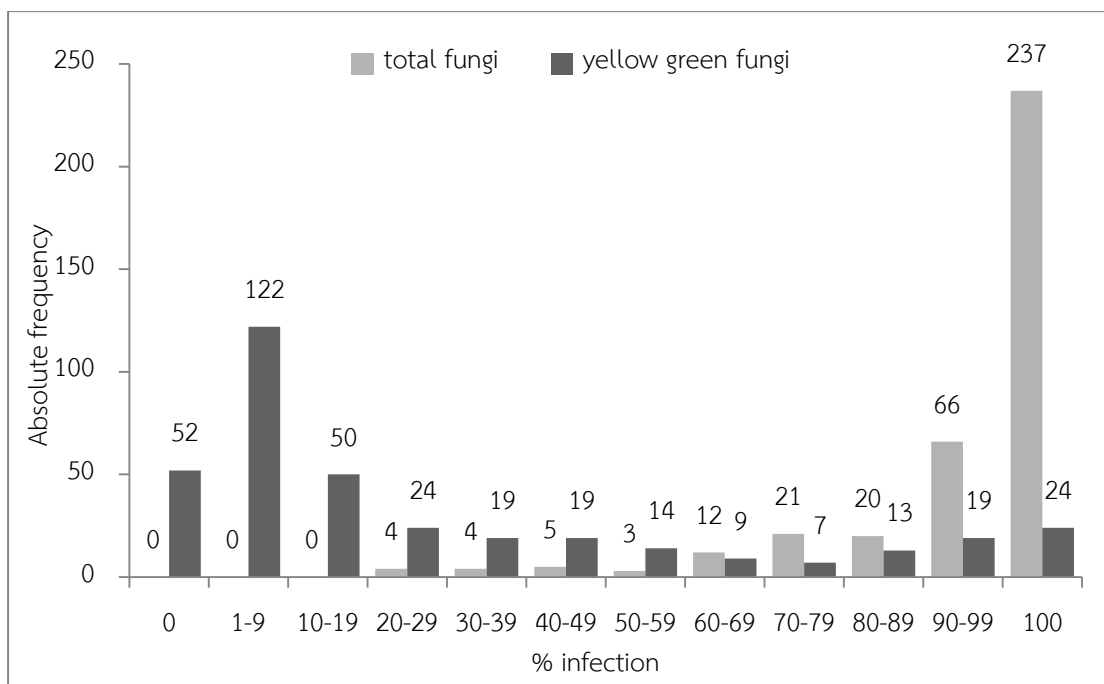
สำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราจากสารแขวนลอยสปอร์ของ *A. flavus* M3T8R4G3 จำนวน 36 ตัวอย่าง (72 ตัวอย่างย่อย) พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดมีการปนเปื้อนของรา มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เท่ากับ 84.53 เปอร์เซ็นต์ และมีตัวอย่างข้าวกล้อง 71 ตัวอย่างที่ปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าว เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

เมื่อรวมข้อมูลของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราทั้งสิ้นจำนวน 186 ตัวอย่าง (372 ตัวอย่างย่อย) พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของรา มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เท่ากับ 93.15 เปอร์เซ็นต์ และพบการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง 320 ตัวอย่างย่อย มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าว เท่ากับ 28.04 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง ในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยวิธี direct plating

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่าง ย่อย)	ชนิดของรา	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา		
			ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย
ตัวอย่างที่มีการ ปนเปื้อนราตาม ธรรมชาติ	150 (300)	ราทั้งหมด	36	100	95.21±10.72
		ราโคโลนีสีเขียว อมเหลือง	0	94	19.17±23.27
ตัวอย่างที่ถูกทำให้ ปนเปื้อนด้วยรา	36 (72)	ราทั้งหมด	22	100	84.53±23.70
		ราโคโลนีสีเขียว อมเหลือง	0	100	65±42.23
รวม	186 (372)	ราทั้งหมด	22	100	93.15±14.76
		ราโคโลนีสีเขียว อมเหลือง	0	100	28.04±33.26

ภาพที่ 4.15 แสดงการแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติจำนวน 150 ตัวอย่าง (300 ตัวอย่างย่อย) และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราจำนวน 36 ตัวอย่าง (72 ตัวอย่างย่อย) ซึ่งรวมตัวอย่างทั้งสิ้น 186 ตัวอย่าง (372 ตัวอย่างย่อย) พบว่าการกระจายตัวของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องเป็นแบบไม่สมมาตร โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดสูงในช่วง 90-100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองต่ำ ซึ่งอยู่ระหว่าง 0-19 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.15 การแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (total fungi) และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง (yellow green fungi) ในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา รวมทั้งสิ้น 372 ตัวอย่างย่อย

4.2.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของราที่คัดแยกได้

จากการตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติด้วยวิธี direct plating สามารถคัดแยกราที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวอมเหลืองซึ่งคาดว่าสามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้จำนวน 277 ไอโซเลต จากนั้น จัดกลุ่มราที่ลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อคัดเลือกราที่จำแนกในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* แล้วนำราแต่ละกลุ่มไปทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 โดยใช้หลักเกณฑ์ 3 ไอโซเลต เลือกรามาทดสอบ 1 ไอโซเลต แล้วทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.4.2.3 พบว่า ราที่คัดเลือกรามาทดสอบจำนวนทั้งหมด 93 ไอโซเลต สามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้จำนวน 72 ไอโซเลต (คิดเป็น 77.42 เปอร์เซ็นต์) อะฟลาทอกซินปี 1 ที่ผลิตได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.02-46483.69 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

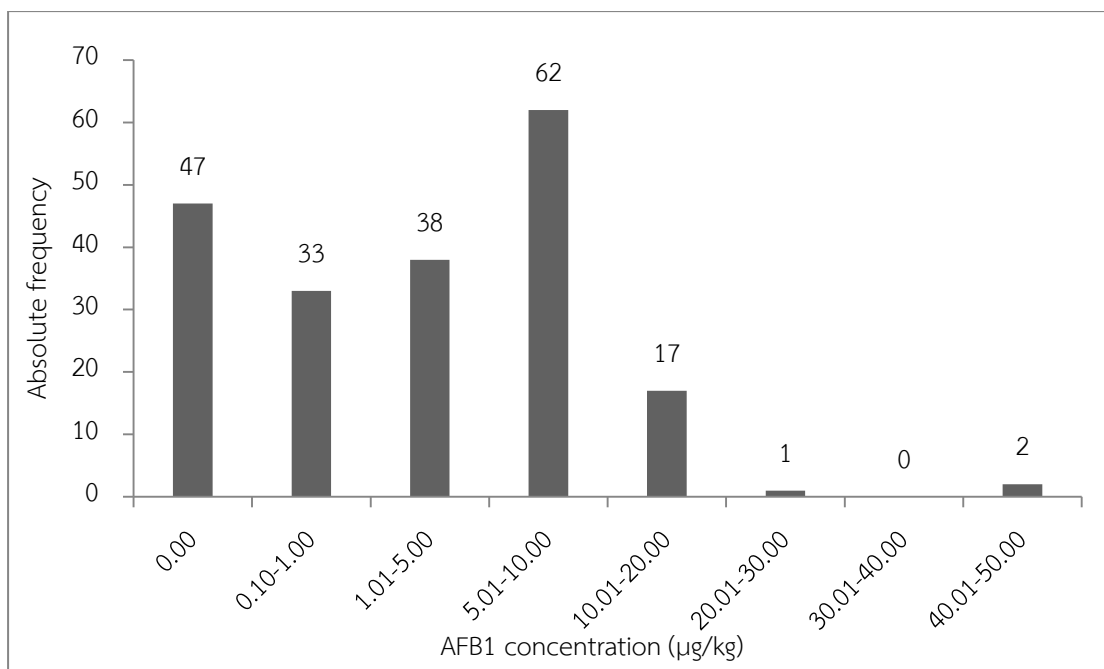
4.2.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

ผลการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.2 และ 3.4.3 แสดงในตารางที่ 4.5 ตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติจำนวน 50 ตัวอย่าง (100 ตัวอย่างย่อย) พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 53 ตัวอย่างย่อย (คิดเป็น 53 เปอร์เซ็นต์) มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 1.88 ± 7.08 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 50 ตัวอย่าง (100 ตัวอย่างย่อย) ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.86 ± 3.65 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเมื่อรวมข้อมูลการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.37 ± 6.15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.5)

การแจกแจงความถี่ของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ทั้งในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 จำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง (200 ตัวอย่างย่อย) แสดงดังภาพที่ 4.16 พบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่วิเคราะห์ได้มีการกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอ ตัวอย่างส่วนใหญ่ (98.5 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ต่ำและอยู่ในข้อกำหนดของประเทศไทยที่อนุญาตให้มีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่าง 50 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีตัวอย่าง 47 ตัวอย่าง (23.5 เปอร์เซ็นต์) ที่ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

ตารางที่ 4.5 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่มี การปนเปื้อน	ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
			ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย
ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนอะ ฟลาทอกซินบี 1 ตามธรรมชาติ	100	53	0.00	54.55	1.88 ± 7.08
ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อน ด้วยอะฟลาทอกซินบี 1	100	100	1.41	29.08	6.86 ± 3.65
รวม	200	153	0.00	54.55	4.37 ± 6.15



ภาพที่ 4.16 การแจกแจงความถี่ของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 200 ตัวอย่างย่อย

4.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

4.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการถูกตรวจสอบค่าผิดพลาดก่อนนำไปสร้างแบบจำลอง ตามวิธีการทดลองข้อ 3.5.1 ซึ่งไม่พบค่าผิดพลาดจากข้อมูลทั้งหมด จากนั้น สร้างแบบจำลองโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ โดยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) ซึ่งข้อมูลเชิงแสงที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองเป็นสเปกตรัมที่ไม่มีการจัดการเบื้องต้นหรือที่มีการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ รายละเอียดข้อมูลที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.6 จากนั้น แบ่งข้อมูลทั้งหมดเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (test set) ด้วยโปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker Optik GmbH) ทดสอบแบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยวิธีการทดสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) โดยใช้กลุ่มทดสอบแบบจำลอง แบบจำลองที่ได้จะแสดงค่าผิดพลาดของเส้นสเปกตรัม พิจารณาตัดค่าผิดพลาดออก และทดสอบแบบจำลองอีกครั้งแล้วเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุด

ตารางที่ 4.6 ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการและข้อมูลเชิงแสงหรือสเปกตรัมที่ใช้สร้างแบบจำลอง

แบบจำลอง	จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่างย่อย)	จำนวนข้อมูลเชิง แสง (เส้น)	ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ
แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น	150 (300)	900	ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น
แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ	150 (300)	900	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ
แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน	186 (372)	1116	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน
แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโคนีเซียวมเหลืองที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ	150 (300)	600	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโคนีเซียวมเหลืองที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ
แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโคนีเซียวมเหลืองที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน	186 (372)	1116	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโคโคนีเซียวมเหลืองที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน

สำหรับข้อมูลทางสถิติของค่าการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลองที่ดีที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.7

ข้อมูล	กลุ่มสร้างแบบจำลอง				กลุ่มทดสอบแบบจำลอง			
	จำนวน (เปอร์เซ็นต์)*	ค่า ต่ำสุด	ค่า สูงสุด	ค่าเฉลี่ย	จำนวน (เปอร์เซ็นต์)*	ค่า ต่ำสุด	ค่า สูงสุด	ค่าเฉลี่ย
1. เปอร์เซ็นต์ความชื้น	445 (50)	8.29	12.53	10.96±0.83	440 (50)	8.31	12.48	11.04±0.79
2. เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ	540 (60)	36	100	95.97±10.16	328 (40)	38	100	96.26±9.3
3. เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติและที่ถูกล้างให้ปนเปื้อนด้วยรา	672 (60)	22	100	94.50±13.04	444 (40)	22	100	91.09±16.83
4. เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราในสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ	630 (70)	0	94	19.34±21.55	270 (30)	0	94	18.78±26.82
5. เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราในสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติและที่ถูกล้างให้ปนเปื้อนด้วยรา	511 (50)	0	100	28.80±33.43	508 (50)	0	100	26.78±32.32

*สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างในกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลอง

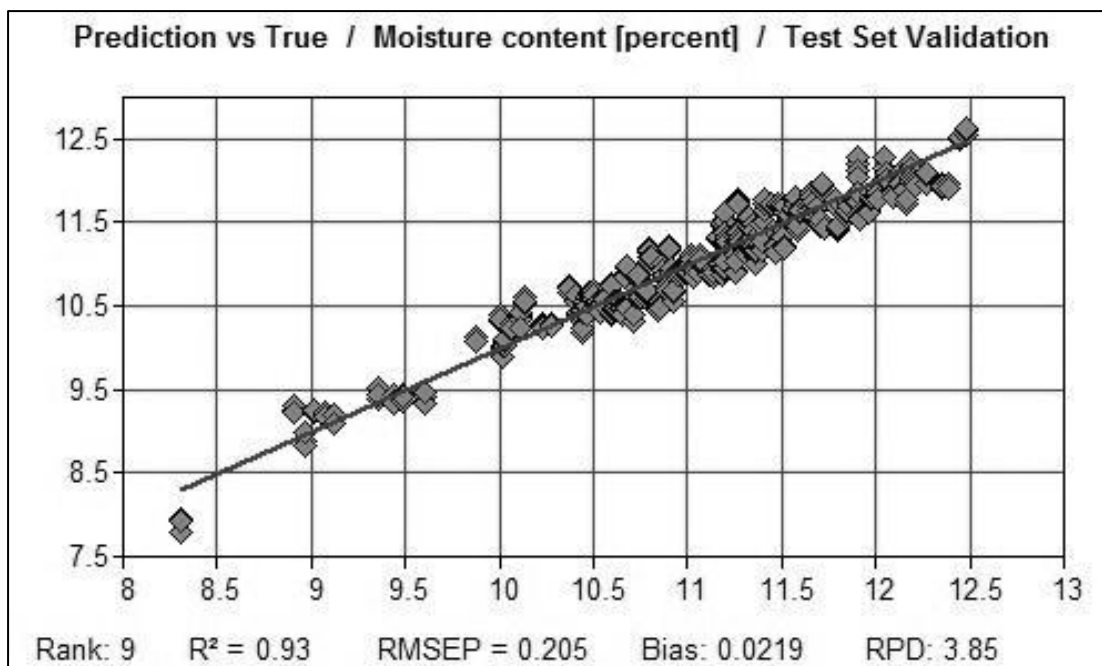
4.3.1.1 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรกแสดงในตารางที่ 4.8 โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 9403.8-7498.3 และ 5454-4242.9 ต่อเซนติเมตร และถูกตัดค่าผิดปกติของเส้นสเปกตรัมออกจากแบบจำลองจำนวนทั้งหมด 14 เส้น (คิดเป็น 1.56 เปอร์เซ็นต์) มีค่า Rank หรือ PLS factor เท่ากับ 9 ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.93 ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (root mean square error of prediction, $RMSEP$) เท่ากับ 0.205 เปอร์เซ็นต์ ค่าอัตราส่วนระหว่างค่า SEP ต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (ratio of standard error of prediction validation to standard deviation, RPD) เท่ากับ 3.85 และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เท่ากับ 0.0219 เปอร์เซ็นต์ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์เมล็ดข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการและค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ดีที่สุด แสดงดังภาพที่ 4.17

ตารางที่ 4.8 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก

การจัดการสเปกตรัมโดย วิธีการทางคณิตศาสตร์	ช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	Rank	R^2	$RMSEP^*$	RPD	Bias*
straight line subtraction	9403.8-7498.3 5454-4242.9	9	0.93	0.205	3.85	0.0219
straight line subtraction	9403.8-7498.3 4852.3-4242.9	7	0.92	0.225	3.47	-0.00367
multiplicative scattering correction	9403.8-7498.3 5454-4242.9	9	0.92	0.227	3.45	-0.00107
first derivative + MSC (17 pts.)	9403.8-5446.3 4605.4-4242.9	9	0.91	0.229	3.43	-0.0259
first derivative (17 pts.)	9403.8-7498.3 6102-4242.9	9	0.91	0.23	3.42	-0.0185

*หน่วย: เปอร์เซ็นต์

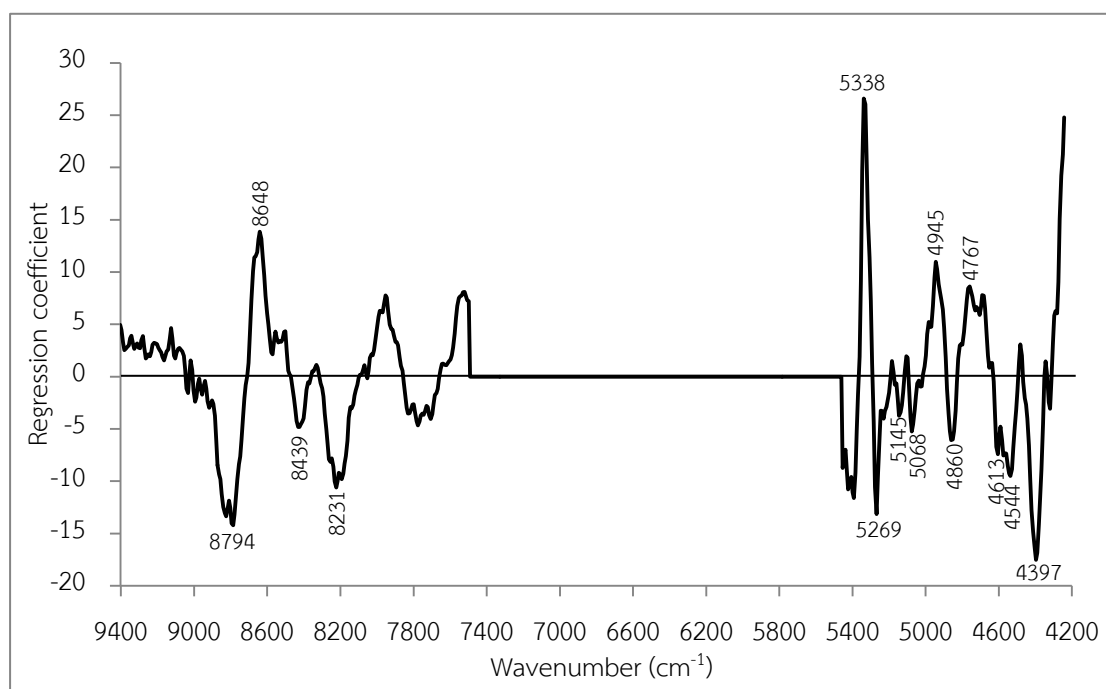


ภาพที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์เมล็ดข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลดโดยเส้นตรง

