**รายงานการวิจัย เรื่อง**

# การตรวจสอบการปนเปื้อนของราและสารพิษอะฟลาทอกซินแบบไม่ทำลายตัวอย่างในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

# Non-destructive determination of mold and aflatoxin in pepper, corn and peanut using near infrared spectroscopy (NIRS)

บุศรากรณ์ มหาโยธี
ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ
Busarakorn Mahayothee
Pramote Khuwijitjaru

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
ภายใต้ชุดโครงการวิจัยเรื่องการตรวจสอบอันตรายในอาหารอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559

## บทคัดย่อ

**ชื่อโครงการ** การตรวจสอบการปนเปื้อนของราและสารพิษอะฟลาทอกซินแบบไม่ทำลายตัวอย่างในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
**ชื่อผู้วิจัย** บุศรากรณ์ มหาโยธี[1], ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ[1]
**หน่วยงานที่สังกัด** [1]ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
**แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย** งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
**ปีที่เสร็จ** พ.ศ. 2559
**ประเภทการวิจัย** การวิจัยประยุกต์
**สาขาวิชา** สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชา อุตสาหกรรมเกษตร

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของราและสารพิษอะฟลาทอกซินแบบไม่ทำลายตัวอย่างในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง และศึกษาการตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นปริมาณอะฟลาทอกซิน

ตัวอย่างพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงวิเคราะห์วิธีมาตรฐานคือ ปริมาณความชื้นด้วยตู้อบลมร้อน ปริมาณเชื้อราด้วยวิธิ total plate count และปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยเทคนิค HPLC ตัวอย่างจะถูกนำมาวัด NIR ในสองรูปแบบคือแบบเมล็ดและแบบบด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง FT-NIR ในระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (reflectance) และศึกษาการเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบอะฟลาทอกซินบี ที่มีความเข้มข้นต่ำ ด้วยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR) โดยการหยดสารสกัดลงบนกระดาษใยแก้ว (GF/A) หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดด้วยเครื่อง FT-NIR ในระบบการวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนกลับ (transflectance) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร สร้างสมการทำนายโดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares, PLS)

จากการศึกษาพบว่าเทคนิค NIRS มีความเหมาะสมในการนำมาตรวจสอบปริมาณความชื้น ปริมาณอะฟลาทอกซินได้ แต่ไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อราได้ โดยให้ค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, $R^2$) และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (root mean mnbsquare error of cross validation, RMSECV) ของปริมาณความชื้น เท่ากับ 0.98 และ 0.521%, ปริมาณเชื้อราเท่ากับ 0.30 และ $3.89x10^3$ cfu/g และ ปริมาณอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0.97 และ 0.014 ppm และ ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** การปนเปื้อน อาหารปลอดภัย เชื้อรา สารพิษอะฟลาทอกซิน จุลินทรีย์ อันตรายในอาหาร การตรวจสอบแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

## Abstract

**Research Title** Non-destructive determination of mold and aflatoxin in pepper, corn and peanut using near infrared spectroscopy (NIRS)

**Reseacher** Busarakorn Mahayothee[1], Pramote Khuwijitjaru[1]

**Office** Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial technology, Silpakorn University

**Research Grant** Fisical Year 2015 Research and Development Institute, Silpakorn University

**Year of completion** 2016

**Type of research** Applied research

**Subjects** Agriculture and Biology, Sub-group: Agro-industry

The objective of this research was to study the rapid determination of moisture content, aflatoxin content and mold in pepper, corn and peanut using near infrared spectroscopy (NIRS) and studying the feasibility sample preparation of dry-extract system for infrared (DESIR) technique for determination low level of aflatoxin B1.

In this study, samples were used for detection of moisture content and mold and aflatoxin $B_1$. The reference analysis of total mold content using dilution plating method and moisture content by oven-dry method and aflatoxin $B_1$ by HPLC were performed. Samples were prepared from two different methods for analysis NIR measurements, the first method was the kernel and the second one were the grond sample. Both types of samples were analyzed using reflectance mode of NIR measurements in wavelength regions 800-2500 nm. glass micro fibre (GF/A) samples were used for model building for determination of aflatoxin B1. Model (GF/A) were dropped with 1 ml of extraction aflatoxin B1 in sample ranging and dried in hood 1 hour. Model (GF/A) were analyzed using transflectance mode of measurements in wavelength regions 800-2500 nm. Then, the calibration model was built by using partial least squares regression analysis.

It was found that grinded sample was a proper sample preparation for NIR measurement to predict the moisture content mold and aflatoxin $B_1$ in pepper, corn and peanut. Maximum coefficient of determination ($R^2$) and less root mean square error of prediction (RMSEP) were respectively 0.98 and 0.521%, 0.30 and $3.89 \times 10^3$ cfu/g and 0.97 and 0.14 ppm for moisture content mold and aflatoxin $B_1$, respectively.

**Keywords:** contamination, food safety, mold, aflatoxin, microbial, food hazards, non-destructive, near infrared spectroscopy

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การตรวจสอบอันตรายในอาหารอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้” ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

# สารบัญ

บทคัดย่อ.....ก
Abstract.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญภาพ.....ช
บทที่ 1.....1
บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....1
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....2
1.4 ขอบเขตของการศึกษา.....2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2.....3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน.....3
2.2 เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....5
บทที่ 3.....9
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....9
3.1 วัตถุดิบ.....9
3.2 สารเคมี.....9
3.3 อุปกรณ์.....9
3.4 วิธีการทดลอง..... 100
บทที่ 4.....15
ผลและการอภิปรายผลการทดลอง.....16
4.1 เส้นสเปกตรัมของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง.....16
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อปริมาณเชื้อราแอสเปอร์จิลัส ฟลาวัส ปริมาณเชื้อราทั้งหมด ปริมาณความชื้น ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ใน พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง.....19
บทที่ 5.....35
สรุปผลการทดลอง.....35
เอกสารอ้างอิง.....36
ภาคผนวก ก.....38
วิธีการวิเคราะห์.....38

**การเผยแพร่ผลงานวิจัย**.....39
**ประวัติผู้วิจัย** .....40

# สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การแบ่งช่วงคลื่นย่านอินฟราเรด ..... 6
ตารางที่ 2 การใช้เทคนิค NIR ในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษอะฟลาทอกซิน ..... 7
ตารางที่ 3 ชุดการทดลองของการวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค NIRS ..... 12
ตารางที่ 4 ค่าทางสถิติของปริมาณความชื้น ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง..... 19
ตารางที่ 5 ค่าทางสถิติของปริมาณเชื้อราทั้งหมด ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง ..... 19
ตารางที่ 6 ค่าทางสถิติของปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง..... 20
ตารางที่ 7 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณความชื้นของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแบบเมล็ดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)..... 21
ตารางที่ 8 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณความชื้นของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแบบบดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR) .....21
ตารางที่ 9 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อราทั้งหมดของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแบบเมล็ดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR).....26
ตารางที่ 10 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อราทั้งหมดของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแบบบดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR).....27
ตารางที่ 11 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR).....32

# สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารพิษอะฟลาทอกซิน ชนิด B1, B2, G1, G2 และ M1 .....3
ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุล coumarin ใน อะฟลาทอกซิน บี 1 .....4
ภาพที่ 3 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินความเข้มข้น 10 ng/g .....4
ภาพที่ 4 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....5
ภาพที่ 5 วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา (1) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (2) ถั่วลิสง (3) พริกไทยดำ .....9
ภาพที่ 6 การเตรียมตัวอย่างสำหรับกลุ่มตัวอย่างเลียนแบบการปนเปื้อน (Artificially contaminate sample).....10
ภาพที่ 7 (1) การวัดสเปกตรัมรูปแบบเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (2) ตำแหน่งการวัดการดูดกลืนแสงเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์.....11
ภาพที่ 8 การวัดสเปกตรัม (1) พริกไทย (2) ถั่วลิสง และ (3) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ผ่านการบด ด้วยเครื่องสเปกโทร สโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....11
ภาพที่ 9 การเตรียมโมเดล GF/C สำหรับวัดสเปกตรัม NIR ของตัวอย่างในระบบส่องผ่าน-สะท้อนกลับ (transflectance) .....12
ภาพที่ 10 การวัดสเปกตรัมสารสกัดอะฟลาทอกซินด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ .....13
ภาพที่ 11 การวัดสเปกตรัมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี 1 และสารสกัดอะฟลาทอกซินโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR) ด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....14
ภาพที่ 12 แผนผังรูปแบบการเตรียมตัวอย่างและการวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR สำหรับสร้างสมการทำนายและแยกกลุ่มพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1.....15
ภาพที่ 13 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 3 ตำแหน่ง.....16
ภาพที่ 14 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่างถั่วลิสง 3 ตำแหน่ง .....16
ภาพที่ 15 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่างพริกไทย 3 ตำแหน่ง.....17
ภาพที่ 16 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บด.....17
ภาพที่ 17 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดตัวอย่างถั่วลิสงบด.....18
ภาพที่ 18 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดตัวอย่างพริกไทยบด.....18
ภาพที่ 19 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดพริกไทยจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative.....22
ภาพที่ 20 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC.....22
ภาพที่ 21 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดถั่วลิสงจาก raw spectral.....23
ภาพที่ 22 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในพริกไทย เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization .....23
ภาพที่ 23 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดพริกไทยบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC.....24
ภาพที่ 24 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV .....24

ภาพที่ 25 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization .....25
ภาพที่ 26 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization .....25
ภาพที่ 27 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดพริกไทยจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative.....28
ภาพที่ 28 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC .....28
ภาพที่ 29 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดถั่วลิสงจาก raw spectral.....29
ภาพที่ 30 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ร่วมกับวิธี first derivative.....29
ภาพที่ 31 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดพริกไทยบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Straight line Subtraction .....30
ภาพที่ 32 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization.....30
ภาพที่ 33 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative.....31
ภาพที่ 34 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization .....31
ภาพที่ 35 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative.....33
ภาพที่ 36 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในสารสกัดที่ 1 จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative .....33
ภาพที่ 37 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในสารสกัดที่ 2 จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Straight line subtraction .....34
ภาพที่ 38 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในการเตรียมตัวอย่างแบบ DESIR: dry-extract system for infrared จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี snv ร่วมกับวิธี first derivative.....34

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการปลูกพืชผลทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก และเนื่องจากลักษณะภูมิประเทศตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรพวกเมล็ดพืชเช่น พริกไทย เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงภายหลังการเก็บเกี่ยว มักพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อมคุณภาพ เสื่อมคุณค่าทางโภชนาการ และเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งคนและสัตว์ อะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งที่อวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต ระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน แหล่งที่มาของสารพิษอะฟลาทอกซิน (Alflatoxin) โดยมากผลิตจากเชื้อราแอสเปอรจิลลัสฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) และแอสเปอรจิลลัส พาราซิติกัส (*Aspergillus parasiticus*)

ปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินถูกใช้เป็นเครื่องต่อรองราคาผลิตผลทางการเกษตรที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนทั้งในระดับการค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ การกำหนดค่าการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินของประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับข้อกำหนดของสหภาพยุโรปอนุญาตให้ปริมาณสูงสุดของสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B1 มีได้ไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร และ สารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B2 มีได้ไม่เกิน 4 ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร ในอาหารจำพวกถั่ว ผลไม้แห้ง และ ธัญพืช (Stroka และ Anklam, 2002)
ซึ่งในปัจจุบันวิธีที่ใช้สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในอาหารนั้นยังใช้เวลานาน ทำลายตัวอย่าง ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ทั้งหมด ราคาแพง มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี ทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับภาคอุตสาหกรรมและการเกษตรในการตรวจสอบการปนเปื้อนดังกล่าว Tripathi และ Mishra และ Mishra (2009) Ibrnandz และคณะ (2009) และ Gaspardo และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิค NIR ในการตรวจสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหาร เช่น พริกป่น, เมล็ดข้าวโพด, กากข้าวโพด, ข้าวบาเลย์ เป็นต้น ซึ่งพบว่าเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้มีความสามารถในการตรวจสอบการปนเปื้อนและสารพิษได้ และ Sirisomboon และคณะ (2013) ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษในข้าว ดังรายละเอียดในตารางที่ 2 ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ของเทคนิค NIR ในการติดตามปริมาณเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในพืชเศรษฐกิจของไทยเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะส่งผลต่อการควบคุมความปลอดภัยด้านอาหาร และการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบจะสามารถยกระดับและประกันคุณภาพให้แก่สินค้าเกษตรของประเทศ

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus spp.* และสารพิษอะฟลาทอกซินในพืชเศรษฐกิจของไทย ได้แก่ เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พริกไทย และถั่วลิสง

**1.3 สมมติฐานของการศึกษา**

เทคนิค near infrared spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิควิเคราะห์ตัวอย่างแบบไม่ทำลาย และรวดเร็วที่สามารถตรวจสอบองค์ประกอบภายในของตัวอย่างที่มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจนและไนโตรเจนได้ ดังนั้นน่าจะนำมาใช้วิเคราะห์อันตรายทางชีวภาพ การปนเปื้อนเชื้อราซึ่งมีองค์ประกอบของเซลเมมเบรนที่มีธาตุข้างต้นอยู่ และ นำมาใช้วิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในวัตถุดิบที่เลือกศึกษา เพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ และเคมีแบบปัจจุบันที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ราคาแพง และใช้เวลานาน

**1.4 ขอบเขตของการศึกษา**

1.4.1 วัตถุดิบที่เลือกศึกษาได้แก่ พริกไทย ถั่วลิสง และเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ซึ่งเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมอาหารเช่น อุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ (ไก่ ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากไก่) อุตสาหกรรมเครื่องเทศ ผงปรุงรส และถั่ว เป็นต้น และเป็นวัตถุดิบที่พบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ อะฟลาทอกซินสูงในระหว่างการเก็บรักษา

1.4.2 วิธีมาตรฐาน (reference method) ที่ใช้ในการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ วิธี direct plating และการใช้เครื่อง High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ตามลำดับ

1.4.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น NIR (800-2500 นาโนเมตร) ของตัวอย่างจะมีการควบคุมอุณหภูมิในเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้จริงในภาคอุตสาหกรรม

1.4.4 สร้างสมการทำนายปริมาณการปนเปื้อนเชื้อรา และสารพิษอะฟลาทอกซินในวัตถุดิบที่เลือกศึกษา โดยอาศัยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ (chemometrics) และตรวจสอบสมการโดยใช้ตัวอย่างจากภายนอก (external validation)

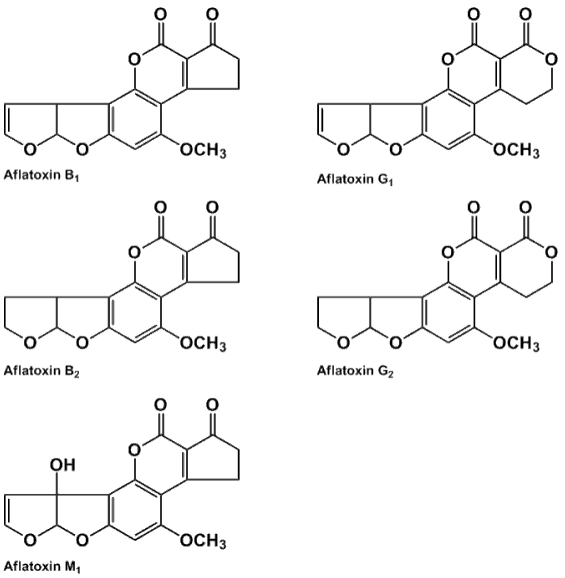
**1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้ข้อมูลที่เป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจสอบการปนเปื้อนของราและสารพิษอะฟลาทอกซินแบบไม่ทำลายตัวอย่างในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงโดยการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

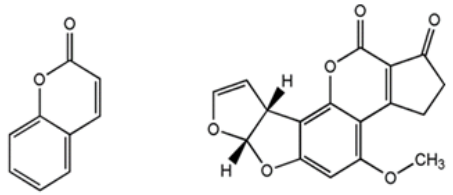
## 2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins) เป็นสารพิษที่สร้างมาจาก เชื้อราแอสเปอรจิลลัส ฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) และแอสเปอรจิลลัส พาราซิติกัส (*Aspergillus parasiticus*) ซึ่งมักพบอยู่ทั่วไปทั้งในอาหารมนุษย์ และอาหารสัตว์ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มักพบการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินได้แก่ พืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วลิสง อาหารแห้ง เช่น พริกแห้ง พริกป่น กุ้งแห้ง ผลไม้แห้ง สมุนไพรแห้ง เครื่องเทศ เป็นต้น เมล็ดพืชและธัญพืชต่างๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าว ข้าวโอ๊ต รวมถึงเมล็ดพืชที่ใช้สำหรับเป็นอาหารสัตว์ สารพิษอะฟลาทอกซิน ชนิดที่สำคัญได้แก่ B1 และ B2 ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 256-365 นาโนเมตร และชนิด G1 และ G2 มีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน ซึ่งชนิด B1 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงที่สุดรองลงมาคือ G1, B2 และ G2 ตามลำดับ สารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B1 ยังสามารถสลายตัวกลายเป็นชนิด M1 ได้อีกด้วย โครงสร้างทางเคมีของสารพิษอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ แสดงดังภาพที่ 1




ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารพิษอะฟลาทอกซิน ชนิด B1, B2, G1, G2 และ M1
ที่มา : http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070664.htm

