

การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและ
อะฟลาทอกซินรวมในข้าวกล้องโดยการปรับภาวะและการตรวจสอบการเจริญ
ของ *Aspergillus flavus* ในข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว



นางสาวพันธุ์ทิพย์ วงศ์ทิพย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PERFORMANCE IMPROVEMENT OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN FUNGAL
AND AFLATOXIN DETECTION IN BROWN RICE BY ADJUSTING CONDITIONS AND
INVESTIGATION OF *Aspergillus flavus* GROWTH IN A SINGLE GRAIN OF BROWN RICE

Miss Panthip Wongthip



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ในการตรวจหาและอะพลาทอกซินรวมในข้าวกล้องโดย การปรับภาวะและการตรวจสอบการเจริญของ <i>Aspergillus flavus</i> ในข้าวกล้องเมล็ดเดียว
โดย	นางสาวพันธุ์ทิพย์ วงศ์ทิพย์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญรณ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญรณ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

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

พันธูทิพย์ วงศ์ทิพย์ : การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะฟลาทอกซินรวมในข้าวกล้องโดยการปรับภาวะและการตรวจสอบการเจริญของ *Aspergillus flavus* ในข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว (PERFORMANCE IMPROVEMENT OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN FUNGAL AND AFLATOXIN DETECTION IN BROWN RICE BY ADJUSTING CONDITIONS AND INVESTIGATION OF *Aspergillus flavus* GROWTH IN A SINGLE GRAIN OF BROWN RICE) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชีวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญ, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญ, 147 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะฟลาทอกซินรวมในข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่าง และเพื่อตรวจสอบการเจริญของ *Aspergillus flavus* บนเมล็ดข้าวกล้องโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่ได้ปรับความชื้นและปรับความชื้นเท่ากับ 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *A. flavus* ถูกจัดเป็น 6 ชุดตัวอย่างเพื่อใช้สร้างแบบจำลองการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมแบบจำลองถูกสร้างโดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) จากความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ (ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และปริมาณอะฟลาทอกซินรวม) และข้อมูลเชิงแสง (สเปกตรัม) ที่ได้จากการสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด แบบจำลองที่ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดได้ดีที่สุดสร้างจากตัวอย่างชุดที่ 6 (ตัวอย่างทั้งหมด) โดยใช้สเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยกำลังสองของการทำนาย (root mean square error of prediction, $RMSEP$) อัตราส่วนระหว่างค่า SD ต่อ SEP (ratio of standard deviation to standard error of prediction, RPD) และค่าความผิดพลาดในการทำนาย (bias) เท่ากับ 0.92, 3.17 เปอร์เซ็นต์, 3.59 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบบจำลองที่ดีที่สุดในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองสร้างจากสเปกตรัมผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction; MSC) ของตัวอย่างชุดที่ 4 (ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์) ($R^2 = 0.84$, ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation, $RMSECV$) = 6.57 เปอร์เซ็นต์, RPD = 2.53 และ bias = -0.15 เปอร์เซ็นต์) และแบบจำลองที่ดีที่สุดในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (vector normalization; SNV) ของตัวอย่างชุดที่ 6 (ตัวอย่างทั้งหมด) ($R^2 = 0.93$, $RMSEP = 188.00$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, RPD = 3.77 และ bias = 21.20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพพบว่า แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมดที่สร้างจากวิธี partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) ให้ผลการทำนายแม่นยำที่สุดด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 97.18 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อแบ่งกลุ่มข้าวเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีราเจริญที่สร้างจากวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงสุด เท่ากับ 93.75 เปอร์เซ็นต์ และแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มข้าวเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีราปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 จากวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงสุด เท่ากับ 98.15 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายและการกระจายของข้อมูลในตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญต่อสมรรถนะของแบบจำลองเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5572230723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: NEAR INFRARED SPECTROSCOPY, AFLATOXINS, AFLATOXIGENIC FUNGI, BROWN RICE

PANTHIP WONGTHIP: PERFORMANCE IMPROVEMENT OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN FUNGAL AND AFLATOXIN DETECTION IN BROWN RICE BY ADJUSTING CONDITIONS AND INVESTIGATION OF *Aspergillus flavus* GROWTH IN A SINGLE GRAIN OF BROWN RICE. ADVISOR: ASST. PROF. CHEEWANUN DACHOUPAKAN SIRISOMBOON, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PANMANAS SIRISOMBOON, 147 pp.

