รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้อง

โดย ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

มิถุนายน 2558

สัญญาเลขที่ TRG5680068

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้อง

ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5680068

ชื่อโครงการ : การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้อง

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Cheewanun.D@chula.ac.th, cheewanun@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ตรวจหาการปนเปื้อนของรา โดยเฉพาะราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและอะฟลาทอกซินในข้าวกล้อง สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องปกติและข้าวกล้องปรับสภาวะที่มีการเติมสปอร์ของ *Aspergillus* และปรับความชื้น (14 และ 18%) เพื่อกระตุ้นการเจริญของราและการสะสมของอะฟลาทอกซิน การปรับสภาวะดังกล่าวจะทำให้เกิดความหลากหลายของตัวอย่างข้าวที่มีและไม่มีการการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซิน แล้วสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนายเชิงปริมาณสำหรับตรวจการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินจากสเปกตรัมดั้งเดิมหรือสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งเบื้องต้นกับค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Partial least squares regression (PLSR) แบบจำลองในการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดที่สร้างจากสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวปรับสภาวะที่ผ่านการปรับแต่งเบื้องต้น ให้ผลการทำนายดีที่สุด ด้วยค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 92.26 ค่า root mean square error of prediction (RMSEP) เท่ากับ 3.17%, และค่า bias เท่ากับ 0.03% ในขณะที่แบบจำลองสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินที่สร้างจากสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวปกติและข้าวปรับสภาวะให้ผลการทำนายที่ไม่ดี แบบจำลองสำหรับทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งเบื้องต้นของตัวอย่างข้าวทั้งสองประเภทให้ผลการทำนายที่ดีและแม่นยำ (R^2= 93.73, RMSEP = 0.938 µg/kg, bias = 0.0147 µg/kg และ R^2= 94.73, RMSEP = 415 µg/kg, bias = -54 µg/kg สำหรับตัวอย่างข้าวปกติและตัวอย่างข้าวปรับสภาวะตามลำดับ) แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราถูกสร้างโดยวิธีการแบ่งกลุ่ม (SMICA และ PLS-DA) เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มโดยรวมถูกต้องมากที่สุด เท่ากับ 87.04% ได้จากแบบจำลองจากวิธี PLS-DA ที่สร้างจากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวเมล็ดเดี่ยวในช่วงความยาวคลื่น 1801-2000 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเมล็ดข้าวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราต่างกันชัดเจน

คำหลัก : เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, อะฟลาทอกซิน, รา, ข้าวกล้อง

Abstract

Project Code : TRG5680068

Project Title : Application of near infrared spectroscopy for detection of aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in rice

Investigator : Cheewanun Dachoupakan Sirisomboon, Chulalongkorn University

E-mail Address : Cheewanun.D@chula.ac.th, cheewanun@hotmail.com

Project Period : 2 years

The objective of this research was to apply the near infrared spectroscopy (NIRS) technique, with full NIR wavenumber range 12500-4000 cm^{-1} (wavenrage of 800-2500 nm) to detect fungal contamination particularly aflatoxigenic fungi and aflatoxin contamination in brown rice samples. NIR spectra were obtained on the natural samples and the rice samples artificially inoculated with *Aspergillus* species and adjusting different moisture level (14 and 18%) in order to induce the fungal growth and aflatoxin accumulation. These conditions were carried out to achieve variability in sample contaminated and non contaminated with fungi and aflatoxin. Quantitative calibration models to detect fungi and aflatoxin contamination were developed using the original and pretreated absorbance spectra in conjunction with partial least squares regression (PLSR) with prediction testing. The statistical model for the total fungal infection developed from the treated spectra of conditioned sample provided the greatest accuracy in prediction, with a coefficient of determination (R^2) of 92.26, a root mean square error of prediction (RMSEP) of 3.17%, and a bias of 0.03%. Whereas, the models developed from the nature samples and conditioned samples for yellow-green *Aspergillus* infection provided the very poor accuracy in prediction. The models for determination of aflatoxin developed from the treated spectra of both natural and conditioned samples provided the best accuracy in prediction (R^2= 93.73, RMSEP = 0.938 µg/kg, bias = 0.0147 µg/kg and R^2= 94.73, RMSEP = 415 µg/kg, bias = -54 µg/kg for natural samples and conditioned samples, respectively). Qualitative calibration models for discriminating fungal contaminated samples and non fungal contaminated samples were processed by classification methods (SIMCA and PLS-DA). The highest percentage of overall correct classification of 87.04 was obtained from the model developed by the NIR spectrum of rice single kernels in the wavelength range of 1801-2000 nm in which the NIRS absorbance values of fungal contaminated samples and non fungal contaminated samples were different.

Keywords : near infrared spectroscopy, aflatoxin, fungi, brown rice

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	6
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
รายการอ้างอิง	46

บทที่ 1

บทนำ

สารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารที่เกิดจากการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของราสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus* และ *A. parasiticus* อะฟลาทอกซินเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้เกิดพิษมีทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง มักพบปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดโดยเฉพาะธัญพืชต่างๆ รวมทั้งข้าวกล้องซึ่งเป็นข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย จึงได้รับความนิยมเพิ่มสูงขึ้นทั้งในและต่างประเทศ ข้าวกล้องเป็นสินค้าทางเกษตรที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้เช่นเดียวกับข้าว และผลิตผลทางการเกษตรประเภทธัญพืชชนิดอื่นๆ เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น อุณหภูมิสูง จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราที่สามารถผลิตสารพิษนี้

การตรวจวัดการปนเปื้อนของราในผลิตผลทางการเกษตรเป็นวิธีการหนึ่งที่จะบ่งชี้ความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อนของสารพิษจากราตามมา ซึ่งวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารนั้นนิยมใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ได้แก่ การนับจำนวนรา การคัดแยกราจากตัวอย่างอาหาร การจำแนกและระบุชนิดของราที่คัดแยกได้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการสังเกตจากลักษณะที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าและโครงสร้างของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แม้ว่าจะเป็นวิธีมาตรฐานแต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ ใช้เวลานานและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน เนื่องจากวิธีนี้มีความจำเพาะและมีความไวสูง สามารถใช้จัดจำแนกและระบุชนิดของรา ทั้งยังสามารถตรวจสอบราที่ปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรได้ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องความซับซ้อนของวิธีการในการวิเคราะห์ สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ และการเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด

การวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารมีขั้นตอนการวิเคราะห์ 3 ขั้นตอนหลัก ประกอบด้วย (1) การสกัดสารพิษจากราในตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลาย เช่น อะซีโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (2) การ clean up นิยมใช้ solid phase extraction (SPE) และ immunoaffinity column (IAC) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากสารสกัด (3) การวิเคราะห์สารพิษจากรา โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์และภูมิคุ้มกันวิทยา วิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography วิธีเหล่านี้มีความแม่นยำและความไวสูง แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากใช้สารเคมีปริมาณมาก และอุปกรณ์ในขั้นตอน clean up ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งเกิดปัญหาสารเคมีตกค้างซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และยังต้องอาศัยบุคคลากรที่มีความชำนาญในการวิเคราะห์ สำหรับวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) นิยมใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็ว ปัจจุบันเทคนิคนี้ถูกพัฒนาให้ใช้งานง่ายและรวดเร็วขึ้น อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ยังคงมีขั้นตอนเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ มีการใช้สารเคมีและเอนไซม์รวมไปถึงเครื่องมือหรือชุดสำเร็จที่มี

ความจำเพาะ ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และอาจประสบปัญหาความไม่เสถียรของน้ำยาที่ใช้ทดสอบเมื่อมีการทดสอบเป็นระยะเวลานาน

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (near infrared spectroscopy, NIRS) เป็นการใช้ประโยชน์ จากคลื่นเนียร์อินฟราเรดซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า มีความยาวคลื่นระหว่าง 800-2500 นาโนเมตร ข้อเด่นของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี คือ เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง สะดวกรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองงบประมาณในการวิเคราะห์ เนื่องจากไม่ใช้สารเคมีทำให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง อีกทั้งเทคโนโลยีนี้ยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

เนียร์อินฟราเรดเปกโทรสโกปีได้ถูกนำมาใช้เพื่อควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ยา เครื่องสำอาง การเกษตร อาหารและเครื่องดื่ม เป็นต้น ด้านอุตสาหกรรมการเกษตรรวมทั้งอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจไขมัน โปรตีน และความชื้นในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ นม และอาหารทะเล นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาสารเคมีอันตราย รวมทั้งราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร

งานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ในการตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในข้าว ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างข้าว 3 ชนิดรวมกัน ได้แก่ ข้าวขาว ข้าวกล้อง และข้าวหอมมะลิ มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาต่อไป โดยต้องปรับปรุงความถูกต้องและแม่นยำของแบบจำลองเพื่อให้นำไปประยุกต์ใช้ในจริง นอกจากนี้ ผลการทดลองยังยืนยันอย่างชัดเจนจากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด ว่าความชื้นมีอิทธิพลอย่างมากต่อการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าว และผลจากการศึกษาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวทั้ง 3 ชนิด พบว่า ข้าวกล้องมีการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินสูงที่สุด

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราโดยเฉพาะราที่ผลิตอะฟลาทอกซินและการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้อง ซึ่งจะพัฒนาแบบจำลองที่มีความถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดย 1) การใช้ช่วงความยาวคลื่นทั้งหมดของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) หรือความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) 2) การเพิ่มจำนวนตัวอย่างข้าวที่มีแหล่งที่มาแตกต่างกัน (ตัวอย่างปกติและตัวอย่างปรับสภาวะ) และ 3) การวิเคราะห์ค่าความชื้นของตัวอย่างข้าว

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ข้าวกล้อง

ข้าวกล้อง คือ ข้าวที่สีเอาเปลือก (แกลบ) ออกไป แต่ยังมีจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (รำ) อยู่ ซึ่งทำให้มีสารอาหารมากกว่าข้าวสารหรือข้าวขาว (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2553) ข้าวกล้องจึงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยโปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ มากกว่า 20 ชนิด และมีเส้นใยมากกว่าข้าวขาวถึง 15 เท่า มีปริมาณธาตุเหล็กและมีวิตามินบี 1 มากกว่าข้าวขาว 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Babu และคณะ, 2009) สารอาหารในข้าวกล้อง ได้แก่ โปรตีน วิตามิน เช่น วิตามินบีรวม วิตามินอี ไนอะซิน และเกลือแร่ต่างๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ทองแดง และสังกะสี ซึ่งช่วยให้ร่างกายทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ข้าวกล้องมีใยอาหารสูงช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้อีกด้วย (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2553) ข้าวกล้องจึงเป็นอาหารสุขภาพช่วยให้ร่างกายได้สารอาหารที่ครบถ้วน และรักษาสมดุลองค์รวมให้กับร่างกาย (นิตตา หงส์วิวัฒน์, 2552) ปัจจุบันผู้บริโภคจึงหันมาสนใจการบริโภคข้าวกล้องมากขึ้น

การส่งออกข้าวกล้องของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2556 มีปริมาณการส่งออกข้าวกล้องรวมทั้งสิ้น 65,906 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 1,648 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2557) ตลาดส่งออกข้าวกล้องที่สำคัญ ได้แก่ เอเชีย อเมริกา ยุโรป และแอฟริกา (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2554)

ความปลอดภัยของอาหารเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญของข้าวไทยที่ส่งออกไปต่างประเทศ ซึ่งนอกจากปัญหาเรื่องสิ่งปลอมปนแล้ว การปนเปื้อนของสารพิษจากราเป็นอีกหนึ่งประเด็นที่ต้องให้ความสำคัญ จากเว็บไซต์ของสมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย ปี พ.ศ. 2551 รายงานว่า Swedish Nation Food Administration ของประเทศสวีเดนตรวจพบระดับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบีรวม และอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวกล้องหอมมะลิ เท่ากับ 8 และ 7.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเกินกว่าค่าที่ประเทศสวีเดนกำหนดไว้ให้มีอะฟลาทอกซินบีรวม และอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ไม่เกิน 4 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2551) เหตุการณ์เช่นนี้ ทำให้ประเทศผู้นำเข้าลดความเชื่อมั่นในคุณภาพของข้าวไทย ดังนั้น จำเป็นต้องให้ความสำคัญอย่างยิ่งกับคุณภาพของข้าวที่ส่งออกไปโดยเฉพาะในด้านความปลอดภัยอาหาร

2.2 สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (mycotoxins) คือ สารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของราสายใย มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ อาหารและผลิตผลทางการเกษตรมักพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราที่สำคัญ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) โอคราทอก

ซิน (ochratoxin) ฟูมิโนซิน (fumonisin) ไตรโคเตอซิน (trichothecene) ซีราลีโนน (zearalenone) ซิทรินิน (citrinin) และพาทูลิน (patulin) (Castegnaro และ Pfohl-Leszkowicz, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนและเขตร้อนชื้น ซึ่งมีสภาพอากาศเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษของรา (Kumar และคณะ, 2008) ราในสกุล *Aspergillus, Penicillium*, *Fusarium, Claviceps* และ *Alternaria* เป็นราที่มีความสามารถผลิตสารพิษจากรา ราเหล่านี้พบได้ในธรรมชาติทั้งในอากาศและในดินที่เพาะปลูก และมีรายงานการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรบ่อยครั้ง (Castegnaro และ Pfohl-Leszkowicz, 2002) ตัวอย่างสินค้าทางการเกษตรที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารพิษจากรา ได้แก่ ธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าว บาร์เล่ย์ และข้าวโอ๊ต โกโก้ เครื่องเทศ เมล็ดน้ำมัน ถั่ว กาแฟ และผลไม้ นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร เช่น แป้ง ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ขนมปัง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์และไวน์ ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้วัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากราในการผลิต นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราในเนื้อหมูและสัตว์ปีกรวมถึงผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น ไข่ นม และเนยแข็ง (Jørgensen, 1998; Skaug, 1999; Chiavaro และคณะ, 2002) เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับสารพิษจากราเข้าไปในร่างกาย จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง สารพิษจากราบางชนิดก่อให้เกิดพิษรุนแรงต่อ ตับ พิษต่อเซลล์และระบบภูมิคุ้มกัน พิษต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อ พิษต่อไต ทำให้เกิดการผ่าเหล่าทางพันธุกรรมและที่ร้ายแรงที่สุด คือ เป็นสารก่อมะเร็ง (IARC, 2002)

2.3 อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins หรือ AFs)

อะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. flavus, A. parasiticus* และ *A. nominus* (Samson และคณะ, 2006; Rodrigues และคณะ, 2007) *A. flavus* เป็นราสายพันธุ์หลักที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (Reddy และ คณะ, 2005) รองลงมา คือ *A. parasiticus* ราทั้งสองชนิดนี้มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 32-33 องศาเซลเซียส (Pitt และ Hocking, 2009) นอกจากนี้ ยังพบว่ามี *Aspergillus* อีกหลายชนิดสามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้ เช่น *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. ochraceorseus* และ *A. rambellii* (Varga และคณะ, 2009) อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษจากราที่พบปนเปื้อนอยู่ในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืชและผลิตภัณฑ์แปรรูป ถั่วลิสง ผักและผลไม้แห้ง เช่น พริกแห้ง พริกไทย งา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ และถั่วต่างๆ รวมถึงอาหารแห้งที่มาจากสัตว์ เช่น ปลาแห้ง กุ้งแห้ง (Murphy และคณะ, 2006)

ในธรรมชาติ ราสามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้ 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบี 1, บี 2 ซึ่งเรืองแสงให้สีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และอะฟลาทอกซินจี 1, จี 2 เรืองแสงให้สีเขียว (Coppock และคณะ, 2012) เมื่ออะฟลาทอกซินบี 1 และ บี 2 เข้าสู่ร่างกายคนหรือสัตว์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารพิษเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และ เอ็ม 2 ซึ่งมักพบใน น้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Wu และคณะ, 2009) อะฟลาทอกซินเป็นสารพวกบิส-ฟิวราโน-ไอโซ คูมาริน (bisfurano-

isocumarin) โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน ความรุนแรงของการเกิดพิษขึ้นอยู่กับชนิดของพันธะโดยเฉพาะในวงแหวนที่ 1 และ 5 อะฟลาทอกซินบี 1 มีพิษรุนแรงมากที่สุด เพราะมีพันธะคู่ในวงแหวนที่ 1 และไม่มีวงแหวนแลคโตในวงแหวน ที่ 5 รองลงไป คือ อะฟลาทอกซินจี 1 อะฟลาทอกซินบี 2 และอะฟลาทอกซินจี 2 ตามลำดับ (Coppock และคณะ, 2012)

อาการเจ็บป่วยเนื่องจากการได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 คล้ายกับอาการเจ็บป่วยที่เกิดจากการได้รับสารพิษ ความรุนแรงของการเกิดพิษขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ร่างกายได้รับในระยะเวลาต่างๆ กัน รวมถึงการตอบสนองของร่างกายในแต่ละบุคคล อาการที่เกิดขึ้นอาจเป็นได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ส่วนใหญ่เป็นการได้รับพิษแบบเรื้อรัง คือ ร่างกายได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นระยะเวลามากกว่า 3 เดือนขึ้นไป ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ติดต่อกันระยะเวลานานๆ สำหรับการออกฤทธิ์แบบเฉียบพลันนั้น คือ การได้รับสารพิษเป็นระยะเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง อาจจะเกิดจากการฉีดสารพิษเข้าสู่ร่างกายหรือได้รับสารพิษปริมาณมากจากการกินอาหารที่ปนเปื้อน (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546)

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษจากราที่มีความเป็นพิษมากที่สุด International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารในกลุ่ม 1 คือ เป็นสารก่อมะเร็งในคน (IARC, 1993) ตับเป็นเป้าหมายหลักของสารพิษชนิดนี้ จากรายงานในประเทศจีน พบว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบที่บริโภคข้าวโพด ข้าว และถั่วที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 (ช่วง 0.3-128.1 ไมโครกรัมต่อกรัม) เป็นระยะเวลานาน มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับ 64 เปอร์เซ็นต์ (Wang และคณะ, 2001) จากการศึกษาของ Asim และคณะ (2011) พบว่า ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีในภาคเหนือของประเทศอินเดียมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับเพิ่มขึ้นสามเท่า เมื่อบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 และห้าเท่าเมื่อตรวจพบระดับอะฟลาทอกซินบี 1 ในน้ำปัสสาวะ