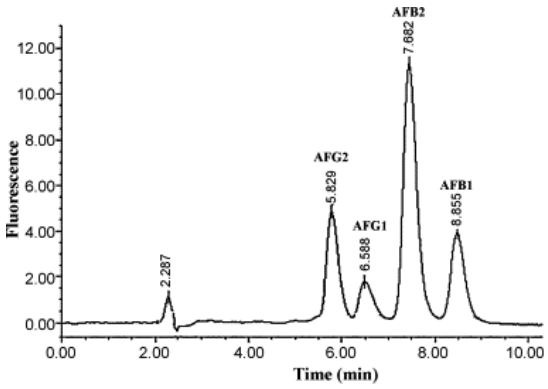
โครงสร้างที่สำคัญของ อะฟลาทอกซิน บี 1 ประกอบไปด้วย วงคูมาริน และวงอโรมาติก (Tripathi และ Mishra, 2009)




ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุล coumarin ใน อะฟลาทอกซิน บี 1
ที่มา: Guan และคณะ. (2008)

**การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซิน**

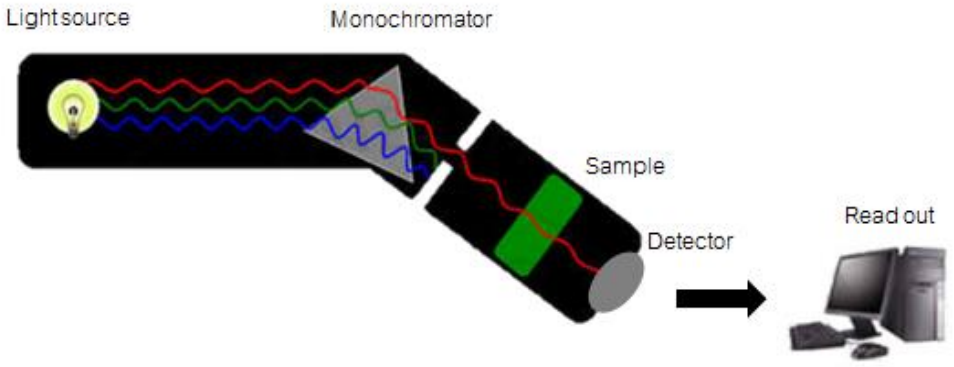
วิธีทั่วไปที่ใช้ในการตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินได้แก่ วิธีโครมาโตรกราฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography,TLC), วิธีโครมาโตรกราฟีเหลวความดันสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) และวิธีทางอิมมูโนวิทยา คือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Stroka and Anklam, 2002) วิธีต่างๆ เหล่านี้สามารถวิเคราะห์ได้ปริมาณละเอียดและแม่นยำ แต่มีข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง ขั้นตอนในการสกัดยุ่งยาก ใช้สารเคมี ต้องมีผู้วิเคราะห์ที่มีความชำนาญเฉพาะทางและมีประสบการณ์ และใช้เวลานานในการวิเคราะห์ การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ชนิด Fluorescence detector ด้วยคอลัมน์ C18 และใช้ mobile phase เป็น น้ำ:เมทานอล:อาซีโตไนไตรล์อัตราส่วน (60:20:20, v/v/v) วัดการดูดกลืนแสงที่ 365 nm (Ghali และคณะ, 2009) แสดงโครมาโตแกรม ดังภาพที่ 3




ภาพที่ 3 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินความเข้มข้น 10 ng/g
ที่มา: Ghali และคณะ. (2009)

**2.2 เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้**

เทคนิค NIRS เป็นเทคนิคที่อาศัยช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านใกล้ที่ช่วงความยาวคลื่น 700 ถึง 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) ระหว่าง 4000 ถึง 14300 $cm^{-1}$ (ตารางที่ 1) ในการวิเคราะห์โมเลกุลแบบไม่ทำลายตัวอย่าง (Schwanninger, 2009; Ellekjaer และคณะ, 1994) โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนในพันธะของโมเลกุลสารตัวอย่าง กล่าวคือ เมื่อฉายแสงในช่วงความยาวคลื่น NIR ลงไปบนตัวอย่าง แสงที่มีพลังงานเพียงพอจะถูกดูดกลืนและกระตุ้นให้เกิดการสั่นของโมเลกุลในหมู่ฟังก์ชันต่างๆ 2 ลักษณะคือ การยืดหด (stretching) และการเปลี่ยนมุม (blending) ที่ช่วงความถี่ overtones และ combination ของหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H, N-H และ O=H (Osborne และคณะ, 1993; Osborne, 2007; Nicolai และคณะ, 2007; Huang, Yu และ Ying, 2008; Ellekjaer และคณะ, 1994) ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักของสารอินทรีย์ โดยปริมาณพลังงานและช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะต่อหมู่ฟังก์ชันนั้นเพียงเท่านั้นที่จะทำให้เกิดการสั่นของพันธะของหมู่ฟังก์ชันด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิค NIRS สามารถวิเคราะห์สารประกอบที่มีหมู่ C, H, O และ N เป็นองค์ประกอบได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือ




ภาพที่ 4 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
ที่มา: Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 1 การแบ่งช่วงคลื่นย่านอินฟราเรด

| Region | Characteristic transitions | Wavelength range (nm) | Wavenumber range ($cm^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| Near-infrared (NIR) | Overtones, combination bands | 700 – 2500 | 14300 – 4000 |
| Mid-infrared (MIR) | Fundamental vibrations | 250 – 25000 | 4000 – 400 |
| Far-infrared (FIR) | Rotations | 25000 - 1000000 | 400 - 10 |

ที่มา: Schwanninger (2009)

ขั้นตอนในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIRS ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ การสร้างข้อมูลสเปกตรัมโดยนำตัวอย่างไปทำการวัดในช่วงคลื่น NIR และการสร้างข้อมูลทางเคมีโดยนำตัวอย่างบริเวณที่ผ่านการวัด NIRS ไปทำการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อได้ข้อมูลครบแล้วจึงนำไปหาความสัมพันธ์เพื่อสร้างเป็นสมการทำนายค่า (Calibration model) ด้วยวิธีทางสถิติ จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของสมการทำนายที่ได้ (Validation) และทำการทำนายค่า (Prediction) ต่อไป

ความสามารถและประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจสอบการเปื้อนของรา และสารพิษที่สร้างจากเชื้อราในอาหารนั้นแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การใช้เทคนิค NIR ในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษอะฟลาทอกซิน

| ตัวอย่างที่ศึกษา | ปัจจัยที่ศึกษา | ความยาวคลื่น | เทคนิคที่ใช้ | ค่า R, $R^2$(Cal) | ค่า RMSECV | ค่า RMSEP, SEP | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| รากโสมอบแห้ง | ปริมาณความชื้น | 1100-2500 nm | PLS | $R^2$ = 0.998 | RMSECV = 0.08 | RMSEP = 0.140 | Guixing ren และ Feng chen (1996) |
| ข้าว | ปริมาณเชื้อราทั้งหมด | 950-1650 nm | PLS | R = 0.668 | - | SEP = 28.874% | Sirisomboon และคณะ (2013) |
| ข้าว | Yellow-green *Aspergillus* | 950-1650 nm | PLS | R = 0.437 | - | SEP = 18.72% | Sirisomboon และคณะ (2013) |
| มะเดื่อ | เชื้อรา,อะฟลาทอกซิน | 780–2500 nm | Mahalanobis distance | accuracy 100% | - | - | Durmuş และคณะ (2016) |
| อัลมอนด์ | เชื้อรา | 400-2500 nm | canonical classifier | accuracy 99% | - | - | Liang และคณะ (2015) |
| พริกผง | อะฟลาทอกซิน | 1100-2000nm | MPLS | R = 0.955 | - | 0.2 ppb | Hernández-Hierro และคณะ (2008) |
| พริกผง | อะฟลาทอกซิน บี 1 | 400-2500 nm | PLS | $R^2$ = 0.967 | RMSECV = 0.654% | - | Mishra และ Tripathi (2009) |
| ข้าวโพด | อะฟลาทอกซิน บี 1 | 400-2500 nm | SNVD | $R^2$ = 0.80 | RMSECV = 0.211 ppb | - | Ibanandez และคณะ (2009) |
| ข้าวบาเลย์ | อะฟลาทอกซิน บี 1 | 400-2500 nm | SNVD | $R^2$ = 0.85 | RMSECV = 0.176 ppb | - | banandez และคณะ (2009) |

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัตถุดิบ

(1) (2) (3)

ภาพที่ 5 วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา (1) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (2) ถั่วลิสง (3) พริกไทยดำ

วัตถุดิบที่เลือกศึกษาได้แก่

3.1.1 เมล็ดข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษาคือข้าวโพดพันธุ์แปซิฟิค จากจังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 เมล็ดถั่วลิสงที่ใช้ในการศึกษาจาก บริษัท ไร่ธัญญะ จำกัด

3.1.3 พริกไทยดำที่ใช้ในการศึกษาจาก บริษัท ไร่ทิพย์ บริษัท ไร่ธัญญะ จำกัด

## 3.2 สารเคมี

3.2.1 สารมาตรฐาน อะฟลาทอกซิน B1

3.2.2 เมทานอล

3.2.3 อาซีโตไนไตรล์

3.2.4 เชื้อราแอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส (*Aspergillus flavus*)

3.2.5 น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water)

## 3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (FT-NIR Spectrometer) (MPA, Bruker, Germany)

3.3.2 ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)

3.3.3 เครื่องปั่นอเนกประสงค์ (HR2115, Philip Electronic, Thailand)

3.3.4 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบตัวเลข แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance KERN& Sohn GmbH, Balingen, Germany)

3.3.5 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบตัวเลข แบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance รุ่น BP 221S, Sartorius, Germany)

3.3.6 เครื่อง Ultrasonic (360D, Advance Ceramics Technology, Malaysia)

3.3.7 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu Corporation, Japan)

3.3.8 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (stomacher)

**3.4 วิธีการทดลอง**

3.4.1 **<u>ตอนที่ 1</u>** การศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราและปริมาณความชื้นในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงด้วยเทคนิค NIRS

3.4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างจากวัตถุดิบทั้ง 3 กลุ่ม (ภาพที่ 5) โดยคัดแยกด้วยตา คัดเลือกตัวอย่างที่เต็มเมล็ด ปราศจากเมล็ดเสีย และ/หรือคัดแยกเมล็ดที่เปลี่ยนสภาพไปจากปกติเช่น เมล็ดงอก เมล็ดเน่า เมล็ดไหม้ เมล็ดเสียจากเชื้อรา เมล็ดมอดเจาะ เมล็ดถูกแมลงศัตรูพืชอื่นๆทำลาย รวมทั้งเมล็ดที่มีสี หรือกลิ่นผิดปกติ หลังจากนั้นตัวอย่างพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงจำนวนตัวอย่างละ 50 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในการทดลองตัวอย่างจะถูกแบ่งการเตรียมเป็น 3 รูปแบบประกอบด้วย ส่วนที่หนึ่งจะถูกแบ่งมาสร้างกลุ่มตัวอย่างเลียนแบบการปนเปื้อน (Artificially contaminated sample) โดยการปิเปต 2 มิลลิลิตร ของสารละลายเชื้อ *Aspergillus flavus* (Thailand Bioresource Research Center, ปทุมธานี, ประเทศไทย) ที่ระดับความเข้มข้น $10^1$-$10^5$ cfu/ mL 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เติมลงในตัวอย่าง ส่วนที่สองปิเปต 2 มิลลิลิตร 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์เติมลงในตัวอย่าง และส่วนที่สามตัวอย่างจากการปนเปื้อนตามธรรมชาติ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 10 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะ เพื่อสร้างการปนเปื้อนของเชื้อราเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ แสดงการเตรียมตัวอย่างในภาพที่ 6

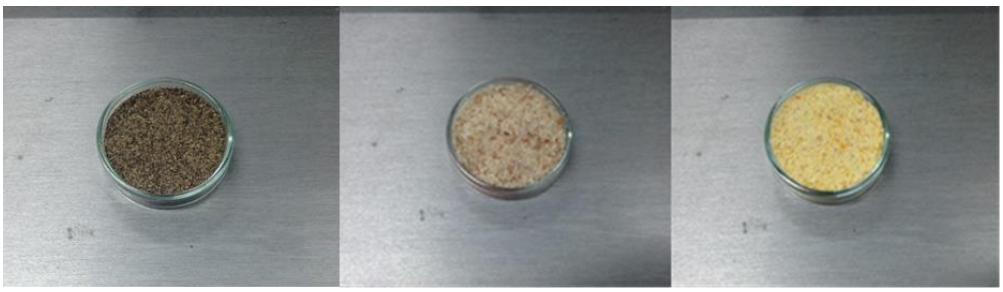
ภาพที่ 6 การเตรียมตัวอย่างสำหรับกลุ่มตัวอย่างเลียนแบบการปนเปื้อน (Artificially contaminate sample)

3.4.1.2 ขั้นตอนการวัดสเปกตรัมจากพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง

นำตัวอย่างที่เลือกศึกษาทั้งสามชนิดที่มีการปนเปื้อนจากธรรมชาติ และเลียนแบบการปนเปื้อนมาวัดค่าการดูดกลืนแสง 2 รูปแบบคือ 1. รูปแบบกลุ่มเมล็ด (batch) และ 2. ตัวอย่างบด วัดในช่วงคลื่น NIR ที่ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตรหรือ 12500-4000 $cm^{-1}$ ด้วยเครื่อง FT-NIR รุ่น MPA (Bruker, Germany) ในระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ โดยควบคุมให้ปริมาณ ความหนาแน่นและอุณหภูมิของตัวอย่างคงที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัวอย่างแบบเมล็ดจะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ตำแหน่ง โดยการหมุนขวดรูปชมพู่ทำมุม 120 องศา ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละตำแหน่งจะได้จากการวัดมีค่าความละเอียด (resolution) เทากับ 16 $cm^{-1}$ และจำนวนครั้งของการสแกนตัวอย่าง (scan time) เท่ากับ 32 ครั้ง จากนั้นค่าการดูดกลืนแสง 3 ตำแหน่งจะนำไปเฉลี่ยเป็นค่าการดูดกลืนแสงของ 1 ตัวอย่างแสดงการวัดสเปกตรัมรูปแบบเมล็ดในภาพที่ 7 หลังจากนั้นนำ

ตัวอย่างมาบดด้วยเครื่องปั่นอเนกประสงค์ (HR2115, Philip Electronic, Thailand) แล้วร่อนผ่านตะแกรงเพื่อควบคุมอนุภาคให้อยู่ระหว่าง 0.5 – 1.18 ไมโครเมตร นำตัวอย่างที่ผ่านการบดบรรจุลงในจานใส่ตัวอย่าง (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ตัวอย่างหนา 0.8 เซนติเมตร ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยสภาวะเช่นเดียวกับการวัดรูปแบบเมล็ดแสดงการวัดสเปกตรัมรูปแบบตัวอย่างบดในภาพที่ 8

ภาพที่ 7 (1) การวัดสเปกตรัมรูปแบบเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (2) ตำแหน่งการวัดการดูดกลืนแสงเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์



(1) (2) (3)

ภาพที่ 8 การวัดสเปกตรัม (1) พริกไทย (2) ถั่วลิสง และ (3) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ผ่านการบด ด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

3.4.1.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อราและความชื้นในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง

เมื่อตัวอย่างผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วจะนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อราทั้งหมด และปริมาณความชื้น โดยนำพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง (แบบบด) หลังจากวัด NIR มาชั่งน้ำหนัก 5 กรัม ผสมกับ 0.85% NaCl 45 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีบดผสมตัวอย่าง เป็นเวลา 3 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) โดยใช้เทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน และหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างโดยใช้วิธีอบลมร้อน (ดูภาคผนวก ก)

3.4.1.4 ขั้นตอนการสร้างสมการทำนาย

เมื่อตัวอย่างผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราในข้อ 3.3.1.3 บันทึกไว้เป็นส่วนของค่ามาตรฐาน ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ หรือค่าสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง FT-NIR จะถูกนำไปทำการปรับแต่งให้เหมาะสมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ เช่นการปรับเรียบ หรือการทำอนุพันธ์หนึ่งและอันดับสอง เป็นต้น จากนั้นข้อมูลทั้ง 2 ชุด (ค่าสเปกตรัมและค่าทางเคมี) จะถูกนำไปหาความสัมพันธ์กัน สมการทำนายปริมาณ PLS โดยใช้โปรแกรม OPUS (Bruker Optics, Germany) สมการทำนายตรวจสอบ (external validation) และสมการทำนายปริมาณที่ได้จะใช้เป็นสมการพื้นฐานในการตรวจสอบ (prediction)

3.4.2 **ตอนที่ 2** การศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบของอะฟลาทอกซิน B1 ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงด้วยเทคนิค NIRS