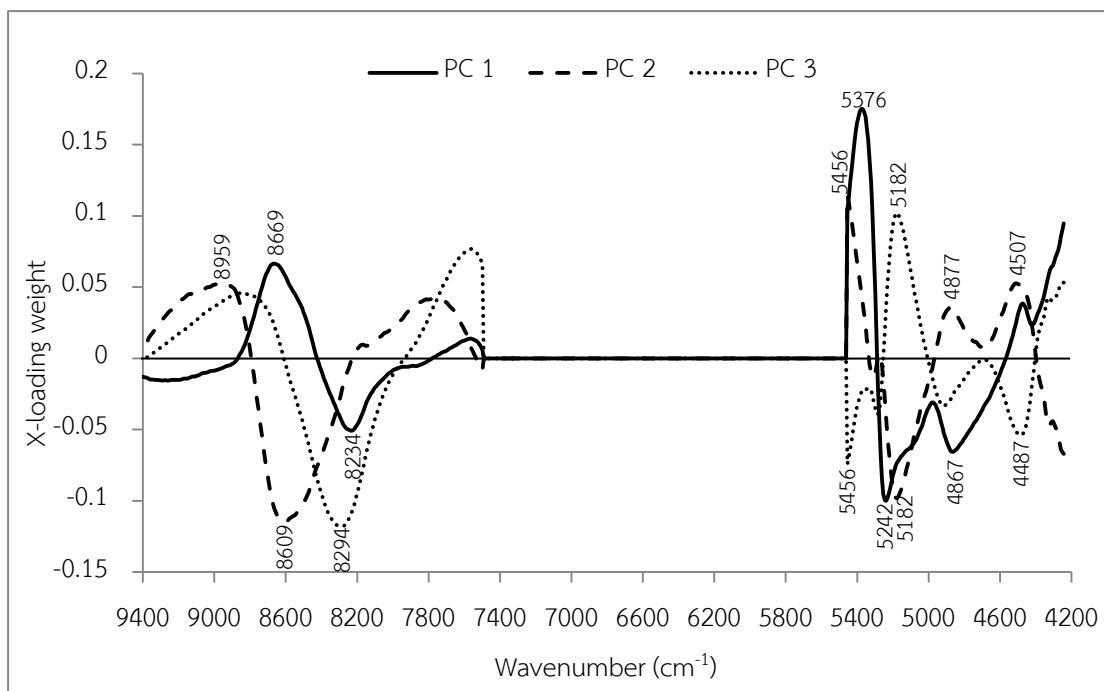
ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) เป็นค่าที่ใช้ในการตรวจสอบผลกระทบการดูดกลืนคลื่นที่จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร) ต่างๆ สำหรับการทำนายตัวแปรตาม (ตัวแปร Y) โดยค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีค่าสูงที่จำนวนคลื่นใด บ่งชี้ถึงอิทธิพลของจำนวนคลื่นนั้นต่อแบบจำลองอย่างมีนัยสำคัญ ภาพที่ 4.18 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR ประกอบด้วยพิกสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 8794, 8648, 8439, 8231, 5338, 5269, 5145, 5068, 4945, 4860, 4767, 4613, 4544 และ 4397 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.11

กราฟ X-loading weight plot เป็นกราฟที่สร้างขึ้นระหว่างค่า X-loading weight ของปัจจัย (factors) หรือองค์ประกอบ (principal components, PC) ต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างแบบจำลองกับจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร) โดยจำนวนคลื่นที่มีค่า X-loading weight สูง แสดงว่าจำนวนคลื่นนั้นมีอิทธิพลต่อการทำนายตัวแปรตาม (ตัวแปร Y) ภาพที่ 4.19 แสดงค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายปริมาณความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้อง โดย PC 1 ประกอบด้วยพิกสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 8669, 8234, 5376, 5242 และ 4867 ต่อเซนติเมตร PC 2 ประกอบด้วยพิกที่จำนวนคลื่น 8959, 8609, 5456, 5182,

4877 และ 4507 ต่อเซนติเมตร และ PC 3 ประกอบด้วยพีคสำคัญที่จำนวนคลื่น 8294, 5456, 5182 และ 4487 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพีคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พีคที่ 5456 และ 5376 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1820 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ 2x C-O stretching ของเซลลูโลส และพีคที่ 5242 และ 5182 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1940 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ O-H deformation ของน้ำ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.12



ภาพที่ 4.18 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR



ภาพที่ 4.19 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายปริมาณความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องที่สร้างด้วยวิธี PLSR

4.3.1.2 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมด

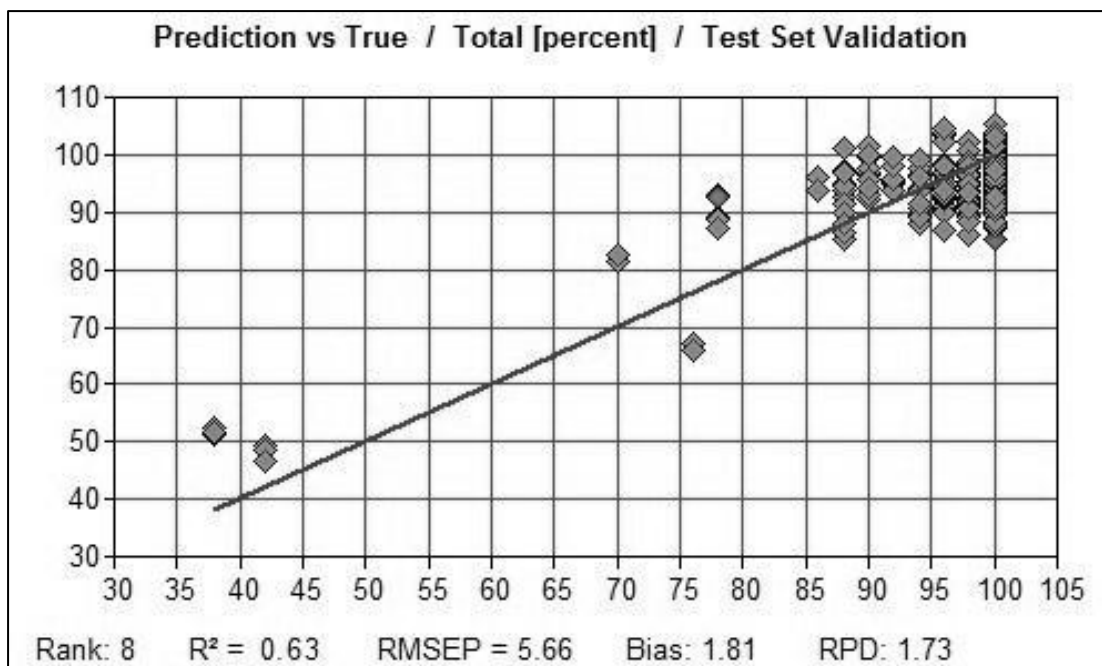
การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมด (total fungi) ได้ทดลองสร้างแบบจำลองโดยใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และแบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากตัวอย่างทั้งหมด (ปนเปื้อนตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน) ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.6 ได้ผลการสร้างแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.9 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมดที่สร้างจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่ใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดร่วมกับการปรับลบโดยเส้นตรง (first derivative + straight line subtraction (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 5454-4597.1 ต่อเซนติเมตร และถูกตัดค่าผิดปกติของเส้นสเปกตรัมออกจากแบบจำลองจำนวนทั้งหมด 32 เส้น (คิดเป็น 3.56 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งให้ผลการทำนายที่ดีที่สุดได้ค่า Rank หรือ PLS factor เท่ากับ 8 ค่า R^2 เท่ากับ 0.63 ค่า $RMSEP$ เท่ากับ 5.66 เปอร์เซ็นต์ ค่า RPD เท่ากับ 1.73 และค่า bias เท่ากับ 1.81 เปอร์เซ็นต์ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการและค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ดีที่สุด แสดงดังภาพที่ 4.20

ในขณะที่ แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างทั้งหมด ให้ผลการทำนายที่ไม่ดี มีค่า R^2 ต่ำ เท่ากับ 0.18-0.20 (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง ด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด 5 อันดับแรก

การจัดการสเปกตรัมโดย วิธีการทางคณิตศาสตร์	ช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	Rank	R^2	RMSEP*	RPD	Bias*
แบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ						
first derivative + straight line subtraction (17 Pts.)	5454-4597.1	8	0.63	5.66	1.73	1.81
vector normalization (SNV)	5454-4597.7	8	0.47	8.28	1.38	-0.157
straight line subtraction	7506-6094.3 5454-4597.7	4	0.46	8.35	1.37	-0.388
straight line subtraction	6102-4597.7	5	0.46	8.39	1.36	-0.195
min-max normalization	9403.8-7498.3 5454-4597.7	8	0.45	8.49	1.35	0.136
แบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากตัวอย่างทั้งหมด						
multiplicative scattering correction	9403.4-7498 6101.8-4597.6	9	0.20	15.1	1.15	-3.63
first derivative + MSC (17 Pts.)	9403.4-7498 6101.8-5446.1	6	0.19	15.1	1.15	-3.9
first derivative (17 Pts.)	9403.4-6094.1 5453.8-4597.6	7	0.18	15.2	1.14	-3.65
vector normalization (SNV)	9403.4-7498 5453.8-4597.6	9	0.18	15.2	1.13	-3.02
first derivative + Vector normalization (SNV) (17 Pts.)	9403.4-6094.1 5453.8-4597.6	8	0.18	15.2	1.13	-3.39

*หน่วย: เปอร์เซ็นต์

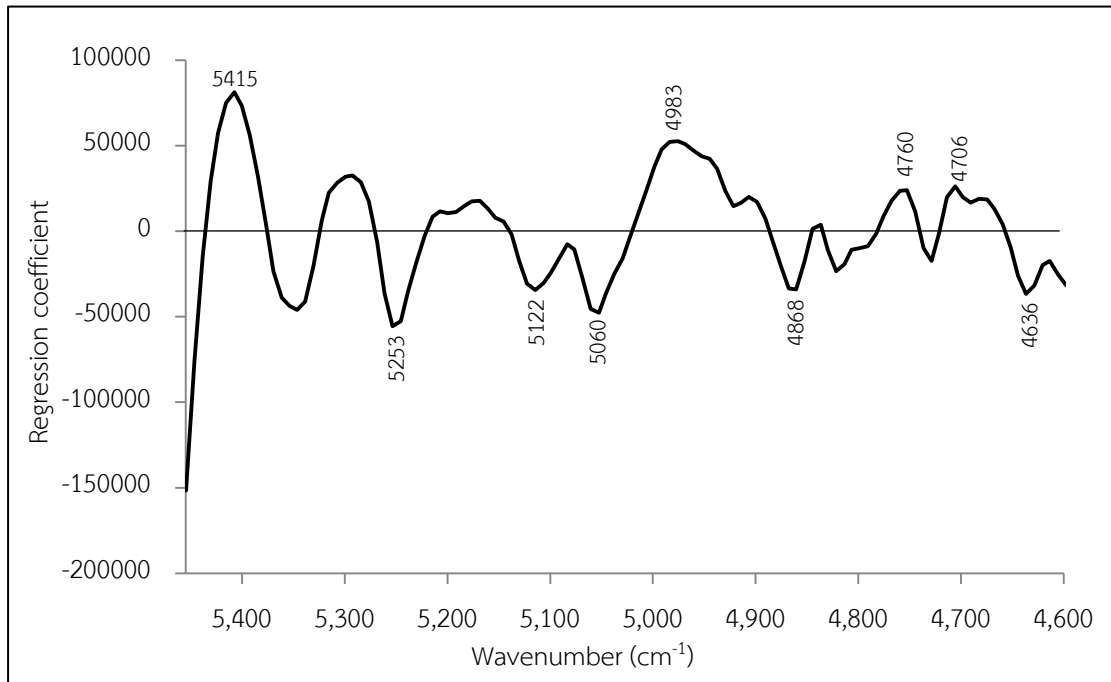


ภาพที่ 4.20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดและการปรับลบโดยเส้นตรง

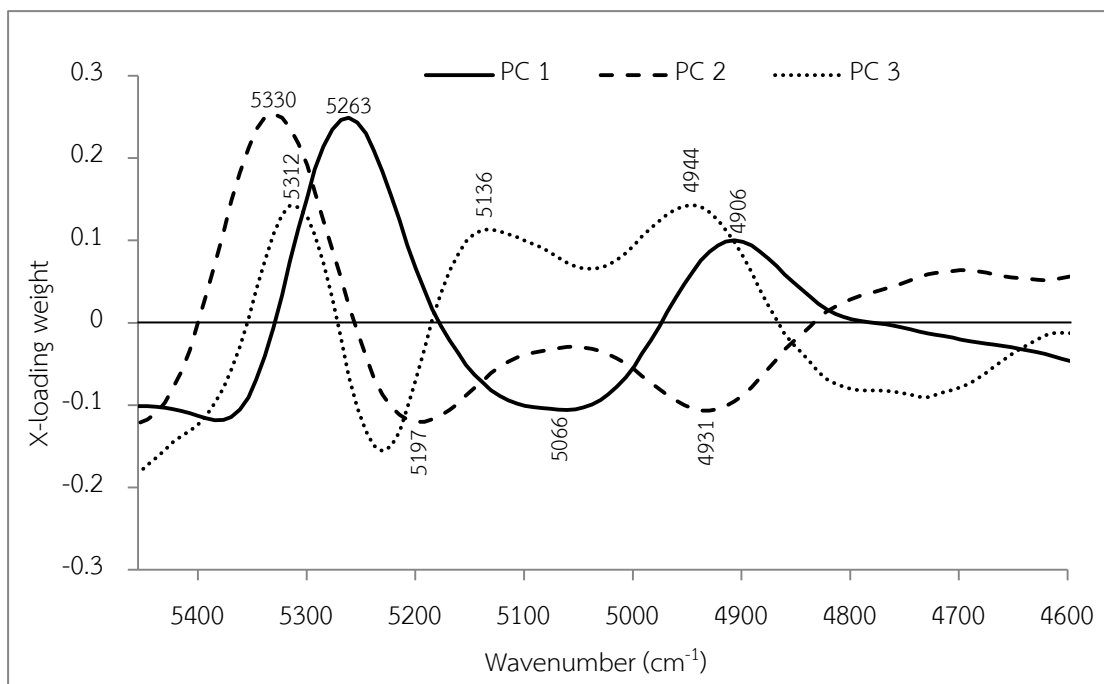
ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ ที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR แสดงในภาพที่ 4.21 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 5415, 5253, 5122, 5060, 4983, 4868, 4760, 4706 และ 4636 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.11

ภาพที่ 4.22 แสดงค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ โดย PC 1 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 5236, 5066 และ 4906 ต่อเซนติเมตร PC 2 ประกอบด้วยพิกัดที่จำนวนคลื่น 5330, 5197 และ 4931 ต่อเซนติเมตร และ PC 3 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่จำนวนคลื่น 5312, 5136 และ 4944 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พิกัดที่ 5330, 5312 และ 5236 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ 2×C-O stretching ของแป้ง พิกัดที่ 5197, 5136 และ 5066 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1940 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H

stretching และ O-H deformation ของน้ำ พีกที่ 4944, 4931 และ 4906 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2000 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ 2xO-H deformation และ C-H deformation ของแป้ง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.17



ภาพที่ 4.21 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR



ภาพที่ 4.22 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่สร้างด้วยวิธี PLSR

4.3.1.3 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus*

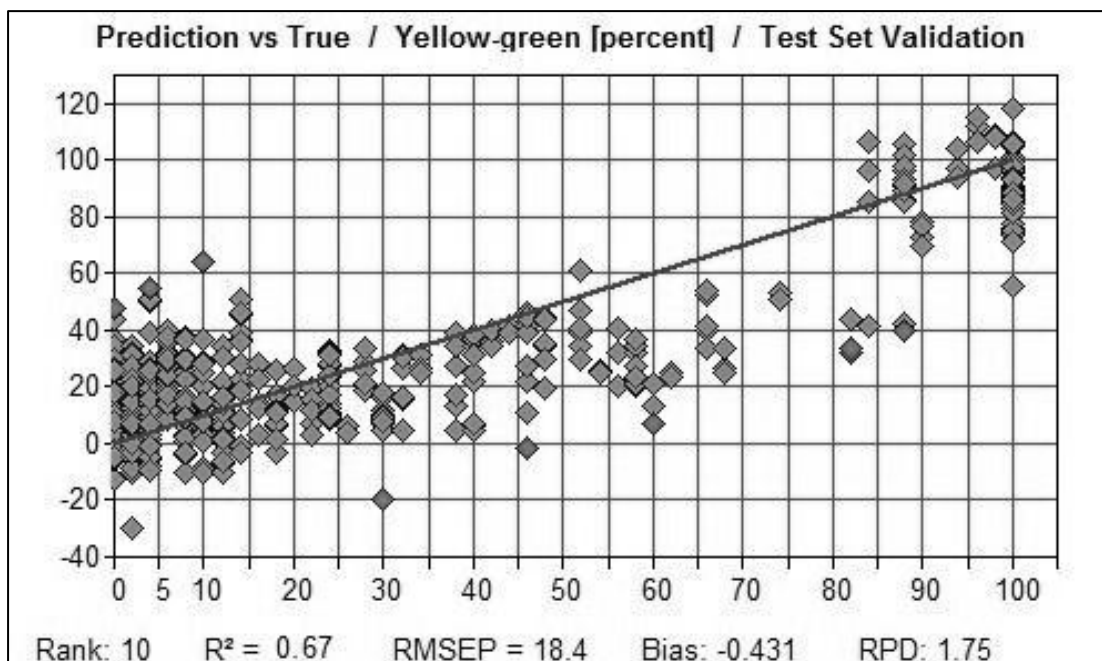
โคโลนีสีเขียวอมเหลือง

การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง ได้ทดลองสร้างแบบจำลองโดยใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และแบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากตัวอย่างทั้งหมด (ปนเปื้อนตามธรรมชาติและถูกทำให้ปนเปื้อน) ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10 แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด ให้ผลการทำนายที่ดีกว่าแบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากข้อมูลสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด (first derivative (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 9403.8-6094.3 ต่อเซนติเมตร และถูกตัดค่าผิดปกติของเส้นสเปกตรัมออกจากแบบจำลองจำนวนทั้งหมด 97 เส้น (คิดเป็น 8.69 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งให้ผลการทำนายที่ดีที่สุดด้วยค่า Rank หรือ PLS factor เท่ากับ 10 ค่า R^2 เท่ากับ 0.67 ค่า $RMSEP$ เท่ากับ 18.4 เปอร์เซ็นต์ ค่า RPD เท่ากับ 1.75 และค่า bias เท่ากับ -0.431 เปอร์เซ็นต์ ภาพที่ 4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ดีที่สุด

ตารางที่ 4.10 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก

การจัดการสเปกตรัมโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์	ช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	Rank	R^2	RMSEP*	RPD	Bias*
แบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ						
multiplicative scattering correction	9403.8-4597.7	10	0.32	22.1	1.21	0.377
vector normalization (SNV)	9403.8-6094.3 5454-4597.7	9	0.31	22.2	1.21	0.453
first derivative + straight line subtraction (17 Pts.)	9403.8-7498.3 4605.4-4242.9	5	0.29	22.6	1.19	0.946
straight line subtraction	7506-4242.9	9	0.28	22.7	1.18	0.93
constant offset elimination	9403.8-7498.3	6	0.28	22.7	1.18	-0.105
แบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากตัวอย่างทั้งหมด						
First derivative (17 Pts.)	9403.8-6094.3	10	0.67	18.4	1.75	-0.431
Multiplicative scattering correction	9403.8-4242.9	10	0.66	19.1	1.73	1.66
vector normalization (SNV)	9403.8-6094.3 5454-4242.9	10	0.66	19.3	1.26	1.19
Vector normalization (SNV)	9403.8-4242.9	9	0.54	22.5	1.48	1.69
Straight line subtraction	9403.8-7498.3 5454-4242.9	7	0.38	25.8	1.27	0.517