เนื่องจากอะฟลาทอกซินมีความสำคัญต่อสุขภาพของคนและสัตว์โดยตรง คณะกรรมาธิการยุโรป (EU) จึงออกข้อกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินในสินค้าเกษตรและอาหารหลายชนิด เช่น ธัญพืชและผลิตภัณฑ์แปรรูปธัญพืช ถั่วลิสง (อะฟลาทอกซินบี 1 ไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ข้าวโพด ข้าวและเครื่องเทศ (อะฟลาทอกซินบี 1 ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) นมดิบ (อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ไม่เกิน 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นต้น (Regulation (EU) No 165/2010) ส่วนในประเทศไทยมีข้อกำหนดเฉพาะอะฟลาทอกซินรวมทุกชนิดในอาหารทุกประเภทไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

2.4 การตรวจหาการปนเปื้อนของราและราที่ผลิตสารพิษในอาหาร

การตรวจหาราที่ผลิตสารพิษและสารพิษจากราตั้งแต่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต หรือระหว่างกระบวนการผลิต เป็นสิ่งสำคัญที่จะลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนสารพิษจากราในห่วงโซ่การผลิต วิธีการต่างๆได้รับการพัฒนาและนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของราในอาหาร ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีทางจุลชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่วิธีพื้นฐานที่ทำได้ง่าย เช่น วิธีการตรวจสอบหาการเจริญของราบนอาหารด้วยตาเปล่า หรืออาศัยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo

microscope) ซึ่งเหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนสูง การนับจำนวนราและการคัดแยกราจากตัวอย่างด้วยวิธี direct plating และ dilution plating การจำแนกและระบุชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization) ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) เช่น ลักษณะของ conidia, conidiophore และ conidial heads (Samson และคณะ, 2004, 2006; Pitt and Hocking, 2009) อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ต้องใช้เวลานานและต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ อีกทั้งยังมีปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานการทดสอบ รวมทั้งข้อผิดพลาดที่เกิดจากการเปื้อนปนระหว่างการทดสอบ (Atkins และ Clark, 2004)

ปัจจุบันวิธีการทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลถูกพัฒนามาใช้ในการตรวจหาการจำแนกราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง ทราบผลภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว (Paterson และคณะ, 2000; Niessen, 2007) ทำได้โดยการสกัดกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid; DNA) ของราจากอาหารโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการบ่มเพาะเลี้ยงรา เทคนิคนี้จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อมีการเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่ถูกต้อง ตัวอย่างยีนเป้าหมายที่นิยมใช้ เช่น 18srDNA, internal transcribed spacer (Van Dijk และคณะ, 2002) region, mitochondrial DNA และยีนสำหรับโปรตีนเฉพาะ (Somashekar และคณะ, 2004) เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของราสกุล *Aspergillus* (Geiser และคณะ, 2007; Samson และคณะ, 2006) และตรวจหาชนิดของ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร (Sartori และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของความซับซ้อนของวิธีการ ค่าใช้จ่ายในเรื่องเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ และการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อราแต่ละชนิด (Santos และคณะ, 2010)

2.5 การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษจากรา ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ คือ การสกัด การกำจัดสิ่งรบกวน และการวิเคราะห์

การสกัดเป็นการเอาสารพิษจากราออกมาจากตัวอย่างอาหารด้วยตัวทำละลาย เทคนิคการสกัดที่นิยมใช้ เช่น liquid-solid extraction เมื่อตัวอย่างเป็นของแข็ง เช่น ธัญพืช เป็นต้น และ liquid-liquid extraction สำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว (Turner และคณะ, 2009) สารตัวทำละลายที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นพวกสารละลายมีขั้ว เช่น อะซิโตไนไตรล์ เมทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์มเป็นต้น ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติทางเคมีของสารพิษจากราที่ต้องการสกัด (Turner และคณะ, 2009)

การกำจัดสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเป็นการแยกสารขั้นต้นและเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ วิธีที่นิยมใช้ในการกำจัดสิ่งรบกวน เช่น immunoaffinity column (IAC) ซึ่งใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย สำหรับการกำจัดสิ่งรบกวนในการวิเคราะห์สารพิษจากรา โดยอาศัยหลักการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน โดยแอนติบอดีของสารพิษจากราจะถูกตรึงอยู่บนของแข็งยึดเกาะ (solid support) เช่น agarose gel ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก (Magdeldi และ Moser,

2012) ดังนั้น IAC จึงมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตาม IAC ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของราคา ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เพราะแอนติบอดีจะเสียสภาพจากตัวทำละลายที่ใช้ชะเอาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ (Moser และ Hage, 2010)

การวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น thin-layer chromatography (TLC) เป็นวิธีที่แรกที่นำมาใช้ตรวจอะฟลาทอกซิน (Marutoiu และคณะ, 2004) ซึ่งทำได้ง่าย จึงนิยมใช้เป็นวิธีการสำหรับงานประจำของห้องปฏิบัติการต่างๆ (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2555), hight-performance liquid chromatography (HPLC) และ gas chromatography (GC) ควบคู่กับการใช้ fluorescence detector หรือ mass spectrometry (MS) (Turner และคณะ, 2009) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำสูงและเชื่อถือได้ (Jaimez และคณะ, 2000) แต่มีข้อเสียในส่วนของขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างก่อนและระหว่างการวิเคราะห์ ใช้สารเคมีจำนวนมาก (พิไล และคณะ, 2551) ค่าใช้จ่ายสูง และต้องการผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ

นอกจากนี้ ยังมีวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบันโดยเฉพาะวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Reiter และคณะ, 2010) เป็นการใช้ปฏิกิริยาที่เฉพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์ เพื่อช่วยให้สังเกตสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ซึ่ง แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ซึ่งชุดทดสอบ ELISA มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีเคมีวิเคราะห์ เพราะไม่ต้องใช้ปริมาณตัวอย่างที่มาก ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวน ใช้ง่าย สะดวกรวดเร็ว นอกจากนี้ ยังมีความจำเพาะและความไวและยังสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารคนและสัตว์นอกห้องปฏิบัติการได้ ปัจจุบันชุดทดสอบ ELISA มีหลายชนิดในหลายรูปแบบ ทั้งที่เป็นแบบการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เชิงกึ่งปริมาณ และเชิงปริมาณ (Pascale, 2009) แต่มีข้อเสียในเรื่องของราคาแพงและระยะเวลาในการใช้งานจำกัด (Abbas และคณะ, 2004)

2.6 เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy: NIRS)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสสารในช่วงย่านใกล้อินฟราเรดที่มีความยาวคลื่น 780-2500 นาโนเมตร สสารที่เกิดอันตรกิริยากับคลื่นเนียร์อินฟราเรดได้ คือสสารที่โมเลกุลประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน เช่น C-H, O-H, N-H, และ S-H ซึ่งการดูดกลืนคลื่น NIR จะส่งผลต่อการสั่นสะเทือนของพันธะต่างๆในโมเลกุล และระดับการดูดกลืนคลื่น NIR ของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ นี้จะปรากฏในรูปแบบสเปกตรัมเพื่อนำไปประมวลผลในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร อุตสาหกรรมเคมีและปิโตรเลียม อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอและโพลิเมอร์ และอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ เพื่อควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิตตั้งแต่วัตถุดิบจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้าย (วารุณี ธนะแพสย์, 2552) ข้อดีของการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี คือ ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่ถูกทำลาย การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก จึงสะดวก รวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ค่าทางเคมีต่างๆ ที่ต้องการได้ในเวลาเดียว (Huang และคณะ, 2008)

ในอุตสาหกรรมเกษตรเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของอาหารและผลิตผลทางการเกษตรที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น โปรตีนในข้าว (Zhang และคณะ, 2007) ปริมาณเพคตินในสาลี่ญี่ปุ่น (Sirisomboon และคณะ, 2007) ปริมาณน้ำตาล ในผลไม้ (Camps และ Christen, 2009) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) ของน้ำผึ้ง (Sirisomboon และ Howvimanporn, 2009) น้ำมันหอมระเหยที่เปลือกส้มโอ (Sirisomboon และ Duangchang, 2009) แบคทีเรียในน้ำผลไม้ (Al-Holy และคณะ, 2006) และหาประมาณเกลือในปลาซาดีนในน้ำมัน (Srikornkarn และ Sirisomboon, 2014)

นอกจากนี้ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปียังถูกนำมาประยุกต์เพื่อการตรวจหาราสายใยในและสารพิษจากราในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด

Berardo และคณะ (2005) ใช้เนียร์อินฟราเรดสปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในข้าวโพด พบว่าสามารถใช้ทำนายการปนเปื้อนของรา *Fusarium verticillioides* ปริมาณของเออร์โกสเทอรอลและฟูโมไนซินบี 1 ได้อย่างแม่นยำด้วยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.78, 0.81 และ 0.78 ตามลำดับ

Hernández Hierro และคณะ (2008) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษจากรา 3 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินรวม อะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอในพริก ได้แบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) เท่ากับ 0.938, 0.955 และ 0.853 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายอยู่ในเกณฑ์ที่แม่นยำ

Tripathi และ Mishra (2009) ได้ศึกษาการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาทำนายระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่น ได้แบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.98 ซึ่งสามารถใช้ทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่นในช่วง 15 -500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้อย่างแม่นยำ

Gaspardo และคณะ (2012) ได้รายงานความเป็นไปได้ในการใช้ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT - NIR) ในการตรวจหาปริมาณของฟูโมนิซินบี 1 และบี 2 ในข้าวโพด ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดยกกำลังสองเฉลี่ยของแบบจำลองแคลิเบรชั่น (*RMSEC*) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างแบบจำลอง (*SEC*) เท่ากับ 0.964, 0.630 และ 0.632 ตามลำดับ

Dachoupakan Sirisomboon และคณะ (2013) ได้รายงานความเป็นไปได้ในการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ในการตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว

บทที่ 3

วิธีดำเนินงาน

ขั้นตอนงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง
2. การเตรียมตัวอย่าง
   ตัวอย่างข้าวกล้องปกติ
   ตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ
   ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว
3. การสแกนตัวอย่าง
4. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
5. การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
6. การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างข้าวกล้อง 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวกล้องหอมนิล และ ข้าวกล้องหอมแดง สุ่มเก็บตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดในช่วงปี พ.ศ. 2556-2557 จากห้างสรรพสินค้า ตลาดสด และโรงสีข้าวหรือโกดัง จำนวน 150 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1-2 กิโลกรัม เก็บรักษาตัวอย่างในถุงพลาสติก และใส่กล่องที่มีฝาปิดสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอทำการทดลองขั้นต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่าง

2.1 ตัวอย่างข้าวกล้องปกติ คือ ตัวอย่างข้าวทั้งหมดที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อที่ 1 เป็นตัวอย่างข้าวที่มีการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินตามธรรมชาติ จำนวน 150 ตัวอย่าง

2.2 ตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ คือ ตัวอย่างข้าวที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อที่ 1 จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อให้ตัวอย่างมีความหลากหลายของค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ โดยนำข้าวแต่ละตัวอย่างนำมาปรับสภาวะ ดังนี้

ไม่เติมสารแขวนลอยสปอร์ - ความชื้นปกติ, ปรับความชื้นเป็น 14% และ 18% บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เติมสารแขวนลอยสปอร์ (10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) - ความชื้นปกติ, ปรับความชื้นเป็น 14% และ 18% บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

2.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ทำได้โดยนำ *Aspergillus flavus* M3T8R4G3 ซึ่งสามารถผลิตอะฟลาทอกซินมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7

วัน เก็บสปอร์ โดยใช้ 0.85% NaCl + 0.01% Tween 80 ปลอดเชื้อ เจือจางให้มีจำนวนสปอร์ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมีเตอร์ในการนับสปอร์

2.2.2 การปรับความชื้นของข้าว

2.2.2.1 การวิเคราะห์ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (moisture content initial, M_{Ci})

ชั่งน้ำหนักข้าวกล้องหอมมะลิ 5 กรัม ใส่ในถ้วยอลูมิเนียม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130±3 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้น ใส่ในเดซิกเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที (AOAC, 1990) ชั่งน้ำหนักข้าวหลังผ่านการอบ นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\%M_{ci} = \frac{(E - m) \times 100}{E}$$

โดย M_{ci} คือ ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์ฐานเปียก)
E คือ น้ำหนักข้าวก่อนอบ (กรัม)
m คือ น้ำหนักข้าวหลังอบ (กรัม)

2.2.2.2 การปรับความชื้นของข้าว

ชั่งน้ำหนักข้าวกล้องตามปริมาณที่ใช้ในการทดลอง นำน้ำหนักข้าวก่อนอบ หลังอบ และความชื้นเริ่มต้นของข้าวกล้องจากข้อ 2.2.2.1 ไปคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงในข้าวกล้องตามสูตร

$$w_w = w_f - w_i$$

$$w_f = \left(\frac{1 - M_{ci}}{1 - M_{cf}}\right) w_i$$

โดย w_w คือ ปริมาณน้ำที่ต้องเตรียมลงไป (กรัม)
w_f คือ น้ำหนักข้าวรวมกับน้ำหนักน้ำ (กรัม)
M_{ci} คือ ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์ฐานเปียก)
M_{cf} คือ ความชื้นของข้าวที่ต้องการ (เปอร์เซ็นต์ฐานเปียก)
w_i คือ น้ำหนักเมล็ดข้าวเริ่มต้น (กรัม)

โดยค่า $\%M_{cf}$ ที่ต้องการได้แก่ 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น เติมน้ำตามปริมาตรที่คำนวณได้ลงในข้าวกล้อง คลุกเคล้าให้น้ำกระจายอย่างทั่วถึงภายในกล่องที่ปิดสนิท นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คลุกข้าวให้เข้ากันทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน แบ่งข้าวใส่จานเลี้ยงเชื้อสำหรับทดลองในขั้นต่อไป

เมื่อปรับสภาวะแล้วจะมีตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะทั้งหมดจำนวน 120 ตัวอย่าง เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ครบ 14 วัน ตัวอย่างจะถูกนำไปสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดทันที

2.3 ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว

นำข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ด จากนั้นแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดแรกจุ่มเมล็ดข้าวกล้องลงในสารแขวนลอยสปอร์ของ *A. flavus* M3T8R4G3 เข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นาน 2 นาที และชุดที่สองจุ่มในสารละลายที่ไม่มีสปอร์รา นาน 2 นาที แล้วนำไปวางบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้น นำไปสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 5 ของการบ่ม

3. การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

3.1 ตัวอย่างข้าวกล้องปกติและข้าวกล้องปรับสภาวะ

นำตัวอย่างข้าวกล้อง 150 กรัม ใส่ในอุปกรณ์สำหรับสแกนตัวอย่างซึ่งก้นของภาชนะทำด้วยควอทซ์ จากนั้น นำไปสแกนด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) โดยวางบนตำแหน่งรับคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ในแบบ diffuse reflectance ที่ความละเอียด 8 cm^{-1} ตัวอย่างข้าวกล้อง 1 ตัวอย่าง ทำการสแกนตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง หลังจากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการทันที

3.2 ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว

นำตัวอย่างแบบเมล็ดเดียวไปสแกนด้วยเครื่อง FT-NIR Spectrometer รุ่น NIRFlex Solids (Buchi, Switzerland) บรรจุตัวอย่างลงในถาดใส่ข้าวแบบ 6 หลุม ที่มีฝาครอบทำจากโลหะเคลือบด้วยทองคำ โดยวางบนตำแหน่งรับคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 cm^{-1} (ความยาวคลื่นประมาณ 1000-2500 นาโนเมตร) วัดในระบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance mode) ที่ความละเอียด 16 cm^{-1} เก็บข้อมูล ด้วยโปรแกรม NIRWare Operator นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางเคโมเมทริกซ์ต่อไป จากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการทันที

4. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

4.1 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างด้วยวิธี Direct plating

สุ่มหยิบเมล็ดข้าวกล้องปกติและข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่ผ่านการสแกนแล้วตามวิธีในข้อ 3.1 จำนวน 50 เมล็ด ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้ววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DG18 (Dichloran Glycerol Agar) โดยวาง 10 เมล็ด ต่อจานเพาะเชื้อ ด้วยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนเมล็ดข้าวที่พบการเจริญของราทั้งหมดและราที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลือง แล้วนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา

4.2 การตรวจสอบการเจริญของราในตัวอย่างข้าวเมล็ดเดี่ยวด้วยวิธี Direct examination

หยิบเมล็ดข้าวกล้องที่ผ่านการสแกนตามวิธีในข้อ 3.2 มาตรวจสอบการเจริญของราด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป โดยสังเกตุการเจริญของสายใยและการสร้างสปอร์ราบนเมล็ดข้าว

4.3 การวัดความชื้นของตัวอย่าง

นำตัวอย่างข้าวกล้องปกติประมาณ 5±1 กรัม ใส่ถ้วยอบที่มีฝาปิด จำนวน 2 ถ้วย ต่อ 1 ตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักก่อนอบด้วยเครื่องชั่ง (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 130±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120±5 นาที โดยการเปิดฝาถ้วยอบไว้ เมื่อครบเวลาจึงปิดฝาถ้วยอบ แล้วนำไปใส่ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้น ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังอบด้วยเครื่องชั่ง (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่าง ดังสมการ