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

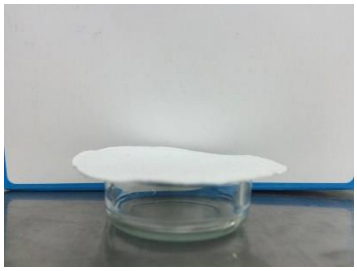
การเตรียมตัวอย่างพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงเพื่อให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน บี 1แบ่งการเตรียมตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 เป็นการปนเปื้อนตามธรรมชาติ โดยบดพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงจากวัตถุดิบในภาพที่ 5 ให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาดอนุภาคให้อยู่ระหว่าง 0.5 – 1.18 ไมโครเมตรเพื่อควบคุมขนาดอนุภาคจำนวนตัวอย่างชนิดละ 6 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 เป็นการเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี 1 โดยการบดพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาดอนุภาคให้อยู่ระหว่าง 0.5 – 1.18 ไมโครเมตร ชั่งตัวอย่างลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด 5 กรัม เติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี 1 ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักสด นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ความเร็วระดับ 9 นาน 3 นาที (ทำ 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะความเข้มข้น) จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 81 ตัวอย่าง แสดงรายละเอียดจำนวนตัวอย่างของทั้งสองกลุ่มดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชุดการทดลองของการวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค NIRS

| ลำดับ | ชุดการทดลอง | จำนวนตัวอย่าง |
|---|---|---|
| 1 | ตัวอย่างพริกไทยข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน B1 ตามธรรมชาติ | 18 |
| 2 | ตัวอย่างพริกไทยข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B1 | 63 |
| | | 81 |

3.4.2.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการสร้างแบบจำลองทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินโดยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR)

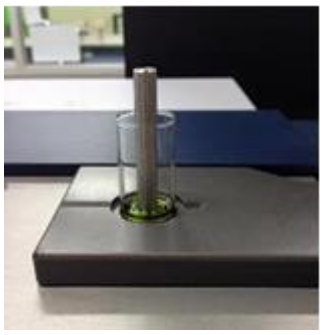
เตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 mg/kg โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำกระดาษกรอง glass micro fiber (GF/C) เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.7 มิลลิเมตร วางบน petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 มิลลิเมตร หยดสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน 1 มิลลิลิตร ลงบน glass micro fiber (GF/C) ทำให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงดังแสดงในภาพที่ 9



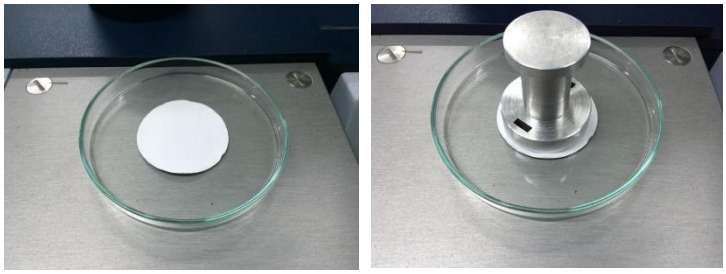
ภาพที่ 9 การเตรียมโมเดล GF/C สำหรับวัดสเปกตรัม NIR ของตัวอย่างในระบบส่องผ่าน-สะท้อนกลับ (transflectance)

3.4.2.3 ขั้นตอนการวัดสเปกตรัมจากพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง, สารสกัด และ glass micro fiber (GF/C)

วัดค่าการดูดกลืนในช่วงคลื่น NIR ที่ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตรหรือ 12500-4000 $cm^{-1}$ ด้วยเครื่อง FT-NIR รุ่น MPA (Bruker, Germany) โดยนำตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 3.3.2.1 ทั้งสองชนิดที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน B1 จากธรรมชาติและการเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B1 ที่ผ่านการบดบรรจุลงในจานใส่ตัวอย่าง (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร นำไปวัดในระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ ดังแสดงในภาพที่ 8 และตัวอย่างที่เตรียมด้วยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR) ในข้อ 3.3.2.2 ดังแสดงในภาพที่ 9 และสารสกัดที่ได้จากวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในข้อ 3.3.2.4 วัดในระบบการวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนกลับ แสดงในภาพที่ 10 โดยควบคุมให้ปริมาณ ความหนาแน่นและอุณหภูมิของตัวอย่างคงที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงได้จากการวัดมีค่าความละเอียด (resolution) เท่ากับ 16 $cm^{-1}$ และ จำนวนครั้งของการสแกนตัวอย่าง (scan time) เท่ากับ 32 ครั้ง



ภาพที่ 10 การวัดสเปกตรัมสารสกัดอะฟลาทอกซินด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้



ภาพที่ 11 การวัดสเปกตรัมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี 1 และสารสกัดอะฟลาทอกซินโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR) ด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

3.4.2.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B1 ความเข้มข้น 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เมทานอลสำหรับปรับปริมาตรสารมาตรฐาน

2. นำตัวอย่างหลังจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR มาชั่งน้ำหนัก 5 กรัม ใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง

3. เติมเมทานอล 80 % ปริมาตร 20 มิลลิลิตร vortex ที่ความเร็วระดับ 9 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

4. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำ (deionized water, DI) 20 มิลลิลิตร ผสมกันอีกครั้งด้วย vortex ที่ความเร็วระดับ 9 จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที แล้วกรองผ่าน glass micro fiber (GF/C) (สารสกัดที่ 1) แบ่งสารละลายสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR วัดในระบบการวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนกลับ แสดงในภาพที่ 10

5. ดูดสารละลายเจือจางในข้อ 4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตรใส่ใน disposable syringe ที่ต่อเข้ากับ immunoaffinity column เพื่อขจัดสารรบกวน และล้างด้วยน้ำ DI 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

6. เติมเมทานอล HPLC (grade) ปริมาตรลงใน column เพื่อชะ อะฟลาทอกซิน ออกจาก column เก็บสารละลายที่ชะออกมาใส่ในหลอดปรับปริมาตร (สารสกัดที่ 2)

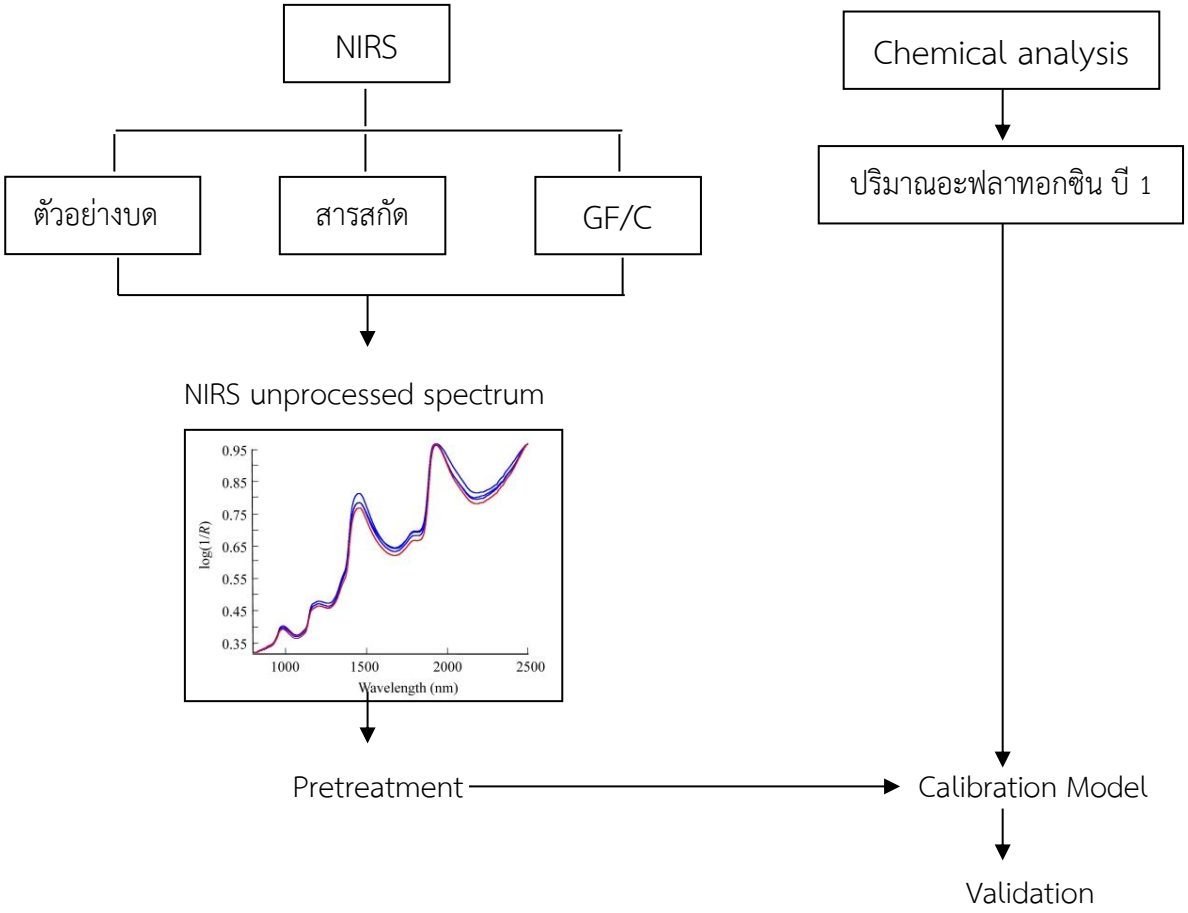
7. แบ่งสารสกัดตัวอย่างออกเป็น 3 ส่วนคือ สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR โดยวัด glass micro fiber (GF/C) เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค dry-extract system for infrared (DESIR) (ดูหัวข้อ 3.3.2.3) และส่วนที่สองสำหรับการวัดปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค HPLC และส่วนที่ 3 วัดในระบบการวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนกลับ แสดงในภาพที่ 10

9. กรองสารสกัดตัวอย่าง HPLC ผ่าน Nylon Syringe Filter Pore ขนาด 0.45 ไมครอน

10.ฉีดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร Column C18 column รุ่น ODS-3 ขนาด 5 um 4.6×250 mm อุณหภูมิของคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ใช้ น้ำ:เมทานอล:อาซีโตไนไตรล์ อัตราส่วน 3:1:1 เป็น Mobile phase อัตราการไหลของ Mobile phase: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีระบบการชะแบบ isocratic

3.4.2.5 ขั้นตอนการสร้างสมการทำนาย

เมื่อตัวอย่างผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ในข้อ 3.4.1.4 บันทึกไว้เป็นส่วนของค่ามาตรฐาน ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ หรือค่าสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง FT-NIR จะถูกนำไปทำการปรับแต่งให้เหมาะสมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ เช่นการปรับเรียบ หรือการทำอนุพันธ์หนึ่งและอันดับสอง เป็นต้น สร้างสมการทำนายปริมาณด้วยเทคนิค PLS โดยใช้โปรแกรม OPUS (Bruker Optics, Germany) สมการทำนายตรวจสอบ (external validation) และสมการทำนายปริมาณที่ได้จะใช้เป็นสมการพื้นฐานในการตรวจสอบ (prediction) แสดงแผนผังการสร้างสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ดังภาพที่ 12



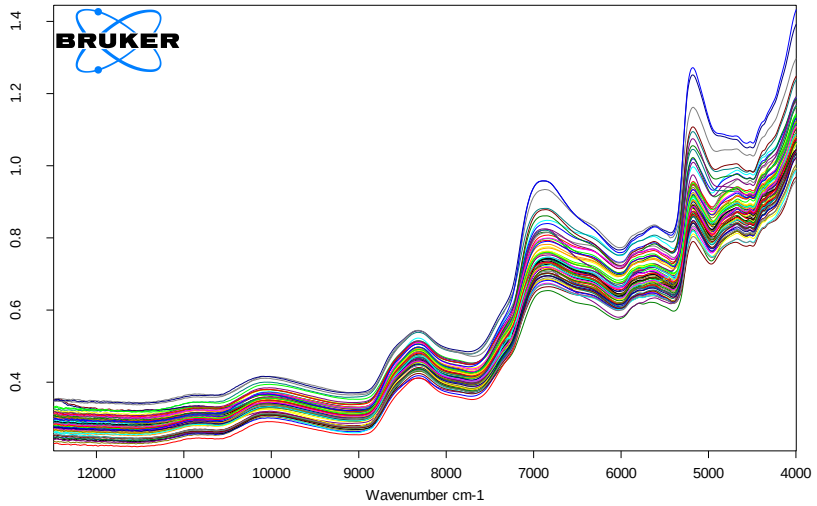

ภาพที่ 12 แผนผังรูปแบบการเตรียมตัวอย่างและการวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR สำหรับสร้างสมการทำนายและแยกกลุ่มพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1

**บทที่ 4**

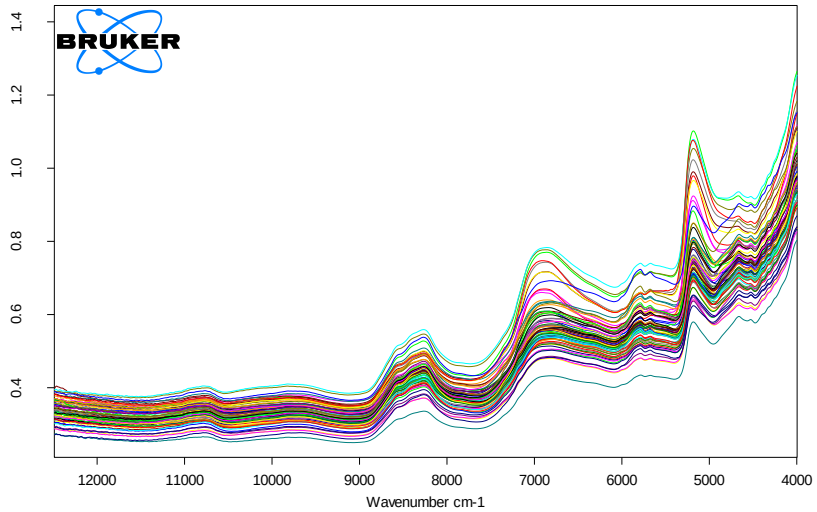
## ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

### 4.1 เส้นสเปกตรัมของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง

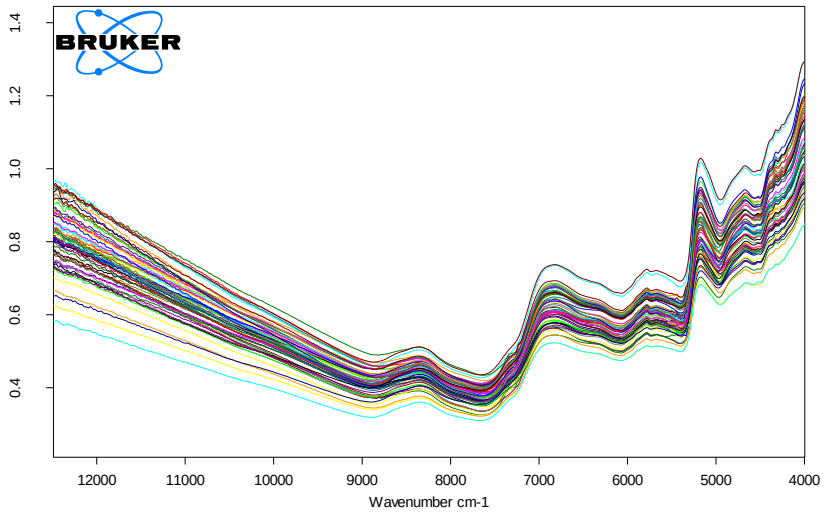
เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงการวัดตัวอย่าง 3 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 13-15




ภาพที่ 13 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 3 ตำแหน่ง

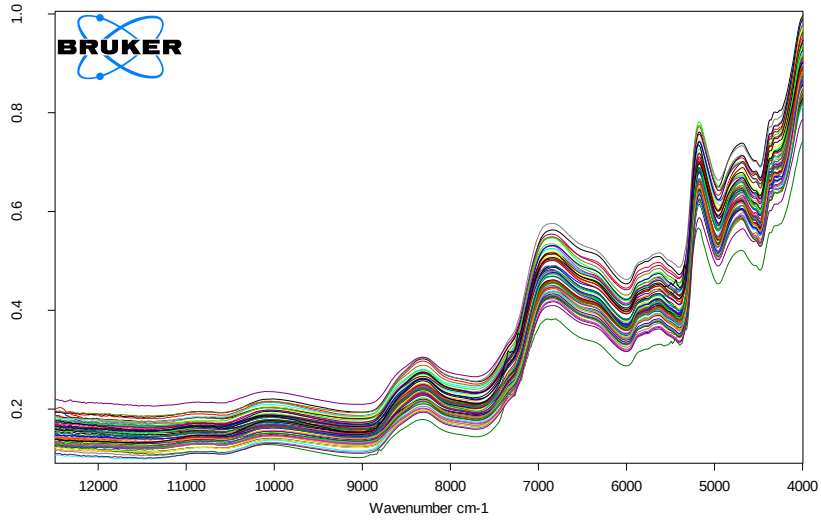



ภาพที่ 14 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่างถั่วลิสง 3 ตำแหน่ง

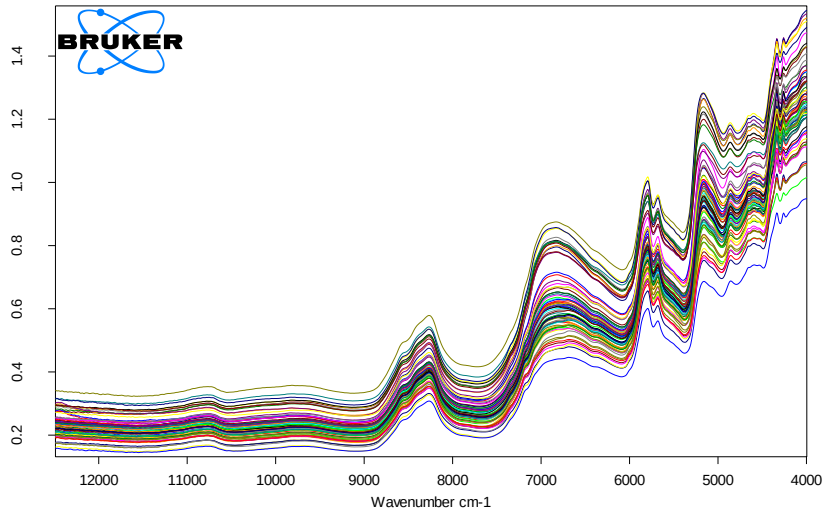



ภาพที่ 15 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากการวัดตัวอย่างพริกไทย 3 ตำแหน่ง