This research aims to improve the performance of the near infrared spectroscopy (NIRS) for the detection of fungi infection and aflatoxins in brown rice by adjusting the conditions of samples and to monitoring the growth of *Aspergillus flavus* in brown rice kernels. The brown rice samples with initial moisture and adjusting the humidity of 14 and 18% including naturally contaminated samples and artificially *A. flavus* contaminated samples were carried out for 6 sample sets for developing the quantitative models for predicting the percentage of total fungal infection, percentage of yellow-green fungal infection and aflatoxins concentration in brown rice samples. The models were developed using the method of partial least square regression (PLSR) from the correlation between laboratory data (percentage of fungal infection and total aflatoxin concentration) and optical data (spectra) from NIR scanning. The best model for predicting percentage of total fungal infection was developed using the straight line subtraction pretreated spectra from the sample set NO. 6th (all samples) with the coefficient of determination (R^2), root mean square error of prediction ($RMSEP$), ratio of standard deviation to standard error of prediction (RPD) and bias of 0.92, 3.17%, 3.59 and 0.03% respectively. The best model for predicting percentage of yellow-green fungal infection was developed using the multiplicative scatter correction (MSC) pretreated spectra from the sample set NO. 4th (artificially fungal contamination with 14% and 18% of moisture content) ($R^2 = 0.84$, root mean square error of cross validation ($RMSECV$) = 6.57%, RPD = 2.53 and bias = -0.15%). The best model for predicting percentage of total aflatoxin concentration was developed using the vector normalization (SNV) pretreated spectra from the sample set NO. 6th (all samples) ($R^2 = 0.93$, root mean square error of cross validation ($RMSEP$) = 188.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, RPD = 3.77 and bias = 21.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). For qualitative models, the classification model of total fungal contamination in brown rice samples developed using partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) provided the highest percentage of overall correct classification of 97.18%. For qualitative models of single kernels, the classification model of fungal growth and non-fungal growth on brown rice kernels developed from PLS-DA provided the highest percentage of overall correct classification of 93.75%. The classification model of aflatoxin B1 contaminated and non-aflatoxin B1 contaminated brown rice kernels developed from PLS-DA provided the highest percentage of overall correct classification of 98.15%. This study demonstrated that the data variability and distribution in the samples are important factors that affect the performance of NIRS models.

Department: Microbiology
Field of Study: Industrial Microbiology
Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุน จากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 27 และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอด ความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมถึงช่วย ตรวจสอบแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญ ในฐานะที่เป็นอาจารย์ที่ ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ด้านเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ เพื่อปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และ ดร. ศุมาพร เกษมสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมไปถึงให้ความรู้และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตร มิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) รุ่น NIRFlex N-500 และสถานที่สำหรับงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณบริษัท Bruker Corporation ประเทศเยอรมนี และ Bruker optik ประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) รุ่น MPA สำหรับงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา นางสาวพัฒนชิตา ธราดลศิริ ฐิติกุล และนางสาวชลธิชา สีเหนียง สมาชิกห้องวิจัย 1904/14 เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุล ชีววิทยาทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัย รวมถึงให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำ ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกมีกำลังใจและมีช่วงเวลาที่ดีตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้ กำลังใจมาโดยตลอดการทำงานวิจัยจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ฐ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	5
2.1 ข้าวกลิ้ง.....	5
2.2 ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวกลิ้ง	6
2.3 สารอาหารและประโยชน์ของข้าวกลิ้ง	7
2.4 ชนิดและมาตรฐานข้าวกลิ้ง.....	10
2.4.1 ประกาศกระทรวงพาณิชย์.....	10
2.4.2 ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์	10
2.5 สถานการณ์การผลิตและการส่งออกข้าว.....	11
2.5.1 สถานการณ์การผลิตข้าว	11
2.5.2 การส่งออกข้าวกลิ้ง	13
2.6 ราและสารพิษจากรา	14
2.7 อะฟลาทอกซิน	16
2.7.1 ชนิดและสมบัติของของอะฟลาทอกซิน	16