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักถ้วยอบ}} \times 100$$

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง

4.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยใช้หลักการ ELISA

สกัดอะฟลาทอกซินโดยนำตัวอย่างข้าวที่ผ่านการสแกนด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์แล้วมาปั่นให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างข้าวที่บดแล้วจำนวน 10 กรัม ลงในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท จากนั้น เติมเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 7:3 (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะที่ใส่ให้สนิท เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วย ELISA โดยใช้ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Veratox® for aflatoxin) ซึ่งได้รับการยอมรับจาก USDA/GIPSA#2008-111 และ AOAC-RI050901 โดยนำสารสกัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลายคอนจูเกตปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงใน Antibody-coated Well บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง เคาะน้ำที่อยู่ในหลุมออกจนหมด แล้วเติม substrate solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่านาน 10-20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วเติม red stop solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate อ่านค่าความเข้มข้นของแสงผ่านเลนส์กรองแสง 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแสงของตัวอย่างกับชุดควบคุม (0, 5, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

4.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยใช้วิธี HPLC

นำตัวอย่างข้าวที่ผ่านการสแกนด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์มาชั่ง 50 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม และสารละลายเมทานอลที่ผสมน้ำปลอดประจุ (เมทานอล : น้ำปลอดประจุ ในอัตราส่วน 80 : 20) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นที่ความ เร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำส่วนน้ำใส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ดูดสารละลายตัวอย่างเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในกระบอกฉีดยาที่ต่ออยู่กับอิมมูโนแอฟ

ฟินิตีคอลัมน์ (immunoaffinity column) (AflaTest, VICAM, USA) ปรับให้มีอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อล้างคอลัมน์ จากนั้น เติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อชะสารอะฟลาทอกซินออกจากคอลัมน์ ระเหยเมทานอลด้วยแก๊สไนโตรเจนในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท แล้วเติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตไนไตรล์ : น้ำปลอดประจุ : เมทานอล ในอัตราส่วน 20 : 60 : 20) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กรองสารที่สกัดได้ด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยวิธี HPLC ทันที

5. การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดและวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่

ตัวอย่างข้าวกล้องปกติ

- ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด
- ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลือง
- ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น
- ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน

ตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะ

- ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด
- ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลือง
- ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน

โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0.129 ทั้งนี้ใช้ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นหรือที่มีการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีทางคณิตศาสตร์ เช่น constant offset elimination, straight line subtraction, vector normalization (SNV), min-max normalization, multiplicative scattering correction, first derivative, second derivative, first derivative + straight line subtraction, first derivative + SNV และ first derivative + MSC แล้วโปรแกรมจะคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดจากคอมบิเนชั่นของวิธรการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น ช่วงจำนวนคลื่นต่างๆ และจำนวน PLS Factor ที่ให้ค่า (root mean square error of calibration; RMSEC) ต่ำที่สุด แล้วจึงพิสูจน์แบบจำลอง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) และค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของชุดทดสอบแบบจำลอง (root mean square error of prediction; RMSEP) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (bias) ค่าอัตราส่วนระหว่างค่าความผิดพลาดเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ratio of standard error of validation to standard deviation; RPD) และบันทึกค่า regression coefficient ที่จำนวนช่วงคลื่นต่างๆ

6. การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

สร้างแบบจำลองเชิงคุณภาพของตัวอย่างที่ปนเปื้อนราทั้งหมด ราเขียวอมเหลือง และอะฟลาทอกซิน โดยการสร้าง Classification model ด้วยวิธี PCA (Principal Component Analysis), SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) และ PLS-DA (Partial Least Square – Discriminant Analysis) เมื่อได้แบบจำลองแล้วนำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลองและคัดเลือกแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด

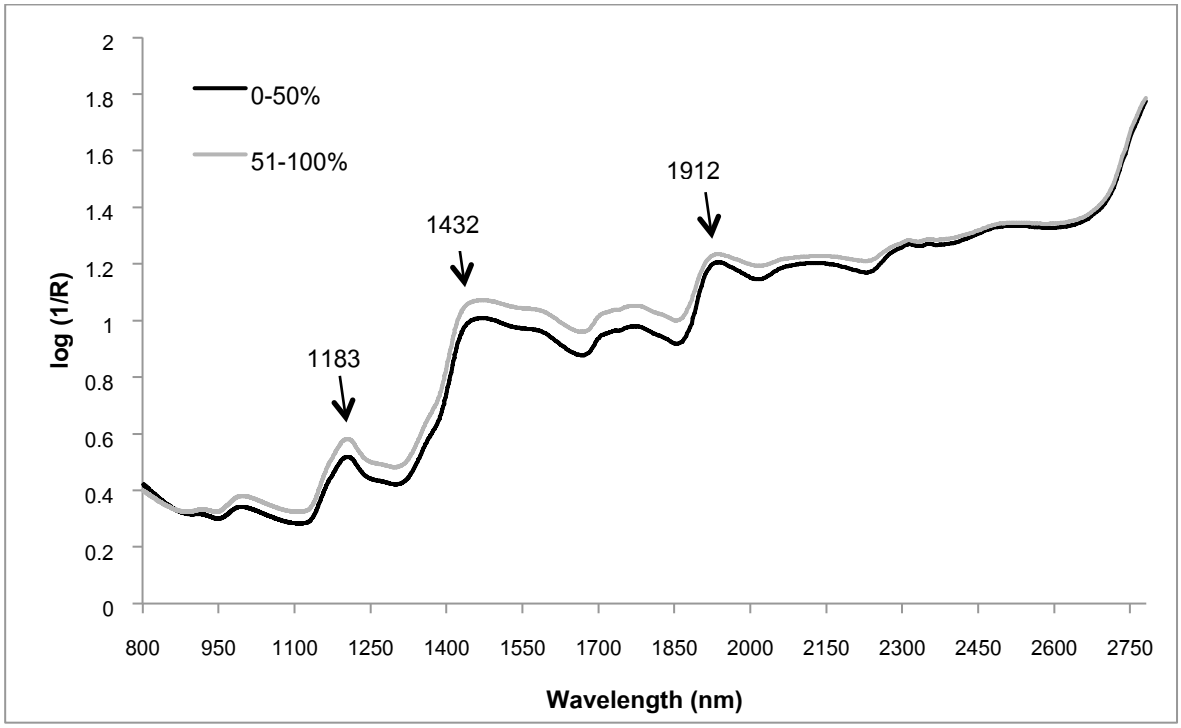
บทที่ 4

ผลการทดลอง

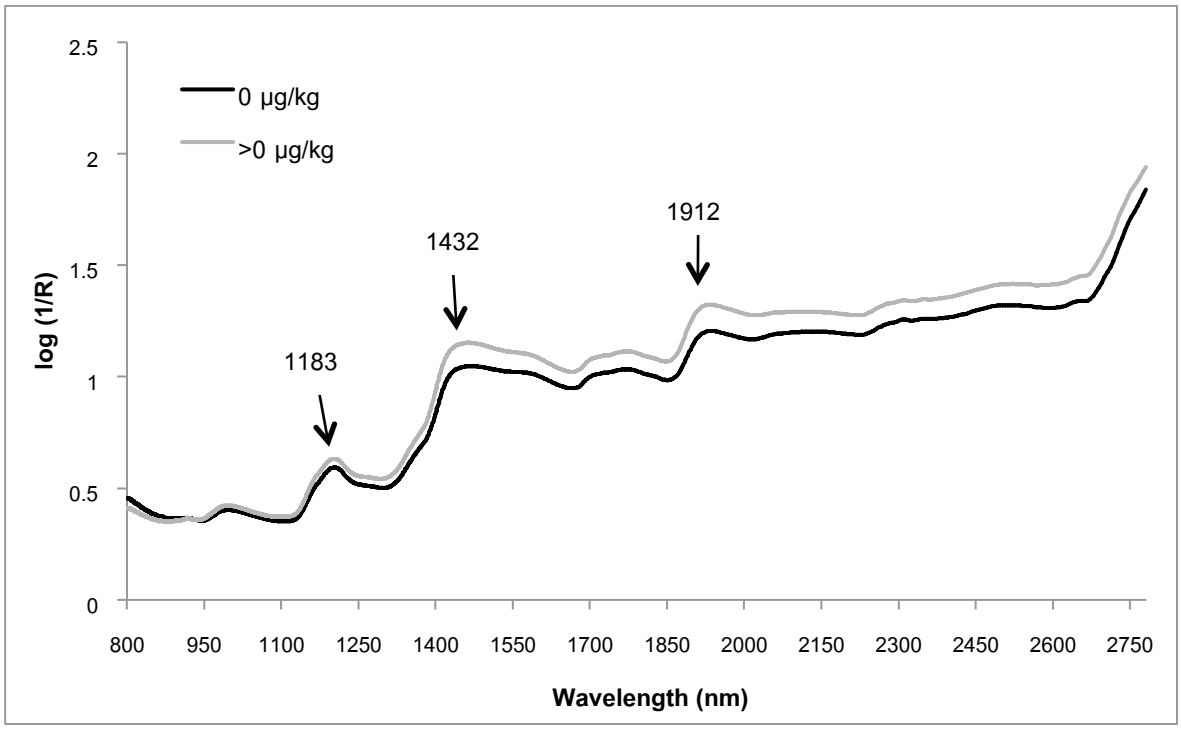
4.1 ลักษณะสเปกตรัม

4.1.1 ลักษณะสเปกตรัมของข้าวกล้องปกติ

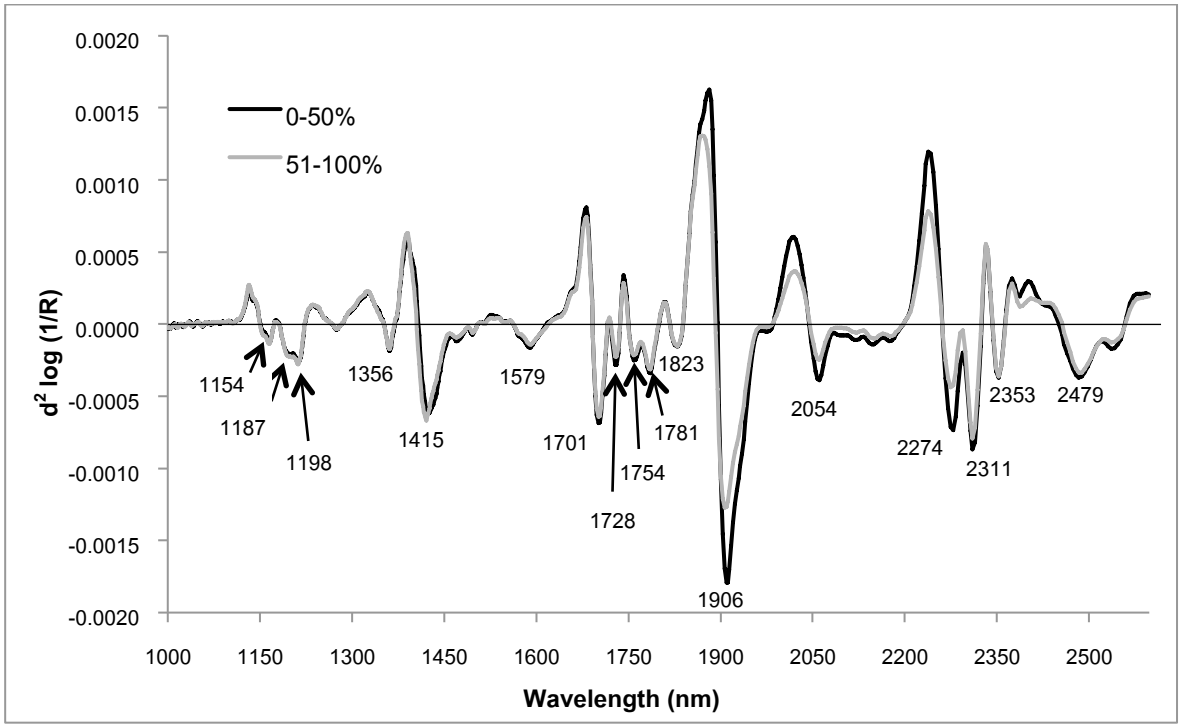
การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องปกติ จำนวน 150 ตัวอย่าง (300 ตัวอย่างย่อย) ด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (12500-4000 cm^{-1}) ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยที่ไม่ได้ปรับแต่งแสดงในรูปที่ 1 และ 2 พบว่า ตัวอย่างข้าวทั้งหมดที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อต่างกัน หรือมีปริมาณอะฟลาทอกซินต่างกัน มีลักษณะของสเปกตรัมที่รูปแบบเหมือนกัน และเมื่อปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative พบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกัน และปรากฏพีคที่สำคัญเหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4 จากรูปดังกล่าวปรากฏ พีคที่สำคัญ เช่น พีคที่ 1415, 1726 และ 2311 นาโนเมตร เป็นการดูดซับคลื่นของ CH_2 (2 × C-H stretch + C-H deformation, C-H stretch first overtone, และ C-H stretch + C-H deformation ตามลำดับ) พีคที่ 1154, 1187, 1356 และ 1701 นาโนเมตร เป็นการดูดซับคลื่นของ CH_3 (C-H stretch second overtone, C-H stretch second overtone, 2 × C-H stretch + C-H deformation และ C-H stretch first overtone ตามลำดับ) พีคที่ 1579 เป็นการดูดซับคลื่นของ starch และ glucose (O-H stretch first overtone (intermol. H-bond)) พีคที่ 1781, 1823 และ 2353 นาโนเมตร เป็นการดูดซับคลื่น ของ cellulose (C-H stretch first overtone, O-H stretch + 2 × C-O stretch และ C-H deformation second overtone ตามลำดับ) พีคที่ 1901 นาโนเมตร เป็นการดูดซับคลื่นของ starch (O-H stretch + 2 × C-O stretch) หรือ $–CO_2H$ (C=O stretch second overtone) พีคที่ 2274 และ 2483 นาโนเมตร เป็นการดูดซับคลื่นของ starch (O-H stretch + C-C stretch และ C-H stretch + C-C stretch ตามลำดับ และพีคที่ 2054 นาโนเมตร เป็นการดูดซับคลื่นของ protein (N-H Symmetrical stretch + amide II) หรือ $CONH_2$ (N-H Asymmetrical stretch + amide III) (Osborne and Fearn, 1986)



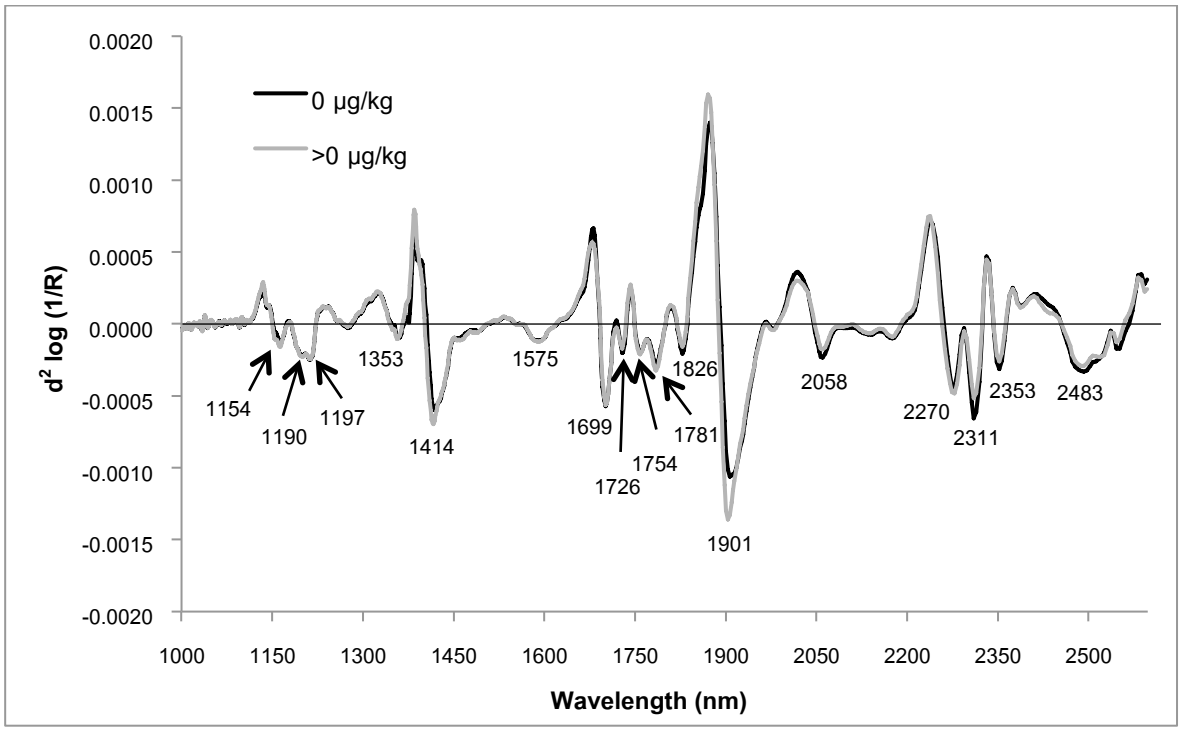
รูปที่ 1. สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดที่มากกว่า 50% และน้อยกว่า 50%



รูปที่ 2. สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0 และมากกว่า 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