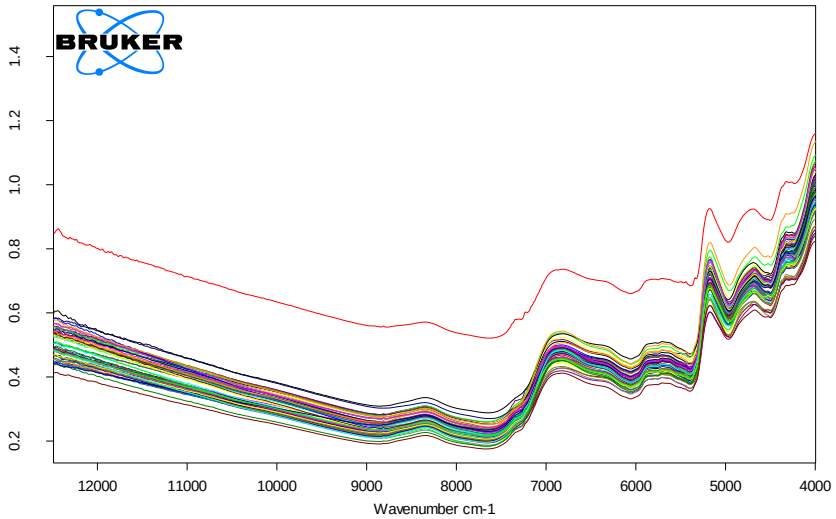
เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และถั่วลิสงบดแสดงดังภาพที่ 16-18




ภาพที่ 16 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บด




ภาพที่ 17 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดตัวอย่างถั่วลิสงบด




ภาพที่ 18 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดตัวอย่างพริกไทยบด

สเปกตรัมที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด พริกไทย และถั่วลิสง ทั้งแบบเมล็ดและแบบบด วัดด้วยเครื่อง NIRS โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร โดยเป็นสเปกตรัมที่ยังไม่ผ่านการปรับแต่ง สเปกตรัมมีความคล้ายคลึงกัน แต่แยกออกจากกันชัดเจนทุกช่วงความยาวคลื่น

จากภาพที่ 13-18 คือสเปกตรัมจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ดข้าวโพด จะเห็นว่าลักษณะสเปกตรัม มีแถบการดูดกลืนค่อนข้างกว้าง (broad band) และมีการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมตามแนวแกน Y (baseline shift effect) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาการกระเจิงแสงจากตัวอย่างที่เป็นของแข็งที่มีขนาดไม่สม่ำเสมอกัน

อย่างไรก็ตามก่อนการนำเส้นสเปกตรัมไปสร้างสมการทำนายค่าทางเคมีที่สนใจ จะต้องมีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัมเพื่อลดอิทธิพลที่เกิดจากปัจจัยดังกล่าว

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์อันดับสองเพื่อลดการซ้อนทับกัน ทำให้พีคแยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยจะพบพีคการดูดกลืนของน้ำได้ชัดเจนที่สุดเพราะน้ำเกิด weak band ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่ดูดกลืนแสงที่มีประสิทธิภาพมาก จะดูดกลืนที่เลขคลื่น 5253 $cm^{-1}$ เป็น O-H first overtone และ พบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 4482 $cm^{-1}$ เป็น N-H first overtone ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของไคทินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Osborne และคณะ, 1993)

## 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อราทั้งหมด ปริมาณความชื้น ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ใน พริกไทย ข้าวโพด เลี้ยงสัตว์และถั่วลิสง

จากตัวอย่างพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงที่ใช้ในการศึกษา แสดงค่าสถิติจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีเมล็ดข้าวโพด ได้แก่ปริมาณความชื้น ปริมาณเชื้อราทั้งหมด (Total Plate count) และปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 แสดงดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4 ค่าทางสถิติของปริมาณความชื้น ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง

| ตัวอย่าง | ต่ำสุด – สูงสุด (%) | ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%) |
|---|---|---|
| พริกไทย | 8.74 – 15.64 | 11.93 ± 1.58 |
| ข้าวโพด | 8.99 – 18.00 | 13.09 ± 2.29 |
| ถั่วลิสง | 2.55 – 11.95 | 6.16 ± 2.30 |
| พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง | 2.55 – 18.00 | 10.74 ± 3.78 |

ตารางที่ 5 ค่าทางสถิติของปริมาณเชื้อราทั้งหมด ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง

| ตัวอย่าง | ต่ำสุด – สูงสุด (cfu/g) | ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (cfu/g) |
|---|---|---|
| พริกไทย | $0 – 2.0x10^4$ | $1.7x10^3 \pm 3.8x10^2$ |
| ข้าวโพด | $0 – 2.7x10^4$ | $4.7x10^3 \pm 4.6x10^3$ |
| ถั่วลิสง | $0 – 9.5x10^4$ | $1.0 x10^4 \pm 2.0x10^4$ |
| พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง | $0 – 9.5x10^4$ | $5.1x10^2 \pm 1.2x10^4$ |

ตารางที่ 6 ค่าทางสถิติของปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง

| ตัวอย่าง | ต่ำสุด – สูงสุด (ppm) | ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ppm) |
|---|---|---|
| พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง | 0-0.28 | 0.07 ±0.07 |

**4.3 การสร้างสมการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)**

**4.3.1 การสร้างสมการทำนายปริมาณความชื้นด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR) ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง**

จากการนำพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงที่แบบเมล็ดและแบบบดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR สเปกตรัมที่ได้จากการวัดการดูดกลืนในช่วงอินฟราเรดจะมีลักษณะการทับเหลื่อมซ้อนกัน (overlaping) อีกทั้งยังมีอิทธิพลของปัจจัยอื่นๆเช่น การกระเจิงแสง อุณหภูมิ ความชื้น ที่มีผลทำให้ลักษณะการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมแตกต่างกัน โดยลักษณะสเปกตรัมที่เกิดขึ้นเช่น การเลื่อนตัวขึ้นของสเปกตรัมตามแนวแกน y หรือ การดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่นที่เพิ่มขึ้น (multiplicative scattering) ดังนั้นก่อนการนำสเปกตรัมมาสร้างสมการทำนายปริมาณความชื้น จึงต้องมีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัม โดยการพิจารณาวิธีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัมที่เหมาะสมคือ เมื่อสร้างสมการทำนายปริมาณความชื้นด้วยเทคนิค PLS สมการที่ให้ค่า $R^2$ และ RPD สูง และให้ค่า RMSECV ต่ำ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 7-8 โดยพบว่าจากการศึกษาการสร้างสมการทำนายปริมาณความชื้นด้วยเทคนิค NIR สามารถใช้ทำนายปริมาณความชื้นได้ดีทั้งการเตรียมตัวอย่างแบบเมล็ดและเตรียมตัวอย่างแบบบด เนื่องจากให้ค่า $R^2$ มากกว่า 0.90 และมี RMSECV ต่ำ ซึ่ง Williams (2007) ได้อธิบายค่า $R^2$ ไว้ว่า $R^2$ ในช่วง 0.83-0.90 สามารถใช้ในการทำนายเพื่องานวิจัยได้ โดยช่วงการดูดกลืนแสงที่ใช้ในการสร้างสมการทำนายความชื้นของ พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงอยู่ในช่วง 9403.8 – 7498.8 $cm^{-1}$ และ 5454.1-4597.8 $cm^{-1}$ แต่จะพบว่าการเตรียมตัวอย่างแบบบดจะให้ค่าทางสถิติที่ดีกว่า เนื่องมาจากลดอิทธิพลเนื่องมาจากขนาดของอนุภาค อย่างไรก็ตามการนำสมการทำนายปริมาณความชื้นไปประยุกต์ใช้ขึ้นอยู่กับการเกณฑ์ยอมรับความผิดพลาดของแต่ละงาน

ตารางที่ 7 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณความชื้นของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และ ถั่วลิสงแบบเมล็ดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

| ตัวอย่าง | วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม | จำนวนตัวแปร | สมการเทียบมาตรฐาน | | สมการทวนสอบ | | | RPD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $R^2$ | RMSEC (%wet basis) | $R^2$ | RMSECV (%wet basis) | Bias | |
| พริกไทย | $1^{st}$+ MSC | 1 | 0.90 | 0.463 | 0.90 | 0.482 | 0.00 | 3.12 |
| ข้าวโพด | MSC | 9 | 0.94 | 0.585 | 0.93 | 0.581 | -0.09 | 3.74 |
| ถั่วลิสง | Raw spectra | 9 | 0.97 | 0.394 | 0.95 | 0.479 | 0.00 | 4.62 |
| รวม 3 ชนิด | Min-Max Normalization | 10 | 0.98 | 0.556 | 0.97 | 0.607 | 0.00 | 6.03 |

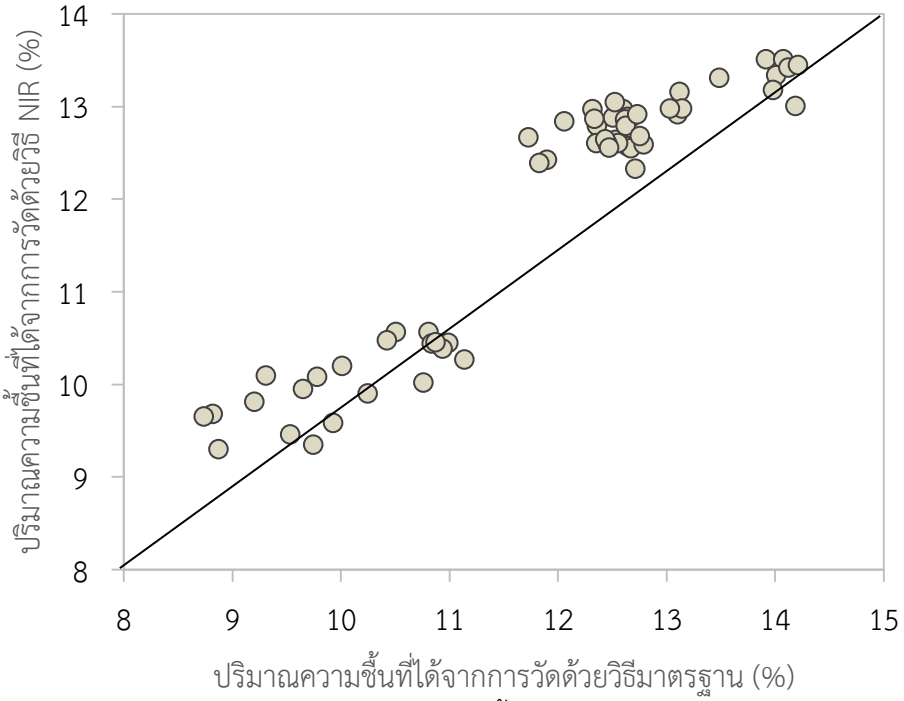
หมายเหตุ: $R^2$: coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate

ตารางที่ 8 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณความชื้นของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และ ถั่วลิสงแบบบดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

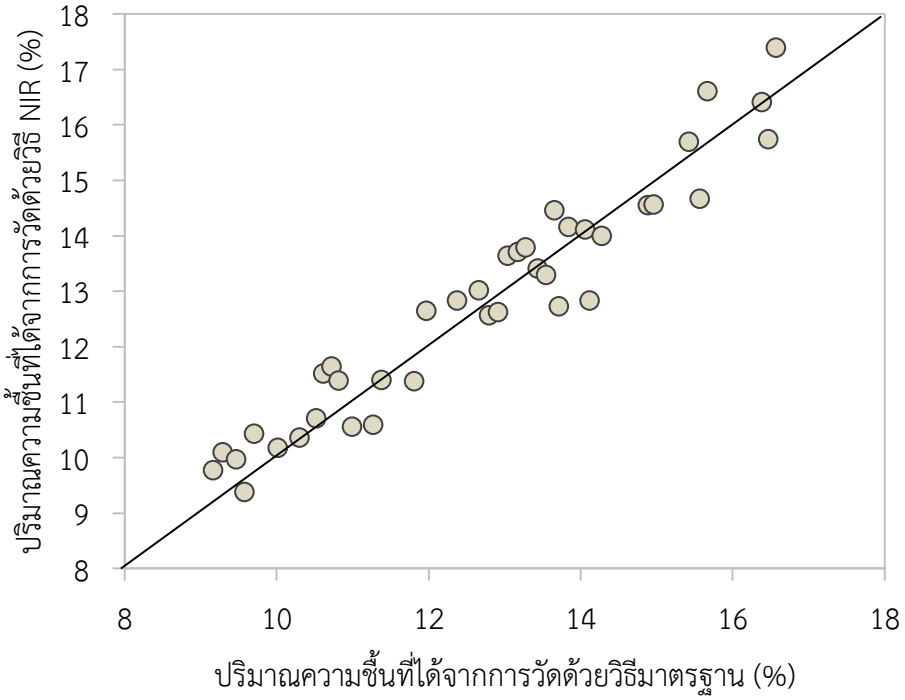
| ตัวอย่าง | วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม | จำนวนตัวแปร | สมการเทียบมาตรฐาน | | สมการทวนสอบ | | | RPD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $R^2$ | RMSEC (%wet basis) | $R^2$ | RMSECV (%wet basis) | Bias | |
| พริกไทย | MSC | 9 | 0.98 | 0.211 | 0.93 | 0.399 | 0.03 | 3.78 |
| ข้าวโพด | SNV | 7 | 0.95 | 0.510 | 0.94 | 0.555 | 0.00 | 4.01 |
| ถั่วลิสง | Min-Max Normalization | 5 | 0.97 | 0.422 | 0.95 | 0.390 | 0.01 | 4.66 |
| รวม 3 ชนิด | Min-Max Normalization | 10 | 0.98 | 0.49 | 0.98 | 0.521 | 0.00 | 6.87 |

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแสดงใน ภาพที่ 19-26 จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line และกระจายเข้าใกล้เส้น target line

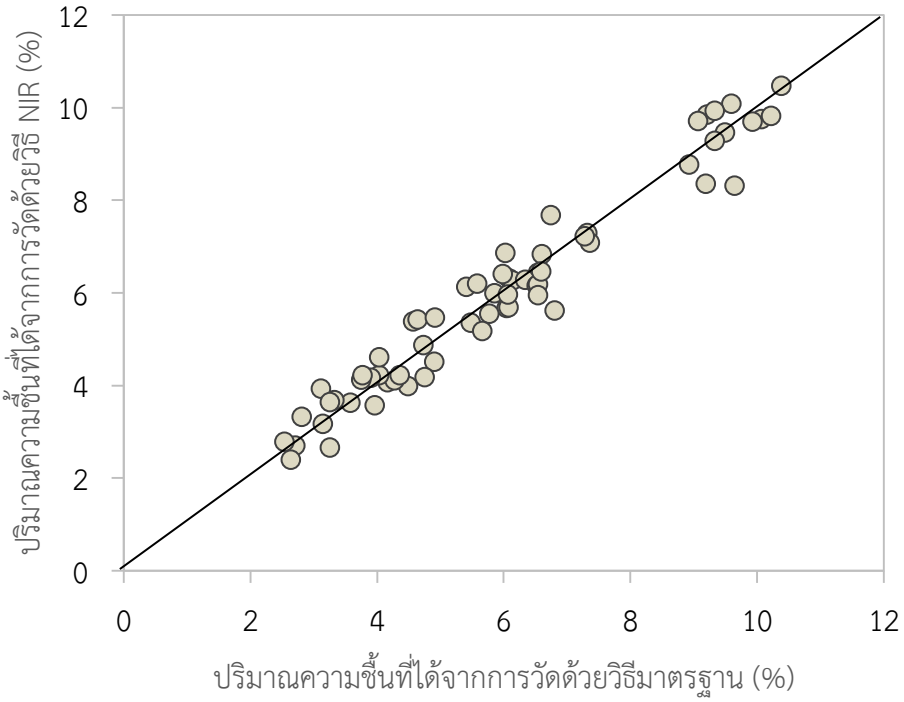
ภาพที่ 20 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในข้าวโพดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC



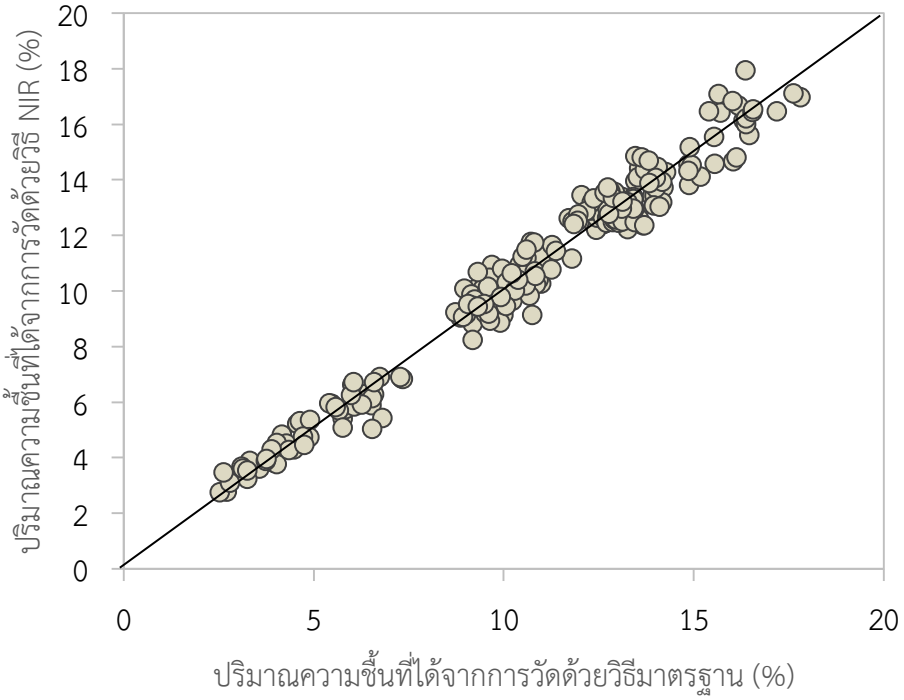

ภาพที่ 19 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดพริกไทยจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative



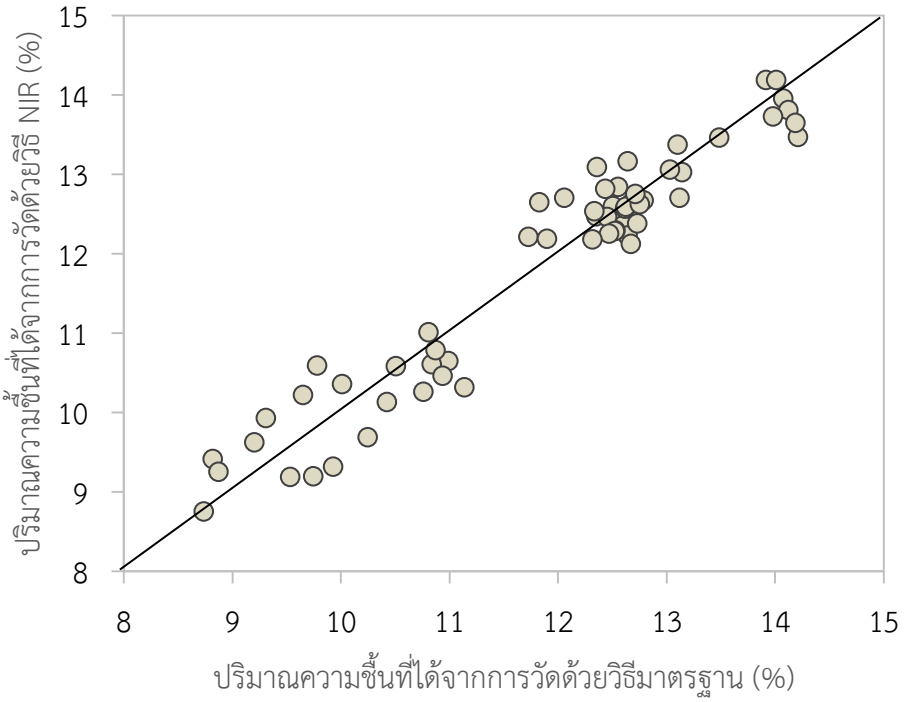

ภาพที่ 20 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC



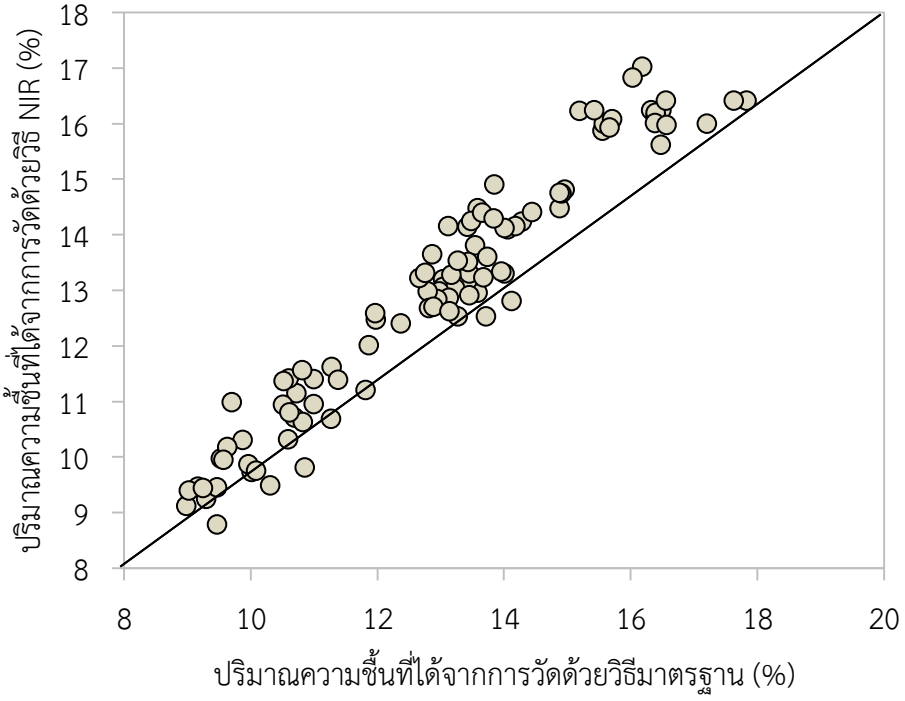

ภาพที่ 21 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดถั่วลิสงจาก raw spectral



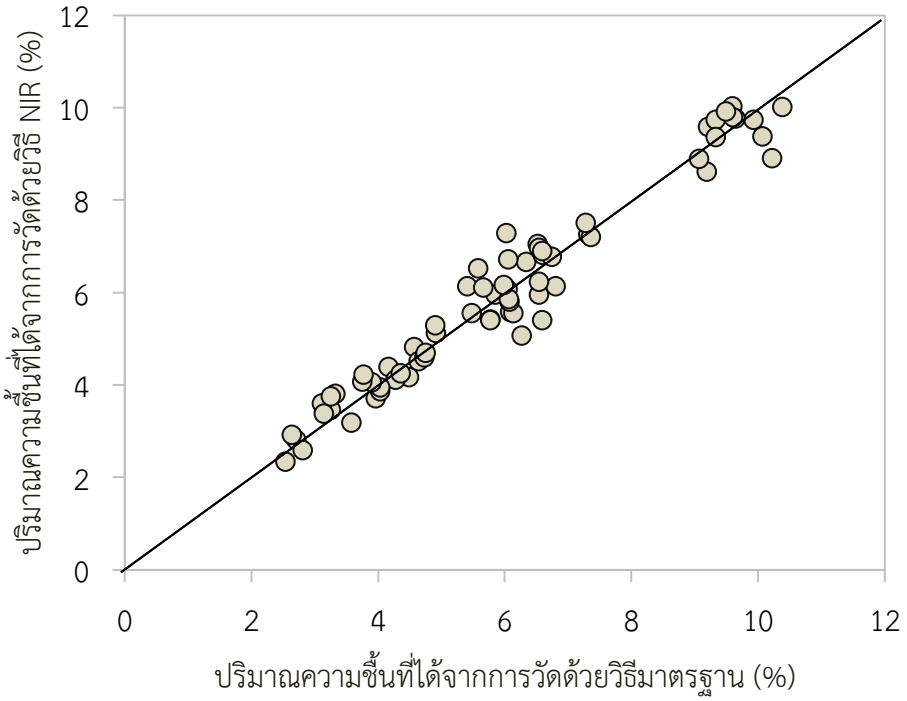

ภาพที่ 22 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในพริกไทย เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ เมล็ดถั่วลิสงจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization



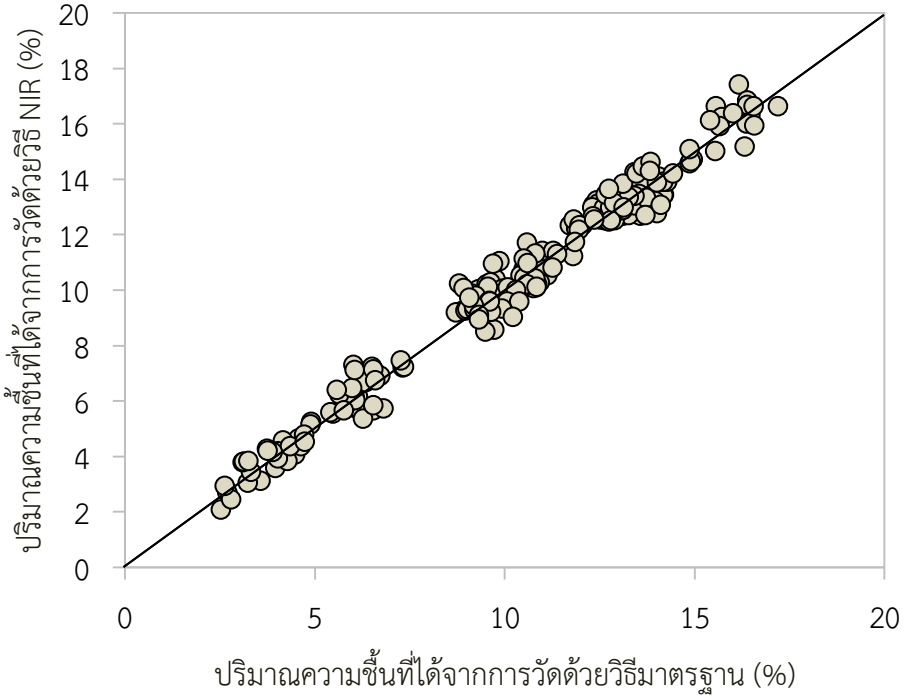

ภาพที่ 23 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดพริกไทยบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC




ภาพที่ 24 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV




ภาพที่ 25 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization




ภาพที่ 26 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงบด จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization

**4.3.2 การสร้างสมการทำนายปริมาณเชื้อราทั้งหมดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR) ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง**

เมื่อนำตัวอย่างพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงที่มีปริมาณเชื้อแตกต่างกัน จากการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 รูปแบบมาสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLS เพื่อทำนายปริมาณเชื้อราพบว่าสมการทำนายปริมาณเชื้อราด้วยเทคนิค NIR ไม่สามารถทำนายได้ เนื่องจากให้ค่า $R^2$ ต่ำ และมี RMSECV สูง โดยเนื่องจากเทคนิค NIR สามารถตรวจสอบองค์ประกอบภายในของตัวอย่างที่มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจนและไนโตรเจนได้ ดังนั้นน่าจะนำมาใช้วิเคราะห์อันตรายทางชีวภาพ การปนเปื้อนเชื้อราซึ่งมีองค์ประกอบของเซลเมมเบรนที่มีธาตุข้างต้นอยู่ แต่เนื่องจากเซลเมมเบรนมาจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นในตัวอย่าง เช่นปริมาณแบคทีเรีย จึงทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง NIR กับปริมาณเชื้อราทั้งหมดไม่สัมพันธ์กัน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 9-10

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายเชื้อราในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแสดงในภาพที่ 27-34 จะพบว่าข้อมูลมีกระจายออกจากเส้น target line

ตารางที่ 9 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อราทั้งหมดของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแบบเมล็ดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

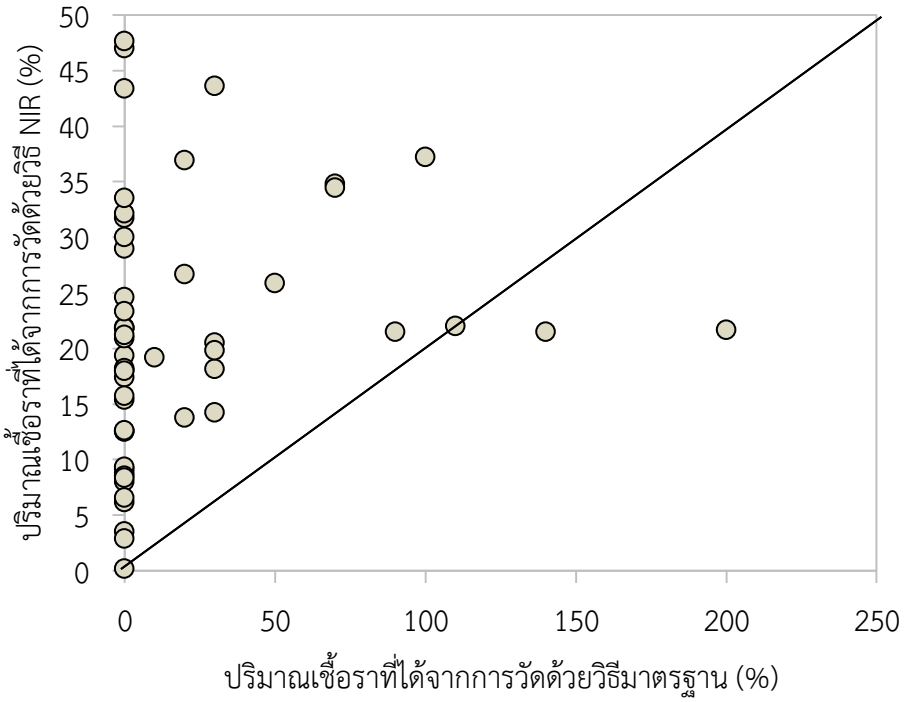
| ตัวอย่าง | วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม | จำนวนตัวแปร | สมการเทียบมาตรฐาน | | สมการทวนสอบ | | | RPD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $R^2$ | RMSEC (cfu/g) | $R^2$ | RMSECV (cfu/g) | Bias | |
| พริกไทย | MSC + $1^{st}$ | 1 | 0.12 | 36.4 | 0.05 | 36.4 | -0.186 | 1.03 |
| ข้าวโพด | MSC | 1 | 0.20 | $2.68x10^3$ | 0.14 | $2.73x10^3$ | -20.3 | 1.08 |
| ถั่วลิสง | raw spectral | 1 | 0.16 | $2.47x10^4$ | 0.11 | $2.52x10^3$ | 1.32 | 1.06 |
| รวม 3 ชนิด | SNV + $1^{st}$ | 1 | 0.30 | $2.33x10^3$ | 0.27 | $2.36x10^3$ | -3.5 | 1.08 |

หมายเหตุ: $R^2$: coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate

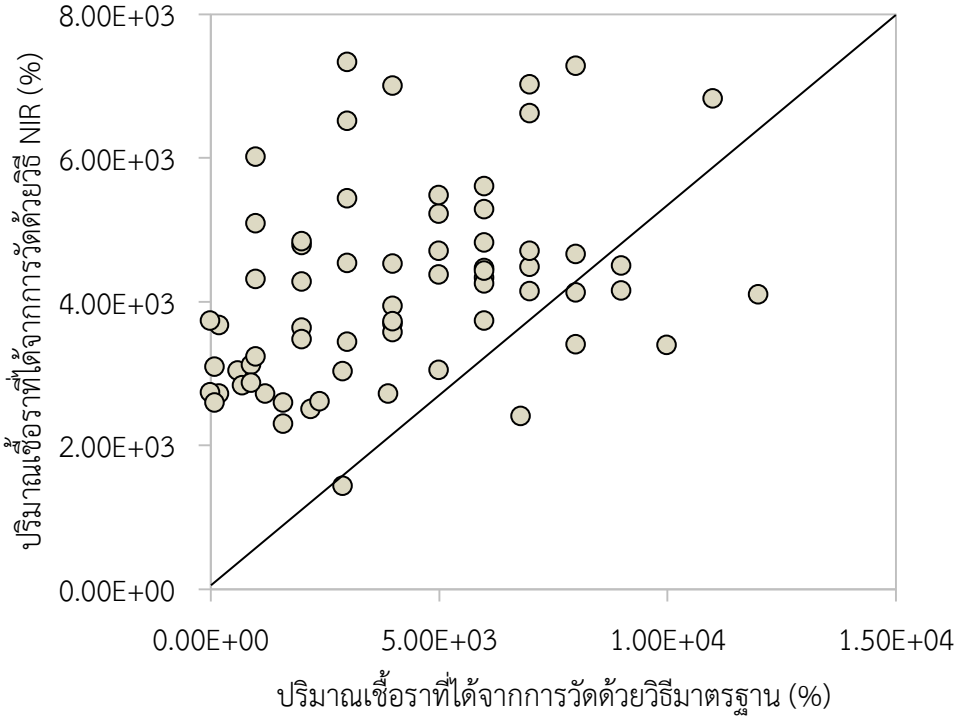
ตารางที่ 10 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อราทั้งหมดของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และ ถั่วลิสงแบบบดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

| ตัวอย่าง | วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม | จำนวนตัวแปร | สมการเทียบมาตรฐาน | | สมการทวนสอบ | | | RPD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $R^2$ | RMSEC (cfu/g) | $R^2$ | RMSECV (cfu/g) | Bias | |
| พริกไทย | Straight line Subtraction | 7 | 0.62 | 25.1 | 0.22 | 33.8 | 0.00 | 1.13 |
| ข้าวโพด | min-max normalization | 7 | 0.45 | $3.57x10^3$ | 0.30 | $3.89x10^3$ | -1.01 | 1.19 |
| ถั่วลิสง | MSC + $1^{st}$ | 6 | 0.48 | $1.53x10^4$ | 0.14 | $1.88x10^4$ | -1.52 | 1.06 |
| รวม 3 ชนิด | min-max normalization | 2 | 0.29 | $2.69x10^3$ | 0.26 | $2.74x10^3$ | -5.24 | 1.16 |