2.7.2	ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน.....	18
2.7.3	ราที่ผลิตอะฟลาทอกซิน	19
2.7.4	การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหาร	20
2.7.5	การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าว	21
2.7.6	ข้อกำหนดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร	23
2.8	การตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหาร	24
2.8.1	วิธีพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา.....	24
2.8.2	วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล.....	25
2.9	การตรวจหาการปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหาร	26
2.10	เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS)	29
2.10.1	หลักการพื้นฐานของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี	30
2.10.2	เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์	34
2.11	การวิเคราะห์ข้อมูลโดยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	35
2.11.1	การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	35
2.11.2	ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	37
2.11.2.1	การสร้างแบบจำลองที่ใช้ทำนาย หรือ การทำแคลิเบรชัน (calibration)....	37
2.11.2.2	การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองที่สร้างขึ้นมา หรือ การทำแวลิด เดชัน (validation) หรือ การทวนสอบ (verification).....	39
2.11.3	ค่าทางสถิติที่ใช้พิจารณาความแม่นยำของแบบจำลอง.....	40
2.12	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	42
2.12.1	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือ.....	42
2.12.2	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่าง	43
2.12.3	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่	45

2.13 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในผลผลิตทางการเกษตร	46
2.14 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราและ สารพิษจากราในธัญพืช.....	46
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ.....	49
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	49
เคมีภัณฑ์.....	51
วิธีดำเนินการวิจัย	52
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	52
3.2 การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะพลา ทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่าง	52
3.2.1 การปรับภาวะข้าวกล้อง	52
3.2.1.1 การปรับความชื้น	53
3.2.1.2 การปรับการปนเปื้อนของรา	54
3.2.2 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด	56
3.2.3 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	57
3.2.3.1 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี direct plating.....	57
3.2.3.2 การสกัดอะพลาทอกซินและวิเคราะห์หาปริมาณอะพลาทอกซินรวมโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	57
3.2.4 การทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ปริมาณอะพลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าว กล้องปรับภาวะของผู้วิจัย (Laboratory performance).....	58
3.2.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	58
3.2.5.1 การตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outliers)	58

3.2.5.2 การสร้างแบบจำลองจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	59
3.2.6 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	61
3.3 การตรวจสอบการเจริญของ <i>A. flavus</i> และปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	61
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อตรวจสอบการเจริญของรา.....	61
3.3.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1	62
3.3.3 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด	62
3.3.4 การติดตามการเจริญของราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ.....	63
3.3.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	63
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	64
4.1 การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะข้าวกล้อง	64
4.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	64
4.1.1.1 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง	64
4.1.1.2 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง	67
4.1.1.3 ผลการทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะของผู้วิจัย (Laboratory performance)	69
4.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด	70
4.1.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	76
4.1.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด.....	79
4.1.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลิเนีซีเซียวมเหลือง.....	81

4.1.3.3	แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวม	82
4.1.3.4	การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแบบจำลอง (Regression coefficient plot).....	84
4.1.4	การสร้างแบบจำลองเพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	94
4.1.4.1	แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด.....	94
4.1.4.2	แบบจำลองที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลือง.....	97
4.1.4.3	แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม.....	99
4.2	การตรวจสอบการเจริญของ <i>A. flavus</i> และปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	102
4.2.1	การตรวจสอบการเจริญของ <i>A. flavus</i> บนเมล็ดข้าวกล้อง.....	102
4.2.1.1	ลักษณะเมล็ดข้าวกล้องที่ใช้สำหรับตรวจสอบการเจริญของรา	102
4.2.1.2	ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ใช้สำหรับตรวจสอบการเจริญของรา.....	103
4.2.1.3	แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามการเจริญของรา.....	106
4.2.2	การตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 บนเมล็ดข้าวกล้อง	107
4.2.2.1	ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1	107
4.2.2.2	แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1	110
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	113

5.1 การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะข้าวกล้อง	113
5.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	113
5.1.1.1 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง	113
5.1.1.2 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง	114
5.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด	116
5.1.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	116
5.1.3.1 แบบจำลองเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด	117
5.1.3.2 แบบจำลองเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลือง	117
5.1.3.3 แบบจำลองเพื่อการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวม	118
5.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	119
5.1.4.1 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด	119
5.1.4.2 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลือง	120
5.1.4.3 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามปริมาณอะฟลาทอกซินรวม	120
5.2 การตรวจสอบการเจริญของ <i>A. flavus</i> และปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี	121
5.2.1 การตรวจสอบการเจริญของ <i>A. flavus</i> บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว	121
5.2.1.1 ลักษณะเมล็ดข้าวกล้อง	121
5.2.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด	121
5.2.1.3 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	122