*หน่วย: เปอร์เซ็นต์

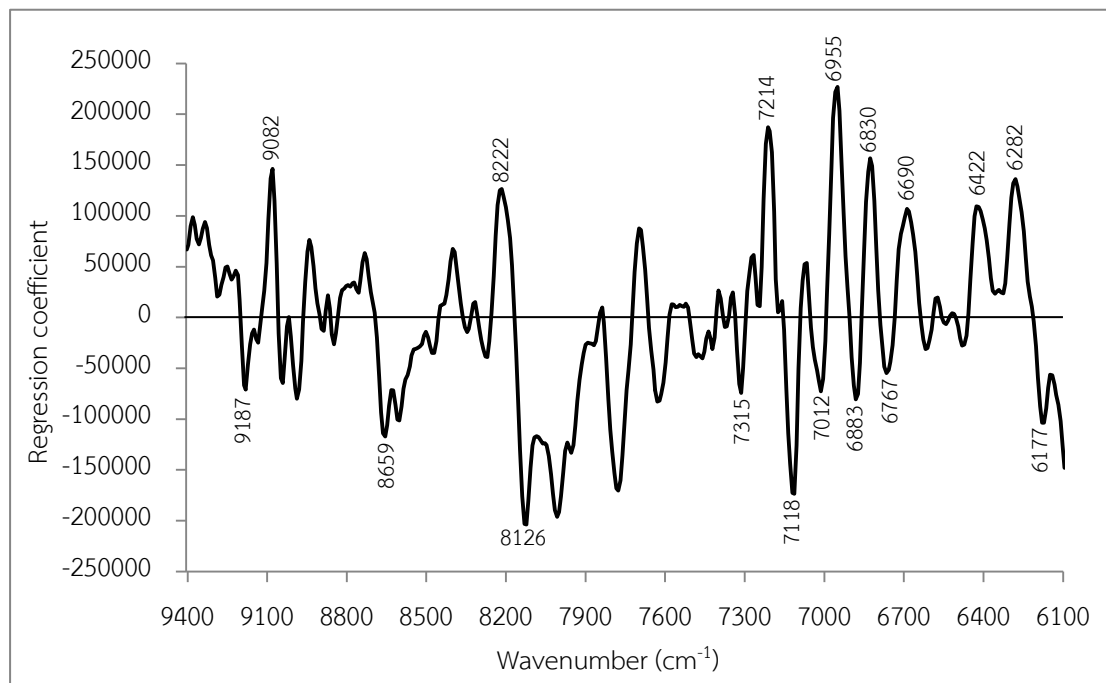


ภาพที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด

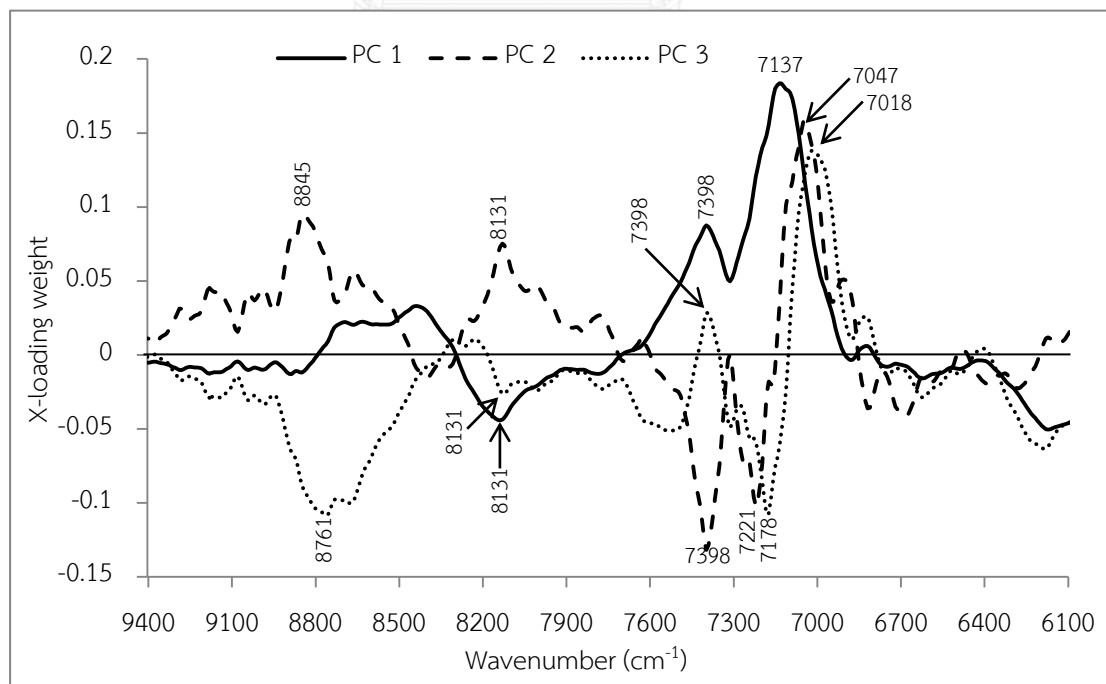
ภาพที่ 4.24 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และที่ถูกทำให้ปนเปื้อน ที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR ประกอบด้วยพิกสำคัญที่เด่นชัด เช่น พิกที่จำนวนคลื่น 9187, 9082, 8659, 8222, 8126, 7214, 7118, 6955, 6830 และ 6177 ต่อเซนติเมตร เป็นต้น ซึ่งรายละเอียดของแต่ละพิก ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ภาพที่ 4.25 แสดงค่า X-loading weight องค์กรประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่ดีที่สุด โดย PC 1 ประกอบด้วยพิกสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 8131, 7398 และ 7137 ต่อเซนติเมตร PC 2 ประกอบด้วยพิกที่จำนวนคลื่น 8845, 8131, 7398, 7221 และ 7047 ต่อเซนติเมตร และ PC 3 ประกอบด้วยพิกสำคัญที่จำนวนคลื่น 8761, 8131, 7398, 7178 และ 7018 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์กรประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พิกที่ 8845 และ 8761 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1143 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของอะโรมาติก พิกที่ 8131 และ 7398 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1225 และ 1360 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะไฮโดรคาร์บอน และพิกที่ 7047 และ 7018 ต่อ

เซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1820 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของแอลกอฮอล์ (ArOH) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.12



ภาพที่ 4.24 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR



ภาพที่ 4.25 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่สร้างด้วยวิธี PLSR

ตารางที่ 4.11 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของตัวอย่างข้าวกล้อง

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
9187 ^c	1088	1080	2xC-H str. + 2xC-C str.	เบนซีน
9082 ^c	1101	1097	2xC-H str. + 2xC-C str.	cyclopropane
8794 ^a	1137	1143	C-H str. second overtone	aromatic
8648 ^a , 8659 ^c	1156, 1155,	1152	C-H str. second overtone	CH ₃
8439 ^a	1185	1195	C-H str. second overtone	CH ₃
8231 ^a , 8222 ^c	1215, 1216	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
8126 ^c	1231	1225	C-H str. second overtone	CH
7315 ^c	1367	1360	2xC-H str. + C-H def.	CH ₃
7214 ^c	1386	1395	2xC-H str. + C-H def.	CH ₂
7118 ^c	1405	1410	O-H str. first overtone	ROH
7012 ^c	1426	1420	O-H str. first overtone	ArOH
6955 ^c	1438	1440	O-H str. first overtone	ซูโครส, แป้ง
			2xC-H str. + C-H def.	CH
6883 ^c	1453	1450	O-H str. first overtone	แป้ง, น้ำ
6830 ^c	1464	1460	N-H str. first overtone	CONH ₂
6767 ^c	1478	1471	N-H str. first overtone	CONHR
6690 ^c	1495	1490	N-H str. first overtone	CONHR
			N-H str. first overtone (intramol. H-bond)	CONH ₂
			O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	เซลลูโลส
6422 ^c	1557	1540	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	แป้ง
6282 ^c	1592	1580	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	แป้ง, กลูโคส
6177 ^c	1619	1620	C-H str. first overtone	=CH ₂

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.18, ^b พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.21, ^c พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.24

*Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของตัวอย่างข้าวกล้อง

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
5415 ^b	1847	1820	O-H str. + 2×C-O str.	เซลลูโลส
5338 ^a , 5269 ^a , 5253 ^b	1873, 1898, 1904	1900	O-H str. + 2 × C-O str.	แป้ง
5145 ^a	1944	1940	O-H str. + O-H def.	น้ำ
5122 ^b	1952	1950	C-O str. second overtone	-CO ₂ R
5068 ^a , 5060 ^b	1973, 1976	1980	N-H asym. str. + amide II	โปรตีน
4983 ^b	2007	2000	2×O-H def. + C-O def.	แป้ง
			N-H sym. str. + amide II	CONH ₂ , CONHR
4945 ^a	2022	2030	C=O str. second overtone	CONH ₂
4868 ^b , 4860 ^a	2054, 2058	2050	N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
			N-H asym. str. + amide III	CONH ₂
4767 ^a , 4760 ^b ,	2098, 2100,	2100	2×O-H def. + 2×C-O str.	แป้ง
4706 ^b	2125	2110	N-H sym. str. + amide III	CONH ₂ , CONHR
4636 ^b	2145, 2157	2150	2×amide I + amide III	CONH ₂
4613 ^a	2168	2160	2×amide I + amide III	CONHR
4544 ^a	2200	2200	C-H str. + C=O str.	-CHO
4397 ^{a,c}	2274	2276	O-H str. + C-C str.	แป้ง

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.18, ^b พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.21, ^c พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.24

*Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 4.12 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่ได้จากค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองต่างๆ ของตัวอย่างข้าวกล้อง

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
8959 ^a , 8845 ^c , 8761 ^c	1116, 1131, 1141	1143	C-H str. second overtone	aromatic
8669 ^a , 8609 ^a	1154, 1162	1152	C-H str. second overtone	HC=CH
8131 ^c	1230	1225	C-H str. second overtone	CH
8294 ^a , 8234 ^a	1206, 1214	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
7398 ^c	1352	1360	2xC-H str. + C-H def.	CH ₃
7221 ^c , 7178 ^c , 7137 ^c	1385, 1393, 1401	1395	2xC-H str. + C-H def.	CH ₂
7047 ^c , 7018 ^c	1419, 1425	1420	O-H str. first overtone	ArOH
5456 ^a , 5376 ^a	1833, 1860	1820	O-H str. + 2xC-O str.	เซลลูโลส
5330 ^b , 5312 ^b , 5263 ^b	1876, 1881, 1900	1900	O-H str. + 2 x C-O str. C-O str. second overtone	แป้ง -CO ₂ H
5242 ^a , 5197 ^b , 5182 ^a , 5136 ^b , 5066 ^b	1908, 1924, 1930, 1947, 1974	1940	O-H str. + O-H def.	น้ำ
4944 ^b , 4931 ^b , 4906 ^b	2023, 2028, 2038	2000	2xO-H def. + C-O def. N-H sym. str. + amide II	แป้ง CONH ₂ , CONHR
4877 ^a , 4867 ^a	2050, 2055,	2050	N-H sym. str. + amide II N-H asym. str. + amide III	โปรตีน CONH ₂
4507 ^a , 4487 ^a	2219, 2229	2200	C-H str. + C=O str.	-CHO

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.19, ^b พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.22, ^c พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.25,

*Osborne และคณะ (1993)

จากตารางแสดงการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่สำคัญที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราของตัวอย่างข้าวกล้อง พิกัดที่พบส่วนใหญ่สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะที่เป็นองค์ประกอบหลัก

ในข้าวกล้อง เช่น พีคที่ 1540, 1580, 1900, 2000, 2100 และ 2276 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของแป้ง น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคส พีคที่ 1450 และ 1940 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของน้ำ พีคที่ 1490 และ 1820 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของเซลลูโลส พีคที่ 1980, 2050, 2110 และ 2150 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของโปรตีนและพันธะที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลของโปรตีน เช่น CONH_2 และ CONHR

4.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

สร้างแบบจำลองโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 และข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง 3 แบบ (เมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด เมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว และสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง) จะได้แบบจำลองในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 3 แบบ ได้แก่

- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง

เมื่อตรวจสอบค่าผิดพลาดของข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตามวิธีการทดลองข้อ 3.5.1 และตัดค่าผิดพลาดที่พบจำนวน 9 ค่า (3 ตัวอย่างย่อย) ออกจากข้อมูล จากนั้น สร้างแบบจำลองโดยใช้ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 และข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องทั้ง 3 แบบ แบบละ 600 เส้น ทั้งนี้ การสร้างแบบจำลองใช้ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นหรือที่มีการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ โดยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) ข้อมูลถูกแบ่งเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (test set) โดยโปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker Optik GmbH) ทดสอบแบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยวิธีการทดสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) โดยใช้กลุ่มทดสอบแบบจำลอง แล้วเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุด รายละเอียดข้อมูลที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.13

สำหรับข้อมูลทางสถิติของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลอง แสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลอง

ข้อมูล	กลุ่มสร้างแบบจำลอง				กลุ่มทดสอบแบบจำลอง			
	จำนวน (เปอร์เซ็นต์)*	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	จำนวน (เปอร์เซ็นต์)*	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
1. ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่ง่่งเมล็ด	280 (50)	0	15.16	3.65±3.89	264 (50)	0	13.16	3.26±3.72
2. ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว	280 (50)	0	15.16	3.62±3.84	267 (50)	0	13.28	3.51±3.75
3. ตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง	284 (50)	0	15.16	3.45±3.59	271 (50)	0	13.05	3.31±3.43

*สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างในกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทดสอบแบบจำลอง

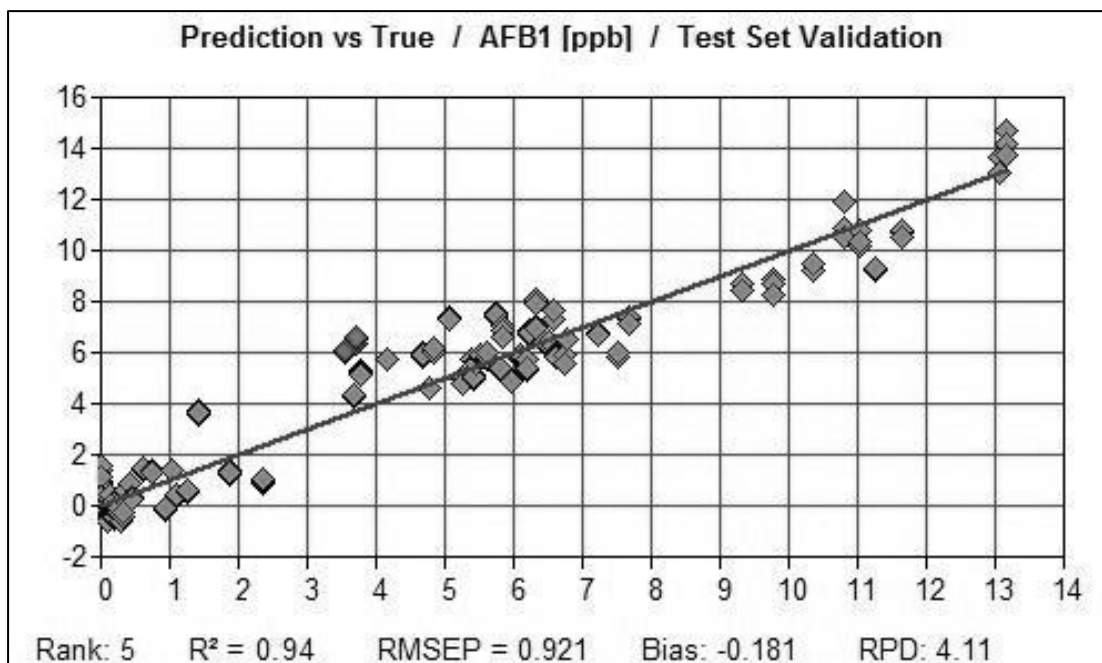
4.3.2.1 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLSR แสดงในตารางที่ 4.14 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 (first derivative (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 5453.8-4597.6 ต่อเซนติเมตร และถูกตัดค่าผิดปกติของเส้นสเปกตรัมออกจากแบบจำลองจำนวนทั้งหมด 56 เส้น (คิดเป็น 9.33 เปอร์เซ็นต์) ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุดได้ค่า Rank หรือ PLS factor เท่ากับ 5 ค่า R^2 เท่ากับ 0.94 ค่า $RMSEP$ เท่ากับ 0.921 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 4.11 และค่า bias เท่ากับ -0.181 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ดีที่สุดแสดงดังภาพที่ 4.26

ตารางที่ 4.14 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก

การจัดการสเปกตรัมโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์	ช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	Rank	R^2	$RMSEP^*$	RPD	Bias*
first derivative (17 Pts.)	5453.8-4597.6	5	0.94	0.921	4.11	-0.181
straight line subtraction	5453.8-4597.6	4	0.92	1.01	3.68	-0.138
constant offset elimination	5453.8-4597.6	5	0.92	1.02	3.65	-0.114
straight line subtraction	9403.4-7498 6101.8-5446.1	6	0.92	1.07	3.5	-0.186
vector normalization (SNV)	9403.4-7498 6101.8-5446.1 4605.3-4242.7	6	0.91	1.09	3.43	-0.116

*หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

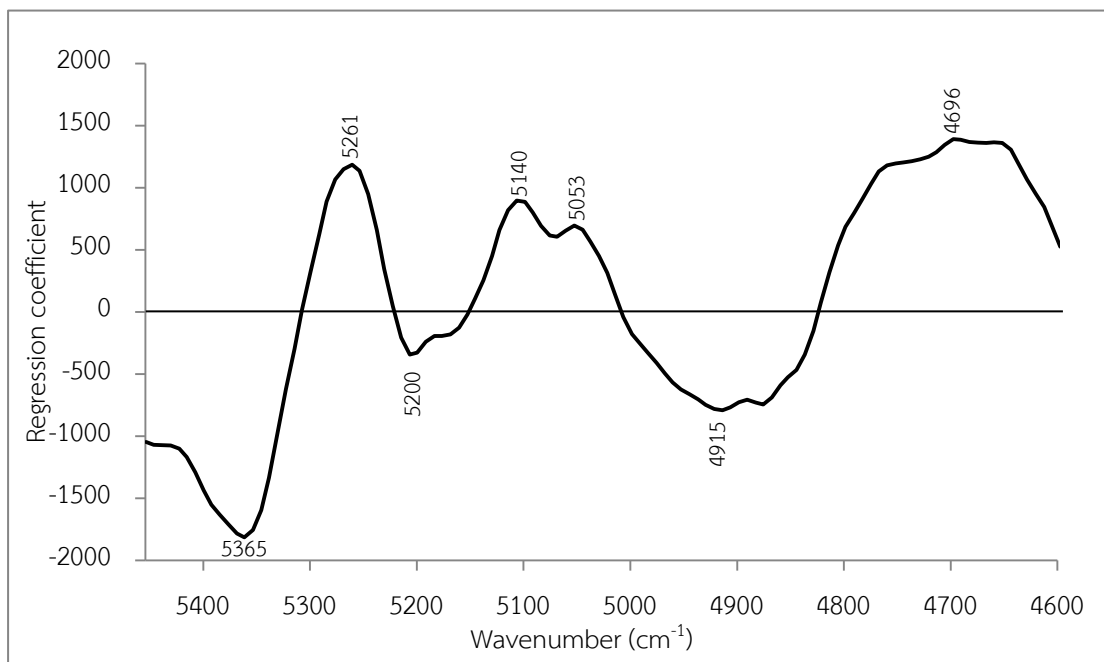


ภาพที่ 4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างข้าวกล้องที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (แกน X) และค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด

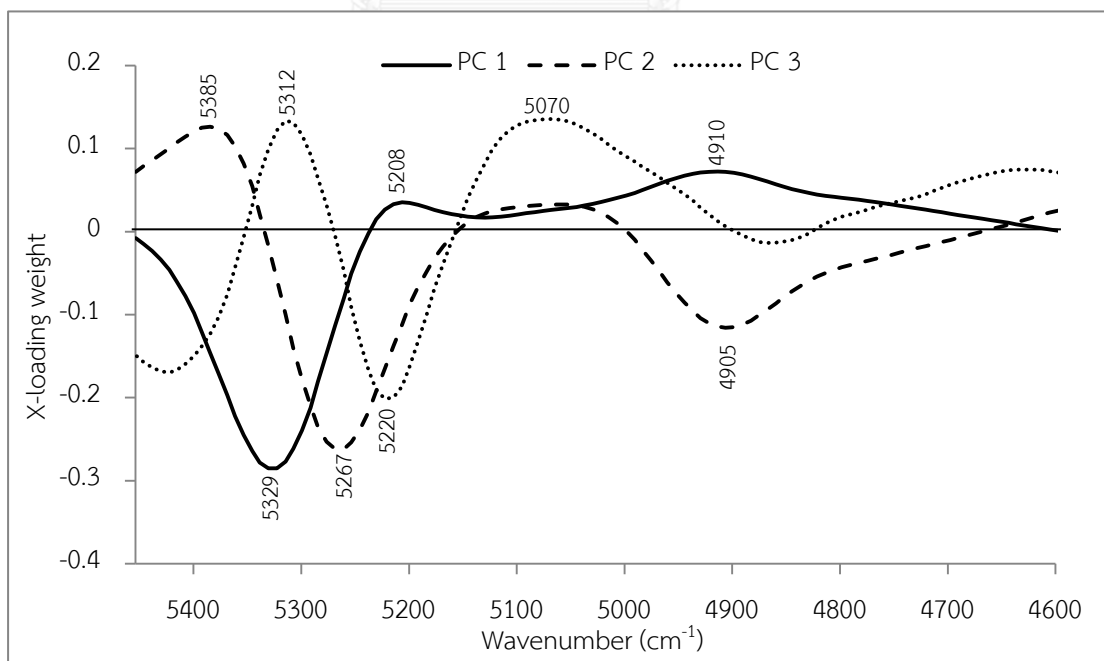
ภาพที่ 4.27 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 5365, 5261, 5200, 5140, 5053, 4915 และ 4696 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.17