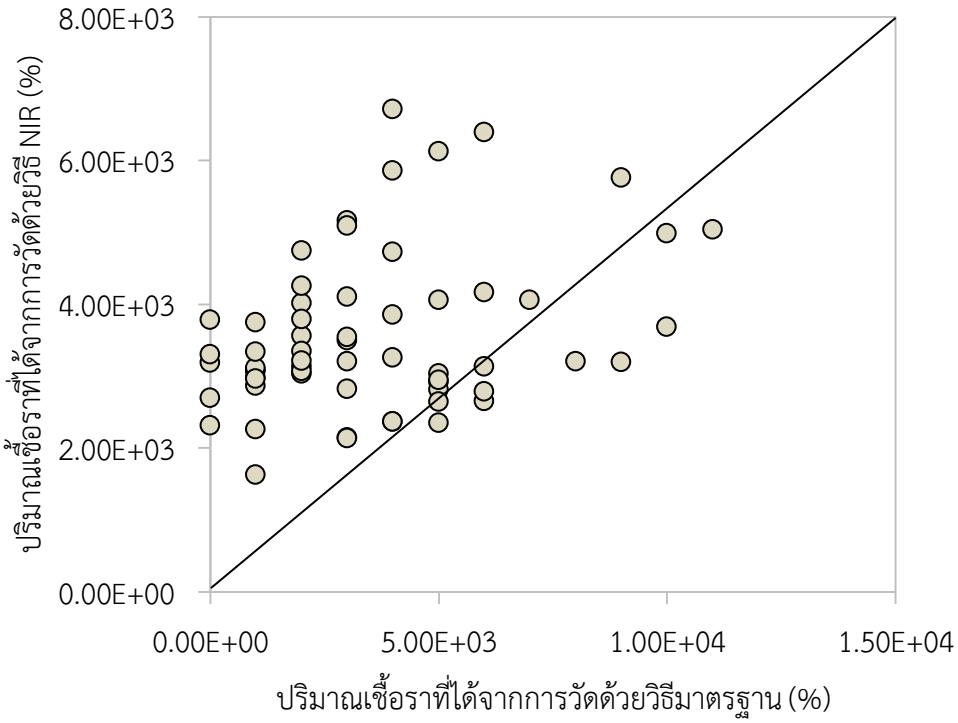
หมายเหตุ: $R^2$: coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate



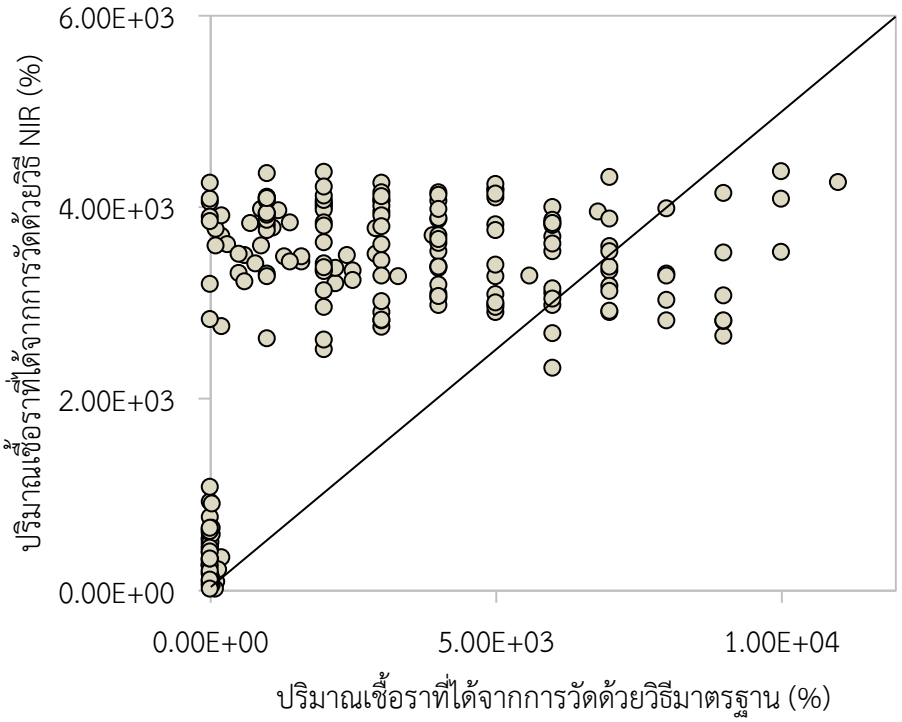

ภาพที่ 27 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดพริกไทยจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative



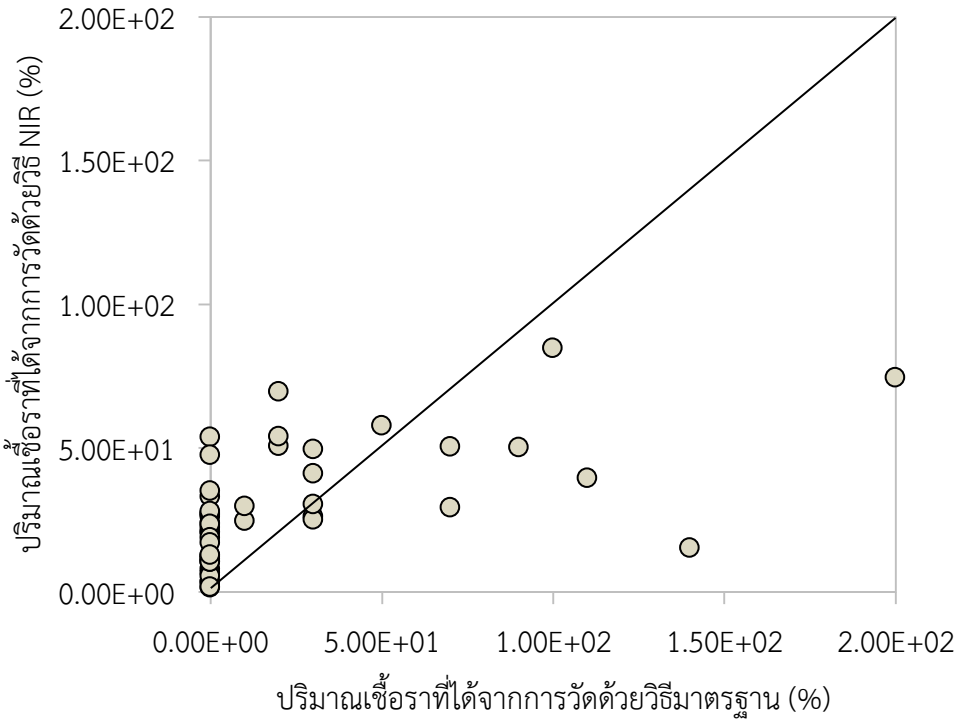

ภาพที่ 28 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC



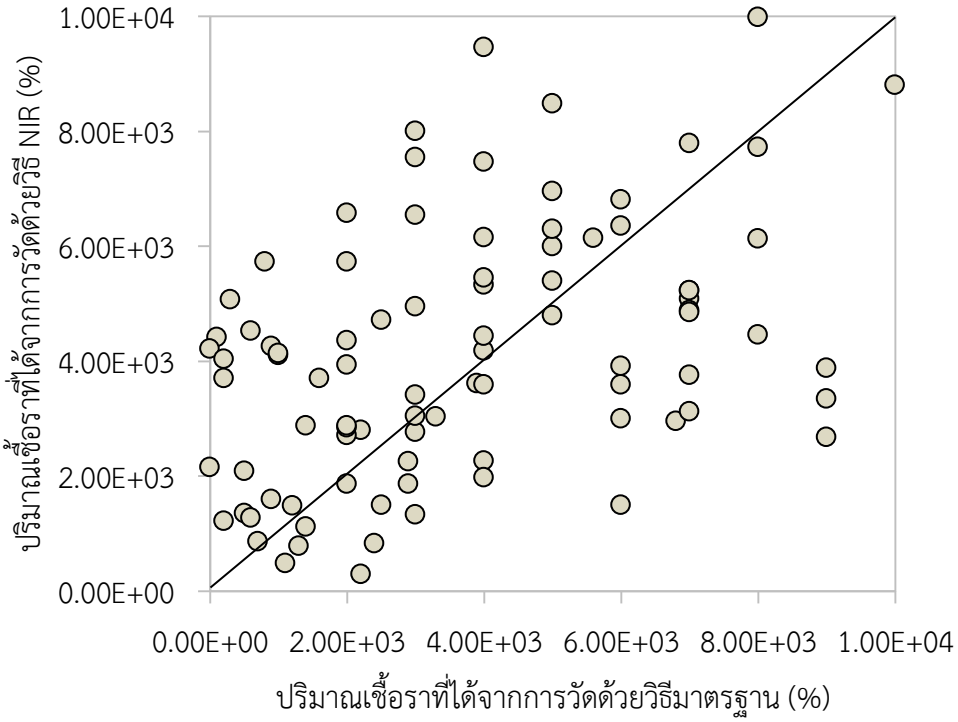

ภาพที่ 29 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดถั่วลิสงจาก raw spectral



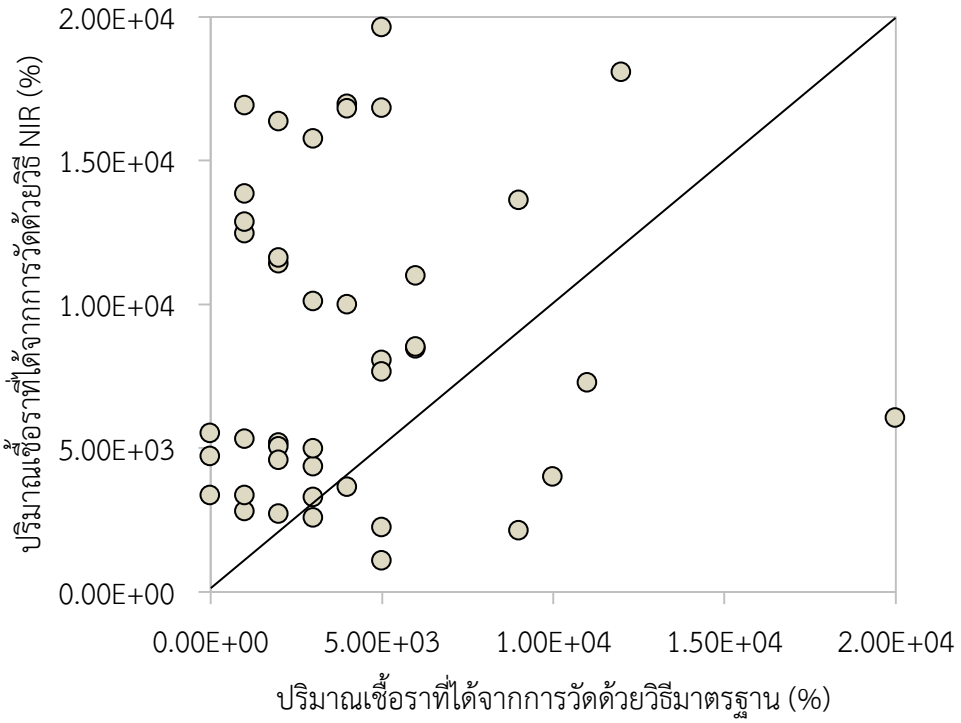

ภาพที่ 30 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ร่วมกับวิธี first derivative



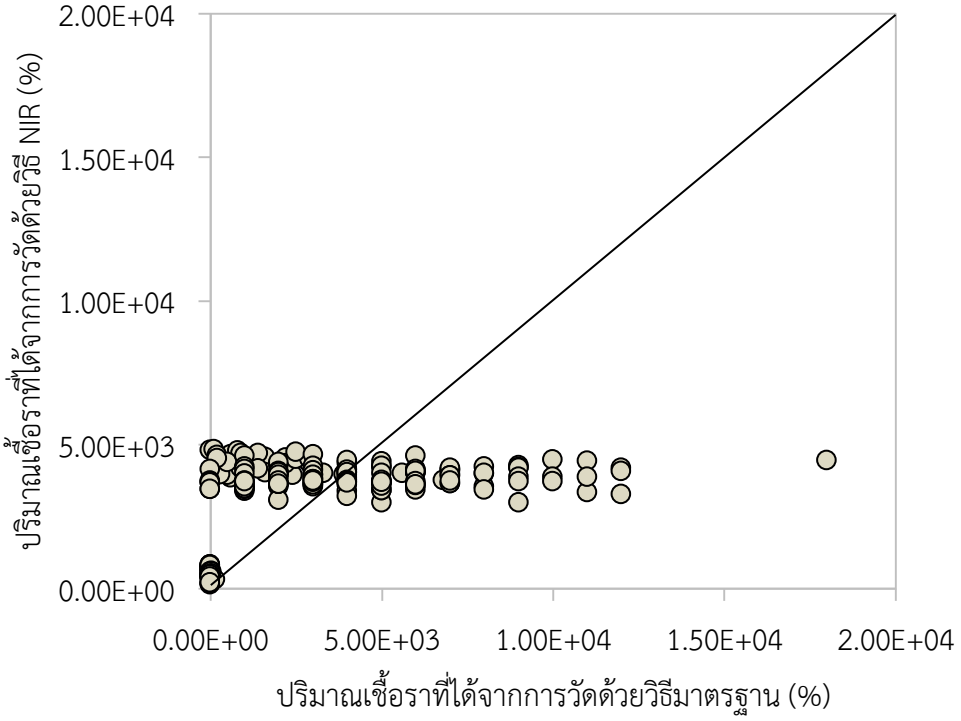

ภาพที่ 31 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดพริกไทยบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Straight line Subtraction




ภาพที่ 32 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization




ภาพที่ 33 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative




ภาพที่ 34 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อราในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงบด จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี min-max normalization

**4.3.3 การสร้างสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR) ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสง**

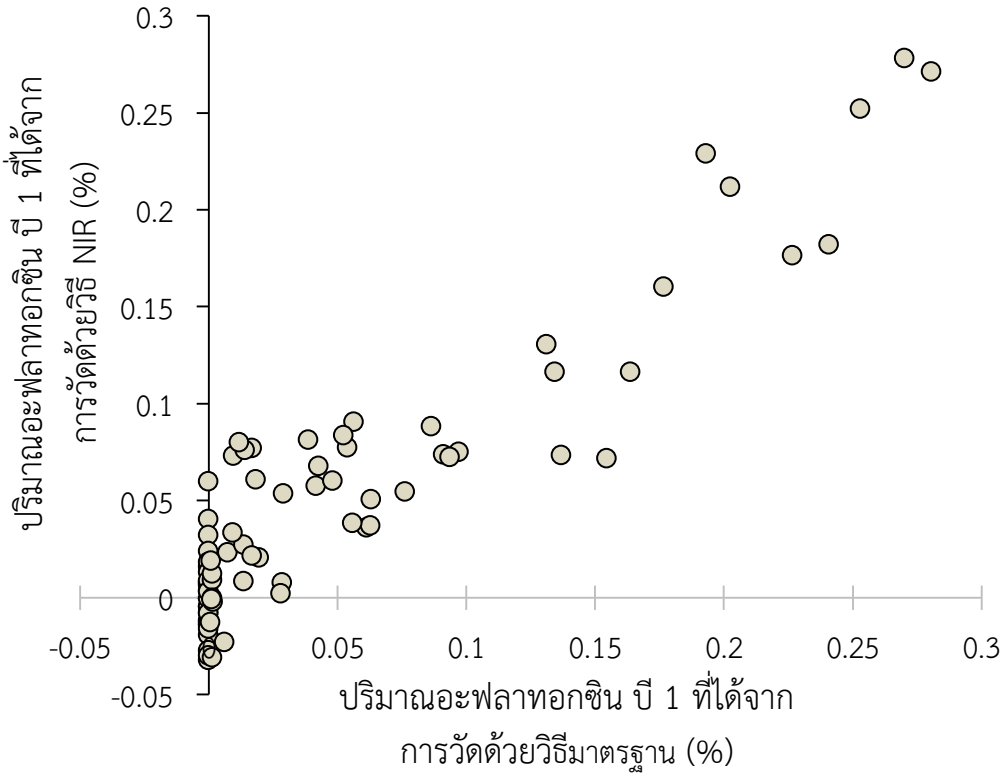
จากการนำพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงบดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR ทำการปรับแต่งเส้นสเปกตรัม โดยการพิจารณาวิธีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัมที่เหมาะสมคือ เมื่อสร้างสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ด้วยเทคนิค PLS สมการที่ให้ค่า $R^2$ และ RPD สูง และให้ค่า RMSEP ต่ำ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 11 โดยพบว่าจากการศึกษาการสร้างสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ด้วยเทคนิค NIR โดยมีการวัด 4 รูปแบบคือ 1.พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงบด 2. สารสกัดขั้นที่ 1 3. สารสกัดขั้นที่ 2 และการเตรียมตัวอย่างแบบ DESIR ตัวอย่างสามารถใช้ทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้ดี เนื่องจากให้ค่า $R^2$ มากกว่า 0.85 และมี RMSECV ต่ำ ซึ่ง Williams (2007) ได้อธิบายค่า $R^2$ ไว้ว่า $R^2$ ในช่วง 0.83-0.90 สามารถใช้ในการทำนายเพื่องานวิจัยได้ เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดในขั้นที 1 และ 2 พบว่า สารสกัดในขั้นที่ 2 มีค่า $R^2$ มากกว่า และมี RMSECV ต่ำกว่าเนื่องมาจากสารสกัดในขั้นที่ 2 ถูกทำการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆให้ลดลงโดยการใช้ column เพื่อชะ อะฟลาทอกซินจึงทำให้มีองค์ประกอบอื่นๆมารบกวนการดูดกลืนของอะฟลาทอกซินลดลง และพบว่าการเตรียมตัวอย่างแบบ DESIR ให้ค่าค่า $R^2$ สูงเท่ากับ 0.97 และมี RMSECV ต่ำ เท่ากับ 0.014 ppm เนื่องมาจากการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DESIR จะระเหยตัวทำละลายของสารสกัดทำให้เหลือพียงการดูดกลืนแสงของอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่สนใจ โดยช่วงการดูดกลืนแสงที่ใช้ในการสร้างสมการทำนายความชื้นของ พริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และถั่วลิสงอยู่ในช่วง 7605.0 – 5446.3 $cm^{-1}$ และ 4605.5 – 4242.9 $cm^{-1}$ โดยจากการศึกษาของ Tripathi และ Mishra (2009) เป็นตำแหน่งการดูดกลืนของ วงคูมาริน ในโครงสร้างอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่มีตำแหน่งการดูดกลืนที่ 4262.37$cm^{-1}$ ตำแหน่งการดูดกลืนของ lactone moiety ของ อะฟลาทอกซิน บี 1 ที่ 4825.90 $cm^{-1}$, 4390.42 $cm^{-1}$, 5868.42 $cm^{-1}$ and 5789.24 $cm^{-1}$