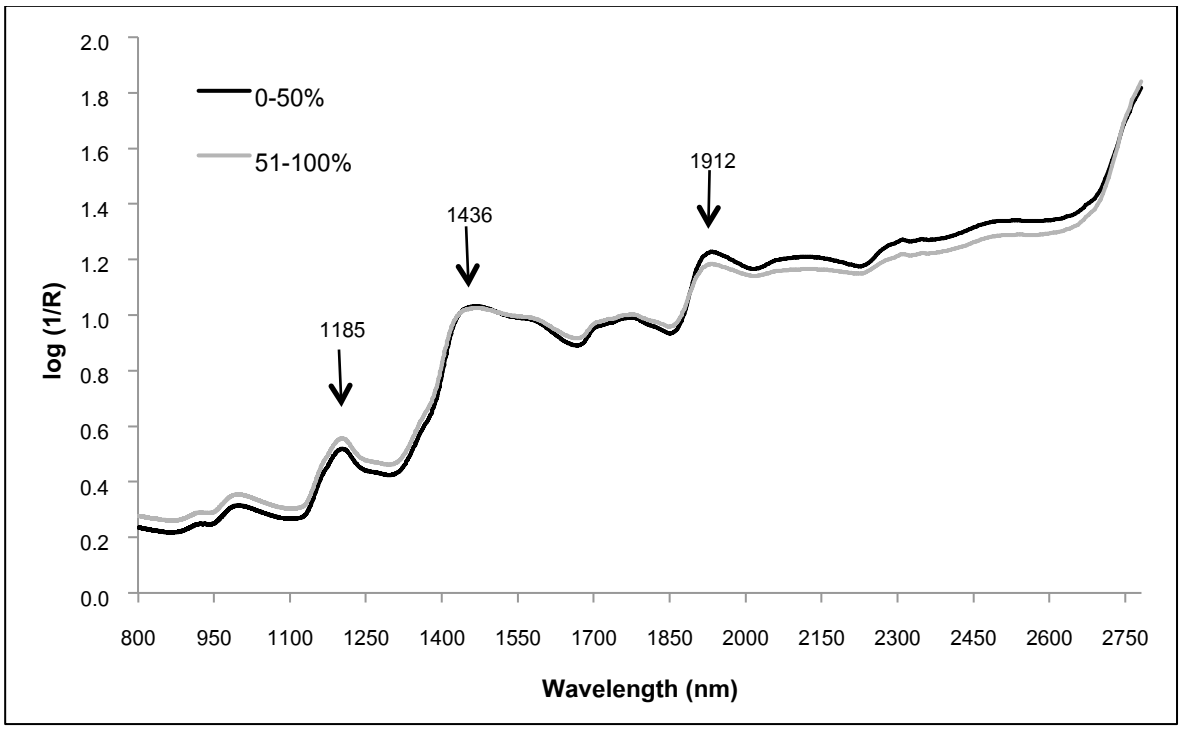
รูปที่ 3. สเปกตรัมที่ได้จากการปรับแต่งด้วยวิธี Second derivative ของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดมากกว่าและน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



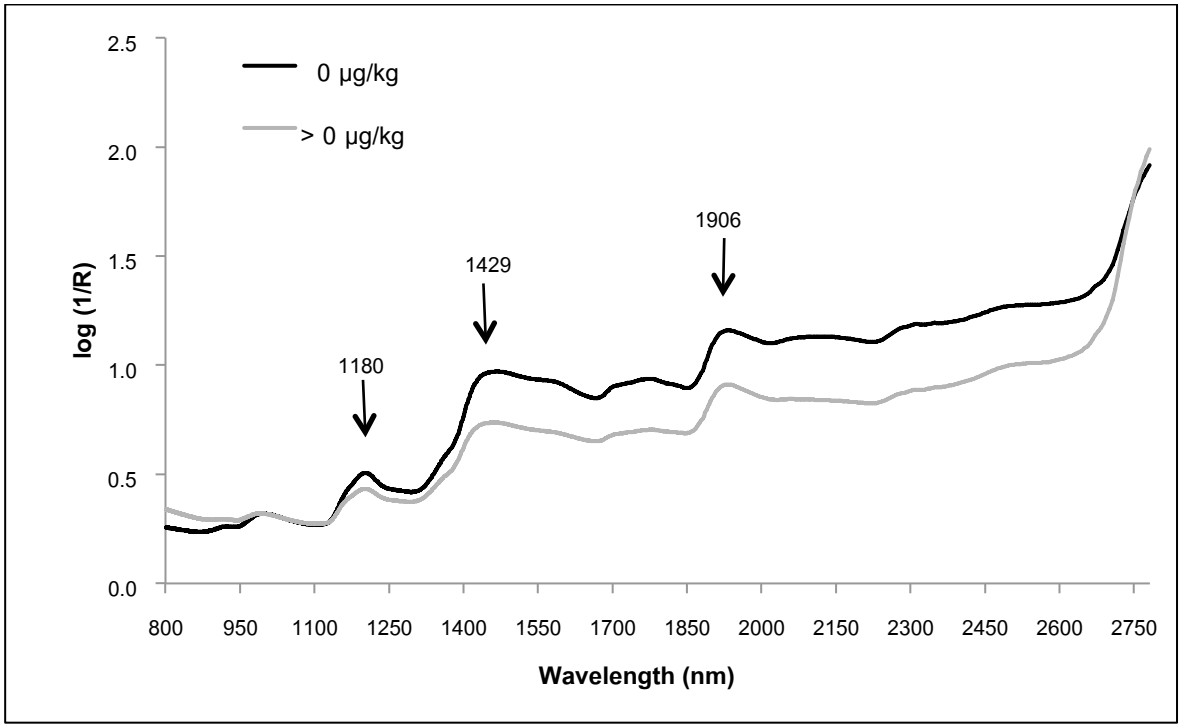
รูปที่ 4. สเปกตรัมที่ได้จากการปรับแต่งด้วยวิธี Second derivative ของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0 และมากกว่า 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

4.1.2 ลักษณะสเปกตรัมของข้าวกล้องปรับสภาวะ

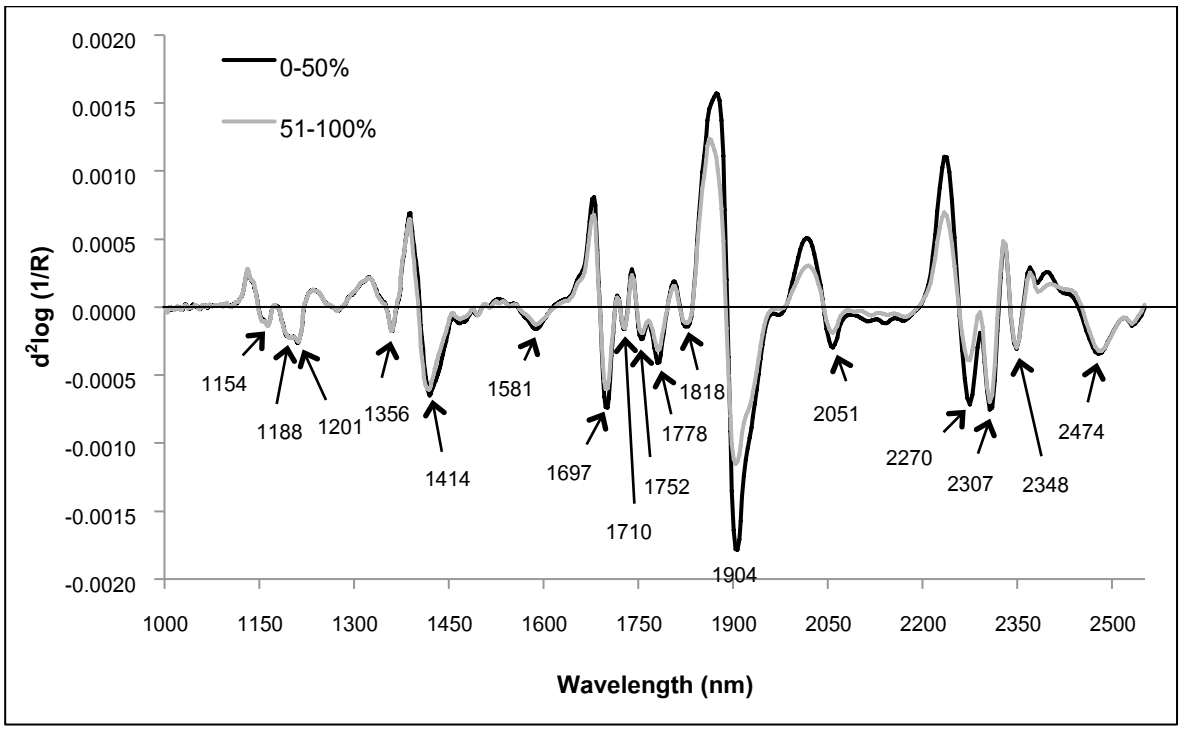
การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะจำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) ด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 800-2500 นาโนเมตร ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยที่ไม่ได้ปรับแต่งแสดงในรูปที่ 5 และ 6 พบว่า ลักษณะของสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวทั้งหมดที่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อต่างกันหรือปริมาณอะฟลาทอกซินต่างกันมีรูปแบบไม่ต่างกัน และมีลักษณะคล้ายกับสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวปกติและเมื่อพิจารณาผลของการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative (รูปที่ 7 และ 8) พบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงและปรากฏพีคที่สำคัญเช่นเดียวกับตัวอย่างข้าวปกติ เช่น พีคที่ 1414 1697 1904 2270 และ 2307 เป็นต้น



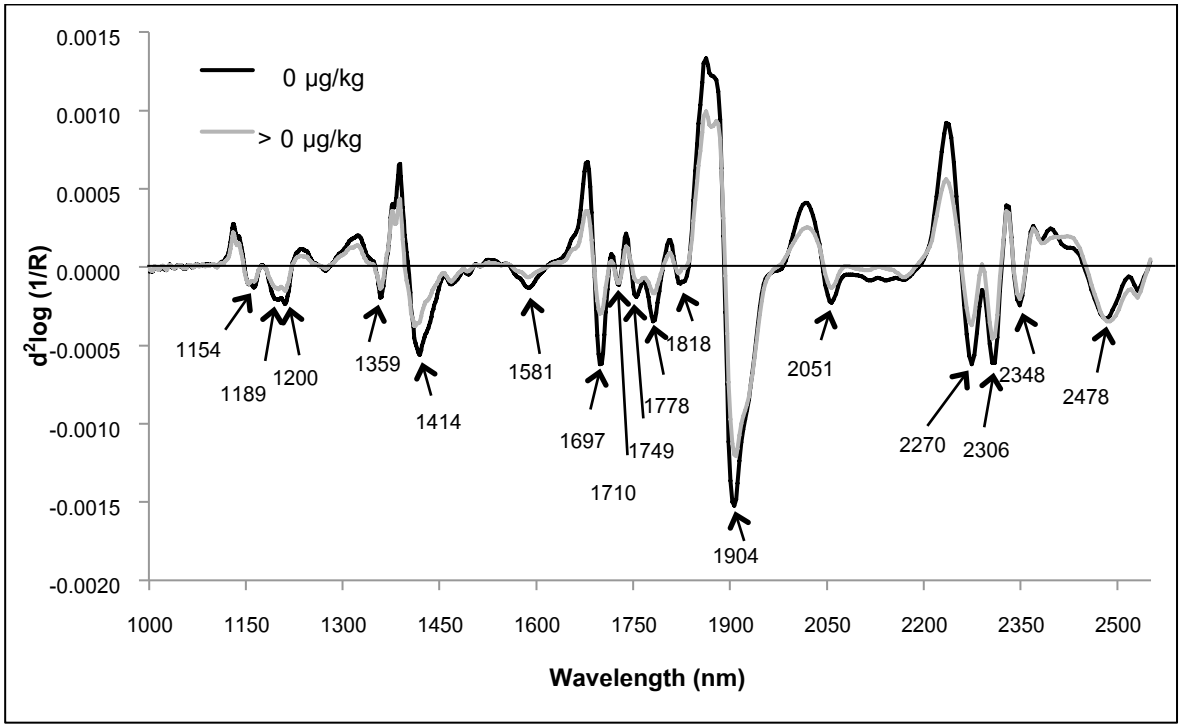
รูปที่ 5. สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดที่มากกว่า 50% และน้อยกว่า 50%



รูปที่ 6. สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่มีค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0 และมากกว่า 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 7. สเปกตรัมที่ได้จากการปรับแต่งด้วยวิธี Second derivative ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดมากกว่าและน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 8. สเปกตรัมที่ได้จากการปรับแต่งด้วยวิธี Second derivative ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่มีค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0 และมากกว่า 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

4.2 ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลือง เปอร์เซ็นต์ความชื้น ในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ 150 ตัวอย่าง และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ 100 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนของราทั้งหมดสูง ด้วยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดเท่ากับ 95.21 ± 10.72% ในขณะที่การปนเปื้อนของราเขียวอมเหลืองซึ่งเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินต่ำ (11.73±15.21%) เช่นเดียวกับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.88 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณความชื้นใกล้เคียงกัน (11.01 ±0.81%)

ตารางที่ 1. ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้องปกติ

Parameters	Min	Max	Mean	SD
Total fungi infection (%)	36.00	100.00	95.21	10.72
Yellow-green fungi infection (%)	0.00	94.00	11.73	15.21
Moisture content (%)	8.29	12.64	11.01	0.81
Aflatoxin concentration (μg/kg)	0.00	54.55	1.88	7.08

ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวปรับสภาวะ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลือง และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน แสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อปรับสภาวะของข้าวทำให้การปนเปื้อนของราทั้งหมด การปนเปื้อนของราเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินเพิ่มสูงขึ้น ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่า เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และราเขียวอมเหลือง เท่ากับ 93.19% และ 56.02% ตามลำดับ และมีปริมาณอะฟลาทอกซินเฉลี่ย 459.27 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 2. ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ

Parameters	**Min**	**Max**	**Mean**	**SD**
Total fungi infection (%)	2.00	100.00	93.19	17.23
Yellow-green fungi infection (%)	0.00	100.00	56.02	40.23
Aflatoxin concentration (μg/kg)	0.00	18,300.00	459.27	1,866.00

4.3 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

4.3.1 ข้าวกล้องปกติ

ค่าสถิติของการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้องปกติ (ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลือง ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน) ที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองโดยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) แสดงในตารางที่ 3

ผลการสร้างแบบจำลองของตัวอย่างข้าวกล้องปกติจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด และข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการแสดงในตารางที่ 4.

ตารางที่ 3. ข้อมูลทางสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลือง เปอร์เซ็นต์ความชื้น และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องปกติสำหรับสร้างแบบจำลอง ที่ตัดค่าผิดปกติออกแล้ว

Parameters	Calibration set					Test set				
	n	Min	Max	Mean	SD	n	Min	Max	Mean	SD
Total fungi (%)*	540	36.00	100.00	95.97	10.16	328	38.00	100.00	96.26	9.30
Yellow-green fungi (%)**	508	0.00	100.00	28.41	33.35	515	0.00	100.00	27.71	32.90
Moisture content (%)**	445	8.29	12.48	10.96	0.83	441	8.31	12.53	11.04	0.79
Aflatoxin concentration (μg/kg)**	273	0.00	13.28	3.50	3.72	265	0.00	13.16	3.49	3.75

หมายเหตุ : * สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างใน Calibration set : Test set = 60 : 40

** สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างใน Calibration set : Test set = 50 : 50

ตารางที่ 4. ผลของการทำ PLS regression จากตัวอย่างข้าวกล้องปกติ

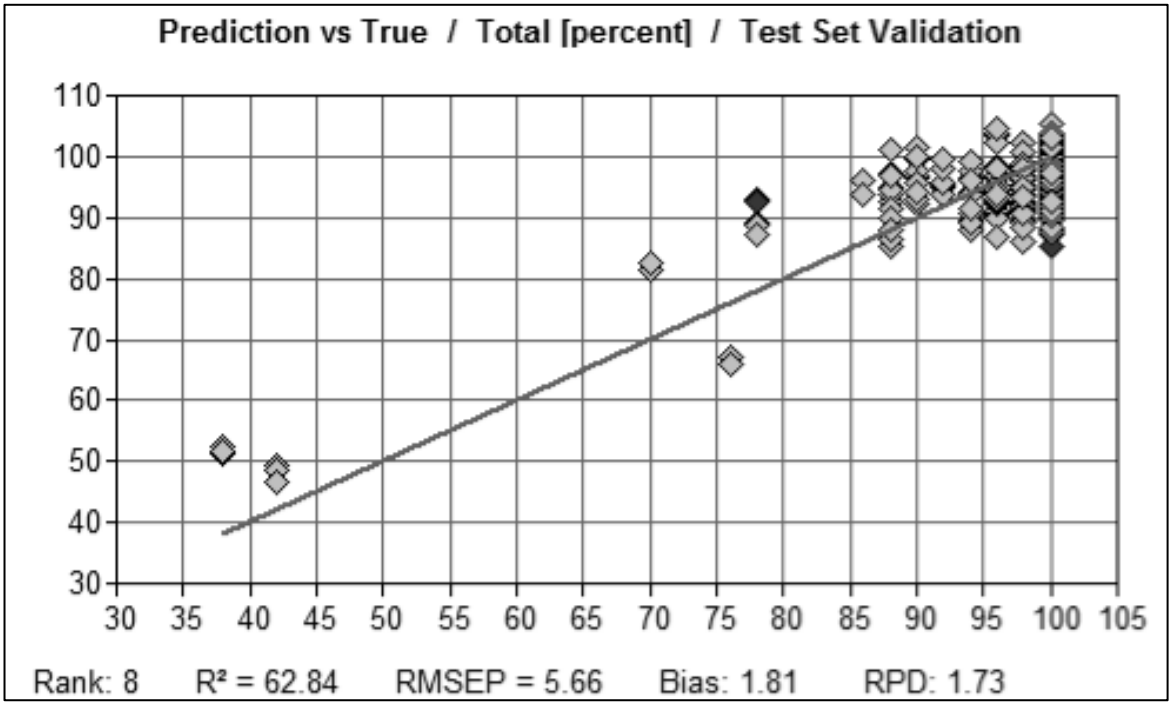
Parameters	wave number range	Pre-processing	Rank	R^2	RMSEP	RPD	Bias
Total fungi infection (%)	5454-4597.1	First derivative + Straight line subtraction (17 Pts.)	8	62.84	5.66	1.73	1.81
Yellow-green infection (%)	9403.8-6094.3 5454-4242.9	Vector normalization (SNV)	10	64.81	19.5	1.71	3.05
Moisture content (%)	9403.8-7498.3 5454-4242.9	Straight line subtraction	9	93.09	0.206	3.83	0.0219
Aflatoxin concentration (μg/kg)	5453.8-4597.6	First derivative (17 Pts.)	5	93.73	0.938	3.99	0.0147

จากตารางที่ 4. แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี First derivative + Straight line subtraction (17 Pts.) ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) เท่ากับ 62.84 ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของชุดทดสอบแบบจำลอง (root mean squared error of prediction; RMSEP) เท่ากับ 5.66 เปอร์เซ็นต์, bias เท่ากับ 1.81 เปอร์เซ็นต์ และ RPD เท่ากับ 1.73 การเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากห้องปฏิบัติการแสดงในรูปที่ 9.