ภาพที่ 4.28 แสดงค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด โดย PC 1 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 5329, 5208 และ 4190 ต่อเซนติเมตร PC 2 ประกอบด้วยพิกัดที่จำนวนคลื่น 5385, 5267 และ 4905 ต่อเซนติเมตร และ PC 3 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่จำนวนคลื่น 5312, 5220 และ 5070 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พิกัดที่ 5385, 5329 และ 5312 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ 2x C-O stretching ของแป้ง และพิกัดที่ 5267, 5220 และ 5208 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1920 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-O stretching second

overtone ของโมเลกุล CONH พีกที่ 4910 และ 4905 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2000 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ $2\times\text{O-H}$ deformation และ C-O deformation ของแป้ง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.18



ภาพที่ 4.27 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR



ภาพที่ 4.28 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่สร้างด้วยวิธี PLSR

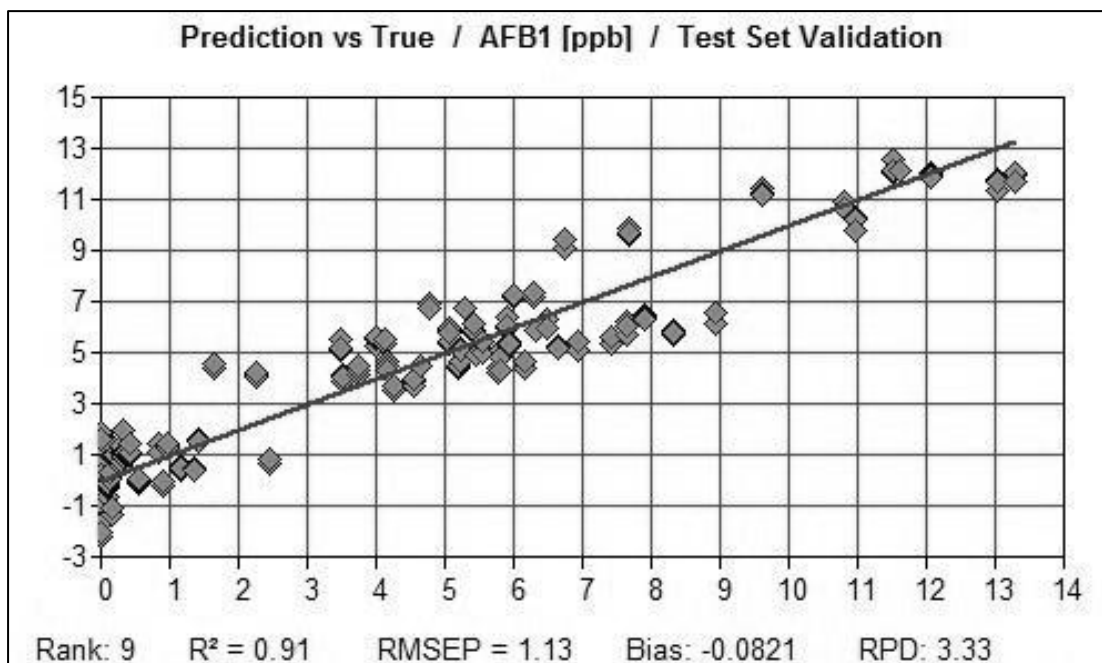
4.3.2.2 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.15 แบบจำลองที่ดีที่สุดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด และการปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (first derivative + vector normalization (SNV) (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 7505.8-4597.6 ต่อเซนติเมตร และถูกตัดค่าผิดปกติของเส้นสเปกตรัมออกจากแบบจำลองจำนวนทั้งหมด 53 เส้น (คิดเป็น 8.83 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งผลการทำนายที่ดีที่สุดได้ค่า Rank หรือ PLS factor เท่ากับ 9 ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.91 ค่า $RMSEP$ เท่ากับ 1.13 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 3.33 และค่า bias เท่ากับ -0.0821 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ภาพที่ 4.29 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และค่าความเข้มข้นอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด ร่วมกับการปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน

ตารางที่ 4.15 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก

การจัดการสเปกตรัมโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์	ช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	Rank	R^2	$RMSEP^*$	RPD	Bias*
first derivative + vector normalization (SNV) (17 Pts.)	7505.8-4597.6	9	0.91	1.13	3.33	-0.0821
Constant offset elimination	7505.8-5446.1 4605.3-4242.7	4	0.87	1.33	2.79	-0.15
Min-Max normalization	9403.4-7498 5453.8-4597.6	7	0.86	1.39	2.67	-0.131
Multiplicative scattering correction	7505.8-6094.1 5453.8-4597.6	7	0.86	1.39	2.66	-0.0557
Vector normalization (SNV)	5453.8-4597.6	5	0.78	1.75	2.15	0.0758

*หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

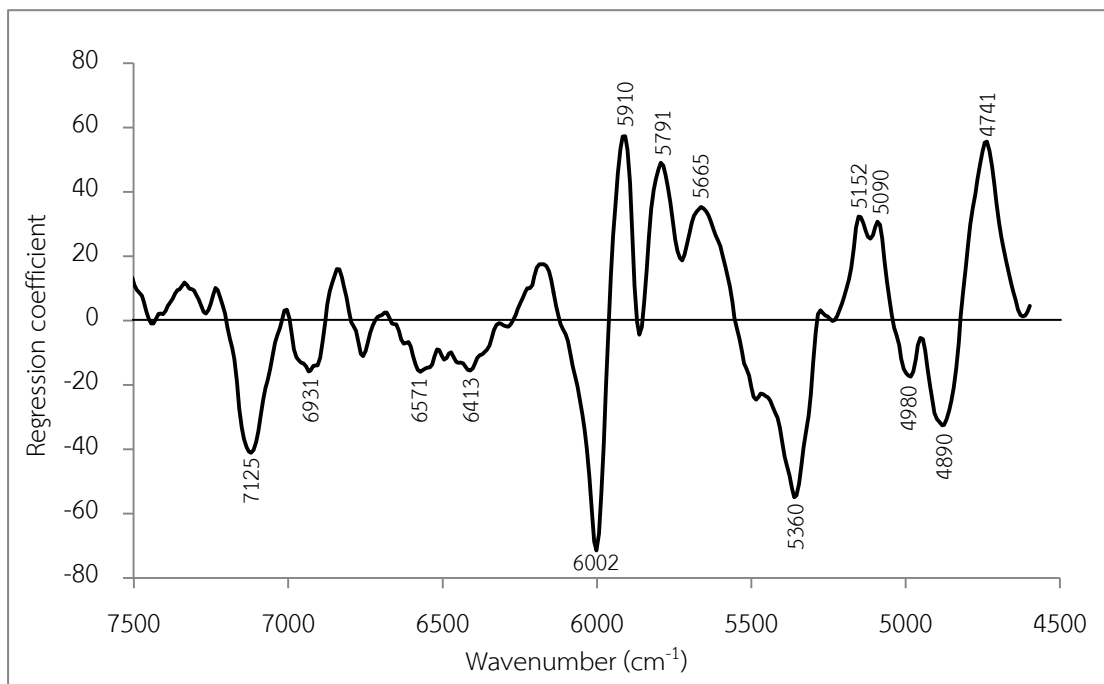


ภาพที่ 4.29 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (แกน X) และค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดและการปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน

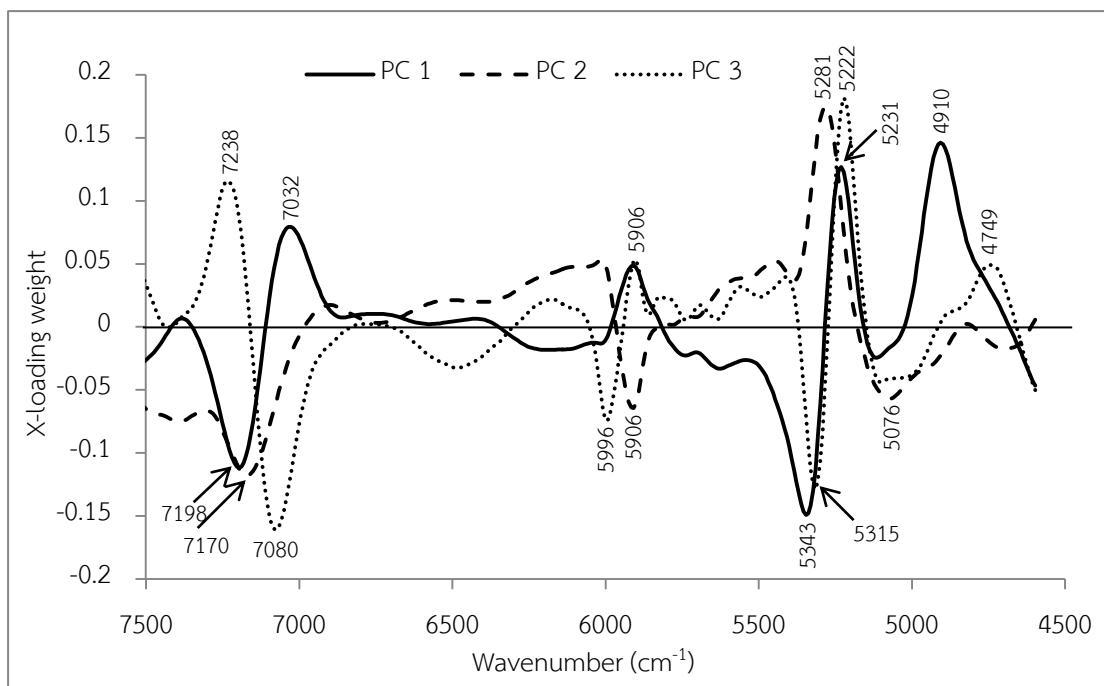
ภาพที่ 4.30 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัด เช่น พิกัดที่จำนวนคลื่น 7125, 6931, 6571, 6413, 6002, 5910, 5791 และ 5665 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.17

ภาพที่ 4.31 แสดงค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วโดย PC 1 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 7198, 7032, 5906, 5343, 5231 และ 4910 ต่อเซนติเมตร PC 2 ประกอบด้วยพิกัดที่จำนวนคลื่น 7170, 5906, 5281 และ 5076 ต่อเซนติเมตร และ PC 3 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่จำนวนคลื่น 7238, 7080, 5996, 5315, 5222 และ 4749 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พิกัดที่ 5343, 5315 และ 5281 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ 2x C-O stretching ของแป้ง และพิกัดที่

5231 และ 5222 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1920 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-O stretching second overtone ของโมเลกุล CONH พิคที่ 4910 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2000 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ 2xO-H deformation และ C-O deformation ของแป้ง และ N-H symmetrical stretching และ amide II ของโมเลกุล CONH₂ หรือ CONHR ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.18



ภาพที่ 4.30 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR



ภาพที่ 4.31 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้วที่สร้างด้วยวิธี PLSR

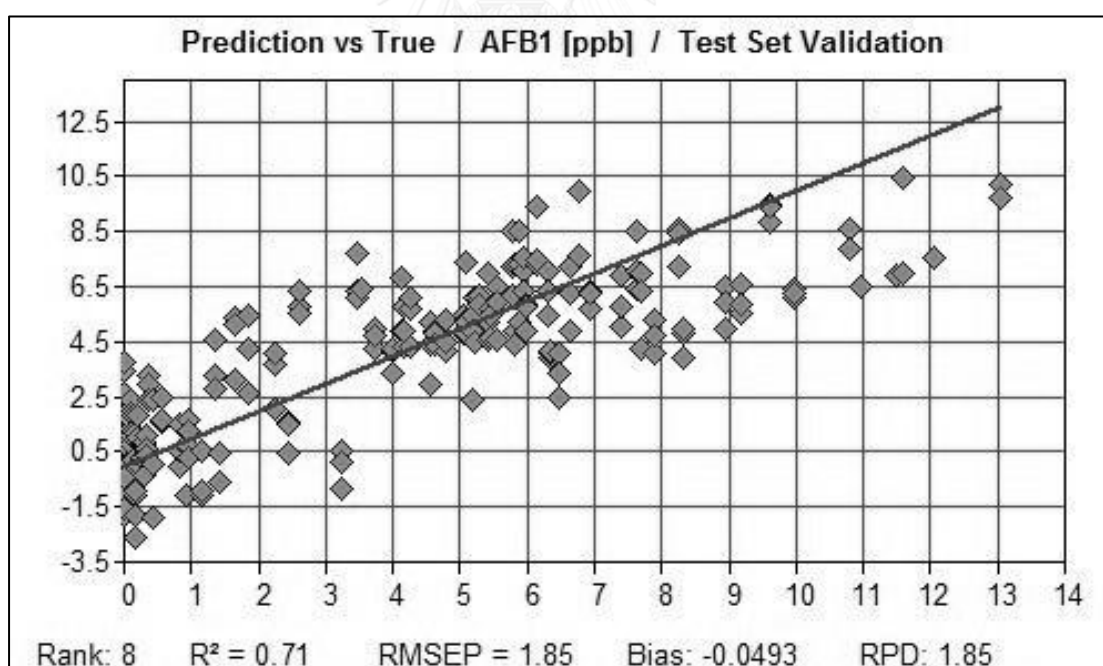
4.3.2.3 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.17 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยค่าคงที่ (constant offset elimination) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 9403.4-7498 และ 6101.8-5446.1 ต่อเซนติเมตร และถูกตัดค่าผิดปกติของเส้นสเปกตรัมออกจากแบบจำลองจำนวนทั้งหมด 45 เส้น (คิดเป็น 7.50 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งผลการทำนายที่ดีที่สุดได้ค่า Rank หรือ PLS factor เท่ากับ 8 ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.71 ค่า $RMSEP$ เท่ากับ 1.85 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 1.85 และค่า bias เท่ากับ -0.0493 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ดีที่สุด แสดงดังภาพที่ 4.32

ตารางที่ 4.16 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR ที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด 5 อันดับแรก

การจัดการสเปกตรัมโดย วิธีการทางคณิตศาสตร์	ช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	Rank	R^2	RMSEP*	RPD	Bias*
constant offset	9403.4-7498	8	0.71	1.85	1.85	-0.0493
elimination	6101.8-5446.1					
no spectral data	9403.4-7498	8	0.69	1.84	1.8	0.0611
preprocessing	6101.8-5770.1					
no spectral data	9403.4-7498	9	0.68	1.96	1.78	-0.138
preprocessing	6101.8-5446.1					
no spectral data	8454.6-7498	7	0.67	1.85	1.74	0.0241
preprocessing	6101.8-5770.1					
Min-Max normalization	9403.4-5446.1	6	0.63	2.22	1.64	-0.0115

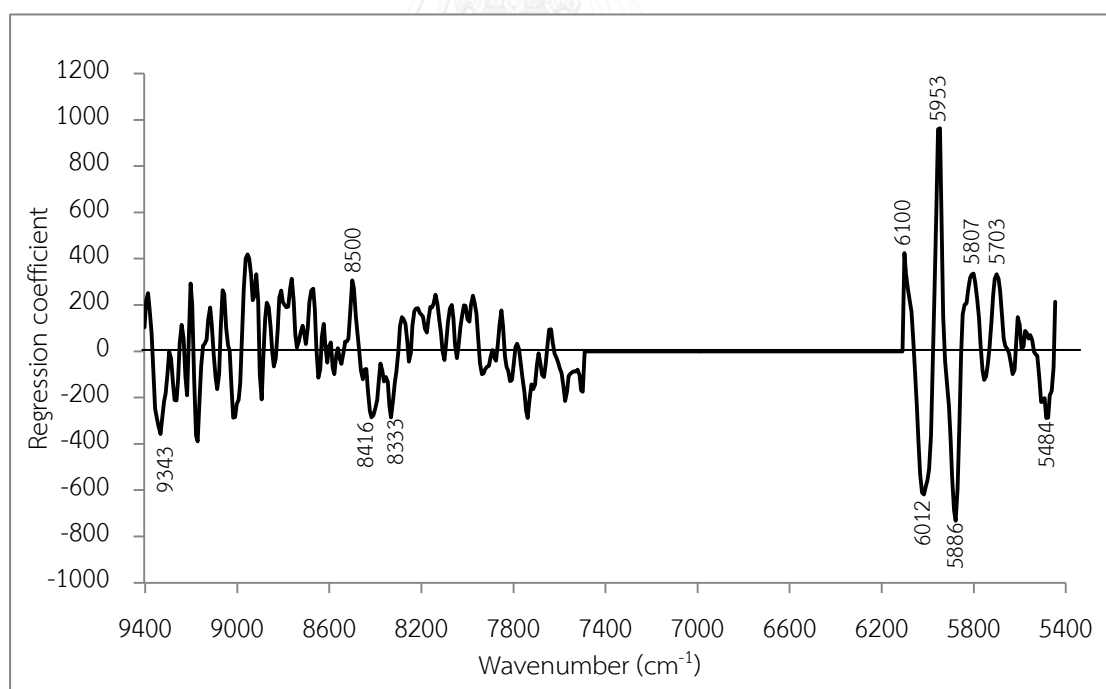
*หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



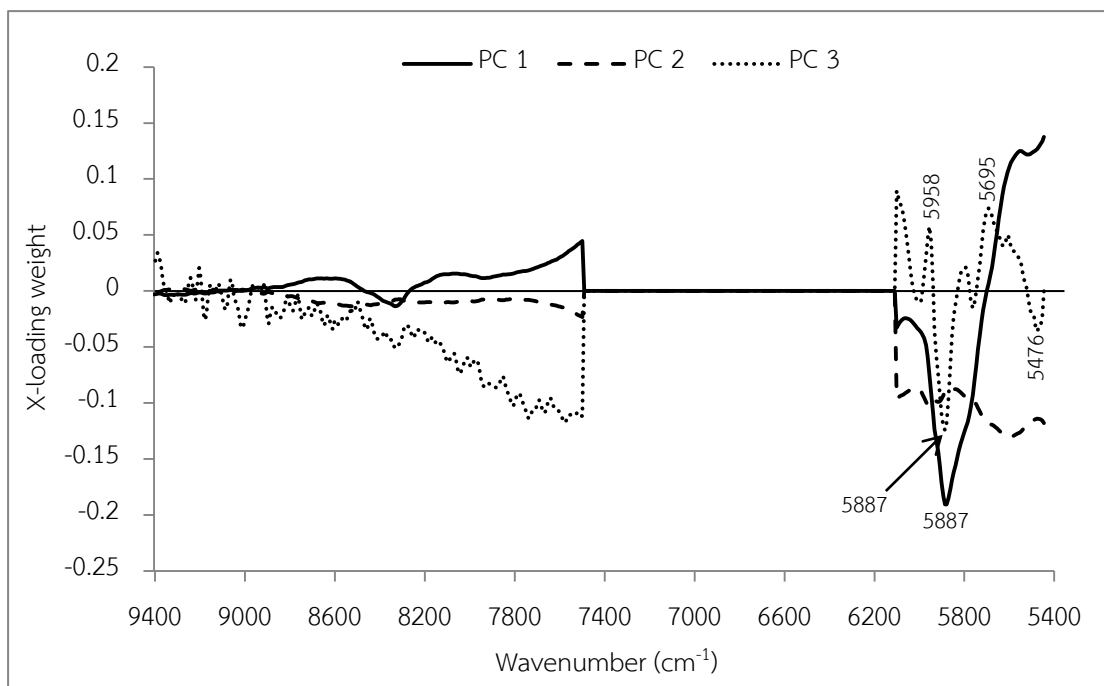
ภาพที่ 4.32 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (แกน X) และค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลอง (แกน Y) ที่สร้างโดยใช้เส้นสเปกตรัมจากตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยค่าคงที่

ภาพที่ 4.33 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 9343, 8500, 8416, 8333, 6100, 6012, 5953, 5886, 5807, 5703 และ 5484 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.17

ภาพที่ 4.34 แสดงค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง โดย PC 1 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่เด่นชัดที่จำนวนคลื่น 5887 ต่อเซนติเมตร PC 2 ไม่พบพิกัดที่ชัดเจน และ PC 3 ประกอบด้วยพิกัดสำคัญที่จำนวนคลื่น 5958, 5887, 5695 และ 5476 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพิกัดสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น พิกัดที่ 5958 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1685 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของโครงสร้างอะโรมาติก และพิกัดที่ 5887 และ 5695 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1705 และ 1765 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.18