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และ ถั่วลิสงแสดงในภาพที่ 35-38 จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line และกระจายเข้าใกล้เส้น target line

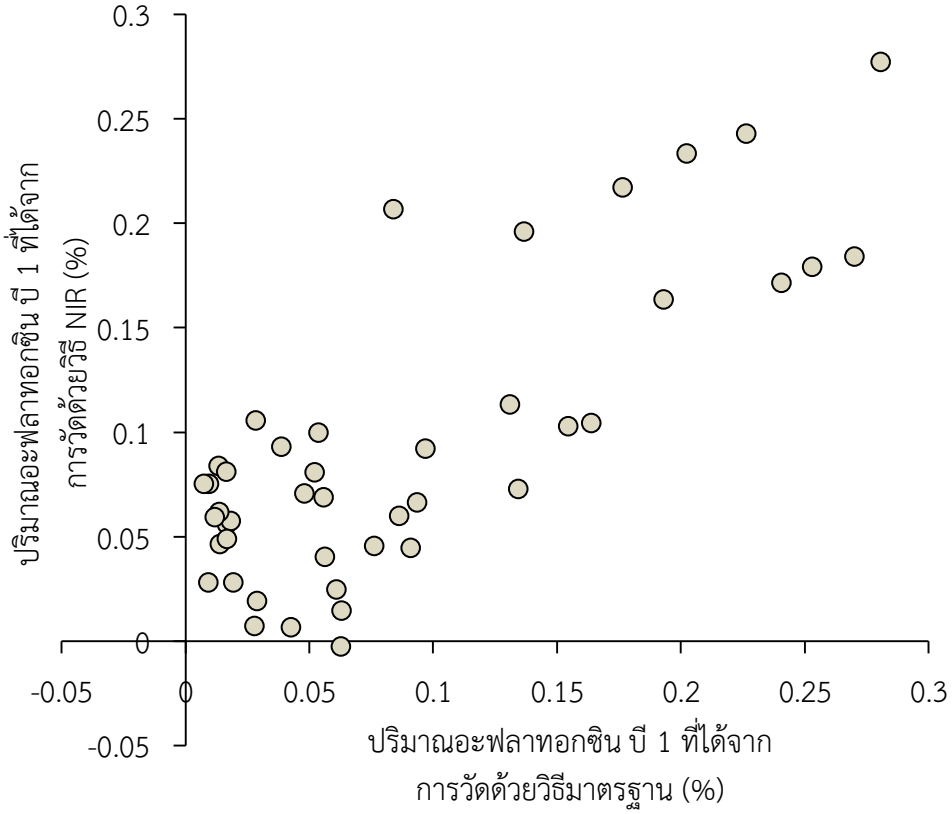
ตารางที่ 11 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ของพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

| ตัวอย่าง | วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม | จำนวนตัวแปร | สมการเทียบมาตรฐาน | | สมการทวนสอบ | | | RPD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $R^2$ | RMSEC (ppm) | $R^2$ | RMSECV (ppm) | Bias | |
| รวม | MSC + $1^{st}$ | 10 | 0.90 | 0.024 | 0.85 | 0.028 | -0.0004 | 2.56 |
| สารสกัด 2 | Straight line subtraction | 10 | 0.94 | 0.019 | 0.79 | 0.034 | 0.0034 | 2.21 |
| สารสกัด 1 | MSC + $1^{st}$ | 5 | 0.84 | 0.033 | 0.59 | 0.050 | -0.0023 | 1.57 |
| DESIR | SNV + $1^{st}$ | 6 | 0.99 | 0.003 | 0.97 | 0.014 | -0.0005 | 6.13 |

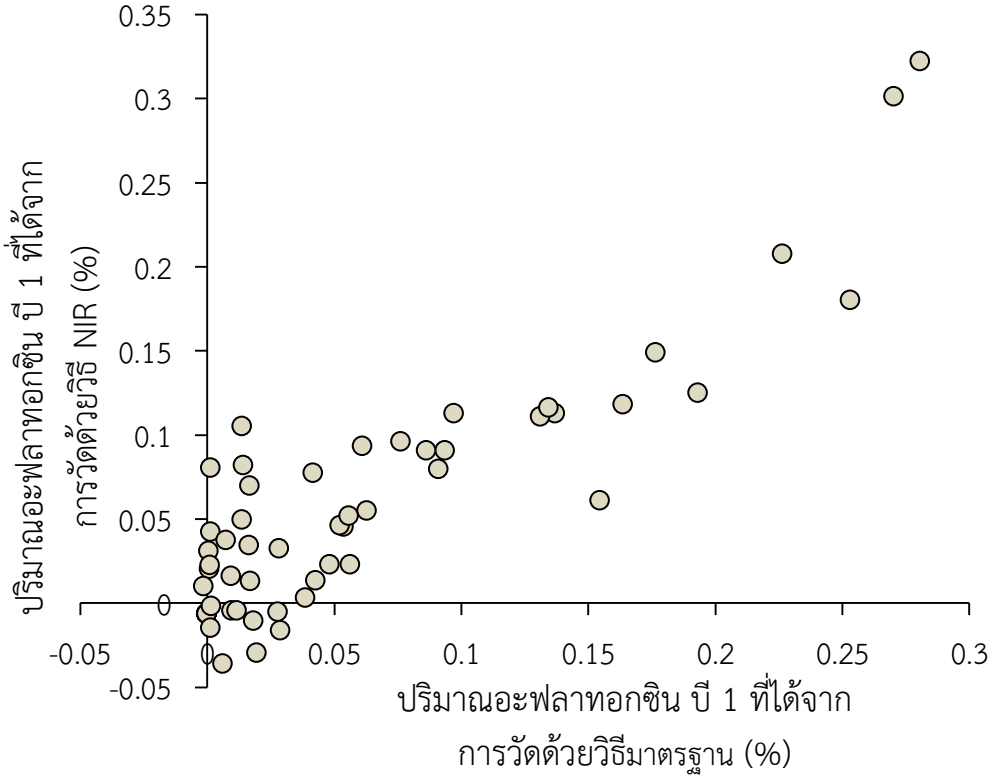
หมายเหตุ: $R^2$: coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate and DESIR: dry-extract system for infrared



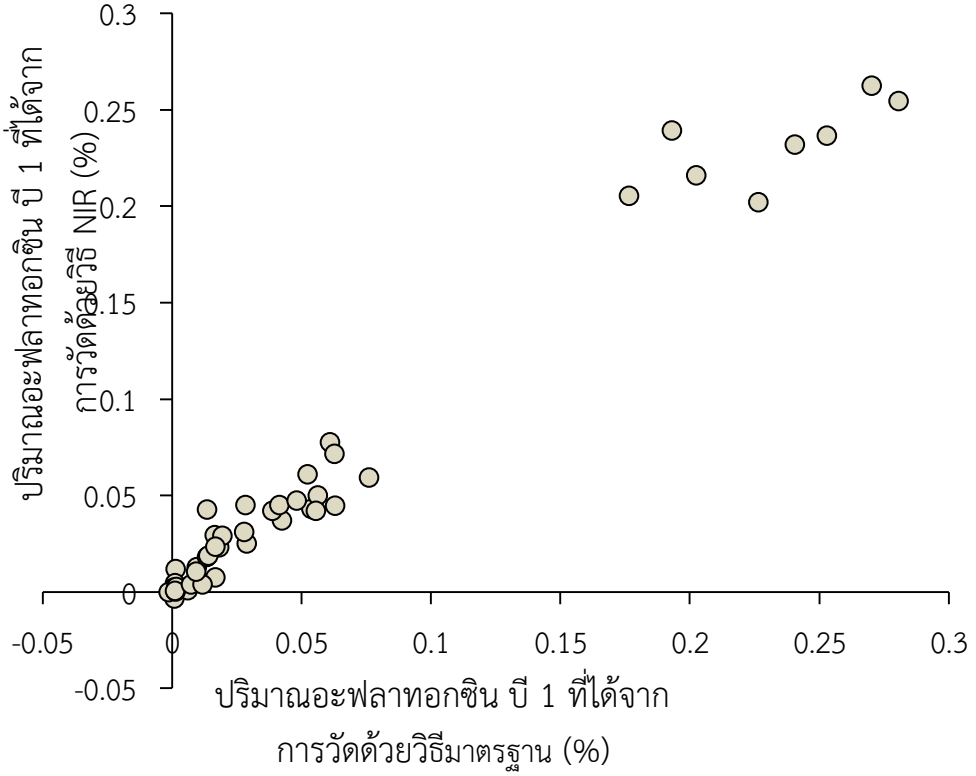

ภาพที่ 35 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และเมล็ดถั่วลิสงบดจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative




ภาพที่ 36 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในสารสกัดที่ 1 จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative




ภาพที่ 37 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในสารสกัดที่ 2 จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Straight line subtraction




ภาพที่ 38 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในการเตรียมตัวอย่างแบบ DESIR: dry-extract system for infrared จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี snv ร่วมกับวิธี first derivative

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา พบว่าเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณความชื้นและปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และ ถั่วลิสงได้และไม่สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณเชื้อราได้ ในพริกไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และ ถั่วลิสงได้

จากการศึกษาการตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค NIR แบบทำลายตัวอย่าง แต่สามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและลดขั้นตอนของการสกัดสารที่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง

จากการตรวจสอบปริมาณความชื้นด้วยเทคนิค NIRS การวิเคราะห์ให้ผลดีที่สุดในตัวอย่างถั่วลิสงทั้งการวัดแบบกลุ่มมล็ดและการเตรียมตัวอย่างแบบบด ปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ด้วยเทคนิค NIRS การวิเคราะห์ให้ผลดีโดยการเตรียมตัวอย่างแบบ DESIR

การเตรียมตัวอย่างโดยการบด และการเตรียมเพื่อให้ได้สารสกัดเข้าสู่กระบวนการ DESIR เป็นการศึกษาการใช้เทคนิค NIR เพื่อใช้ทำนายปริมาณอะฟลาทอกซิน จะต้องเริ่มทำการวิจัยจากการเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 จากการเติมสารมาตรฐานจึงต้องมีการบดทำลายตัวอย่างเพื่อควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง เพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIR ในการติดตามปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 และศึกษาการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DESIR เนื่องจากปริมาณที่พบตามมาตรฐานมีความเข้มข้นต่ำ เพราะการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานมีราคาสูง จึงทำการทดลองหาความเป็นไปได้ในขั้นต้น หลังจากทราบแล้วว่าเทคนิค NIR สามารถใช้ทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินได้ จึงจะมีการพัฒนาจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินตามธรรมชาติโดยไม่มีการทำลายตัวอย่าง

จากผลการศึกษา ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อราทั้งหมดได้อย่างไรก็ตามหากพิจารณาสมการทำนายปริมาณเชื้อราทั้งหมดสมการยังมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ ซึ่งอาจทำการปรับปรุงสมการได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและช่วงของค่าทางเคมีของตัวอย่างให้เพิ่มขึ้นจากเดิม และผลการงานวิจัยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของอะลทอกซินแต่มีความคลาดเคลื่อนในช่วงความเข้มข้นต่ำ ซึ่งอาจมีการปรับปรุงได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและสร้างจากวัตถุดิบชนิดเดียวและเพิ่มช่วงค่าทางเคมี อีกทั้งศึกษารูปแบบการเตรียมตัวอย่างเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซิน

**เอกสารอ้างอิง**

ธวัชชัย เพชรแก้ว รุ่งนภา ไกลถิ่น ปาริชาติ เทียนจุมพล เกวลิน คุณาศักดากุล สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ และ สุชาดา เวียรศิลป์. (2554, มกราคม-เมษายน) การตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ถูกเชื้อ *Aspergillus flavus* เข้าทำลายด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. (42): 357-360.

Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A. and Pietri, A. (2011). Evaluation and Improvement of Extraction Methods for the Analysis of Alflatoxins B1, B2, G1 and G2 from Naturally Contaminated Maize, Food Anal. Methods.

Durmuş, E., Güneş, A. and Kalkan, H. 2016. Detection of aflatoxin and surface mould contaminated figs by using Fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of the Science of Food and Agriculture: n/a-n/a.

Ghalia, R., Belouaera, I., Hdiria, S., Ghorbela H., Maaroufib, K. and Hedillia, A. (2009). Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Tunisian sorghum and pistachios. Journal of Food Composition and Analysis. 22(7): 751–755.

Edite Bezerra da Rocha, M., Freire, F. d. C. O., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo, M.G. and Rondina, D. (2014) . Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control 36(1): 159-165.

Ellekjaer, M.R., Isaksson, T. and Solheim, R. (1994). Assessment of sensory quality of meat sausages using near infrared spectroscopy. Journal of Food Science. 59(3): 456-464.

Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. and 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., Zotto, S.D., Torelli, E., Cividino, S.R., Firrao, G., Riccia, G.D. and 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: 1608–1612.

Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., and Niu, T. (2008). Aflatoxin B1 degradation by stenotrophomonas maltophilia and other microbes selected using coumarin Medium. Int. J. Mol. Sci. 9(8); 1489-1503.

Guixing Ren and Feng Chen. (1996). Determination of moisture content of ginseng by near infra-red reflectance spectroscopy. Food Chemistry. 60: 433–436.

Hernández Hierro., J. M., Garcia-Villanova, R. J., Rodríguez Torrero, P., Toruño Fonseca, I.M. (2008). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. Anal Chim Acta. 622(1-2):189-94.บบ

Huang, H., Yu, H., Xu, H. and Ying, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. Journal of Food Engineering 87: 303–313.

Ibrnandz, V. F., Soldado, A., Fernandez, A.M., B. Delgado, D.L.R. (2009). Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin $B_1$ in maize and barley as analytical quality assessment, Food Chemistry, 113: 629-634.

Liang, P.S., Slaughter, D.C. Ortega-Beltran, A. and Michailide, T.J. (2015). Detection of fungal infection in almond kernels using near-infrared reflectance spectroscopy. Biosystems Engineering 137: 64-72.

Nicoli, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I. and Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy. Postharvest Biology and Technology 46: 99–118.

Osborne, B.G., Fearn, T. and Hindle, P.H. (1993). Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific & Technical. Singapore. 29.

Osborne, B.G. (2007). Near-infrared spectroscopy in food analysis. [On line]. Accessed on 3 February 2009. Available from http://bsel.ist.utl.pt/2007/News/NIR%20Food%20Review.pdf.

Pearson, T.C., Wicklow, D.T., Maghirang, E.B., Xie, F. and Dowell, F.E. (2001). Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy, Transactions of the American Society of Agricultural Engineers, 44 (5): 1247-1254.

Schwanninger, M. (2009). Basics and applications of infrared spectroscopy in biomass properties. [online]. Accessed on 30 August 2009. Available from http://www.boku.ac.at/chemie/bc2/

Sirisomboon, C.D., Putthang, R. and Sirisomboon, P. (2013). Application of near infrared spectroscopy to detect flatoxigenic fungal contamination in rice, Food Control 33: 207-214.

Stroka, J. and Anklam, E. (2002). New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed, trends in analytical chemistry, 21 (2): 90-95.

Tripathi, S. and Mishra, H. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin $B_1$ in red chili powder, Food Control, 20(9): 840–846.

Williams, P. (2007) “Grains and seeds.” In Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology, 165-217. Edited by Ozaki, Y., McClure, W. F. and Christy, A. A. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc,.