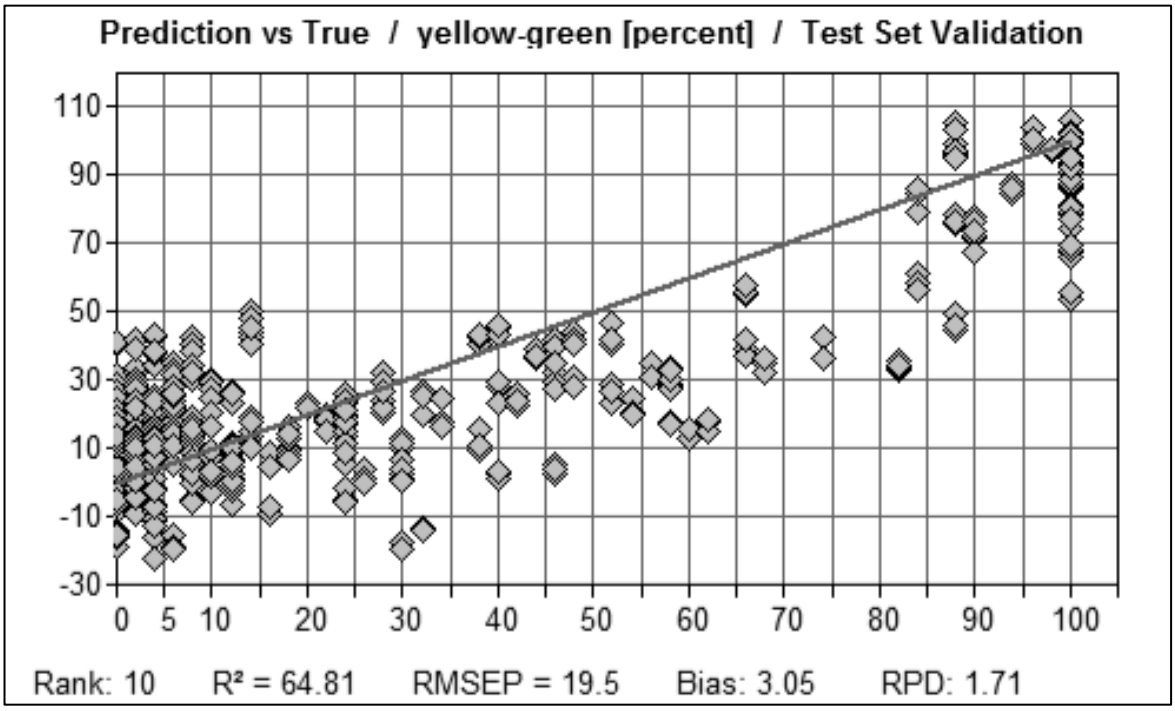
แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Vector normalization ให้ค่า R^2 เท่ากับ 64.81 ค่า RMSEP เท่ากับ 19.50 เปอร์เซ็นต์ bias เท่ากับ 3.05 เปอร์เซ็นต์ และ RPD เท่ากับ 1.71 รูปที่ 10. แสดงการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากห้องปฏิบัติการ

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องปกติได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Straight line subtraction ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 93.09 ค่า RMSEP เท่ากับ 0.206 เปอร์เซ็นต์ bias เท่ากับ 0.0219 เปอร์เซ็นต์ และ RPD เท่ากับ 3.83 รูปที่ 11. แสดงการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากห้องปฏิบัติการ

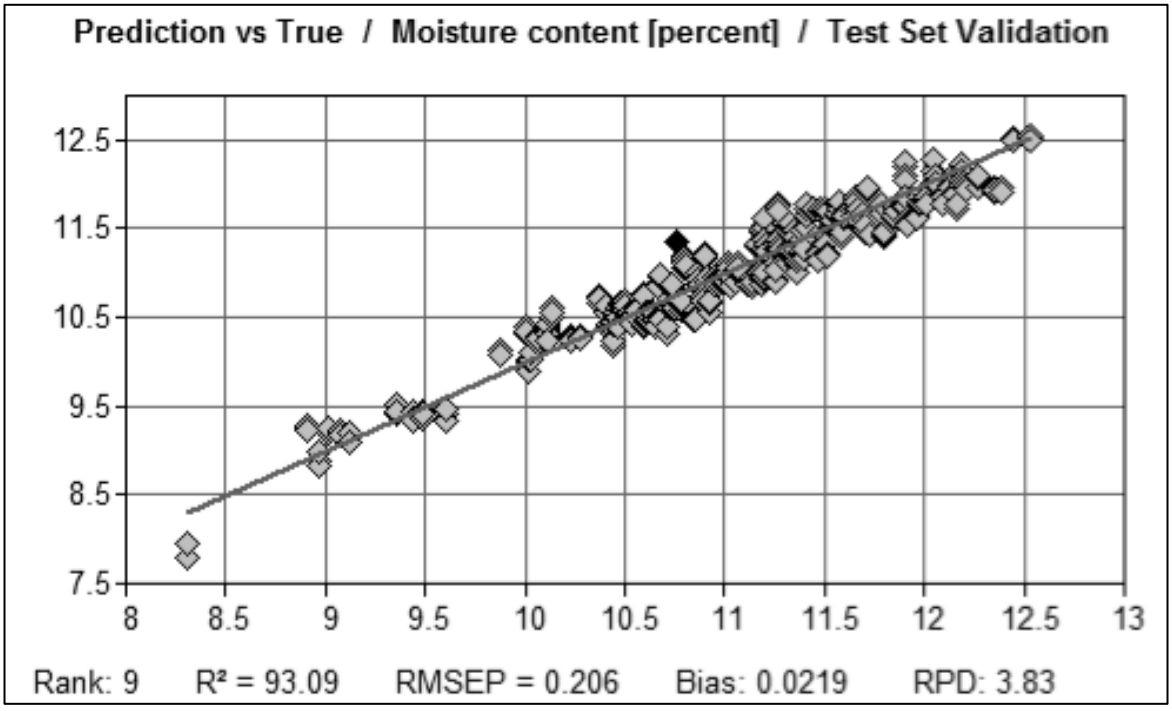
แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องปกติได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี First derivative (17 Pts.) ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 93.73 ค่า RMSEP และ bias เท่ากับ 0.938 และ 0.0147 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และ RPD เท่ากับ 3.99 รูปที่ 12. แสดงการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ทำนายด้วยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากวิธีวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ



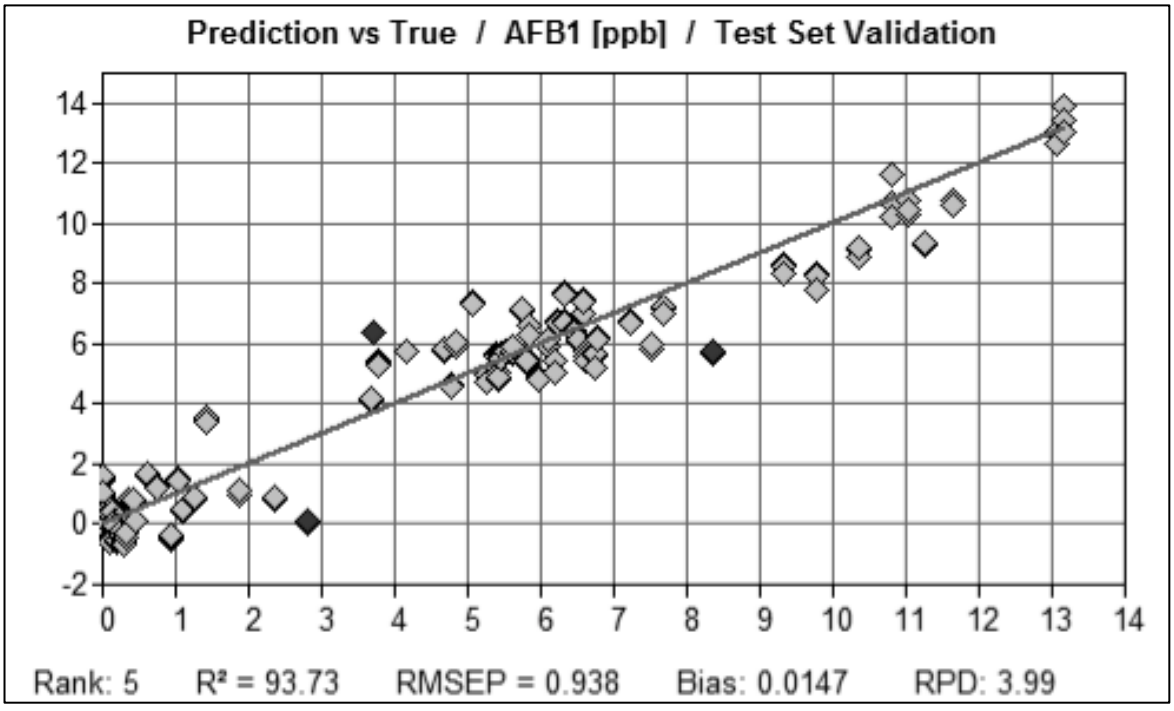
รูปที่ 9. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปกติที่ได้จากวิธีทางห้องปฏิบัติการกับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งเบื้องต้นด้วยวิธี First derivative + Straight line subtraction (17 Pts.) (จุดสีดำ คือ ตัวอย่าง ที่เป็น outlier)



รูปที่ 10. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ได้จากวิธีในห้องปฏิบัติการกับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Vector normalization



รูปที่ 11. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ได้จากวิธีในห้องปฏิบัติการ กับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Straight line subtraction (จุดสีดำ คือ ตัวอย่างที่เป็น outlier)



รูปที่ 12. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องปกติที่ได้จากวิธีในห้องปฏิบัติการกับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากเส้นสเปกตรัมที่มีปรับแต่งเบื้องต้นด้วยวิธี First derivative (17 Pts.) (จุดสีดำ คือ ตัวอย่างที่เป็น outlier)

4.3.2 ข้าวกล้องปรับสภาวะ

ค่าสถิติของการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ (ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลือง และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน) ที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองโดยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) แสดงในตารางที่ 5

ผลการสร้างแบบจำลองของตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด และข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการ แสดงในตารางที่ 6.

ตารางที่ 5. ข้อมูลทางสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลือง และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะสำหรับสร้างแบบจำลอง ที่ตัดค่าผิดปกติออกแล้ว

Parameters	Calibration set					Test set				
	n	Min	Max	Mean	SD	n	Min	Max	Mean	SD
Total fungi (%)	413	2.00	100.00	95.14	10.12	232	4.00	100.00	97.47	11.40
Yellow-green fungi (%)	450	0.00	100.00	54.00	40.08	253	0.00	100.00	59.95	39.91
Aflatoxin concentration (μg/kg)	432	0.00	18300.00	405.18	1796.43	275	0.00	16100.00	398.55	1809.54

หมายเหตุ : สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างใน Calibration set : Test set = 60 : 40

ตารางที่ 6. ผลของการทำ PLS regression จากตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ

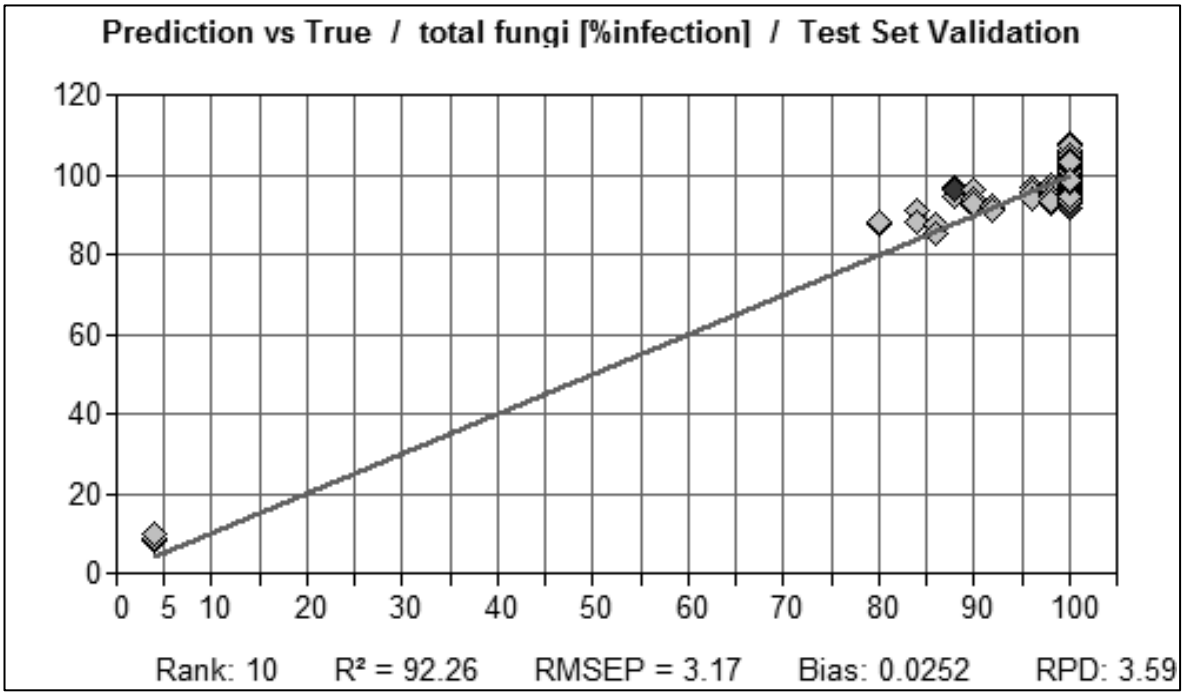
Parameters	wave number range	Pre-processing	Rank	R^2	RMSEP	RPD	Bias
Total fungi infection (%)	9064.3 – 6094.3 5454.0 – 4242.9	Straight line substraction	9	92.26	3.17	3.59	0.03
Yellow-green infection (%)	9033.5 – 7498.3 6102.0 – 5446.3 4605.4 – 4242.9	Constant offset elimination	10	53.64	27.10	1.47	-0.003
Aflatoxin concentration (μg/kg)	9403.8 – 6094.3 5454.0 – 4242.9	Vector normalization (SNV)	10	94.73	415.00	4.39	-54.00

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Straight line subtraction ให้ค่า R^2 เท่ากับ 92.26 ค่า RMSEP เท่ากับ 3.17 เปอร์เซ็นต์ bias เท่ากับ 0.03 เปอร์เซ็นต์ และ RPD เท่ากับ 3.59

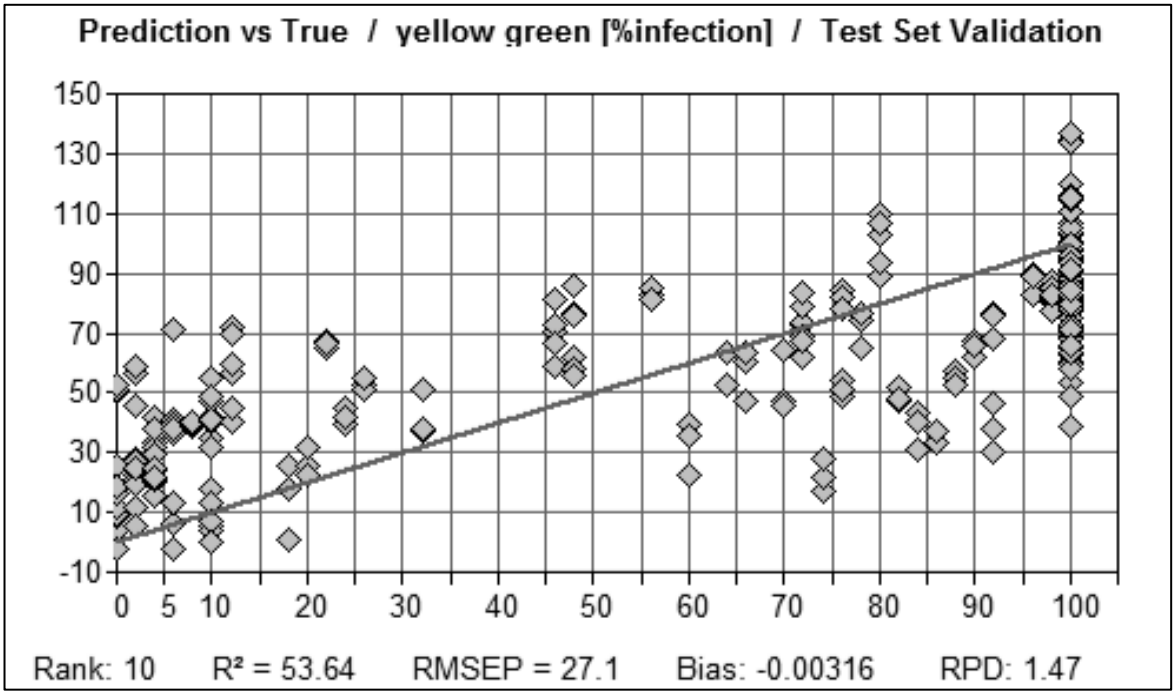
การเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะที่ทำนายด้วยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากห้องปฏิบัติการแสดงในรูปที่ 13.