ภาพที่ 4.33 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLSR



ภาพที่ 4.34 ค่า X-loading weight ของ PC 1 - PC 3 ของแบบจำลองทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่สร้างด้วยวิธี PLSR

ตารางที่ 4.17 การสันเสเหือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ

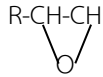
จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสันเสเหือนของพันธะ	โครงสร้าง
9343 ^c	1070	1080	2xC-H str. + 2xC-C str.	เบนซีน
8500 ^c	1177	1170	C-H str. second overtone	HC=CH
8416 ^c	1188	1195	C-H str. second overtone	CH ₃
8333 ^c	1200	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
7125 ^b	1404	1410	O-H str. first overtone	ROH
6931 ^b	1443	1450	O-H str. first overtone	แป้ง, น้ำ
6571 ^b	1522	1520	O-H str. first overtone	CONH ₂

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.27, ^b พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.30, ^c พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.33

*Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 4.17 (ต่อ) การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของค่าความเข้มขั้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
6413 ^b	1559	1540	O-H str. first overtone (intramol. H-bond)	แป้ง
6100 ^c	1639	1645	C-H str. first overtone	
6012 ^c , 6002 ^b	1663, 1666	1660	C-H str. first overtone	<i>cis</i> -RCH=CHR ¹
5953 ^c	1680	1685	C-H str. first overtone	อะโรมาติก
5910 ^b , 5886 ^c	1692, 1699	1695	C-H str. first overtone	CH ₃
5807 ^c , 5791 ^b	1722, 1727	1725	C-H str. first overtone	CH ₂
5703 ^c , 5665 ^b	1753, 1765	1765	C-H str. first overtone	CH ₂
5484 ^c , 5365 ^a	1823, 1864	1820	O-H str. + 2×C-O str.	เซลลูโลส
5360 ^b , 5261 ^a	1866, 1899	1900	O-H str. + 2 × C-O str. C-O str. second overtone	แป้ง -CO ₂ H
5200 ^a	1923	1920	C-O str. second overtone	CONH
5152 ^b , 5140 ^a	1941, 1946	1940	O-H str. + O-H def.	น้ำ
5090 ^b	1965	1950	C-O str. second overtone	-CO ₂ R
5053 ^a	1983	1980	N-H asym. str. + amide II	โปรตีน
4980 ^b	2008	2000	2×O-H def. + C-O def. N-H sym. str. + amide II	แป้ง CONH ₂ , CONHR
4915 ^a	2035	2030	C=O str. second overtone	CONH ₂
4890 ^b	2045	2050	N-H sym. str. + amide II N-H asym. str. + amide III	โปรตีน CONH ₂
4741 ^b	2109	2100	2×O-H def. + 2×C-O str.	แป้ง
4696 ^a	2129	2132	N-H str. + C=O str.	กรดอะมิโน

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.27, ^b พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.30, ^c พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.33

*Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 4.18 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละช่วงจำนวนคลื่นที่ได้จากค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC3) ของแบบจำลองต่างๆ ของตัวอย่างข้าวกล้อง

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
7238 ^b , 7198 ^b , 7170 ^b	1382, 1389, 1395,	1395	2 × C-H str. + C-O def.	CH ₂
7080 ^b , 7032 ^b	1412, 1422	1420	O-H str. first overtone	ROH
5996 ^b ,	1668,	1660	C-H str. first overtone	<i>cis</i> -RCH=CHR ¹
5958 ^c	1678	1685	C-H str. first overtone	อะโรมาติก
5906 ^b	1693	1695	C-H str. first overtone	CH ₃
5887 ^c	1699	1705	C-H str. first overtone	CH ₃
5695 ^c	1756	1765	C-H str. first overtone	CH ₂
5476 ^c	1826	1820	O-H str. + 2×C-O str.	เซลลูโลส
5385 ^a , 5343 ^b ,	1857, 1872,	1900	O-H str. + 2 × C-O str.	แป้ง
5329 ^a , 5312 ^a ,	1877, 1881,		C-O str. second overtone	-CO ₂ H
5315 ^b , 5281 ^b	1883, 1894			
5267 ^a , 5220 ^a ,	1899, 1916,	1920	C-O str. second overtone	CONH
5222 ^b , 5231 ^b ,	1915, 1912,			
5208 ^a	1920			
5070 ^a , 5076 ^b	1970, 1970	1980	N-H asym. str. + amide II	โปรตีน
4910 ^{a,b} , 4905 ^a	2037, 2039	2000	2×O-H def. + C-O def.	แป้ง
			N-H sym. str. + amide II	CONH ₂ , CONHR
4749 ^b	2106	2100	2×O-H def. + 2×C-O str.	แป้ง

str. = stretching, def. = deformation, sym. = symmetrical, asym. = asymmetrical

^a พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.28, ^b พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.31, ^c พิกัดสำคัญในภาพที่ 4.34

*Osborne และคณะ (1993)

จากตารางแสดงการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่สำคัญที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และค่า X-loading weight องค์ประกอบที่ 1-3 (PC 1-PC 3) ของแบบจำลองทำนายปริมาณอะพลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ พิกัดที่พบส่วนใหญ่ของแบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดและตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะของแป้ง

น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำ เซลลูโลส โปรตีนและพันธะที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลของโปรตีน เช่น CONH_2 และ CONHR ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในข้าวกล้อง เช่นเดียวกับพืคส่วนใหญ่ที่พบของแบบจำลองทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา ขณะที่ แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง พืคที่พบส่วนใหญ่สัมพันธ์กับการสิ้นสเหเทือนของพันธะไฮโดรคาร์บอน เช่น พืคที่ 1195, 1695 และ 1705 นาโนเมตร ของโมเลกุล CH_3 พืคที่ 1080 นาโนเมตร ของโมเลกุลเบนซีน พืคที่ 1685 นาโนเมตร ของสารอะโรมาติก และพืคที่ 1820 นาโนเมตร ซึ่งสัมพันธ์กับการสิ้นสเหเทือนของพันธะของเซลลูโลส

4.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

4.4.1 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง

จากการตรวจหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดมีปริมาณความชื้นไม่เกินตามที่มาตรฐานกำหนดไว้ ซึ่งอ้างอิงจากมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 4004-2555) ที่กำหนดให้ข้าวที่จะนำไปเก็บรักษานั้นจะต้องมีความชื้นไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าใกล้เคียงกันมาก ดังนั้น จึงไม่ได้ทำการทดลองแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องสำหรับสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามปริมาณความชื้นได้

4.4.2 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

4.4.2.1 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด

จากการพิจารณาการแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง ดังผลการทดลองที่ 4.2.2.1 (ภาพที่ 4.15) พบว่า ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราอยู่ในเกณฑ์ที่สูง (90-100 เปอร์เซ็นต์) จึงพิจารณาสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

จากนั้น สร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี Soft Independent Modeling of Class Analog (SIMCA) และ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) โดยใช้จำนวนตัวอย่างจริงของแต่ละกลุ่ม และปรับจำนวนตัวอย่างให้เท่ากันทั้งสองกลุ่มด้วยวิธีสุ่มตัดตัวอย่าง

ตารางที่ 4.19 และ 4.20 แสดงผลการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ตามลำดับ ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 23.72-76.28 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ แบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างเท่ากันให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 48.55-56.52 เปอร์เซ็นต์ โดยแบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างกลุ่มใดจะสามารถทำนายตัวอย่างกลุ่มเดียวกันได้แม่นยำ โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 78.98 และ 73.19 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดและจำนวนตัวอย่างเท่ากัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.19 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม		จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม	
		ถูกต้อง			ถูกต้อง	
		≤90%	>90%		≤90%	>90%
≤90%	69	94.02	15.94	69	94.20	15.94
>90%	264	5.30	92.05	69	2.90	97.10
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		23.72	76.28		48.55	56.52

ตารางที่ 4.20 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
≤90%	69	14.49	69	60.87
>90%	264	95.83	69	85.51
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		78.98		73.19

4.4.2.2 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง

จากการพิจารณาการแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง (ผลการทดลองที่ 4.2.2.1, ภาพที่ 4.15) พบว่า ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ (0-20 เปอร์เซ็นต์) จึงพิจารณาสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งหมด 2 แบบจำลอง ได้แก่

แบบจำลองที่ 1 แบ่งกลุ่มตามการมีและไม่มีการปนเปื้อนของรา

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มี การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง

แบบจำลองที่ 2 แบ่งกลุ่มตามค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

โดยจำนวนตัวอย่างสำหรับสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ของทั้ง 2 แบบจำลองดังข้างต้น ได้ใช้ตัวอย่างจำนวนทั้งหมดของแต่ละกลุ่ม และปรับจำนวนตัวอย่างให้มีจำนวนเท่ากันทั้งสองกลุ่มด้วยวิธีสุ่มตัดตัวอย่างเพื่อสร้างแบบจำลอง

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงใน ตารางที่ 4.21 และ 4.22 ตามลำดับ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง โดยรวมเท่ากับ 44.24-80.61 และ 52.22-60.00 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวน ตัวอย่างทั้งหมดและจำนวนตัวอย่างเท่ากัน ตามลำดับ โดยแบบจำลองสำหรับใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ สร้างจากตัวอย่างในกลุ่มเดียวกันให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สูง การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมดให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 86.36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างเท่ากันที่มีค่าเท่ากับ 73.33 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.21 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม		จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม	
		ถูกต้อง			ถูกต้อง	
		ไม่มีการปนเปื้อน	มีการปนเปื้อน		ไม่มีการปนเปื้อน	มีการปนเปื้อน
ไม่มีการปนเปื้อน	45	77.78	11.11	45	80.00	11.11
มีการปนเปื้อน	285	38.95	91.58	45	40.00	93.33
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		44.24	80.61		60.00	52.22

ตารางที่ 4.22 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
ไม่มีการปนเปื้อน	45	0.00	45	77.78
มีการปนเปื้อน	285	100.00	45	68.89
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		86.36		73.33

ตารางที่ 4.23 และ 4.24 แสดงผลการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีเซียวมเหลือง น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ตามลำดับ ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA พบว่า แบบจำลองสำหรับแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่สร้างจากกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน (กลุ่มตัวอย่าง $\leq 50\%$ กับ $\leq 50\%$ และกลุ่มตัวอย่าง $> 50\%$ กับ $> 50\%$) จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สูง และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 28.83-73.57 และ 49.33-56.67 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมดและตัวอย่างเท่ากัน ตามลำดับ สำหรับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA โดยให้ค่าเท่ากับ 83.18 และ 71.33 สำหรับแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมดและตัวอย่างเท่ากัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.23 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีเซียวมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม		จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม	
		ถูกต้อง			ถูกต้อง	
		$\leq 50\%$	$> 50\%$		$\leq 50\%$	$> 50\%$
$\leq 50\%$	258	89.15	11.24	75	92.00	9.33
$> 50\%$	75	20.00	89.33	75	21.33	89.33
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		73.57	28.83		56.67	49.33

ตารางที่ 4.24 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีเซียวมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การ	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การ
		แบ่งกลุ่มถูกต้อง		แบ่งกลุ่มถูกต้อง
$\leq 50\%$	258	91.09	75	64.00
$> 50\%$	75	56.00	75	78.67
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		83.18		71.33

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดตั้งข้างต้น พบว่า การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สูง เมื่อสร้างแบบจำลองสำหรับใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างที่สร้างจากตัวอย่างในกลุ่มเดียวกันนั้น แต่อย่างไรก็ตาม การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA

และจำนวนตัวอย่างส่งผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง โดยเมื่อใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมดของแต่ละกลุ่มสำหรับสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่ม จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มที่ดีกว่าการใช้จำนวนตัวอย่างที่ถูกปรับให้เท่ากัน

4.4.3 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

ผลจากการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ (ผลการทดลองที่ 4.3.2) พบว่า แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด โดยส่วนใหญ่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในปริมาณต่ำ และเมื่อพิจารณาจากข้อกำหนดของคณะกรรมการยุโรป (European Commission) ที่กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวสูงสุดที่ยอมรับได้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2010) ดังนั้น จึงพิจารณาสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดทั้งหมด 2 แบบจำลอง ได้แก่

แบบจำลองที่ 1 แบ่งกลุ่มตามการมีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มี การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

แบบจำลองที่ 2 แบ่งกลุ่มตามปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่มากกว่า 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

โดยจำนวนตัวอย่างสำหรับสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ของทั้ง 2 แบบจำลองดังกล่าวข้างต้น ได้ใช้ตัวอย่างจำนวนทั้งหมดของแต่ละกลุ่มและปรับจำนวนตัวอย่างให้มีจำนวนเท่ากันทั้งสองกลุ่มด้วยวิธีสุ่มตัดตัวอย่างเพื่อสร้างแบบจำลอง

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงดังตารางที่ 4.25 และ 4.26 ตามลำดับ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 64.94-70.69 และ 52.56-78.21 เปอร์เซ็นต์ แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างกลุ่มเดียวกันให้ผลการทำนายกลุ่มเดียวกันได้แม่นยำด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดและจำนวนตัวอย่างเท่ากัน ตามลำดับ สำหรับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 76.44 และ 79.49 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมดและตัวอย่างเท่ากัน ตามลำดับ แบบจำลองที่สร้างขึ้นด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA จากตัวอย่างทั้งสองแบบ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.25 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม ถูกต้อง		จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม ถูกต้อง	
		ไม่มีการ ปนเปื้อน	มีการ ปนเปื้อน		ไม่มีการ ปนเปื้อน	มีการ ปนเปื้อน
		ไม่มีการปนเปื้อน	39		97.44	0.00
มีการปนเปื้อน	135	55.56	91.11	39	58.97	92.31
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		64.94	70.69		78.21	52.56

ตารางที่ 4.26 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การ แบ่งกลุ่มถูกต้อง	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การ แบ่งกลุ่มถูกต้อง
ไม่มีการปนเปื้อน	39	48.72	39	97.44
มีการปนเปื้อน	135	84.44	39	61.54
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		76.44		79.49

ตารางที่ 4.27 และ 4.28 แสดงผลการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ตามลำดับ ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA พบว่า แบบจำลองที่สร้างขึ้นสามารถทำนายกลุ่มตัวอย่างที่สร้างจากตัวอย่างกลุ่มเดียวกันได้ดี ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมของแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดและจำนวนตัวอย่างเท่ากัน ยังให้ผลการทำนายที่ไม่แม่นยำ ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องเท่ากับ 50.28-70.62 และ 52.08-62.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA โดยแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 85.31 เปอร์เซ็นต์ และแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากจำนวนตัวอย่างเท่ากันให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.27 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g}/\text{kg}$) โดยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม		จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่ม	
		ถูกต้อง			ถูกต้อง	
		$\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$	$> 5 \mu\text{g}/\text{kg}$		$\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$	$> 5 \mu\text{g}/\text{kg}$
$\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$	105	95.24	19.05	72	94.44	8.33
$> 5 \mu\text{g}/\text{kg}$	72	34.72	95.83	72	30.56	95.83
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		70.62	50.28		62.50	52.08

ตารางที่ 4.28 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g}/\text{kg}$) โดยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การ	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การ
		แบ่งกลุ่มถูกต้อง		แบ่งกลุ่มถูกต้อง
$\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$	105	91.43	72	93.06
$> 5 \mu\text{g}/\text{kg}$	72	76.39	72	73.61
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		85.31		83.33

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด พบว่า การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองที่ใช้สำหรับแบ่งกลุ่มตัวอย่างจะสร้างจากตัวอย่างในกลุ่มเดียวกัน ทำให้ผลการทำนายตัวอย่างในกลุ่มนั้นๆ ได้แม่นยำ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ทำนายตัวอย่างในกลุ่มอื่นได้ไม่ดี ในขณะที่ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองสร้างจากตัวอย่างทั้งหมดแล้วจึงนำมาใช้แบ่งกลุ่มตัวอย่างแบบจำลองจึงให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA อย่างไรก็ตาม ผลการใช้ตัวอย่างทั้งสองแบบ (ตัวอย่างจำนวนทั้งหมดของแต่ละกลุ่มและปรับจำนวนตัวอย่างให้มีจำนวนเท่ากันทั้งสองกลุ่ม) เพื่อสร้างแบบจำลองการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA นั้นพบว่า แต่ละวิธีให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมที่ใกล้เคียงกัน

4.5 การทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย (laboratory performance)

ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) ของการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของผู้วิจัย แสดงดังตารางที่ 4.29 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำและค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.30 และ 0.19 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับค่าความสามารถในการวัดเหมือน (reproducibility) ของผู้วิจัย มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำของตัวอย่างที่ผู้วิจัยไม่ทราบว่าเป็นตัวอย่างใด (blind duplicate) และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 1.04 และ 0.26 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.30

ตารางที่ 4.29 ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) ของการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของผู้วิจัย

ตัวอย่างที่	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ความแตกต่างระหว่างซ้ำ
7,8	0.83	0.96	-0.13
21,22	0.33	0.31	0.03
73,74	0.08	0.00	0.08
93,94	0.00	0.00	0.00
113,114	5.25	5.81	-0.56
169,170	5.40	5.96	-0.56
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำ (SD)			0.30
ค่าเฉลี่ย			-0.19

ตารางที่ 4.30 ค่าความสามารถในการวัดเหมือน (reproducibility) ของการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องของผู้วิจัย

ตัวอย่างที่	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ความแตกต่างระหว่างซ้ำ
R1,3	0.69	0.00	-0.69
R2,14	0.00	1.43	1.43
R3,51	1.75	0.00	-1.75
R4,60	0.72	0.27	-0.45
R5,70	0.25	0.16	-0.09
R6,99	0.00	0.00	0.00
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำ (SD)			1.04
ค่าเฉลี่ย			-0.26

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ลักษณะข้อมูลเชิงแสงหรือสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวกล้อง

5.1.1 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดเพื่อตรวจหาปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา

จากผลการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนเมล็ดข้าวกล้อง ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) (MPA, Bruker, Germany) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ในแบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) และเก็บข้อมูลด้วยโปรแกรม OPUS v.7.0.129 (Bruker Optik GmbH, Germany) ลักษณะสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโลนีสีเขียวมเหลืองที่ต่างกัน มีรูปแบบโดยรวมเหมือนกัน การดูดกลืนแสงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อตัวอย่างข้าวกล้องค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเปลี่ยนแปลงไป (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ในขณะที่ การดูดกลืนแสงของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่มีโคโลนีสีเขียวมเหลืองไม่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่ชัดเจน (ภาพที่ 4.3) เมื่อจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด พบว่า สเปกตรัมปรากฏพีคหรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ชัดเจนขึ้นมากกว่าสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย และมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยมีพีคที่สำคัญจำนวน 11 พีค ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพีคที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบหลักในเมล็ดข้าวกล้อง เช่น พีคที่ 7046-7030 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของแป้งและน้ำ พีคที่ 5621-5618 และ 5482-5480 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1780 และ 1820 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของเซลลูโลส และพีคที่ 4030-4025 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2488 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของแป้ง (Osborne และคณะ, 1993)

สำหรับการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเมล็ดข้าวกล้องที่มีความชื้นต่างกัน โดยทั่วไปนั้น เมล็ดข้าวกล้องที่มีปริมาณความชื้นสูงจะส่งผลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงด้วย แต่จากงานวิจัยนี้พบว่า ลักษณะของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยและสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุดของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่างกัน (ภาพที่ 4.1 และ 4.4) ไม่เป็นไปตามทฤษฎี โดยปัจจัยรบกวนที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนอาจเกิดจากตัวอย่างข้าวกล้องที่ใช้มี