# ภาคผนวก ก
# วิธีการวิเคราะห์

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552)

ก.1.1 เครื่องมือ

ก.1.1.1 ตู้อบ (oven)

ก.1.1.2 เครื่องชั่ง ที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.01 กรัม

ก.1.1.3 เดซิกเคเตอร์ (desiccator)

ก.1.1.4 กล่องอลูมิเนียมมีฝาปิด

**หมายเหตุ** กรณีที่มีการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยใช้วิธีอื่น เช่น การใช้เครื่องวัดความชื้น ต้องมีการทวนสอบความถูกต้องของเครื่องมือเปรียบเทียบกับวิธีการอบในตู้อบลมร้อน ความถี่ในการทวนสอบขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความถี่ในการวัด ปริมาณตัวอย่างที่วัด ความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือวัด

ก.1.2 วิธีวิเคราะห์

ก.1.2.1 เปิดฝากล่องอลูมิเนียมตามข้อ ก.1.1.4 โดยเอาฝาซ้อนไว้ใต้กล่องหรือวางข้างๆ แล้วนำไปอบในตู้อบตามข้อ ก.1.1.1 ที่อุณหภูมิ 105°C (องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตาม ก.1.1.2

ก.1.2.2 ตักตัวอย่างเมล็ดกาแฟมาประมาณ 10 g ใส่ในกล่องอลูมิเนียมที่ได้จากข้อ ก.1.2.1 แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตาม ก.1.1.2 อบกล่องเมล็ดกาแฟตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C โดยเปิดฝาและเอาฝาซ้อนไว้ใต้กล่องหรือวางข้างๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ± 0.5 ชั่วโมง แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตาม ก.1.1.2

ก.1.2.3 ทำตามข้อ ก.1.2.1 และข้อ ก.1.2.2 อย่างน้อย 2 ซ้ำ

ก.1.2.4 คำนวณหาปริมาณความชื้นของการวิเคราะห์แต่ละครั้ง จากสูตร

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

เมื่อ A = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา

B = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดกาแฟก่อนอบ

C = น้ำหนักกลองอลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดกาแฟหลังอบ

และนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้น

## การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. Ektasaeng, R., Tantinijakun, S., Khuwijitjaru, P. and Mahayothee, B. 2016. Rapid Determination of Moisture Content, Mold and Aflatoxin B1 in Corn using Near Infrared Spectroscopy. The 5th Asian NIR Symposium, Kagoshima, Japan Nov. 30 – 3 Dec, 2016. (Poster Presentation)

## ประวัติผู้วิจัย


หัวหน้าโครงการวิจัย นางสาวบุศรากรณ์ มหาโยธี (Busarakorn Mahayothee)
ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม โทรศัพท์ 034-219361 โทรสาร 034-272194
e-mail: busarakornm@yahoo.com


ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีอาหาร สถาบันจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ พ.ศ. 2532
- ปริญญาโท M.Sc. สาขา เทคโนโลยีอาหาร สถาบันจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ พ.ศ. 2537
- ปริญญาเอก Dr.rer.nat. สาขา Natural Science (Food Technology) สถาบัน The University of Hohenheim, Germany ปีที่จบ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

Marcus Nagle; Habasimbi K; **Mahayothee B**; Haewsungcharern M; Janjai S; Müller J (2011). Fruit processing residues as an alternative fuel for drying in Northern Thailand. Fuel, 90 (2), 813-823.

Precoppe M F; Nagle M; Janjai S**; Mahayothee B**; Müller J (2011). Analysis of dryer performance for the improvement of small-scale litchi processing. International Journal of Food Science & Technology, 46 (3), 561–569.

Marcus Nagle, **Busarakorn Mahayothee**, Parika Rungpichayapichet, Serm Janjai and Joachim Müller. 2010. Effect of irrigation on near-infrared (NIR) based prediction of mango maturity. Scientia Horticulturae, 125 (4) 771-774.

Janjai, S., Lamlert, N., Tohsing, K., **Mahayothee, B.**, Bala, B. K., Mueller, J. 2010. Measurement and modeling of moisture sorption isotherm of litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.). International Journal of Food Properties, 13(2) 251-260.

Marcus Nagle, Juan Carlos Gonzalez Azcarraga, **Busarakorn Mahayothee**, Methinee Haewsungcharern, Serm Janjai, Joachim Muller. 2010. Improved quality and energy performance of a fixed-bed longan dryer by thermodynamic modifications, Journal of Food Engineering, 99(3) 392-399.

S. Janjai, **B. Mahayothee**, N. Lamlert, B.K. Bala, M. Precoppe, M. Nagle, J. Muller, 2010. Diffusivity, shrinkage and simulated drying of litchi fruit (*Litchi Chinensis* Sonn.), Journal of Food Engineering, 96(2) , 214-221.

Janjai S; Precoppe M F; Lamlert N; **Mahayothee B**; Bala B K; Nagle M; Müller J (2010). Thin-layer drying of litchi (Litchi chinensis Sonn.). Food and Bioproducts Processing, online available.

**Busarakorn Mahayothee**, Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Methinee Haewsungcharoen, Serm Janjai, Joachim Mueller. 2009. Effects of pretreatments on colour alterations of litchi during drying and storage. European Food Research and Technology, 229 (2) 329-337.

S. Janjai, P. Intawee, K. Tohsing, **B. Mahayothee**, B.K. Bala, M.A. Ashraf, J. Muller. (2009) Neural network modeling of sorption isotherms of longan (Dimocarpus longan Lour.), Computers and Electronics in Agriculture, 66, (2), May 2009, 209-214.

Franz Roman, Marcus Nagle, Hermann Leis, Serm Janjai, **Busarakorn Mahayothee**, Methinee Haewsungcharoen, Joachim Muller. Potential of roof-integrated solar collectors for preheating air at drying facilities in Northern Thailand. 2009. Renewable Energy 34(7): 1661-1667.

S. Janjai, N. Lamlert, P. Intawee, **B. Mahayothee**, B.K. Bala, M. Nagle, J. Muller. (2009) Experimental and simulated performance of a PV-ventilated solar greenhouse dryer for drying of peeled longan and banana. Solar Energy, 83 (9), 1550-1565.

Janjai, S., Lamlert, N. Intawee, P., **Mahayothee, B.**, Boonrod, Y., Haewsungcharern, M., Bala, B. K., Nagle, M., Mueller, J. 2009. Solar Drying of Peeled Longan Using a Side Loading Type Solar Tunnel Dryer: Experimental and Simulated Performance. Drying Technology 27(4) 595-605.

M. Nagle, J. C. González-Azcárraga, S. Phupaichitkun, **B. Mahayothee**, M. Haewsungcharern, S. Janjai, He. Leis & J. Müller (2008). Effects of operating practices on performance of a fixed-bed convection dryer and quality of dried longan. 43(11): 1979 - 1987.

Janjai, S., Lamlert, N., Intawee, P., **Mahayothee, B.**, Haewsungcharern, M., Bala, B. K., Nagle, M., Leis, H. & Müller, J. 2008. Finite Element Simulation of Drying of Longan Fruit. Drying Technology, 26 (6), 666-674.

S. Janjai, N. Lamlert, P. Intawee, **B. Mahayothee**, M. Haewsungcharern, B.K. Bala, J. Müller. 2008. Finite element simulation of drying of mango. Biosystems Engineering, 99(4): 523-531.

Sarawut Phupaichitkun, **Busarakorn Mahayothee**, Thomas Waldenmaier, Joachim Müller. Generalized single-layer model for drying kinetics of unpeeled-longan. Int J Agric & Biol Eng. 2008; 1(2): 64-71.

**Busarakorn Mahayothee**, Sybille Neidhart, Reinhold Carle and Werner Mühlbauer. 2007. Effects of variety, ripening condition and ripening stage on the quality of sulphite-free dried mango slices. European Food Research and Technology, 225(5-6): 723-732.

S. Janjai, B.K. Bala, N. Lamlert, **B. Mahayothee**, M. Haewsungcharern, W. Muhlbauer, J. Muller. 2007. Moisture Diffusivity Determination of Different Parts of Longan Fruit. International Journal of Food Properties, 10(3): 471-478.

**Busarakorn Mahayothee**, S. Neidhart, W. Mühlbauer, R. Carle. 2007. Effects of Calcium Carbide and 2-Chloroethylphosphonic Acid on Fruit Quality of Thai Mangoes under Various Postharvest Ripening Regimes. European Journal of Horticultural Science, 72(4):171-178.

Janjai S, Bala BK, Tohsing K, **Mahayothee B**, Haewsungcharern M, Müller J. 2007. Moisture sorption isotherms and heat of sorption of mango (Magnifera Indica L. cv. Nam Dok Mai). International Agricultural Engineering Journal;16(3-4):159-168.

Janjai, S., Bala, B.K., Tohsing, K., **Mahayothee, B.**, Haewsungcharern, M., Muehlbauer, W., Mueller, J. 2006. Equilibrium moisture content and heat of sorption of longan (Dimocarpus longan Lour.). Drying technology 24 (12),1691-1696.

**Mahayothee, B.**, Neidhart, S., Leitenberger, M., Mühlbauer, W., Carle, R. Non-destructive determination of maturity of Thai mangoes by near-infrared spectroscopy. Acta Horticulturae (ISHS) 2004; 645: 581-588.

**Mahayothee, B.**, Neidhart, S., Mühlbauer, W., Carle, R. Influence of postharvest ripening processes on appropriate maturity for drying mangoes `Nam Dokmai´ and `Kaew´. *Acta Horticulturae* (ISHS) 2004; 645: 241-248.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ชื่อ นายปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ (Pramote Khuwijitjaru)
ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
โทรศัพท์ 034-219361 โทรสาร 034-272194 e-mail: kpramote@su.ac.th

ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่จบ 2539
- ปริญญาโท Master of Agricultural Science, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น ปีที่จบ 2544
- ปริญญาเอก Doctor of Agricultural Science, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น ปีที่จบ 2547

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

Klinchongkon, K., Khuwijitjaru, P., Adachi, S.Degradation kinetics of passion fruit pectin in subcritical water. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry doi: 10.1080/09168451.2016.1277941

Klinchongkon, K.; Chanthong, N.; Ruchain, K.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Effect of ethanol addition on subcritical water extraction of pectic polysaccharides from passion fruit peel. Journal of Food Processing and Preservation doi: 10.1111/jfpp.13138.

Khuwijitjaru, P.; Koomyart, I.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Hydrolysis of konjac flour under subcritical water conditions. Chiang Mai Journal of Science (in press).

Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Degradation kinetics of trisaccharides comprising glucose residues in subcritical water. Journal of Carbohydrate Chemistry 2016, 35(5):286-299.

Kobayashi, T., Khuwijitjaru, P., Adachi, S. Decomposition kinetics of glucose and fructose in subcritical water containing sodium chloride. Journal of Applied Glycoscience 2016, 63 (4): 99-104.

Wiboonsirikul, J.; Watanabe, Y.; Omori, A.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Antioxidative properties of stearoyl ascorbate in a food matrix system. Journal of Oleo Science 2016, 65, 487-492.

Watanabe, Y.; Khuwijitjaru, P.; Hamai, Y.; Wiboonsirikul, J.; Adachi, S., Antioxidative property of acyl ascorbate in cookies containing iron. Japan Journal of Food Engineering 2016, 17, 77 - 81.

Tamiya, S.; Koomyart, I.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Preparation of liquid and solid seasonings with shrimp-like flavor from Isada krill under subcritical water conditions by steam injection. Food Science and Technology Research 2016, 22, 317-323.

Soisangwan, N.; Gao, D.-M.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Kinetic analysis for the isomerization of cellobiose to cellobiulose in subcritical aqueous ethanol. Carbohydrate Research 2016, 433, 67-72.

Soisangwan, N.; Gao, D.-M.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Production of lactulose from lactose in subcritical aqueous ethanol. Journal of Food Process Engineering 2016, DOI: 10.1111/jfpe.12413.

Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Nagle, M.; Khuwijitjaru, P.; Müller, J., Robust NIRS models for non-destructive prediction of fruit ripeness and quality in mango. Postharvest Biology and Technology 2016, 111, 31-40.

Mahayothee, B.; Koomyart, I.; Khuwijitjaru, P.; Siriwongwilaichat, P.; Nagle, M.; Müller, J., Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. International Journal of Food Properties 2016, 19, 2041-2051.

Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Using severity factor as a parameter to optimize krill treatment under subcritical water conditions. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2016, 80(11): 2192-2197.

Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Direct treatment of Isada krill under subcritical water conditions to produce seasoning with shrimp-like flavor. Food Technology and Biotechnology 2016, 54 (3) 335–341.

Khuwijitjaru, P., Utilization of plant-based agricultural waste by subcritical water treatment Japan Journal of Food Engineering 2016, 17, 33-39.

Wiboonsirikul, J.; Nakata, Y.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Degradation of disaccharides containing two glucose units in subcritical water. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering 2015, 10, 681-686.

Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Khuwijitjaru, P.; Nagle, M.; Müller, J., Non-destructive determination of β- carotene content in mango by NIR spectroscopy compared with colorimetric measurements. Journal of Food Composition and Analysis 2015, 38, 32-41.

Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Compositions, flavour and antiradical properties of products from subcritical water treatment of raw Isada krill. International Journal of Food Science and Technology 2015, 50, 1632-1639.

Klinchongkon, K.; Khuwijitjaru, P.; Wiboonsirikul, J.; Adachi, S., Extraction of oligosaccharides from passion fruit peel by subcritical water treatment. Journal of Food Process Engineering 2017, 40(1): e12269.

Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Subcritical water treatment for producing seasoning from semidried Isada krill. Journal of Food Process Engineering 2014, 37, 567–574.

Khuwijitjaru, P.; Suaylam, B.; Adachi, S., Degradation of caffeic acid in subcritical water and on-line HPLC-DPPH assay of degradation products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2014, 62, 1945-1949.

Khuwijitjaru, P.; Pokpong, A.; Klinchongkon, K.; Adachi, S., Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. International Journal of Food Science and Technology 2014, 49, 1946-1952.

Khuwijitjaru, P.; Plernjit, J.; Suaylam, B.; Samuhaseneetoo, S.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Stability of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. Can. J. Chem. Eng. 2014, 92, 810-815.

Wiboonsirikul, J.; Mori, M.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Properties of extract from okara by its subcritical water treatment. International Journal of Food Properties 2013, 16, 974-982.

Wanpen, C.; Ngampanya, B.; Pruksasri, S.; Jaturapiree, P.; Khuwijitjaru, P., The effect of ultrasonic pretreatment on inulin extraction from Jerusalem artichoke tuber. KMUTT Research and Development Journal 2013, 36, 261-270.

Murayama, Y.; Wiboonsirikul, J.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Antioxidant characteristics of extracts from cereal residues by their subcritical water treatment. Journal of Oleo Science 2012, 61, 465-468.

Khuwijitjaru, P.; Watsanit, K.; Adachi, S., Carbohydrate content and composition of product from subcritical water treatment of coconut meal. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 2012, 18, 225-229.

Khuwijitjaru, P.; Sayputikasikorn, N.; Samuhasaneetoo, S.; Penroj, P.; Siriwongwilaichat, P.; Adachi, S., Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (Cinnamomum zeylanicum). Journal of Oleo Science 2012, 61, 349-355.

Leelayuwapan, H.; Hiangratch, K.; Liangpaiboon, T.; Khuwijitjaru, P.; Boonyarattanakalin, S. In Identification of Products Obtained from Subcritical Water Hydrolysis of Coconut Meal, PACCON2011, Thailiand, 2011; Thailiand, 2011; pp 124-127.

Khuwijitjaru, P.; Yuenyong, T.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Effects of ferric chloride on thermal degradation of γ-oryzanol and oxidation of rice bran oil. European Journal of Lipid Science and Technology 2011, 113, 652-657.

Khuwijitjaru, P.; Anantanasuwong, P.; Adachi , S., Emulsifying and foaming properties of defatted soy meal extracts obtained by subcritical water treatment. International Journal of Food Properties 2011, 14, 9-16.

Khuwijitjaru, P.; Suthasirisup, T., Properties of breader prepared from rice flour. KKU Research Journal 2010, 15, 965-972.

Khuwijitjaru, P.; Yuenyong, T.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Degradation kinetics of gamma-oryzanol in antioxidant-stripped rice bran oil during thermal oxidation. Journal of Oleo Science 2009, 58, 491-497.

Khuwijitjaru, P.; Wanpen, C.; Mala, T.; Ariyakriangkrai, M.; Adachi, S., Effect of subcritical water pretreatment on enzymatic digestibility of rice straw, corn stover and sugar cane bagasse. KKU Research Journal 2009, 14, 1084-1090 (in Thai).

Khuwijitjaru, P.; Chalooddong, K.; Adachi, S., Phenolic content and radical scavenging capacity of kaffir lime fruit peel extract obtained by pressurized hot water extraction. Food Science and Technology Research 2008, 14, 1-4.

Wiboonsirikul, J.; Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Morita, H.; Tsuno, T.; Adachi, S., Production optimization of the extract with high phenolic content and radical scavenging activity from defatted rice bran by subcritical water treatment. Japan Journal of Food Engineering 2007, 8, 311-315.

Khuwijitjaru, P.; Nualchan, P.; Adachi, S., Foaming and emulsifying properties of rice bran extracts obtained by subcritical water treatment. Silpakorn University Science and Technology Journal 2007, 1, 7-12.

Fujii, T.; Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Adachi, S., Decomposition kinetics of monoacyl glycerol and fatty acid in subcritical water under temperature-programmed heating conditions. Food Chemistry 2006, 94, 341-347.

Khuwijitjaru, P.; Taengtieng, N.; Changprasit, S., Degradation of gamma-oryzanol in rice bran oil during heating: An analysis using derivative UV-spectrophotometry. Silpakorn University International Journal 2004, 4, 154-165.

Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Matsuno, R.; Adachi, S., Solubility of oleic and linoleic acids in subcritical water. Food Science and Technology Research 2004, 10, 261-263.

Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Matsuno, R.; Adachi, S., Preparation of finely dispersed O/W emulsion from fatty acid solubilized in subcritical water. Journal of Colloid and Interface Science 2004, 278, 192-197.

Khuwijitjaru, P.; Fujii, T.; Adachi, S.; Kimura, Y.; Matsuno, R., Kinetics on the hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water. Chemical Engineering Journal 2004, 99, 1-4.

Khuwijitjaru, P. Solubility of fatty acids and hydrolysis of their esters in subcritical water. Dissertation, Kyoto University, Kyoto, 2004.

Khuwijitjaru, P.; Adachi, S.; Matsuno, R., Solubility of saturated fatty acids in water at elevated temperatures. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2002, 66, 1723-1726.