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Constant offset elimination ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 53.64 ค่า RMSEP เท่ากับ 27.10 เปอร์เซ็นต์ bias เท่ากับ -0.003 เปอร์เซ็นต์ และ RPD เท่ากับ 1.47 รูปที่ 14. แสดงการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ

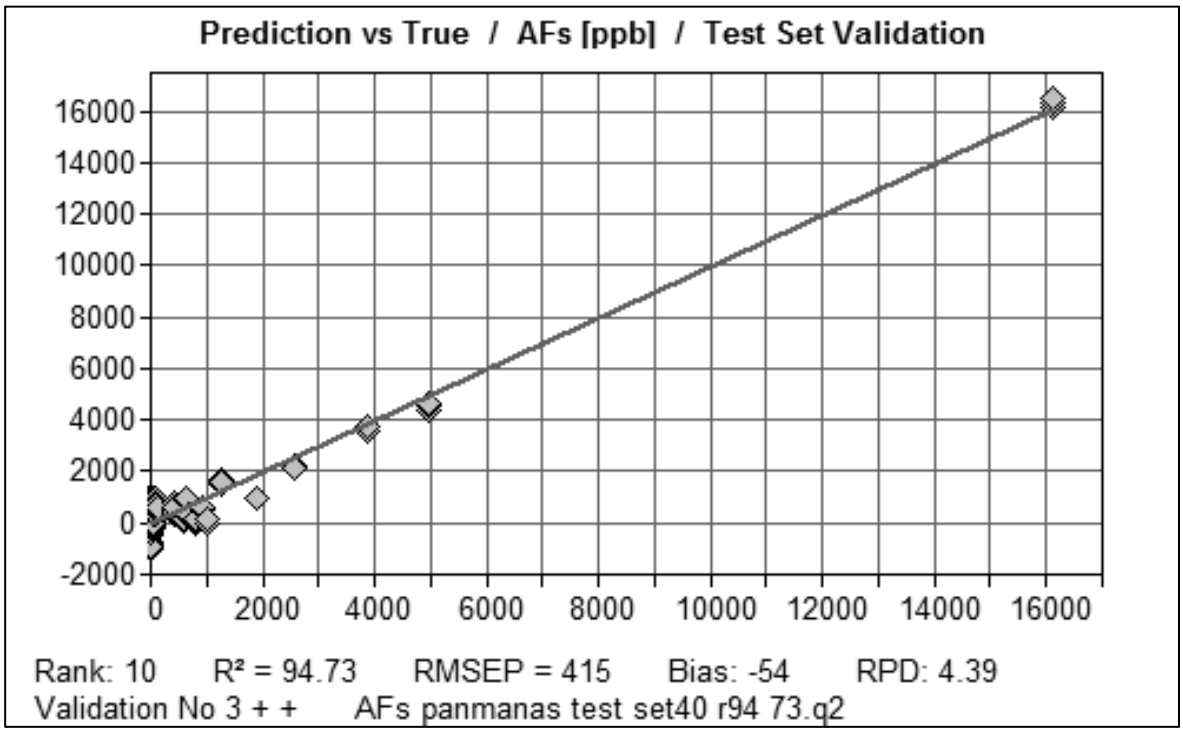
แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Vector normalization (SNV) ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 94.73, ค่า RMSEP และ bias เท่ากับ 415.00 และ -54.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ RPD เท่ากับ 4.39 รูปที่ 15. แสดงการเปรียบเทียบค่า ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกับค่าวัดจริงจากห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 13. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่ได้จากวิธีในห้องปฏิบัติการกับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Straight line subtraction (จุดสีดำ คือ ตัวอย่าง ที่เป็น outlier)



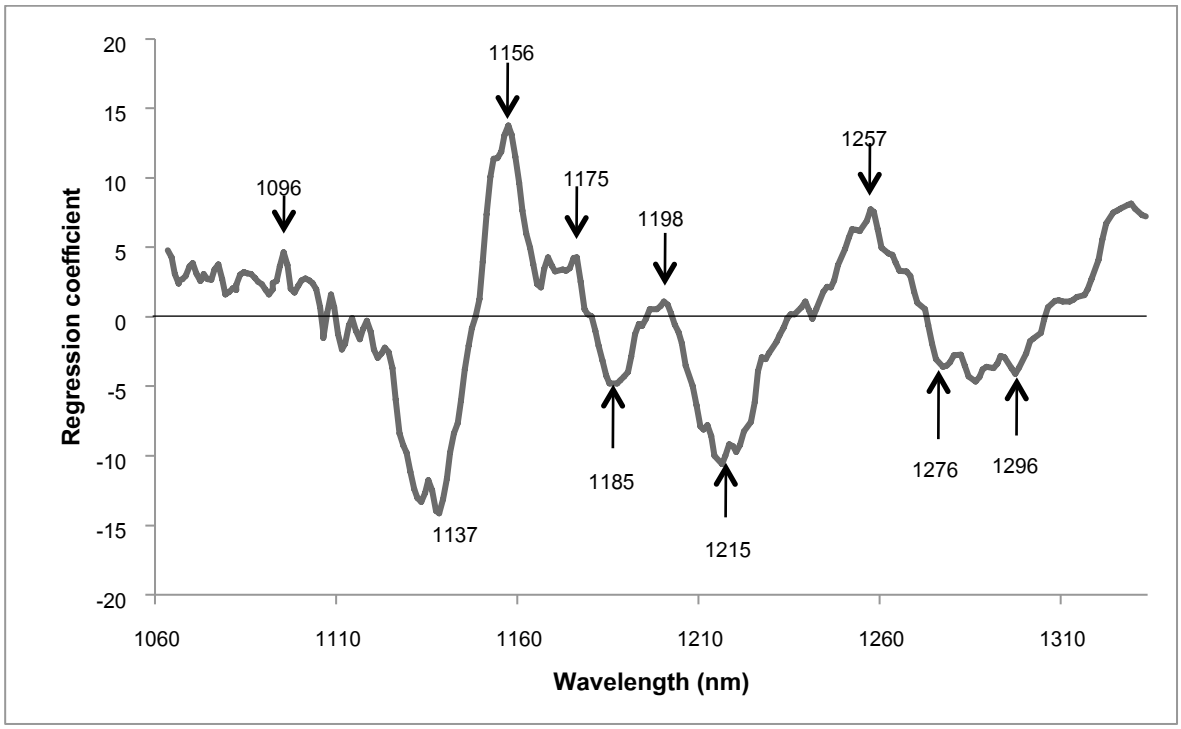
รูปที่ 11. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่ได้จากวิธีในห้องปฏิบัติการกับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งเบื้องต้นด้วยวิธี Constant offset elimination



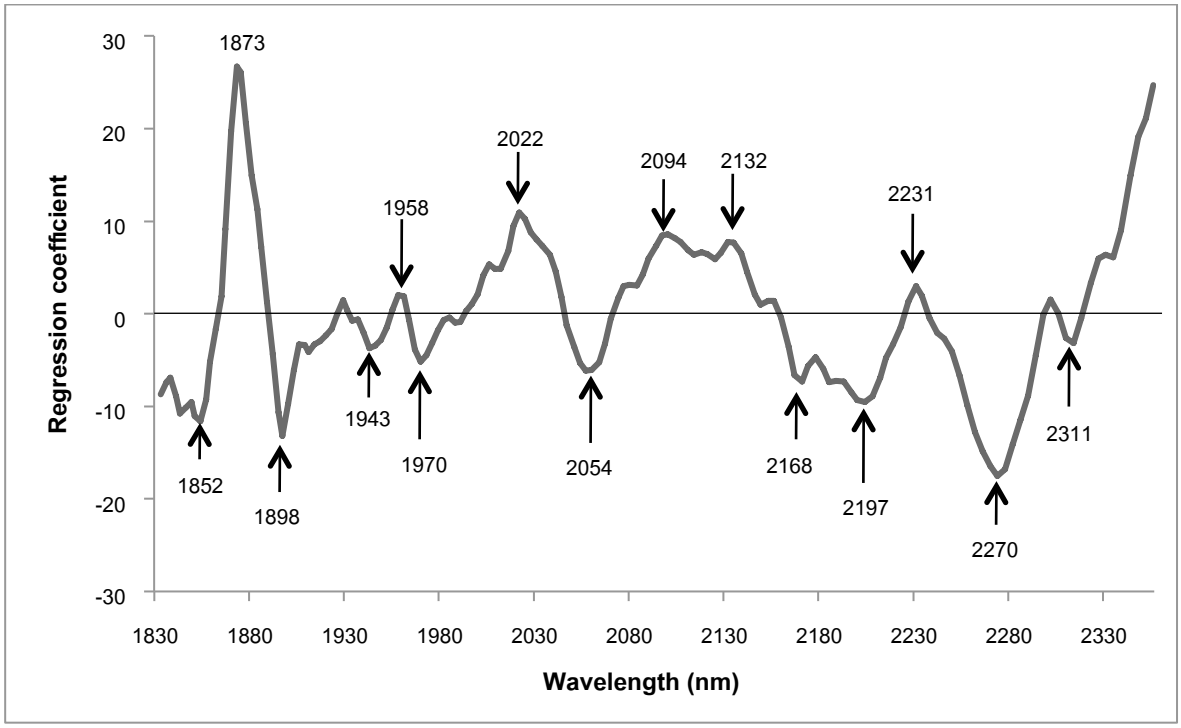
รูปที่ 15. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะที่ได้จากวิธีในห้องปฏิบัติการกับค่าทำนายของแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งเบื้องต้นด้วยวิธี Vector normalization (SNV)

สำหรับการพิจารณาในระดับโมเลกุลจากกราฟ regression coeffcient ผู้วิจัยขอแสดงผลเฉพาะแบบจำลองที่ให้ค่า R^2 สูง สำหรับตัวอย่างข้าวกล้องปกติ ได้แก่ แบบจำลองในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น (รูปที่ 16 และ 17) พบว่า ความยาวคลื่นที่มีความสำคัญต่อแบบจำลอง ได้แก่ 1137, 1156, 1185, 1215, 1257, 1873, 1898, 1970, 2022, 2054, 2168, และ 2270 นาโนเมตร แสดงถึงการดูดซับคลื่นที่พีคดังกล่าวมีผลอย่างมากต่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น และแบบจำลองในการทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน (รูปที่ 18) ค่าความยาวคลื่นที่อิทธิพลต่อการทำนายค่าดังกล่าว ได้แก่ 1863, 1895, 1921, 1979 และ 2061 นาโนเมตร

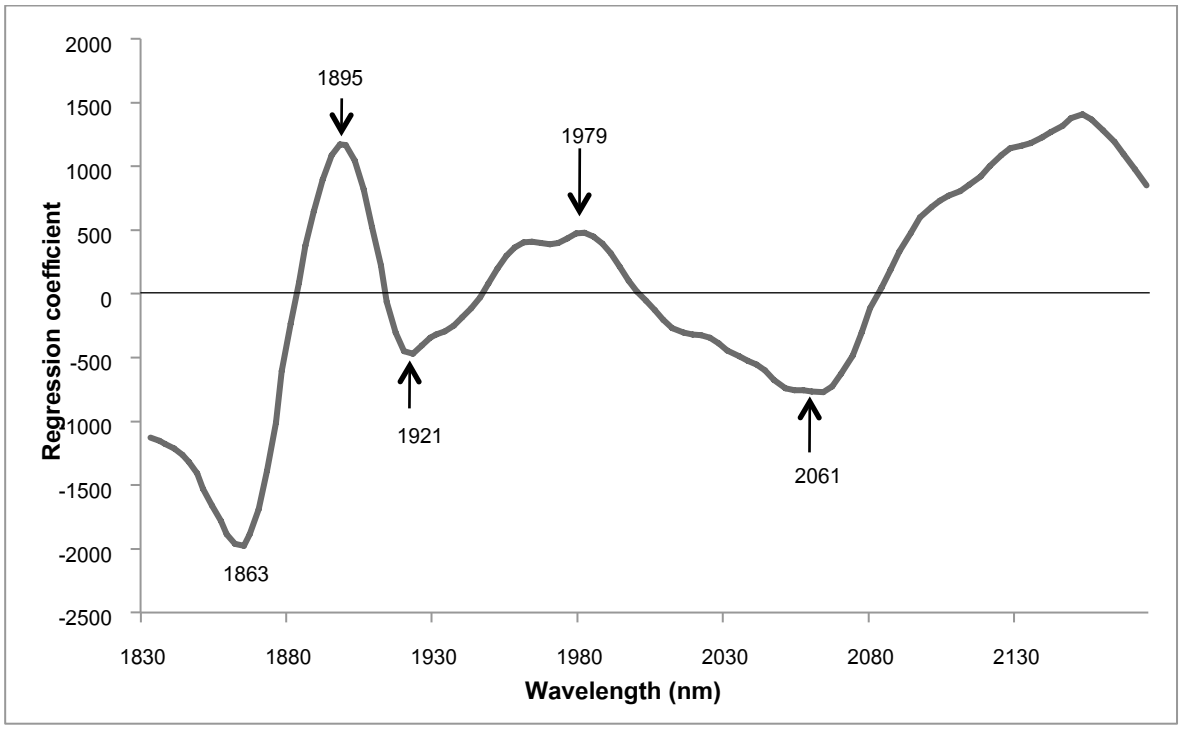
การพิจารณาในระดับโมเลกุลจากกราฟ regression coefficient สำหรับตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะจะแสดงผลของแบบจำลองในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และแบบจำลองทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน ซึ่งทั้งสองแบบจำลองให้ค่า R^2 สูง ค่าความยาวคลื่นที่มีอิทธิพลต่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 1060-1610 นาโนเมตร และ 1830-2330 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 19 และ 20 ตามลำดับ และค่าความยาวคลื่นที่มีความสำคัญต่อแบบจำลองในการทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ ได้แก่ 1082, 1156, 1361, 1375, 1389, 1407, 1871, 1895, 1955, 2227 และ 2270 นาโนเมตร (รูปที่ 21 และ 22)



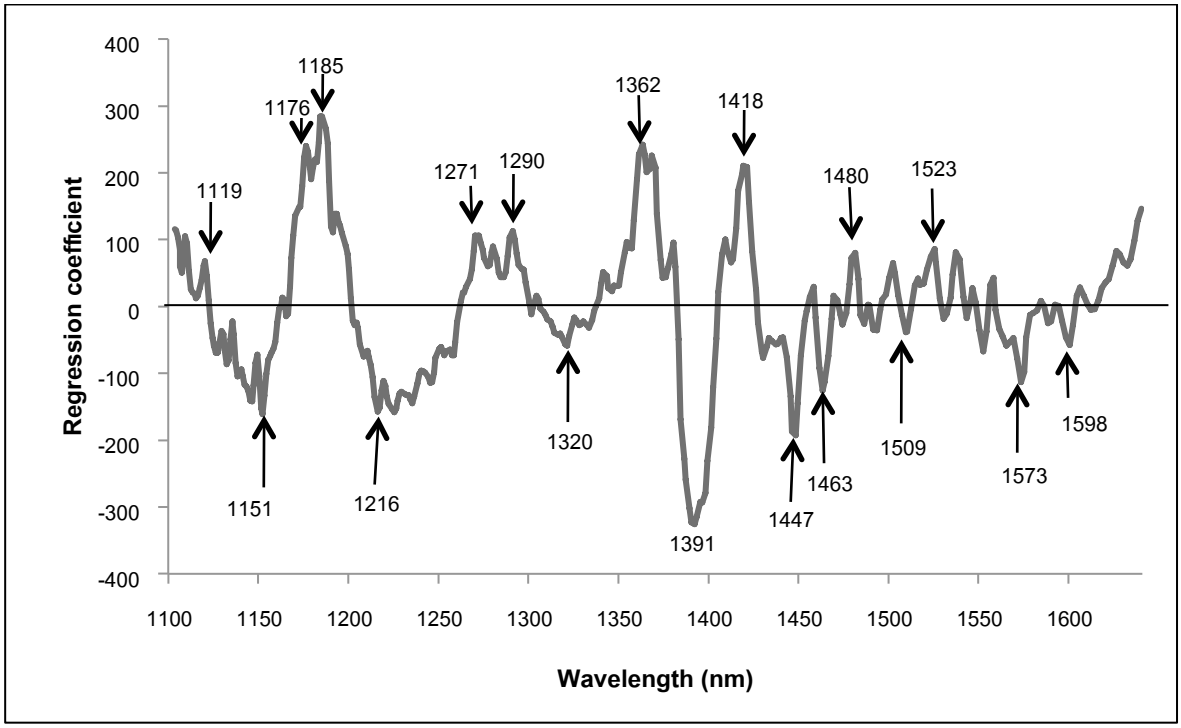
รูปที่ 16. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องปกติ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1060-1310 นาโนเมตร



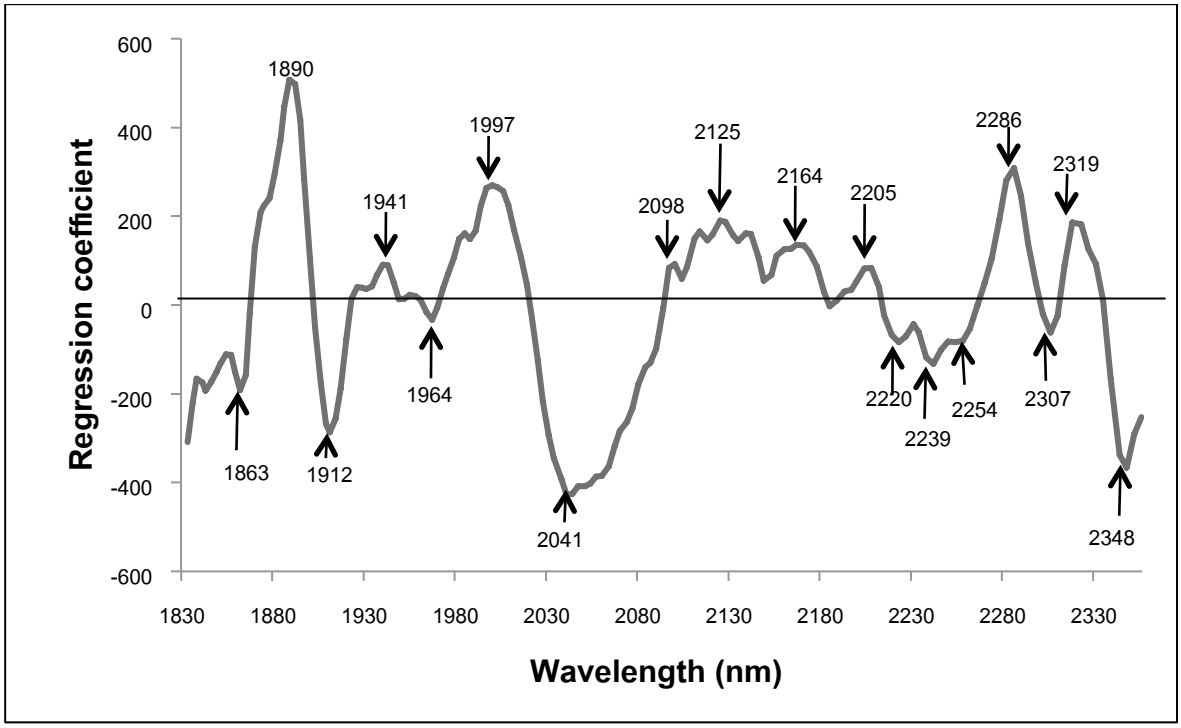
รูปที่ 17. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องปกติ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1830-2330 นาโนเมตร