สีที่แตกต่างกัน (ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวกล้องหอมนิล และข้าวกล้องหอมแดง) ซึ่งสัมพันธ์ต่อการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน (ศุมาพร เกษมสำราญ และคณะ, 2552) และตัวอย่างข้าวกล้องแต่ละชนิดมีจำนวนไม่เท่ากัน รวมถึงสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยแยกตามปริมาณความชื้นที่แตกต่างกันของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดซึ่งไม่แยกตามชนิดของข้าวกล้อง ทำให้ลักษณะสเปกตรัมที่ได้มีความคลาดเคลื่อนไม่เกินไปตามทฤษฎี

5.1.2 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

จากผลการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง 3 แบบ ได้แก่ เมล็ดข้าวทั้งหมด เมล็ดข้าวที่บด และสารสกัดหยาบ เมล็ดข้าวกล้อง เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า ลักษณะสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยและสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ของตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด และตัวอย่างข้าวกล้องที่บดแล้ว ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ต่ำสุดและสูงสุดมีรูปแบบที่คล้ายกัน โดยลักษณะของสเปกตรัมปรากฏพีคที่สำคัญหรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ คล้ายคลึงกับผลการทดลองก่อนหน้านี้นี้ ในขณะที่สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยและสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง ทุกๆ 17 จุด ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้องที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ต่ำสุดและสูงสุด มีรูปแบบที่แตกต่างออกไป โดยปรากฏพีคที่เด่นชัดจำนวน 8 พีค ที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบหลักในเมล็ดข้าวกล้องและสารละลายที่ใช้ในการสกัดอะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งประกอบด้วยเมทานอลและน้ำปilotประจุ เช่น พีคที่ 6862 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของแอมโมเนียมและน้ำ พีคที่ 5907 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1695 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของ CH_3 ซึ่งพบได้ในเมทานอล พีคที่ 5259 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของแอมโมเนียมและหมู่คาร์บอกซิล ($-\text{CO}_2\text{H}$) ซึ่งพบในโมเลกุลของกรดอะมิโน พีคที่ 4851 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2050 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของโปรตีนและ CONH_2 ซึ่งพบในโมเลกุลของโปรตีน และพีคที่ 4424, 4115, และ 3987 ต่อเซนติเมตร (ขยับจากความยาวคลื่น 2252, 2461, และ 2500 นาโนเมตร) เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของแอมโมเนียม (Osborne และคณะ, 1993)

5.2 สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวกล้องทางห้องปฏิบัติการ

5.2.1 ปริมาณความชื้นของเมล็ดข้าวกล้อง

จากผลการตรวจหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่าง (300 ตัวอย่างย่อย) ตามวิธีในมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 4004-2555) พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดมีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นอยู่ระหว่าง 8.29-12.64 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.01 ± 0.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดนี้ เป็นไปตามประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง ข้าว ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่กำหนดให้ความชื้นของข้าวกล้องไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ (มกษ. 4004-2555)

เมล็ดข้าวมีแบ่งเป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้สามารถดูดความชื้นเพื่อปรับสมดุลกับปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพแวดล้อม ซึ่งเมล็ดข้าวที่มีความชื้นสูงจะส่งผลต่อการเน่าเสีย การเข้าทำลายของแมลง (Juliano, 1993) และส่งเสริมการเจริญและผลิตสารพิษของรา โดยเฉพาะราในสกุล *Aspergillus*, *Penicilium* และ *Fusarium* ที่เจริญได้ในเมล็ดที่มีความชื้นตั้งแต่ 10-17 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่ 70-90 เปอร์เซ็นต์ (อนงค์ บินทวีหค, 2546) ดังนั้น ปริมาณความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของข้าว ซึ่งปริมาณความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดข้าวในเขตร้อนนั้นไม่ควรเกิน 14 เปอร์เซ็นต์ (Juliano, 1993)

5.2.2 การปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวกล้อง

จากผลการตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่าง (300 ตัวอย่างย่อย) ด้วยวิธี direct plating พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนของราทั้งหมดในปริมาณสูง โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เท่ากับ 95.21 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ พบการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองซึ่งเป็นตัวแทนของราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* ด้วยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าว เท่ากับ 19.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคัดแยกและจำแนกราดในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 จำนวน 93 ไอโซเลต ซึ่งพบจำนวน 72 ไอโซเลต (คิดเป็น 77.42 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ โดยมีปริมาณการผลิตสูงสุด เท่ากับ 46483.69 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

5.2.3 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

จากผลการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ จำนวน 100 ตัวอย่างย่อย ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบตัวอย่างข้าวกล้องมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 จำนวน 53 ตัวอย่างย่อย (คิดเป็น 53 เปอร์เซ็นต์) ตัวอย่างส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนอยู่ในระดับต่ำ (ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.88 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) แต่มีตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 สูงสุด เท่ากับ 54.55 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าข้อกำหนดตามประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ที่อนุญาตให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) และข้อกำหนดของคณะกรรมการยุโรป (The commission of the European Communities) ที่กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าว ได้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2010)

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย ซึ่งปัจจุบันผู้บริโภคหันมาใส่ใจด้านสุขภาพและโภชนาการมากยิ่งขึ้น ข้าวกล้องจึงได้รับความนิยมมากขึ้น ข้าวกล้องอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ จึงเหมาะแก่การเจริญและช่วยส่งเสริมการผลิตสารพิษของรา ราที่พบมากในข้าว ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* (Reddy และคณะ, 2008) จากงานวิจัยของ Begum และคณะ (2000), Makun และคณะ (2007) และ Reddy และคณะ (2009) ระบุว่า *Aspergillus section Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus* เป็นราสำคัญที่พบปนเปื้อนสูงและเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Shank และคณะ (1972) ที่พบการปนเปื้อนของ *A. flavus* ในตัวอย่างข้าวจากประเทศไทยและฮ่องกงสูงถึง 58 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Trung และคณะ (2001) รายงานว่าพบ *Aspergillus section Flavi* ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวจากประเทศเวียดนามกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Sales และคณะ (2005) ได้ศึกษาพบว่า ข้าวเปลือก ข้าวสาร ข้าวกล้อง รวมไปถึงรำข้าวและแกลบ ในประเทศฟิลิปปินส์และนำเข้าจากประเทศไทยและเวียดนามทุกตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของ *Aspergillus section Flavi* โดยเฉพาะตัวอย่างข้าวกล้องที่พบการปนเปื้อนของ *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* อย่างน้อยหนึ่งชนิดในทุกตัวอย่าง

จากการศึกษาของ ศุภรัตน์ ไชยิตเจริญกุล และคณะ (2545) ได้รายงานไว้ว่า ตัวอย่างข้าวกล้องที่สีใหม่และข้าวกล้องที่จำหน่ายตามร้านค้าในประเทศไทย พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสูงถึง 60.3 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องที่สีใหม่ เท่ากับ 2-34 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และข้าวกล้องที่จำหน่ายตามร้านค้า เท่ากับ 2-18

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับการศึกษาของ อัญชลี ประเสริฐศักดิ์ และคณะ (2550) ที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องจากโรงสีและจากผู้ประกอบการส่งออกที่ปริมาณ 0-11 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ อมรา ชินภูติ และคณะ (2552) ที่รายงานว่า ตัวอย่างข้าวกล้องที่เก็บจากตลาดในกรุงเทพมหานคร พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 สูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ โดยระดับการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0-4.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ ยังมีรายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่สุ่มเก็บจากห้างสรรพสินค้าและท้องตลาดในภาคกลางของประเทศไทย พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องจากห้างสรรพสินค้าปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 8.22-11.29 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ข้าวกล้องจากท้องตลาดพบการปนเปื้อน 63.3 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 8.03-15.10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กิตติพงษ์ ศรีม่วง, 2557)

สำหรับตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินปี 1 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.2 และตรวจหาการปนเปื้อนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าปริมาณของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ตรวจสอบได้มีค่าความเข้มข้นน้อยกว่าค่าความเข้มข้นที่กำหนดไว้เบื้องต้น ทำให้ตัวอย่างมีปริมาณการปนเปื้อนต่ำกว่าที่กำหนด ซึ่งอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้เติมลงในตัวอย่าง และอาจเกิดการสูญเสียปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ไประหว่างกระบวนการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

5.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

5.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

การหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้อง (ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโคโนสีเซียวมเหลือง) และข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker Optik GmbH) เพื่อสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง สรุปได้ดังนี้

5.3.1.1 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้อง ได้จากการสร้างแบบจำลองโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 9403.8-7498.3 และ 5454-4242.9 ต่อ

เซนติเมตร ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้เป็นแนวทางในการอธิบายประสิทธิภาพของแบบจำลอง เท่ากับ 0.93 ซึ่งค่า R^2 ที่ได้อยู่ในช่วง 0.92-0.96 หมายความว่า แบบจำลองนี้สามารถใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ (Williams, 2007) และค่าอัตราส่วนระหว่างค่า SEP ต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (ratio of standard error of prediction validation to standard deviation, RPD) หรือค่า RPD เป็นค่าที่บ่งบอกประสิทธิภาพของแบบจำลองที่ได้ เท่ากับ 3.83 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 3.1-4.9 หมายความว่า แบบจำลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้แบบพอใช้ (Williams, 2007)

5.3.1.2 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมด

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง ได้แก่ แบบจำลองที่สร้างโดยใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ โดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุดและการปรับลบโดยเส้นตรง (first derivative + straight line subtraction (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 5454-4597.1 ต่อเซนติเมตร โดยให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.63 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.50-0.64 หมายความว่า แบบจำลองที่ได้สามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างแบบหยาบ ค่า RPD ของแบบจำลอง เท่ากับ 1.73 อยู่ในช่วง 0-2.3 หมายความว่า แบบจำลองนี้ไม่ดีมากและไม่ควรนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนาย (Williams, 2007)

แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดที่สร้างโดยใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติให้ผลการทำนายที่ดีกว่าแบบจำลองที่สร้างจากข้อมูลของตัวอย่างทั้งหมด (ปนเปื้อนตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน) อาจเนื่องจากการเติมสปอร์ของรา *A. flavus* ลงไปในข้าวกล้อง (ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อน) ทำให้จำนวนตัวอย่างส่วนใหญ่ซึ่งจากเดิมที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดสูง ให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดสูงมากยิ่งขึ้น จำนวนตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดสูงจึงมีมากขึ้น ทำให้การกระจายตัวของข้อมูลจึงไม่สม่ำเสมอและไม่ครอบคลุมค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เมื่อนำไปสร้างแบบจำลองจึงให้ผลการทำนายที่ไม่แม่นยำ

5.3.1.3 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus*

โคโคโนสียิวอมเหลือง

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโคโนสียิวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง ได้แก่ แบบจำลองที่สร้างจากข้อมูลของ

ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อน ซึ่งให้ผลการทำนายที่ดีกว่าแบบจำลองที่สร้างโดยใช้ข้อมูลจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติเพียงอย่างเดียว อาจเนื่องจาก ตัวอย่างข้าวกล้องส่วนใหญ่พบการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองตามธรรมชาติในปริมาณต่ำ ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าวมีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอและไม่ครอบคลุม ดังนั้น การทำให้ตัวอย่างข้าวกล้องถูกปนเปื้อนด้วยรา *A. flavus* ทำให้จำนวนตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน *A. flavus* เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การกระจายตัวของข้อมูลดีขึ้นและได้แบบจำลองที่มีความแม่นยำขึ้น ซึ่งแบบจำลองที่ดีที่สุด ได้จากการสร้างแบบจำลองโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 จุด (first derivative (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 9403.8-6094.3 ต่อเซนติเมตร ซึ่งผลการทำนายที่ดีที่สุดให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.67 เป็นค่าที่อยู่ในช่วง 0.66-0.81 หมายความว่า แบบจำลองที่ได้สามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างแบบหยابและใช้ในการประมาณค่าเบื้องต้น ขณะที่ ค่า RPD ของแบบจำลองเท่ากับ 1.75 ซึ่งอยู่ในช่วง 0-2.3 หมายความว่า แบบจำลองนี้ไม่ดีมากและไม่ควรนำไปประยุกต์ใช้ในการทำนาย (Williams, 2007)

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณทั้งหมดดังข้างต้น พบว่าแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นให้ผลการทำนายดีที่สุด กลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องสำหรับใช้สร้างแบบจำลองและใช้ในการทำนายมีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ใกล้เคียงกัน จึงให้ผลการทำนายที่แม่นยำ (R^2 เท่ากับ 0.93) และสามารถนำแบบจำลองไปประยุกต์เพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวได้จริง ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีงานวิจัยหลายเรื่องที่ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในข้าว รวมทั้งการนำมาใช้งานจริง เช่น ปารีชาติ เทียนจุมพล และคณะ (2549) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่นยาว 1100-2500 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งให้ผลการตรวจวัดความชื้นได้อย่างแม่นยำสูง (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.93) Rittiron และคณะ (2004) ตรวจหาปริมาณความชื้นของข้าวกล้องโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ในช่วงความยาวคลื่น 1100-1800 นาโนเมตร ซึ่งให้ผลการทำนายที่แม่นยำด้วยค่า R^2 เท่ากับ 0.94 และ SEP เท่ากับ 0.40 เปอร์เซ็นต์ ชาวนาในประเทศออสเตรเลีย ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ระบบการวัดแบบส่องทะลุผ่านของข้าวเปลือกหลายเมล็ดตรวจสอบความชื้นของข้าวเปลือก (รณฤทธิ์ ฤทธิธรณ, 2552)

ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวกล้องส่วนใหญ่มีค่าต่ำหรือสูงเกินไป ทำให้การกระจายตัวของข้อมูลไม่สม่ำเสมอและไม่ครอบคลุมข้อมูลทั้งหมด แบบจำลองที่ได้จึงให้ผลการทำนายที่ยังไม่แม่นยำ อาจนำไปใช้ได้เพื่อการประมาณค่าเบื้องต้น แต่ยังไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง การเลือกตัวอย่าง

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สำหรับสร้างแบบจำลองจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นสาเหตุของความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ต้องการทราบ ซึ่งส่งผลต่อความแม่นยำและประสิทธิภาพของแบบจำลอง ดังนั้น ในขั้นตอนการเลือกหรือสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่ดีควรจะครอบคลุมและเป็นตัวแทนที่แท้จริงขององค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ รวมถึงมีการกระจายตัวของข้อมูลแบบสม่ำเสมอ (uniform distribution) และมีจำนวนตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์มากพอ (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2545)

จากงานวิจัยของ ธวัชชัย เพชรแก้ว (2552) ที่นำเมล็ดข้าวโพดมาเติมสปอร์ของรา *A. flavus* ลงไปและปล่อยให้เกิดการเจริญ จากนั้น นำเมล็ดข้าวโพดปกติผสมกับกับเมล็ดข้าวโพดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แล้วนำไปตรวจสอบรา *A. flavus* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพด โดยใช้เทคนิคคิวชิเบิลและเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร และสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLSR พบว่า แบบจำลองที่ได้ให้ค่า R เท่ากับ 0.94 ค่าความคลาดเคลื่อนจากการประเมิน (SEC) เท่ากับ 2.29 เปอร์เซ็นต์ ค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำนาย (SEP) เท่ากับ 4.18 เปอร์เซ็นต์ และค่า RPD เท่ากับ 2.68 และการศึกษาของ รุ่งนภา ไกลถิ่น (2555) ที่ประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร ตรวจสอบการปนเปื้อนของราในเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยสร้างแบบจำลองจากตัวอย่างเมล็ดข้าวสารปกติผสมกับเมล็ดข้าวสารที่มีการเจริญของรา *A. flavus* 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยวิธี PLSR พบว่า แบบจำลองให้ค่า R เท่ากับ 0.97 ค่า RPD เท่ากับ 3.91 และให้ค่า SEC , SEP และ bias เท่ากับ 1.60, 1.82 และ -0.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การสร้างแบบจำลองที่ได้จากงานวิจัยข้างต้น ให้ผลการทำนายการปนเปื้อนของราที่แม่นยำ (ค่า R เท่ากับ 0.94 และ 0.97) ซึ่งสูงกว่าแบบจำลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ ทั้งนี้เพราะการใช้ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน งานวิจัยข้างต้นนำตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยรามาสสมกับตัวอย่างปกติ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติ คือ ค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วยรา กับตัวอย่างปกติ จึงทำให้มีค่าจากห้องปฏิบัติการเพียง 4-5 ค่า และจำนวนตัวอย่างเท่ากันในแต่ละค่า ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราจากทุกตัวอย่างข้าวกล้องตามวิธีมาตรฐาน (Pitt และคณะ, 2009) จึงทำให้ได้ค่าที่หลากหลายและจำนวนไม่เท่ากัน

นอกจากนี้ ริณภา พุทธิง (2556) ได้ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบสะท้อนแบบแพร่ ในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร สร้างแบบจำลองเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และตัวอย่างข้าวที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราสกุล *Aspergillus* ซึ่งพบว่า แบบจำลองสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด ให้ค่า R เท่ากับ 0.701 ค่า SEP และ

bias เท่ากับ 28.249 และ -0.803 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับแบบจำลองทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในข้าวนั้น ยังให้ผลการทำนายที่ไม่แม่นยำ โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดให้ค่า R เท่ากับ 0.474 ค่า SEP และ bias เท่ากับ 17.926 และ 3.604 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้อง (ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1) และข้อมูลเชิงแสงหรือเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างข้าวกล้อง 3 แบบ ก่อนการสแกน (เมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด เมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว และสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง) ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker Optik GmbH) ทำให้ได้แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง สรุปได้ดังนี้

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ได้จากการใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดและสร้างแบบจำลองโดยใช้เส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง ทุกๆ 17 (first derivative (17 Pts.)) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 5453.8-4597.6 ต่อเซนติเมตร ซึ่งผลการทำนายที่ดีที่สุดให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.94 โดยค่า R^2 ที่ได้อยู่ในช่วง 0.92-0.96 หมายความว่า แบบจำลองนี้สามารถใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ และค่า RPD เท่ากับ 4.11 ซึ่งอยู่ในช่วง 3.1-4.9 หมายความว่า แบบจำลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้แบบพอใช้ (Williams, 2007)

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 แบบ (เมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ด เมล็ดข้าวกล้องที่บดแล้ว และสารสกัดหยาบเมล็ดข้าวกล้อง) พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากการใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดที่ไม่ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปสร้างและทำนายแบบจำลอง ทำให้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้สารเคมีในการสกัดจึงช่วยลดมลพิษ และยังคงความแม่นยำในการวิเคราะห์ ซึ่งเหล่านี้เป็นข้อดีของการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาประยุกต์ใช้เพื่อหาวิเคราะห์องค์ประกอบที่ต้องการทราบในตัวอย่างที่ต้องการ (Burns และคณะ, 2007) โดยแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องทั้งเมล็ดนี้ให้ผลการทำนายที่แม่นยำ (ค่า R^2 เท่ากับ 0.94 และ RPD เท่ากับ 4.11) สามารถนำไปใช้ได้จริงในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ แม้ผลของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนไม่เป็นไปตามที่

กำหนด แต่อย่างไรก็ตาม การกระจายตัวของค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ได้นั้นมีค่าที่ใกล้เคียงกัน จึงทำให้แบบจำลองและผลการทำนายที่ได้มีความแม่นยำ

แบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ได้จากการทดลองนี้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือดีกว่าหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ เช่น Hernández-Hierro และคณะ (2008) สร้างแบบจำลองเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกหยวกแดงจากประเทศสเปนด้วยวิธี modified partial least squares regression (MPLS) โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พหุคูณ (multiple correlation coefficients, RSQ) และค่า RPD เท่ากับ 0.955 และ 5.2 ตามลำดับ หมายความว่า แบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการประกันคุณภาพได้จริง เช่นเดียวกับ Fernández-Ibañez และคณะ (2009) ที่ประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์แบบ grating และแบบ FT-NIRS เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ และสร้างแบบจำลองด้วยวิธี partial least squares (PLS) โดยวิธีแบบ grating ให้ค่า R เท่ากับ 0.80 และ 0.85 และเครื่องแบบ FT-NIRS ให้ค่า R เท่ากับ 0.82 และ 0.84 สำหรับข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมีความสอดคล้องกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้ตรวจหาอะฟลาทอกซินบี 1 จึงสามารถใช้แบบจำลองนี้เพื่อการคัดกรองการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในธัญพืชได้ และจากงานวิจัยของ Tripathi และคณะ (2009) ที่ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสร้างแบบจำลองด้วยวิธี partial least squares regression (PLS) เพื่อทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ถูกทำให้ปนเปื้อนในพริกปนที่ความเข้มข้น 15-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) ให้ค่า R^2 เท่ากับ 96.7 ซึ่งแบบจำลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างแม่นยำ

นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษจากราอีกหลายชนิด เช่น โอคราทอกซินเอ (Hernández-Hierro และคณะ, 2008; Senthilkumar และคณะ, 2016) พูโมนิซิน (Gaspardo และคณะ, 2012; Giacomo และคณะ, 2013) ตีออกซินิวาลินอล (Beyer และคณะ, 2010; Dvoráček และคณะ, 2012; Pettersson และคณะ, 2003) และเออร์โกสเตอรอล (Börjesson และคณะ, 2007; Porep และคณะ, 2014)

5.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

5.4.1 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี Soft Independent Modeling of Class Analog (SIMCA) และ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) พบว่า การใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมดสำหรับสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงที่สุดและให้ค่าสูงกว่าวิธี SIMCA โดยผลการทำนายการแบ่งกลุ่มค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี PLS-DA ที่ดีที่สุด ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 78.98 เปอร์เซ็นต์ และการแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสียีวอม ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 86.36 เปอร์เซ็นต์

5.4.2 แบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

การสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมที่สูงที่สุด เท่ากับ 79.49 และ 85.31 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแบ่งกลุ่มที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง และการแบ่งกลุ่มตามปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ตามลำดับ

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มทั้งหมดด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงให้เห็นว่า การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมที่สูงกว่าวิธี SIMCA และการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มโดยใช้จำนวนตัวอย่างจริงของแต่ละกลุ่ม ให้ผลการทำนายที่ดีกว่าการใช้ตัวอย่างที่ปรับจำนวนตัวอย่างให้เท่ากัน ซึ่งทำให้มีสมาชิกหนึ่งกลุ่มที่ไม่ได้ใช้จำนวนตัวอย่างจริงทั้งหมด การสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มโดยใช้จำนวนตัวอย่างจริงที่สมาชิกในแต่ละกลุ่มเท่ากัน อาจทำให้ผลการทำนายที่ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพสำหรับทำนายปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมด การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสียีวอมเหลือง และการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ให้ผลการทำนายที่แม่นยำ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาการสร้างแบบจำลองให้มีประสิทธิภาพและแม่นยำขึ้นเพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างจริงตามธรรมชาติให้มากขึ้น

เพื่อให้ตัวอย่างมีค่าการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ครอบคลุมและมีการกระจายตัวแบบสม่ำเสมอ (uniform distribution)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นวิธีที่มีแนวโน้มสูงที่จะนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะในธัญพืช อีกทั้ง ผู้ผลิตและผู้ดำเนินการต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารได้มองหาวิธีการที่รวดเร็วและเชื่อถือได้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของราและสารพิษจากรา เพื่อควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร และช่วยลดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจที่เกิดจากการปนเปื้อนนี้ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจึงเป็นวิธีทางเลือกที่มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีขั้นตอนการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน ไม่ทำลายตัวอย่างและไม่ใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ จึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของตัวอย่างได้หลายค่าพร้อมกันได้อย่างแม่นยำและน่าเชื่อถือ ซึ่งเหล่านี้สามารถช่วยลดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจที่สำคัญได้ในระดับอุตสาหกรรม (Hossain และคณะ, 2014)

รายการอ้างอิง

- Abbas, H. K. (2005). Aflatoxin and food safety: CRC Press.
- Afssa. (2006). Risk assessment for mycotoxins in human and animal food chains. *French Food Safety Agency: Summary report.*
- Agelet, L. E., & Hurburgh, C. R. (2010). A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(4), 246-260.
- Al-Hammadi, S., Marzouqi, F., Al-Mansouri, A., Shahin, A., Al-Shamsi, M., Mensah-Brown, E., & Souid, A.-K. (2014). The Cytotoxicity of Aflatoxin B1 in Human Lymphocytes. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(1), e65-e71.
- Arroyo-Manzanares, N., Malysheva, S. V., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Diana Di Mavungu, J., & De Saeger, S. (2014). Holistic approach based on high resolution and multiple stage mass spectrometry to investigate ergot alkaloids in cereals. *Talanta*, 118, 359-367.
- Asghar, M. A., Iqbal, J., Ahmed, A., & Khan, M. A. (2014). Occurrence of Aflatoxins Contamination in Brown Rice from Pakistan. *Iranian Journal of Public Health*, 43(3), 291-299.
- Asim, M., Sarma, M. P., Thayumanavan, L., & Kar, P. (2011). Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. *Clinical Biochemistry*, 44(14-15), 1235-1240.
- Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, 45(1), 3-15.
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H. S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L. F., Misore, A., & DeCock, K. (2005). Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), 1779-1783.
- Bagchi, T. B., Sharma, S., & Chattopadhyay, K. (2015). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. *Food Chemistry*(0).

- Bansal, J., Pantazopoulos, P., Tam, J., Cavlovic, P., Kwong, K., Turcotte, A. M., Lau, B. P. Y., & Scott, P. M. (2011). Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *28*(6), 767-774.
- Bao, B., Liu, M., Liu, Y., Zhang, X., Zang, Y., Li, J., & Lu, W. (2015). NIR absorbing DICPO derivatives applied to wide range of pH and detection of glutathione in tumor. *Tetrahedron*, *71*(41), 7865-7868.
- Begum, F., & Samajpati, N. (2000). Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. *Naturwissenschaften*, *87*(6), 275-277.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(3), 497-516.
- Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A., & Marocco, A. (2005). Rapid Detection of Kernel Rots and Mycotoxins in Maize by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(21), 8128-8134.
- Beyer, M., Pogoda, F., Ronellenfitsch, F. K., Hoffmann, L., & Udelhoven, T. (2010). Estimating deoxynivalenol contents of wheat samples containing different levels of Fusarium-damaged kernels by diffuse reflectance spectrometry and partial least square regression. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(3), 370-374.
- Bhatnagar-Mathur, P., Sunkara, S., Bhatnagar-Panwar, M., Waliyar, F., & Sharma, K. K. (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, *234*, 119-132.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Moore, G. G., & Payne, G. A. (2014). *ASPERGILLUS* | *Aspergillus flavus* A2 - Batt, Carl A. In M. L. Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 83-91). Oxford: Academic Press.
- Bianco, G., Russo, R., Marzocco, S., Velotto, S., Autore, G., & Severino, L. (2012). Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon*, *59*(6), 644-650.

- Blanco, M., Alcalá, M., González, J. M., & Torras, E. (2006). Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations. *Analytica Chimica Acta*, *567*(2), 262-268.
- Blanco, M., Sánchez, M. J., & Alcalá, M. (2010). Study of ϵ -caprolactone polymerization by NIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *397*(8), 3575-3579.
- Blanco, M., & Villarroya, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *21*(4), 240-250.
- Bluma, R. V., & Etcheverry, M. G. (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, *25*(2), 324-334.
- Bodine, A. B., Fisher, S. F., & Gangjee, S. (1984). Effect of Aflatoxin B1 and Major Metabolites on Phytohemagglutinin-Stimulated Lymphoblastogenesis of Bovine Lymphocytes¹. *Journal of Dairy Science*, *67*(1), 110-114.
- Börjesson, T., Stenberg, B., & Schnürer, J. (2007). Near-Infrared Spectroscopy for Estimation of Ergosterol Content in Barley: A Comparison Between Reflectance and Transmittance Techniques. *Cereal Chemistry Journal*, *84*(3), 231-236.
- Breitkreitz, M. C., Raimundo, J. I. M., Rohwedder, J. J. R., Pasquini, C., Dantas Filho, H. A., Jose, G. E., & Araujo, M. C. U. (2003). Determination of total sulfur in diesel fuel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration. *Analyst*, *128*(9), 1204-1207.
- Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2007). *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Third Edition: CRC Press.
- Cary, J. W., Rajasekaran, K., Brown, R. L., Luo, M., Chen, Z.-Y., & Bhatnagar, D. (2011). Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxins (Basel)*, *3*(6), 678-696.
- Conzen, J.-P. (2006). *Multivariate Calibration. A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry*. Germany: Bruker Optik GmbH.

- Dachoupan Sirisomboon, C., Putthang, R., & Sirisomboon, P. (2013). Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control*, *33*(1), 207-214.
- de Fátima Bezerra de Lira, L., de Vasconcelos, F. V. C., Pereira, C. F., Paim, A. P. S., Stragevitch, L., & Pimentel, M. F. (2010). Prediction of properties of diesel/biodiesel blends by infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Fuel*, *89*(2), 405-409.
- De Saeger, S. (2011). Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed: Elsevier.
- Del Fiore, A., Reverberi, M., Ricelli, A., Pinzari, F., Serranti, S., Fabbri, A., Bonifazi, G., & Fanelli, C. (2010). Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(1), 64-71.
- Delwiche, S., Kim, M. S., & Dong, Y. (2011). Fusarium damage assessment in wheat kernels by Vis/NIR hyperspectral imaging. *Sensing and instrumentation for food quality and safety*, *5*(2), 63-71.
- Delwiche, S., MCKENZIE, K., & Webb, B. (1996). Quality characteristics in rice by near-infrared reflectance analysis of whole-grain milled samples. *Cereal Chemistry*, *73*(2), 257-263.
- Deshpande, S. S. (2002). Handbook of Food Toxicology. US: Marcel Dekker, Inc.
- Dvoráček, V., Prohasková, A., Chrpová, J., & Štočková, L. (2012). Near infrared spectroscopy for deoxynivalenol content estimation in intact wheat grain. *Plant, Soil and Environment*, *58*, 196-203.
- European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, *L 50*, 8-12.
- Fernanda Pimentel, M., Ribeiro, G. M. G. S., da Cruz, R. S., Stragevitch, L., Pacheco Filho, J. G. A., & Teixeira, L. S. G. (2006). Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Microchemical Journal*, *82*(2), 201-206.

- Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., & de la Roza-Delgado, B. (2009). Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry*, *113*(2), 629-634.
- Gaspardo, B., Del Zotto, S., Torelli, E., Cividino, S. R., Firrao, G., Della Riccia, G., & Stefanon, B. (2012). A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chemistry*, *135*(3), 1608-1612.
- Giacomo, D. R., & Stefania, D. Z. (2013). A multivariate regression model for detection of fumonisins content in maize from near infrared spectra. *Food Chemistry*, *141*(4), 4289-4294.
- Gilbert, J. (1999). Overview of mycotoxin methods, present status and future needs. *Natural Toxins*, *7*(6), 347-352.
- GIPSA. (1994). Rice Inspection Handbook. Chapter 2: Sampling. Washington (DC): USDA Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration. [online]. Available from: <http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area%4home&subject%4lr&topic%4hb-ri>. [25 May 2016].
- GIPSA. (1995). Grain Inspection Handbook. Book I: Grain Sampling. Washington (DC): USDA Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration. [online]. Available from: <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/handbooks/grain-insp/grbook1/gihbk1.htm>. [25 May 2016].
- GIPSA. (1998). Hop Inspection Handbook. Chapter 2: Sampling. Washington (DC): USDA Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration. [online]. Available from: <http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area%4home&subject%4lr&topic%4hb-hi>. [25 May 2016].
- Heigl, N., Greiderer, A., Petter, C. H., Kolomiets, O., Siesler, H. W., Ulbricht, M., Bonn, G. K., & Huck, C. W. (2008). Simultaneous Determination of the Micro-, Meso-, and Macropore Size Fractions of Porous Polymers by a Combined Use of Fourier Transform Near-Infrared Diffuse Reflection Spectroscopy and Multivariate Techniques. *Analytical Chemistry*, *80*(22), 8493-8500.

- Hernández-Hierro, J. M., García-Villanova, R. J., & González-Martín, I. (2008). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta*, 622(1–2), 189-194.
- Hindle, P. H. (2007). Historical Development. In *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition* (pp. 3-6): CRC Press.
- Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., & Thrane, U. (2006). Advances in food mycology (Vol. 571). US: Springer.
- Hodge, G., & Woodbridge, W. (2004). Use of near infrared spectroscopy to predict lignin content in tropical and sub-tropical pines. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12(6), 381-390.
- Hossain, M. Z., & Goto, T. (2014). Near- and mid-infrared spectroscopy as efficient tools for detection of fungal and mycotoxin contamination in agricultural commodities. *World Mycotoxin Journal*, 7(4), 507-515.
- Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Chapter Four - Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. In S. Sima & M. G. Geoffrey (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. Volume 86, pp. 199-249): Academic Press.
- Huang, H., Yu, H., Xu, H., & Ying, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 303-313.
- IARC. (2012). Chemical Agents and Related Occupations. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100F, 229.
- Iyer, M., & Cousin, M. (2003). Immunological detection of *Fusarium* species in cornmeal. *Journal of Food Protection®*, 66(3), 451-456.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., & Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(11), 1590-1609.
- Jarvis, B. B., & Miller, J. D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 367-372.

- Jerome, J. W. (2007). NIR Spectroscopy Calibration Basics. In *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition* (pp. 123-150): CRC Press.
- Jinap, S., De Rijk, T. C., Arzandeh, S., Kleijnen, H. C. H., Zomer, P., Van der Weg, G., & Mol, J. G. J. (2012). Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods. *Food Control*, 26(1), 42-48.
- Juliano, B. O. (1993). Rice in human nutrition: Int. Rice Res. Inst.
- Kamika, I., & Takoy, L. L. (2011). Natural occurrence of Aflatoxin B1 in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Food Control*, 22(11), 1760-1764.
- Kasemsumran, S., Apiwatanapiwat, W., Suttiwijitpukdee, N., Vaithanomsat, P., & Thanapase, W. (2014). Evaluation of Fourier transform-near infrared spectroscopic measurements for the quantification of curcumin in turmeric herbal medicines. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 22(2), 113-120.
- Kasemsumran, S., Thanapase, W., Punsuvon, V., & Ozaki, Y. (2012). A feasibility study on nondestructive determination of oil content in palm fruits by visible-near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20(6), 687-694.
- Kautzman, M. E., Wickstrom, M. L., & Scott, T. A. (2015). The use of near infrared transmittance kernel sorting technology to salvage high quality grain from grain downgraded due to *Fusarium* damage. *Animal Nutrition*, 1(1), 41-46.
- Kawamura, S., Natsuga, M., & Itoh, K. (1999). Determination of undried rough rice constituent content using near-infrared transmission spectroscopy. *Transactions of the ASAE-American Society of Agricultural Engineers*, 42(3), 813-818.
- Kellogg, E. (2009). The Evolutionary History of *Ehrhartoideae*, *Oryzeae*, and *Oryza*. *Rice*, 2(1), 1-14.
- Khlangwiset, P., Shephard, G. S., & Wu, F. (2011). Aflatoxins and growth impairment: a review. *Critical reviews in toxicology*, 41(9), 740-755.
- Kihara, T., Matsuo, T., Sakamoto, M., Yasuda, Y., Yamamoto, Y., & Tanimura, T. (2000). Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors of rat offspring. *Toxicological Sciences*, 53(2), 392-399.

- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2), 152-163.
- Kumar, V., Basu, M. S., & Rajendran, T. P. (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27(6), 891-905.
- Leslie, J. F., & Logrieco, A. (2014). *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*: John Wiley & Sons.
- Li, F.-Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, X.-Y., & Li, Y.-W. (2001). Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4122-4126.
- Liu, Z., Gao, J., & Yu, J. (2006). Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Products Research*, 42(4), 468-479.
- Makun, H. A., Gbodi, T. A., Akanya, O. H., Salako, E. A., & Ogbadu, G. H. (2007). Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza sativa*) in Niger state, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6(2).
- Markaki, P. (2010). Chapter 45 - Occurrence of Aflatoxin B1 in the Greek Virgin Olive Oil: Estimation of the Daily Exposure. In V. R. P. R. Watson (Ed.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 407-414). San Diego: Academic Press.
- Masaki, K., Ohkawara, S. I., Hirano, T., Seno, M., & Sato, T. (2003). Fourier transform near-infrared and electron spin resonance studies on the crosslinking reaction of liquid carboxylated poly (acrylonitrile-co-butadiene) rubber with dicumyl peroxide in dioxane. *Journal of applied polymer science*, 89(8), 2095-2101.
- McGoverin, C. M., Ho, L. C., Zeitler, J. A., Strachan, C. J., Gordon, K. C., & Rades, T. (2006). Quantification of binary polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride using NIR spectroscopy. *Vibrational spectroscopy*, 41(2), 225-231.

- McLean, M., & Dutton, M. F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & therapeutics*, *65*(2), 163-192.
- Meirelles, P. G., Ono, M. A., Ohe, M. C. T., Maroneze, D. M., Itano, E. N., Garcia, G. T., Sugiura, Y., Ueno, Y., Hirooka, E. Y., & Ono, E. Y. (2006). Detection of *Fusarium* sp. contamination in corn by enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and agricultural immunology*, *17*(2), 79-89.
- Mühlemann, M., Lüthy, J., & Hübner, P. (1997). Mycotoxin contamination of food in Ecuador: A: aflatoxins. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, *88*(4), 474-496.
- Nguyen, M. T., Tozlovanu, M., Tran, T. L., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, *105*(1), 42-47.
- Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, *119*(1-2), 38-46.
- Nilsson, D., Edlund, U., Sjöström, M., & Agnemo, R. (2005). Prediction of thermo mechanical pulp brightness using NIR spectroscopy on wood raw material. *Paperi ja puu*, *87*(2), 102-109.
- Nisa, A., Zahra, N., & Yasha, N. (2016). Comparative study of aflatoxins in brown rice samples of local and import quality. *International Food Research Journal*, *23*(1).
- Osborne, B. G., & Fearn, T. (1986). *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. UK: Longman Scientific and Technical.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. UK: Longman Scientific and Technical.
- Osman, N., Abdelgadir, A., Moss, M., & Bener, A. (1999). Aflatoxin contamination of rice in the United Arab Emirates. *Mycotoxin Research*, *15*(1), 39-44.
- Paderes, D. E., Mew, T. W., & Ilag, L. L. (1997). Influence of moisture content and length of storage on fungal invasion of paddy rice. *Biotropia (Indonesia)*.

- Park, J. W., Kim, E. K., & Kim, Y. B. (2004). Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B1 through food consumption. *Food Additives & Contaminants*, 21(1), 70-75.
- Pascale, M. N. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*(117), 15-25.
- Peng, B., Ge, N., Cui, L., & Zhao, H. (2016). Monitoring of alcohol strength and titratable acidity of apple wine during fermentation using near-infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 86-92.
- Pettersson, H., & Åberg, L. (2003). Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control*, 14(4), 229-232.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. US: Springer.
- Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., & Cvetnić, Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40(0), 286-291.
- Pojić, M. M., & Mastilović, J. S. (2013). Near Infrared Spectroscopy—Advanced Analytical Tool in Wheat Breeding, Trade, and Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 330-352.
- Porep, J. U., Erdmann, M. E., Körzendörfer, A., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2014). Rapid determination of ergosterol in grape mashes for grape rot indication and further quality assessment by means of an industrial near infrared/visible (NIR/VIS) spectrometer – A feasibility study. *Food Control*, 43(0), 142-149.
- Pubchem. (2016). Compound Summary for CID 186907: AFLATOXIN B1. [online]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=Top>. [4 June 2016].
- Qiang, Z., Cheng-hai, L., Jing-kun, S., Yi-juan, C., Qun, L., Fu-guo, J., & Xian-zhe, Z. (2014). Rapid Non-destructive Detection for Molds Colony of Paddy Rice Based on Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 21(4), 54-60.

- Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 202-251.
- Raymond, C. A., & Schimleck, L. R. (2002). Development of near infrared reflectance analysis calibrations for estimating genetic parameters for cellulose content in *Eucalyptus globulus*. *Canadian Journal of Forest Research*, 32(1), 170-176.
- Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., Abbas, H. K., Abel, C. A., & Muralidharan, K. (2008). MYCOTOXIGENIC FUNGI, MYCOTOXINS, AND MANAGEMENT OF RICE GRAINS. *Toxin Reviews*, 27(3-4), 287-317.
- Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., & Muralidharan, K. (2009). Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiology*, 26(1), 27-31.
- Reiter, E. V., Vouk, F., Böhm, J., & Razzazi-Fazeli, E. (2010). Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. *Food Control*, 21(7), 988-991.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2772-2777.
- Rittiron, R., Saranwong, S., & Kawano, S. (2004). Useful tips for constructing a near infrared-based quality sorting system for single brown-rice kernels. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12, 133-139.
- Rohde, S., & Rabenstein, F. (2005). Standardization of an indirect PTA-ELISA for detection of *Fusarium* spp. in infected grains. *Mycotoxin Research*, 21(2), 100-104.
- Rustom, I. Y. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57-67.
- Rustom, I. Y., López-Leiva, M. H., & Nair, B. M. (1993). Effect of pH and heat treatment on the mutagenic activity of peanut beverage contaminated with aflatoxin B 1. *Food Chemistry*, 46(1), 37-42.
- Sales, A. C., & Yoshizawa, T. (2005). Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus* section *Flavi* contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *Food Additives & Contaminants*, 22(5), 429-436.

- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, *161*(2), 168-175.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(9), 893-908.
- Senthilkumar, T., Jayas, D., White, N., Fields, P., & Gräfenhan, T. (2016). Detection of fungal infection and Ochratoxin A contamination in stored barley using near-infrared hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, *147*, 162-173.
- Senthilkumar, T., Singh, C., Jayas, D., & White, N. (2012). Detection of fungal infection in canola using near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of Agricultural Engineering*, *49*(1), 21-27.
- Şenyuva, H. Z., & Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B*, *878*(2), 115-132.
- Set, E., & Erkmen, O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(8-9), 2532-2537.
- Singh, C. B., Jayas, D. S., Paliwal, J., & White, N. D. G. (2011). Fungal Damage Detection in Wheat Using Short-Wave Near-Infrared Hyperspectral and Digital Colour Imaging. *International Journal of Food Properties*, *15*(1), 11-24.
- Sirisomboon, P., Deeprommit, M., Suchaiboonsiri, W., & Lertsri, W. (2013). Shortwave near infrared spectroscopy for determination of dry rubber content and total solids content of Para rubber (*Hevea brasiliensis*) latex. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *21*(4), 269-279.
- Sirisomboon, P., Tanaka, M., Kojima, T., & Williams, P. (2012). Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato 'Momotaro' by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, *112*(3), 218-226.
- Suarez-Bonnet, E., Carvajal, M., Mendez-Ramirez, I., Castillo-Urueta, P., Cortes-Eslava, J., Gomez-Arroyo, S., & Melero-Vara, J. M. (2013). Aflatoxin (B1 , B2 , G1 , and

- G2) contamination in rice of Mexico and Spain, from local sources or imported. *Journal of Food Science*, 78(11), T1822-1829.
- Sulub, Y., LoBrutto, R., Vivilecchia, R., & Wabuye, B. W. (2008). Content uniformity determination of pharmaceutical tablets using five near-infrared reflectance spectrometers: a process analytical technology (PAT) approach using robust multivariate calibration transfer algorithms. *Analytica Chimica Acta*, 611(2), 143-150.
- Tallada, J., Wicklow, D., Pearson, T., & Armstrong, P. (2011). Detection of fungus infected corn kernels using near infrared reflectance spectroscopy and color imaging. *Transactions of the ASABE*, 54(3), 1151-1158.
- Tellis, G. M., Vitale, C., & Murgallis, T. (2015). Near Infrared Spectroscopy (NIRS): A Pilot Study to Measure Hemoglobin Concentration Changes in the Brains of Persons who Stutter and Typically Fluent Speakers. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 193, 261-265.
- Toteja, G. S., Mukherjee, A., Diwakar, S., Singh, P., Saxena, B. N., Sinha, K. K., Sinha, A. K., Kumar, N., Nagaraja, K. V., Bai, G., Krishna Prasad, C. A., Vanchinathan, S., Roy, R., & Sarkar, S. (2006). Aflatoxin B1 contamination of parboiled rice samples collected from different states of India: A multi-centre study. *Food Additives & Contaminants*, 23(4), 411-414.
- Tripathi, S., & Mishra, H. N. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*, 20(9), 840-846.
- Trung, T., Bailly, J., Querin, A., Le Bars, P., & Guerre, P. (2001). Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152(7), 555-560.
- Tsutsumi, Y., Takao, Y., & Suzuki, T. (2011). Calculation of repeatability and reproducibility for qualitative data. In.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168-180.

- Urusov, A. E., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2010). Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(3), 253-266.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57-80.
- VICAM. (2003). AflaTest HPLC procedure for corn, grains & feeds (1.0 gram sample equivalent, 0-50 ppb). *AflaTest HPLC Instruction Manual*.
- Wang, D., Dowell, F., Ram, M., & Schapaugh, W. (2004). Classification of fungal-damaged soybean seeds using near-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, 7(1), 75-82.
- Wang, W., Heitschmidt, G. W., Ni, X., Windham, W. R., Hawkins, S., & Chu, X. (2014). Identification of aflatoxin B1 on maize kernel surfaces using hyperspectral imaging. *Food Control*, 42(0), 78-86.
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A. K., & Telang, A. G. (2005). Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 607-615.
- Williams, P. (2007). Near-infrared Technology-Getting the Best Out of Light. Canada: PDK project Inc.
- Wood, G. E. (2015). AFLATOXIN REGULATORY ISSUES. [online]. Available from: http://www.extension.iastate.edu/grain/files/Migrated/3_WoodAflatoxinRegulatoryIssues.ppt. [15 October 2015].
- Workman, J. J., & Burns, D. A. (2007). Commercial NIR Instrumentation. In *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition* (pp. 67-78): CRC Press.
- Wu, D., He, Y., & Feng, S. (2008). Short-wave near-infrared spectroscopy analysis of major compounds in milk powder and wavelength assignment. *Analytica Chimica Acta*, 610(2), 232-242.
- Xiaobo, Z., Yanxiao, L., & Jiewen, Z. (2007). Using genetic algorithm interval partial least squares selection of the optimal near infrared wavelength regions for determination of the soluble solids content of "Fuji" apple. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 15(3), 153.

- Yao, H., Hruska, Z., & Di Mavungu, J. D. (2015). Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 181-191.
- Yunus, A. W., Razzazi-Fazeli, E., & Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins (Basel)*, 3(6), 566-590.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.
- กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2558). สถานการณ์การผลิตและการตลาดข้าวของโลก ปีการผลิต 2557/2558 (ณ เดือนมีนาคม 2558). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
- กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. (2557). สถิติการนำเข้า-ส่งออกของไทย: ข้าวหอมมะลิไทย เดือนธันวาคม 2556 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=164&ctl=DetailUserContent&mid=689&contentID=4643>. [27 มีนาคม 2559].
- กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. (2558). สถิติการนำเข้า-ส่งออกของไทย: ข้าวหอมมะลิไทย เดือนธันวาคม 2557. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=164&ctl=DetailUserContent&mid=689&contentID=6366>. [20 มีนาคม 2559].
- กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. (2559). สถิติการนำเข้า-ส่งออกของไทย: ข้าวหอมมะลิไทย เดือนธันวาคม 2558. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=164&ctl=DetailUserContent&mid=689&contentID=8011>. [27 มีนาคม 2559].
- กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2547). คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย. กรุงเทพฯ: บริษัทจิรวัดน์เอ็กซ์เพรส จำกัด.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2555). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: ข้าว ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 (มกษ. 4004-2555). ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป. เล่มที่ 129. ตอนที่ 173 ง (พิเศษ).
- กระทรวงสาธารณสุข. (2529). ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4(2). ราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษ. เล่มที่ 103. ตอนที่ 23.
- กล้า เมธากานต์. (2552). ข้าวกล้องงอก: มหัศจรรย์พันธุ์ข้าวไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แฮปปี้ ทู ดู.

- กิตติพงษ์ ศรีม่วง. (2557). การตรวจสอบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ในผลิตภัณฑ์ข้าวจากแหล่งจำหน่ายในภาคกลาง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 45(3), 195-203.
- ณัฐภรณ์ สุทธิจิตรภักดี. (2552). การประยุกต์ใช้สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในด้านอุตสาหกรรมที่มีโซ่อาหาร. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธงชัย สุวรรณสิขณน์, & ปิติพร ฤทธิเรืองเดช. (2552). การวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี.
- ธวัชชัย เพชรแก้ว. (2552). การประยุกต์ใช้เทคนิควิลิเบลและเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Aspergillus flavus* บนเมล็ดข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นิตดา หงษ์วิวัฒน์. (2552). ข้าวกล้อง ข้าวอก มหัศจรรย์อาหารต้านโรค. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แสงแดด.
- นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์. (2545). หลักการพื้นฐานของเทคนิคอินฟราเรดย่านใกล้สเปกโตรสโกปี การอบรมเชิงปฏิบัติการ การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โนทัย กิตติคำแหง. (2554). การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปาริชาติ เทียนจุมพล, รณฤทธิ์ ฤทธิธรม, สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์, & สุชาดา เวียรศิลป์. (2549). การหาปริมาณความชื้นอย่างแม่นยำสูงในข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. วารสารเกษตร, 22(3), 213-222.
- รณฤทธิ์ ฤทธิธรม. (2552). การประยุกต์ใช้ NIR ในเมล็ดพืช. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ริณภา พุทธิง. (2556). การตรวจหาการปนเปื้อนราและอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- รุ่งนภา ไกลถิ่น. (2555). การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Aspergillus flavus* ในเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วารุณี ณะแพสย์. (2552). สถานการณ์การใช้ประโยชน์เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในประเทศไทย. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์, & อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. (2552). เครื่องมือและอุปกรณ์สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล, อมรา ชินญาติ, & กัญญา พุทธสมัย. (2545). Aflatoxin Contamination in Brown Rice Milling and Trade. ข้าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา, 12(2), 122-131.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. (2545). ขั้นตอนการสร้างสมการประเมินค่าทางเคมีและการทดสอบสมการในเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรด. การอบรมเชิงปฏิบัติการ การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. (2552). หลักการพื้นฐานของสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุมาพร เกษมสำราญ, & ปิติพร ฤทธิเรืองเดช. (2552). ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ NIR. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร และภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.). (2544). ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 10: ธัญพืช. นนทบุรี: สหมิตรพรีนติ้ง.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2551). รายงานเรื่องประเทศสวีเดนตรวจพบสาร Aflatoxin ในข้าวกล้องหอมมะลิของไทย (23 กุมภาพันธ์ 2551).

- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2558). World Rice Trade (Exporters 2014). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thairiceexporters.or.th/world%20rice%20trade.htm>. [28 กันยายน 2558].
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). (2558). ประวัติความเป็นมาของข้าว. คลังข้อมูลสารสนเทศ ข้าวเชิงลึก. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice-histories.html#hisworld>. [25 กันยายน 2558].
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. (2552). เอกสารวิชาการ ข้าวโภชนาการ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://brrd.in.th/library/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=37 [30 กันยายน 2558].
- สิทธา พรหมสมบุญ. (2552). ข้าวของเรา. กรุงเทพฯ: มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์.
- อนงค์ บิณฑวิท. (2546). สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. (2552). การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนวิเคราะห์. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม: ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อมรา ชินภูติ, & ศุภรา อัครสาระกุล. (2552). การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน ปี 1 และสารโคราทอกซิน เอ ในข้าวกล้องและข้าวขาว. วารสารวิชาการข้าว, 3(2).
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2556). ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี ประเสริฐศักดิ์, สุนันทา วงศ์ปิยชน, ศิริวรรณ ตั้งวิสุทธิจิต, ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล, & ละม้าย มาศ ยังสุข. (2550). ความมีชีวิตและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของข้าวกล้อง. วารสารวิชาการข้าว, 1(1).



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Dichloran 18% Glycerol agar (DG18)

อาหารสำเร็จรูป DG18	31.6 กรัม
---------------------	-----------

กลีเซอรอล	175 มิลลิลิตร
-----------	---------------

ละลายอาหารสำเร็จรูป 31.6 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เตรียมกลีเซอรอล 175 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ผสมอาหารสำเร็จรูปกับกลีเซอรอล 85 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน

2. อาหารแข็ง Potato Dextrose agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDA	39 กรัม
--------------------	---------

ละลายอาหารสำเร็จรูป 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายสำหรับเตรียมสารแขวนลอยสปอร์

ซังโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Tween 80 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1

เตรียมอะซีโทไนโตรลปริมาตร 200 มิลลิลิตร น้ำปลอดประจุปริมาตร 600 มิลลิลิตร และเมทานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมรวมกัน จากนั้น นำไปกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรอง ชนิด regenerated cellulose ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่แก้วในสารละลายด้วยอ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยเครื่อง HPLC

3. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

เตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเปิดสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ตั้งต้น ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติมเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 จนครบปริมาตร

4. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

เตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยเปิดสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาตร 12.5, 25, 50, 125, 250, 500, 1000, และ 2000 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 จนครบปริมาตร

ภาคผนวก ค

สูตรสำหรับการคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100$$

โดย A คือ น้ำหนักกระทงพอยล์

B คือ น้ำหนักกระทงพอยล์และตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องก่อนอบ

C คือ น้ำหนักกระทงพอยล์และตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องหลังอบ

2. การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อของรา}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3. การคำนวณปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ราผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

$$\text{ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{A}{B \times 2.5 \times C \times \left(\frac{1}{D}\right)}$$

โดย A คือ พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1

B คือ สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1

C คือ การเติมเฟสเคลื่อนที่ลงในอะฟลาทอกซินปี 1 ที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง (กรัม)

4. การคำนวณปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ปนเปื้อนในเมล็ดข้าวกล้อง

$$\text{ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{A}{B}$$

โดย A คือ พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1

B คือ สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1

5. การคำนวณปริมาณสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่เติมลงในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง

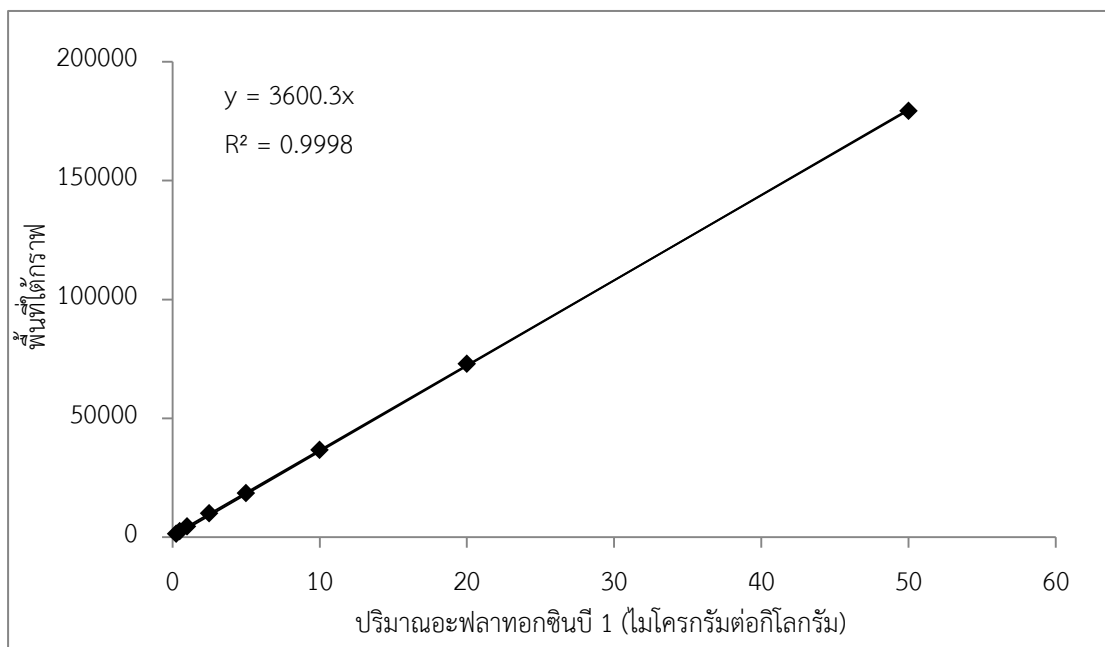
$$\text{ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่เติมลงในตัวอย่าง (มิลลิกรัม)} = \frac{A \times B}{C}$$

- โดย A คือ ความเข้มข้นอะฟลาทอกซินบี 1 สุดท้ายที่ต้องการ (นาโนกรัมต่อกรัม)
B คือ น้ำหนักข้าวกล้อง (กรัม)
C คือ ความเข้มข้นอะฟลาทอกซินบี 1 เริ่มต้น (นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม)

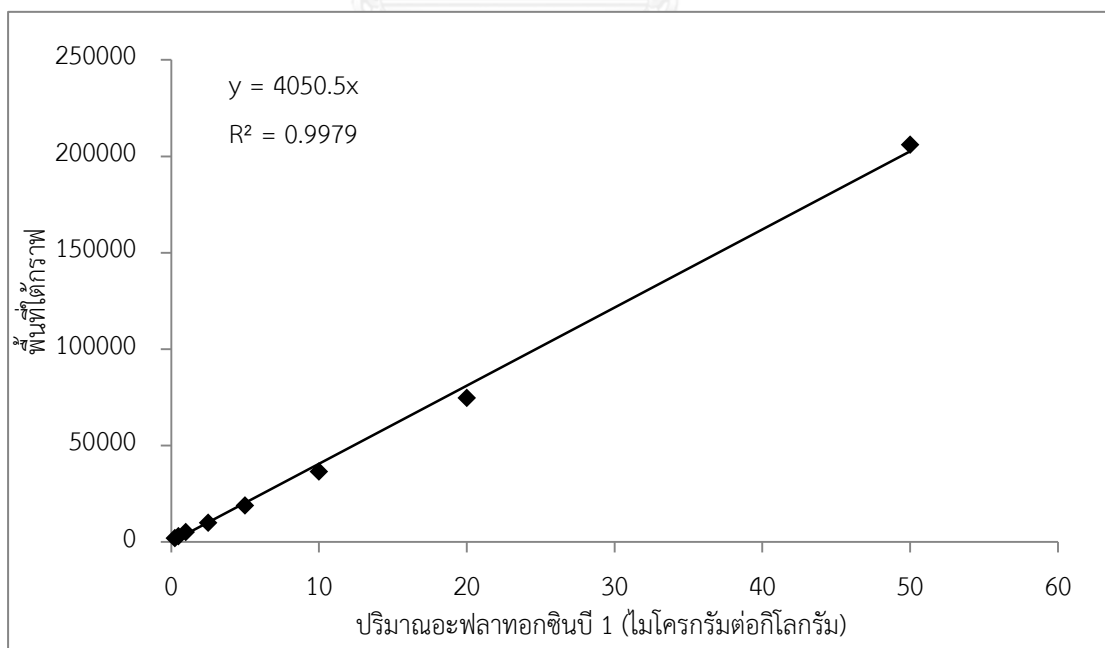


ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1



ภาพที่ ง.1 กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1 สำหรับคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ราผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง



ภาพที่ ง.2 กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1 สำหรับคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในตัวอย่างข้าวกล้อง

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ จ.1 สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างข้าวกล้องทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดข้าวกล้อง		
	ข้าวกล้องหอมมะลิ	ข้าวกล้องหอมนิล	ข้าวกล้องหอมแดง
กรุงเทพมหานคร	36	24	31
สมุทรปราการ	6	2	2
ลพบุรี	9	5	12
ประจวบคีรีขันธ์	12	3	3
ชัยภูมิ	1	1	2
ร้อยเอ็ด	1	0	0
รวม	65	35	50

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล: นางสาวชลธิชา สีเหนียง

วัน เดือน ปีเกิด: 6 ธันวาคม พ.ศ. 2533

ประวัติการศึกษา:

ปีการศึกษา 2555 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556 เข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ปัจจุบัน: 135/1 หมู่ที่ 5 ต.บ้านกล้วย อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี 15110

ผลงานเผยแพร่:

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ “TSB 2015: The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference” ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558 ณ โรงแรม Mandarin by Centre Point กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Determination of fungal contamination and moisture content in brown rice using near infrared spectroscopy