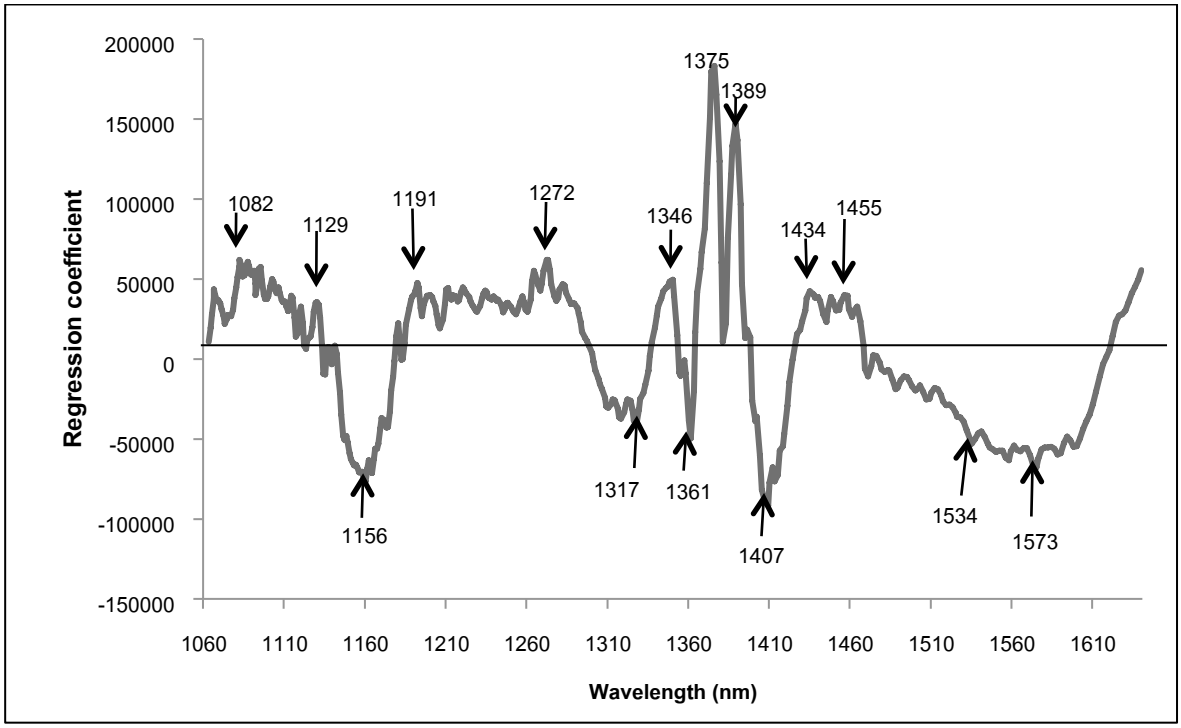
รูปที่ 18. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปกติ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1830- 2130 นาโนเมตร



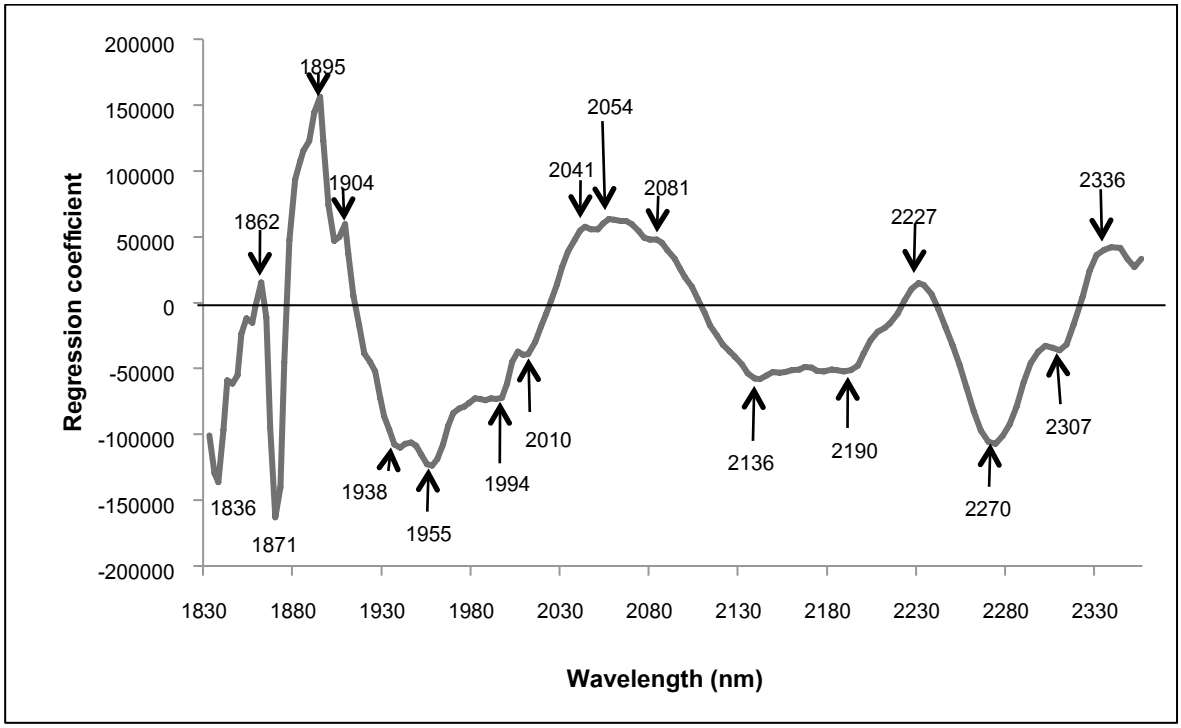
รูปที่ 19. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1100-1600 นาโนเมตร



รูปที่ 20. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1830-2330 นาโนเมตร



รูปที่ 21. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อทำนายความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1060-1610 นาโนเมตร



รูปที่ 22. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อทำนายความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับสภาวะ ที่ช่วงความยาวคลื่น 1830-2330 นาโนเมตร

4.4 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

จากผลการทดลองในข้อ 4.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบว่า แบบจำลองสำหรับทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินทั้งในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ และตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะให้ผลดีและแม่นยำ แบบจำลองสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะให้ผลการทำนายที่ดีกว่าแบบจำลองของข้าวกล้องปกติ ในขณะที่แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวทั้งสองชนิดให้ผลการทำนายที่ไม่ดี

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกแบบจำลองทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติและตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมด ทั้งนี้เพราะแบบจำลองดังกล่าวมียังมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเพื่อใช้งานได้ โดยนำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของราจากค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดมาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดอยู่ในช่วง 0-90%

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดอยู่ในช่วง 91-100%

โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดซึ่งจำนวนตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดสูง หากแบ่งโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดต่ำกว่านี้ จะทำให้มีจำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 น้อยมาก จากนั้นจึงสร้าง Classification model โดยวิธี SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) และ PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) ทั้งนี้ ได้ทดลองแบ่งจำนวนสมาชิกในแต่ละกลุ่มตามจริง และแบ่งจำนวนสมาชิกในแต่ละกลุ่มให้เท่ากัน เมื่อได้แบบจำลองแล้ว นำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง คัดเลือกแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงที่สุด

ผลการแบ่งกลุ่มของการปนเปื้อนของราจากเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องปกติและตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงไว้ในตารางที่ 7-10 ในตัวอย่างข้าวกล้องปกติการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองทั้งหมดที่สร้างขึ้นนั้นยังมีเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ไม่แม่นยำเมื่อเทียบกับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวมสูงกว่า (ตารางที่ 7 และ 8) ในขณะที่ในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA และ PLSDA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องไม่ต่างกันอย่างชัดเจน

เมื่อพิจารณาจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม พบว่า การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองที่สร้างจากจำนวนสมาชิกที่เท่ากันในแต่ละกลุ่ม ให้ผลการทำนายที่ไม่แตกต่างหรือลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับแบบจำลองที่สร้างจากจำนวนสมาชิกที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 7 และ 9) ในขณะที่การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แบบจำลองที่สร้างจากจำนวนสมาชิกที่เท่ากันทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องมากขึ้นโดยเฉพาะในตัวอย่างข้าวปรับสภาวะ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7. ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราของทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ 0-90 และ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA

% infection	number	model		number	model	
		0 - 90%	91 - 100%		0 - 90%	91 - 100%
0 - 90%	45	97.78	17.78	45	97.78	17.78
91 - 100%	219	8.68	92.69	45	4.44	93.33
% overall correct classification		53.23	55.24		51.11	55.56

ตารางที่ 8. ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราของทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ 0-90 และ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA

% infection	number	model	number	model
0 - 90%	45	8.89	45	80.00
91 - 100%	219	94.98	45	62.22
% overall correct classification		51.94		71.11

ตารางที่ 9. ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ 0-50 และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA

% infection	number	model		number	model	
		0 - 90%	91 - 100%		0 - 90%	91 - 100%
0 - 90%	39	94.87	5.13	39	94.87	5.13
91 - 100%	174	77.59	94.25	39	61.54	82.05
% overall correct classification		86.23	49.69		78.21	43.59

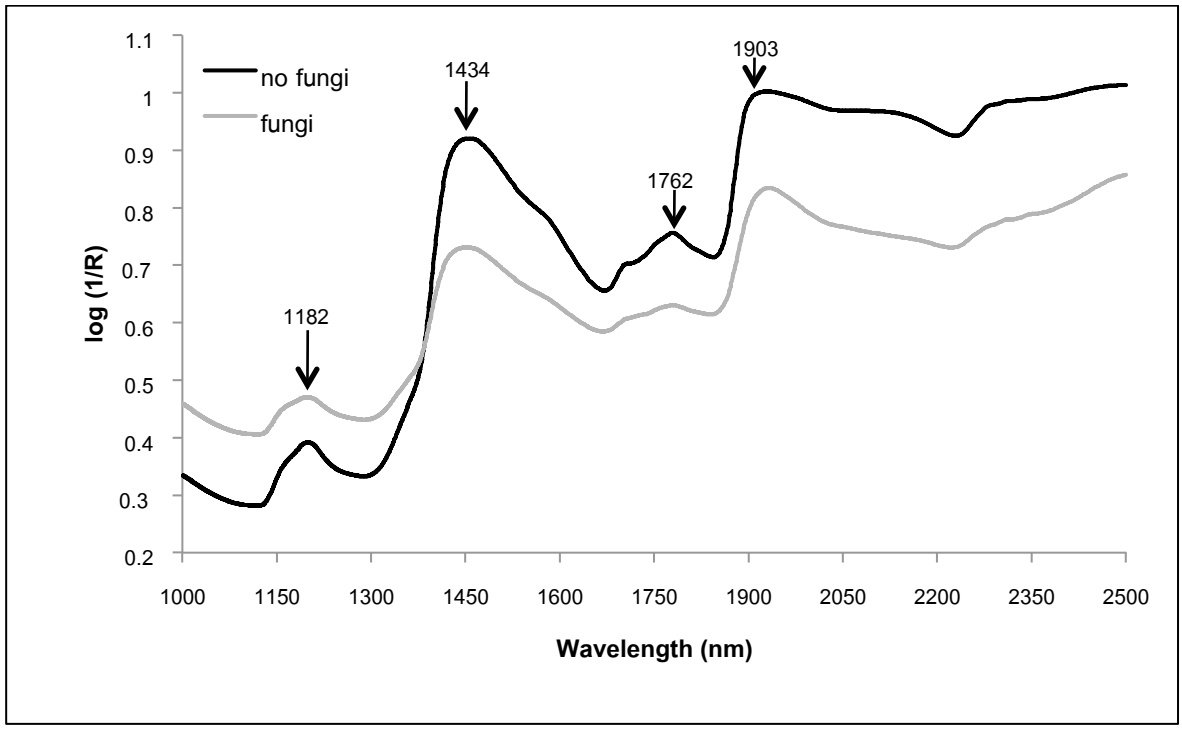
ตารางที่ 10. ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะ 0-50 และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA

% infection	number	model	number	model
0 - 90%	39	38.46	39	74.36
91 - 100%	174	93.10	39	58.97
% overall correct classification		65.78		66.67

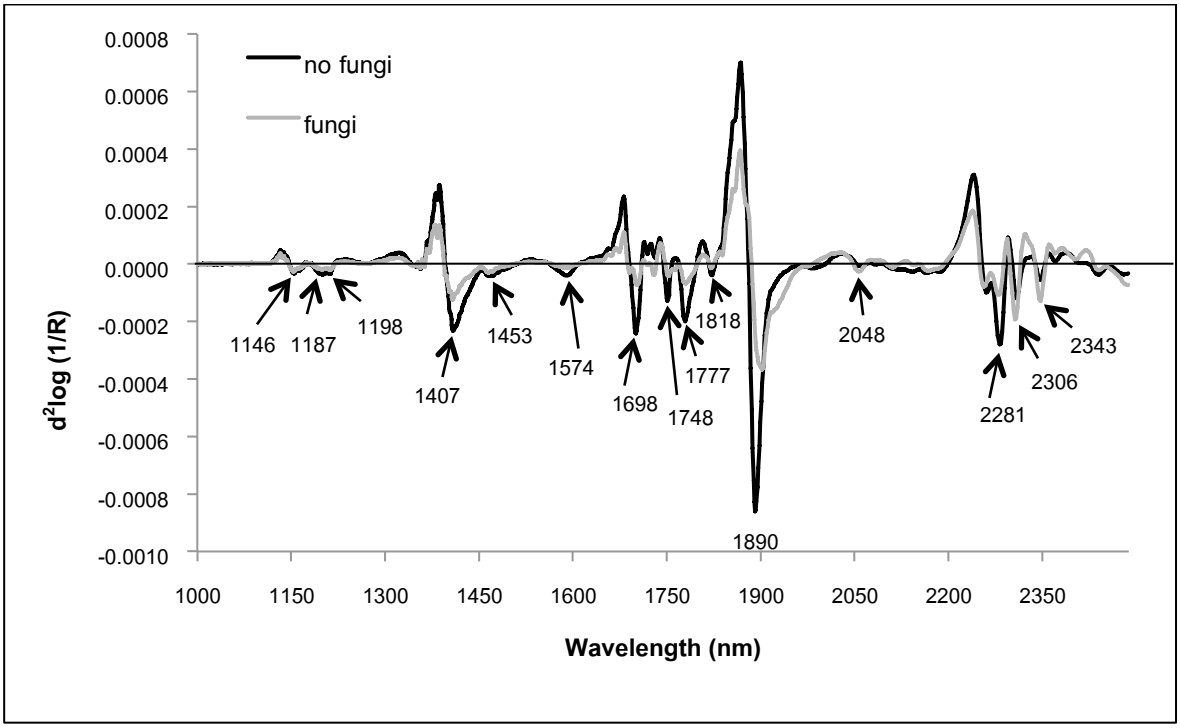
4.5 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว

จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลการแบ่งกลุ่มของแบบจำลองในข้อที่ 4.4 พบว่าแบบจำลองให้ผลการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมดยังไม่ดี ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมยังต่ำกว่า 80% ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบการแบ่งกลุ่มโดยใช้ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนรา

การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนราจำนวน 200 ตัวอย่าง ด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยที่ไม่ได้ปรับแต่งแสดงในรูปที่ 9 พบว่า ลักษณะของสเปกตรัมของตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสง พบว่า การดูดกลืนคลื่นแสงในบางช่วงความยาวคลื่นมีค่าแตกต่างกันชัดเจนเมื่อเมล็ดข้าวมีและไม่มีการปนเปื้อนของรา (รูปที่ 23) และเมื่อปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative ปรากฏพีคที่สำคัญที่ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเมล็ดข้าวที่มีราและไม่มีรา เช่น พีคที่ 1407 และ 1890 นาโนเมตร (รูปที่ 24)



รูปที่ 23. สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการเจริญของรา



รูปที่ 24. สเปกตรัมที่ได้จากการปรับแต่งด้วยวิธี Second derivative ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการเจริญของรา

การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราโดยใช้การวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมทั้งหมด (full spectrum analysis) และวิเคราะห์แบบเลือกช่วงสเปกตรัมที่มีช่วงความยาวคลื่น 1801-2000 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดมีความแตกต่างกันมากระหว่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีและไม่มีราเจริญ โดยนำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของราแบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีราเจริญ และ กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่ไม่มีราเจริญ

ผลการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องเดี่ยวด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงในตารางที่ 11 และ 12 ตามลำดับ พบว่า การแบ่งกลุ่มทั้งสองวิธีให้ผลดีกว่าผลการทดลองในข้อ 4.4 การแบ่งกลุ่มโดยใช้สเปกตรัมทั้งหมดแบบ SIMCA แบบจำลองที่สร้างขึ้นให้ค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 62.96-77.78 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA โดยมีค่าเท่ากับ 85.19 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของสร้างแบบจำลองการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา โดยใช้สเปกตรัมที่มีช่วงความยาวคลื่น 1801-2000 นาโนเมตร พบว่า แบบจำลองมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มที่ถูกต้องสูงขึ้น โดยผลของการสร้างแบบจำลองการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราด้วยวิธี SIMCA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 57.41-81.48 เปอร์เซ็นต์ และผลการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 87.04 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11. ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มของข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนราด้วยวิธี SIMCA

group fungi	Full wavelength model			1801.15-2000.00 nm model		
	number	no fungi	fungi	number	no fungi	fungi
no fungi	27	96.30	29.63	27	92.59	18.52
fungi	27	59.26	96.30	27	70.37	96.30
% overall correct classification		77.78	62.96		81.48	57.41

ตารางที่ 12. ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มของข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนราด้วยวิธี PLS-DA

group fungi	full wavelength		1801.15-2000.00 nm	
	number	model	number	model
no fungi	27	88.89	27	96.30
fungi	27	81.48	27	77.78
% overall correct classification		85.19		87.04

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

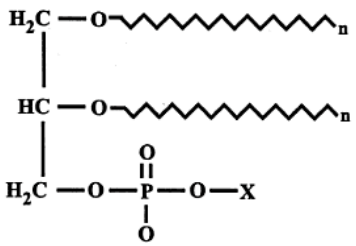
จากการศึกษาการประยุกต์เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินตัวอย่างข้าวกล้อง โดยใช้ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) และการเพิ่มจำนวนตัวอย่างข้าวที่มีแหล่งที่มาแตกต่างกัน โดยศึกษาทั้งในตัวอย่างกล้องปกติและตัวอย่างกล้องปรับสภาวะ ซึ่งทำให้ค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์มีค่าหลากหลายและกระจายตัวสม่ำเสมอ ซึ่งจะส่งผลต่อความถูกต้องในการตรวจสอบค่าองค์ประกอบด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปโทรสโกปี

เมื่อนำเส้นสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องปกติและตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะไปหาความสัมพันธ์กับค่าที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราของราทั้งหมด ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองซึ่งเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน และค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติ ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี First derivative + Straight line subtraction (17 Pts.) ให้ค่า R^2, RMSEP, bias และ RPD เท่ากับ 62.84, 5.66 เปอร์เซ็นต์, 1.81 เปอร์เซ็นต์ และ 1.73 ตามลำดับ ในขณะที่ในตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Straight line subtraction ให้ผลการทำนายที่ดีกว่า ด้วยค่า R^2, RMSEP, bias และ RPD เท่ากับ 92.26, 3.17 เปอร์เซ็นต์, 0.03 เปอร์เซ็นต์ และ 3.59 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 ที่ได้อยู่ในช่วง 92-96 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์หรืออาจใช้ในการประกันคุณภาพได้ (William, 2007) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด พบว่า ข้อมูลแบ่งแยกจากกันอย่างชัดเจน คือ มีค่าต่ำมากและสูงมาก ไม่มีข้อมูลระหว่างกลาง จึงทำให้ได้ค่า R^2 สูง จึงทำให้แบบจำลองนี้จึงไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง สำหรับแบบจำลองที่ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวทั้งสองแบบให้ผลการทำนายที่ไม่ดี

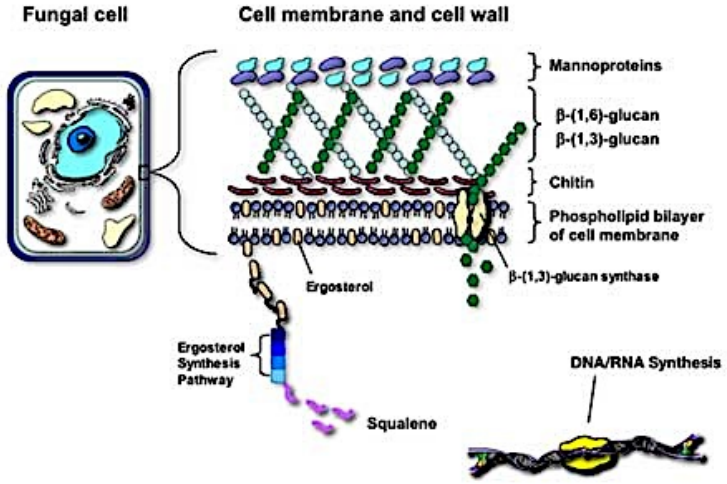
สำหรับแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน พบว่า แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างข้าวกล้องปกติและข้าวกล้องปรับสภาวะให้ผลการทำนายค่าดังกล่าวได้ดีใกล้เคียงกัน ด้วยค่า R^2 เท่ากับ 93.73 และ 94.73 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 ที่ได้อยู่ในช่วง 92-96 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ หรืออาจใช้ในการประกันคุณภาพได้ (William, 2007)

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวอย่างข้าวกล้องปกติได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธี Straight line subtraction ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 93.09 ค่า RMSEP เท่ากับ 0.206 เปอร์เซ็นต์ bias เท่ากับ 0.0219 เปอร์เซ็นต์ และ RPD เท่ากับ 3.83 ซึ่งค่า R^2 ที่ได้อยู่ในช่วง 92-96 แสดงว่าแบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ หรืออาจใช้ในการประกันคุณภาพได้ (William, 2007)

จากการเลือกแบบจำลองทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปกติและตัวอย่างข้าวกล้องปรับสภาวะมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนราทั้งหมดด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องโดยรวมต่ำกว่า 80% ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบการแบ่งกลุ่มโดยใช้ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนรา ผลจากการสแกนเมล็ดข้าว ปรากฏพีคที่สำคัญที่ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเมล็ดข้าวที่มีราและไม่มีรา เช่น พีคที่ 1407 และ 1890 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาพีคที่ 1908 นาโนเมตร เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของโมโลกุล POH ซึ่งสามารถพบได้ในโครงสร้างของ phospholipid (รูปที่ 25) โครงสร้างดังกล่าวเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งชีวิตพวกยูคาริโอตรวมทั้งรา (Gow and Gadd, 1999) (รูปที่ 26) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการสังเกตุการเจริญของรา โดยดูได้จากความหนาแน่นของสายใยและสปอร์บนเมล็ดข้าวกล้อง พบว่าการเจริญของราที่เพิ่มขึ้นทุกวันและเมื่อครบตามระยะเวลาการบ่ม ราเจริญปกคลุมหนาแน่นทั่วทั้งเมล็ด ในขณะเดียวกันพีคที่ 1908 อาจเกิดจากการขยับของพีคที่ 1940 นาโนเมตร ซึ่งเป็นพีคของน้ำ (Osborne and Fearn,1986) แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำมีความสัมพันธ์กับการเจริญของราบนเมล็ดข้าวกล้อง



รูปที่ 25. โครงสร้างของ phospholipid ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (Gow and Gadd, 1999)



รูปที่ 26. โครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของรา
(ที่มา http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.php)

ผลการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องเดี่ยวด้วยวิธี PLS-DA โดยใช้ข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมด ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA มีค่าเท่ากับ 85.19 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสร้างแบบจำลองโดยใช้สเปกตรัมที่มีช่วงความยาวคลื่น 1801-2000 นาโนเมตร พบว่า แบบจำลองมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มที่ถูกต้องสูง ผลการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 87.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลการทำนายที่ดีกว่าการใช้สเปกตรัมทั้งหมด

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องโดยใช้การสแกนตัวอย่างข้าวเมล็ดเดี่ยว (single kernel) ที่มีและไม่มีการเจริญของรา ได้แบบจำลองที่ให้ผลการทำนายที่แม่นยำกว่าการสแกนตัวอย่างข้าวทั้งหมด (whole sample) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างจึงเป็นสาเหตุสำคัญของความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะองค์ประกอบที่ต้องการวัดนั่นก็ คือ การปนเปื้อนของรา ในธรรมชาติราไม่ได้เจริญอยู่บนเมล็ดข้าวทุกเมล็ดราจะเจริญอยู่เป็นบริเวณๆ ซึ่งบางเมล็ดมีและบางเมล็ดไม่มีการเจริญ แสดงว่าองค์ประกอบที่ต้องการวัดไม่ได้เป็นเนื้อเดียวกับตัวอย่าง หรือเรียกว่า Heterogeneous sample ซึ่งต่างจากองค์ประกอบที่อยู่ในข้าว เช่น ปริมาณแป้ง หรือปริมาณความชื้นที่มีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละเมล็ด เพราะเป็นองค์ประกอบที่เป็นเนื้อเดียวกับตัวอย่าง หรือที่เรียกว่า Homogenous samples ดังนั้น ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวทั้งหมด (whole sample) จึงไม่สัมพันธ์กับตัวแปรตาม (การปนเปื้อนของรา) ที่ต้องการทำนาย ในขณะที่การสแกนตัวอย่างข้าวเมล็ดเดี่ยวมีความสัมพันธ์กับค่าตัวแปรตามมากกว่า

นอกจากนี้ นักวิจัยพบว่า ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่มีการเจริญของราจะมีค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 1908 นาโนเมตรสูงกว่าเมล็ดที่ไม่มีการเจริญของราอย่างชัดเจน และเมื่อใช้สเปกตรัมในช่วงตำแหน่งความยาวคลื่นดังกล่าวมาสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มเมล็ดข้าวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของรา ทำให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มสูงที่สุด แสดงให้เห็นสเปกตรัม ในช่วงคลื่นดังกล่าวอาจมีความสัมพันธ์กับโมเลกุลที่เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ราและปริมาณน้ำ จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาความสัมพันธ์ของสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวกับการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซิน เพื่อพัฒนาแบบจำลองให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ, กระทรวงพาณิชย์. (2554). การกำหนดมาตรฐานสินค้าและวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสร้างศักยภาพการ ส่งออกสินค้าไทย : กรณีข้าวหอมมะลิไทย. (เอกสารเผยแพร่) แหล่งที่มา : http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=165&ctl=DetailUserContent&mid=684&contentID=821 (วันที่ 2 สิงหาคม 2557)

นิตตา หงส์วิวัฒน์. (2552). ข้าวกล้อง ข้าวงอก มหัศจรรย์อาหารต้านโรค. หน้า 15 - 17.

บดินทร์ บุตรอินทร์. (2555). วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เรื่อง สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาท็อกซิน ปีที่ 45 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม 2555 (ออนไลน์) แหล่งที่มา: http://www.ams.cmu.ac.th/journal/images/stories/journal/201205/20120501.pdf (วันที่ 21 กรกฎาคม 2557)

บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล. สำนักการแพทย์ทางเลือก. (2553). ข้าวกล้องดีต่อสุขภาพ (ออนไลน์) แหล่งที่มา:http://www.thaicam.go.th/Index.php?option=com_attachmenth&task=download&id=276 (วันที่ 23 กรกฎาคม 2557)

พิไล กวิศราศัย; สุทธิพร พิริยายน; and มนัญญา ปัทมะสุนทร. 2552. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อะฟลาท็อกซินด้วย IAC-Post Column Photochemical Reaction. In วารสารสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์, 408-426. กรุงเทพ: กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2551). ประเทศสวีเดนตรวจพบสาร Aflatoxin ในข้าวกล้องหอมมะลิของไทย (ออนไลน์) แหล่งที่มา : http://www.riceexporters.net/PR%20news/prnews-15Feb08.htm (วันที่ 14 กันยายน 2557)

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2557). สถิติที่สำคัญ : Rice Export Quantity and Value 2013 (ออนไลน์) แหล่งที่มา : http://www.thairiceexporters.or.th/statistic_2013.html (วันที่ 14 กันยายน 2557)

วารุณี ธนะแพสย์, 2552. สถานการณ์การใช้ประโยชน์เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในประเทศไทย. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสหกรรม สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ มหานคร, 1-1-1-8.

ศุมาพร เกษมสำราญ. (2552). หลักการพื้นฐานของสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร. หน้า 2-5.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Abbas, H. K., Shier, W. T., Horn, B. W., and Weaver, M. A., 2004. Cultural methods for aflatoxin detection. Toxin Reviews, 23:295-315.

Al-Holy, M.A., Mengshi, L., Cavinato, A.G., and Rasco, B.A., 2006. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice. Food Microbiology, 23:162-168.

Asim, M., Sarma, M. P., Thayumanavan, L., and Kar, P. 2011. Role of Aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. Available online: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912011014561

Atkins, S.D. and Clark, I.M., 2004. Fungal molecular diagnostic: a mini review. Journal of Applied Genetics, 45:3-15.

Babu, P. D., Subhasree, R. S., Bhakyaraj, R., and Vidhyalakshmi, R., 2009. Brown Rice-Beyond the Color Reviving a Lost Health Food - A Review. American - Eurasian Journal of Agronomy, 2:67-72.

Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A. and Marocco, A., 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:8128-8134.

Camps, C. and Christen, D., 2009. Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. LWT - Food Science and Technology, 42: 1125-1131.

Castegnaro M. and Pfohl-Leszkowicz A., 2002. Les mycotoxines : Contaminations omnipresents dans l'alimentation animales et humaines. La sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec & doc., Moll &Moll Eds., Paris.

Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E. and Spotti, E., 2002. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorimetric method. Food additives and Contaminants, 19:575-581.

Coppock, R. W., Christian, R. R. G., and Jacobsen, B. J., 2012. Chapter 88 - Aflatoxins. In R. C. Gupta (Ed.), Veterinary Toxicology (Second Edition). Boston: Academic Press, 1181-1199.

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

Gaspardo, B., Del Zotto, S., Torelli, E., Cividino, S. R., Firrao, G., Della Riccia, G. 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. Food Chemistry, 135:1608-1612.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. and Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus.* Studies in Mycology, 59:1-10.

Hernández Hierro, J. M., Garcia-Villanova, R. J., Rodríguez Torrero, P. T. F. and Ivania, M., 2008. Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56:751-756.

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.

IARC. 1993. Aflatoxins: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and my cotoxins. International Agency for Research on Cancer 56:245-395.

IARC. 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monographs, 82;169-279.

Jaimez, J., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A., Mahuzier, G. and Prognon, P., 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography A, 882:1-10.

Jorgensen, K., 1998. Survey of pock, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Additives and Contaminants, 15, 550-554.

Kumar, V., Basu, M.S. and Rajendran, T.P., 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. Crop Protection, 27:891-905.

Kyodo News, 2008. Food maker detects aflatoxin in Thai rice, prevents shipment. The Japan Times Online. http://search.japantimes.co.jp/cgi-bin/nn20081220a8.html.

Magdeldi, S. and Moser, A., 2012. Affinity Chromatography: Principles and Applications, Affinity Chromatography, Dr. Sameh Magdeldin. USA: InTech.

Marutoiu, C., Puiu, S., Moise, M., Soran, L., Marutoiu, O and Bobos, L., 2004. Optimization of the separation of some aflatoxins by thin-layer chromatography. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 17:372-374.

Moser, A. C. and Hage, D. S., 2010. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. Bioanalysis, 2:769-790.

Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. and Bryant, C.M., 2006. Food mycotoxins: An update. Journal of Food Science, 71:R51-R56.

Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology, 119:38-46.

Osborne, B.G. and Fearn, T., 1986. Near infrared spectroscopy in food analysis. Longman Scientific & Technical, Yew York, USA.

Paterson, R., Archer, S., Kozakiewicz, Z., Lea, A., Locke, T. and O'Grady, E., 2000. A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential for use in patulin and novel disease control. Biocontrol Science and Technology, 10:509-512.

Pascale, M. N., 2009. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 15-25.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D., 2009. Fungi and food spoilage. 3 e edition, Aspen Publishers, Inc., the United Kingdom.

Reddy, C. S., Reddy, K. R. N., Raja Kumar, N. and Muralidharan, K., 2005. Norsolorinic acid production by Aspergillus spp. isolated from discolored rice grains. Journal of Mycology and Plant Pathology, 35:53-57.

Regulation (EU) No 165/2010. Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 Febbruary 2010. Amending Regulation (EU) No 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of The European Union, 27.2.2010, L 50/8-L50/12.

Reiter, E. V., Vouk, F., Böhm, J. and Razzazi-Fazeli, E., 2010. Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. Food Control, 21:988-991.

Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N.; and Venâncio, A., 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 527-537.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C., 2004. Introduction to food borne fungi. 7 e édition, Centraalbureau voor Schimmelcucutures, Netherlands.

Samson, R.A., Hong, S.B. and Frisvad, J.C., 2006. Old and new concept of species differentiation in *Aspergillus*. Medical Mycology, 44:s133-s148.

Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z. and Lima, N., 2010. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. Research in Microbiology. 161:168-175.

Sartori, D., Furlaneto, M. C., Martins, M. K., Ferreira de Paula, M. R., Pizzirani-Kleiner, A. A., Taniwaki, M. H. and Fungaro, M. H. P., 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. Res Microbiol, 157:350-354.

Sirisomboon P. and Duangchang J., 2009. Prediction and analysis of peel essential oil of pomelo by NIR spectroscopy. 10th International Conference of Thailand Society of Agricultural Engineering on “Innovations of Agricultural, Food and Renewable Energy Productions for Mankind” 1-3 April 2009 , Suranaree Univeristy of Technology, THAILAND.

Sirisomboon P. and Howvimanporn S., 2009. Determination of soluble solids of honey by near infrared spectroscopy. 10th International Conference of Thailand Society of Agricultural Engineering on “Innovations of Agricultural, Food and Renewable Energy Productions for Mankind” 1-3 April 2009 , Suranaree Univeristy of Technology, THAILAND.

Sirisomboon P., Tanaka M., Fujita S. and Kojima T., 2007. Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy, J. Food Engineering 78(2): 701-707.

Skaug, M.A., 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. Food additives and Contaminants, 16:75-78.

Somashekar, D., Rati, E. R. and Chandrashekar, A., 2004. PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus in maize. Int J Food Microbiol, 93:101-107.

Srikornkarn S. and Sirisomboon P., 2014. Feasibility of Evaluation of Salt Content in Canned Sardine in Oil by Near Infrared Spectroscopy. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2: 381-385.

Tripathi, S. and Mishra, H. N., 2009. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. Food Control, 20:840-846.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S. and Piletsky, S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Analytica Chimica Acta, 632:168-180.

Van Dijk, C., Fischer, M., Holm, J., Beekhuizen, J. G., Stolle-Smits, T. and Boeriu, C., 2002. Texture of cooked potatoes (Solanum tuberosum). 1. Relationships between dry matter content, sensory-perceived texture, and near-infrared spectroscopy. J Agric Food Chem, 50:5082-5088.

Varga, J., Frisvad, J. C., and Samson, R. A., 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. World Mycotoxin Journal, 2:263-277.

Wang, J.-S., Huang, T., Su, J., Liang, F., Wei, Z., Liang, Y., Luo, H., Kuang, S.-Y., Qian, G.-S.; and Sun, G., 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing village, Fusui county, People's Republic of China. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 10:143-146.

Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V. and Kuca, K., 2009. Biological degradation of aflatoxins. Drug metabolism reviews, 41:1-7.

Zhang, H.J., Wu, J.H., Luc Li-jun, Y., Hua Yang, L.,Yu, X.Q., Wang, X.S., Chen, L. and Mei, H.W., 2007. Comparison of Near Infrared Spectroscopy Models for Determining Protein and Amylose Contents Between Calibration Samples of Recombinant Inbred Lines and Conventional Varieties of Rice. Agricultural Sciences in China, 6:941-948.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

อยู่ระหว่างดำเนินการเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