5.2.2 การตรวจการปนเปื้อนของอะพลาทอกซินปี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดียว.....	122
5.2.2.1 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด	122
5.2.2.2 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	123
รายการอ้างอิง	125
ภาคผนวก.....	142
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	147



สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1	ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวกล้อง (ดัดแปลงจาก อรอนงค์ นัยวิกุล (2556)).....	6
ภาพที่ 2.2	<i>A. flavus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA [ก], ลักษณะโคโคนิเดียลเฮดและโคโคนิเดียของ <i>A. flavus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเกล =10 ไมโครเมตร กำลังขยาย 40X [ข].....	19
ภาพที่ 2.3	ตำแหน่งรังสีเนียร์อินฟราเรดในแถบแม่เหล็กไฟฟ้า (Singh และคณะ, 2011).....	30
ภาพที่ 2.4	รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552).....	30
ภาพที่ 2.5	สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของพริกหยวกแดง แขนงนอนแสดงความยาวคลื่นในหน่วยนาโนเมตรและแกนตั้งแสดงค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดแสงที่สะท้อน (reflectance) (ดัดแปลงจาก Hernández Hierro และคณะ (2008)).....	31
ภาพที่ 2.6	องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (ดัดแปลงจาก Reich (2005)).....	34
ภาพที่ 2.7	ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	37
ภาพที่ 3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะพลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่าง.....	55
ภาพที่ 3.2	ตัวอย่างข้าวกล้องที่บรรจุในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่าง [ก], การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer; FT-NIR) รุ่น MPA [ข].....	56
ภาพที่ 3.3	ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่บรรจุในภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่าง [ก], เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR) รุ่น NIRFlex N-500 [ข].....	63
ภาพที่ 4.1	การตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง ด้วยวิธี direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยภาพ [ก] แสดงการติดเชื้อของราทั้งหมด และภาพ [ข] แสดงการติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลือง.....	64
ภาพที่ 4.2	การแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะ 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย).....	65

ภาพที่ 4.3 การแจกแจงความถี่ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลือง จากตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ จำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย).....	67
ภาพที่ 4.4 การแจกแจงความถี่ของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่พบในตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ จำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย)	68
ภาพที่ 4.5 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดุกกลั่นคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ (natural) และที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificial) ที่ความชื้นต่างกัน (initial = ไม่ปรับความชื้น, ปรับความชื้น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์)	71
ภาพที่ 4.6 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ (natural) และที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificial) ที่ความชื้นต่างกัน (initial = ไม่ปรับความชื้น, ปรับความชื้น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์)	71
ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดุกกลั่นคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์	73
ภาพที่ 4.8 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์	73
ภาพที่ 4.9 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดุกกลั่นคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลือง เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์	74
ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลือง เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์	74
ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดุกกลั่นคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมเท่ากับ 0, 0.1-50 และมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม	75

<p>ภาพที่ 4.12 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมเท่ากับ 0, 0.1-50 และมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม.....</p>	75
<p>ภาพที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากวิธี direct plating (แแกนนอน) กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการลบโดยเส้นตรงของชุดตัวอย่างที่ 6 (ตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะทั้งหมด) (แแกนตั้ง).....</p>	80
<p>ภาพที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากวิธี direct plating (แแกนนอน) กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณของชุดตัวอย่างที่ 4 (ตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์) (แแกนตั้ง).....</p>	82
<p>ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA (แแกนนอน) กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานของชุดตัวอย่างที่ 6 (ตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะทั้งหมด) (แแกนตั้ง).....</p>	83
<p>ภาพที่ 4.16 กราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง</p>	84
<p>ภาพที่ 4.17 กราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง</p>	85
<p>ภาพที่ 4.18 กราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง</p>	86
<p>ภาพที่ 4.19 ค่า X-loading weight ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง</p>	89
<p>ภาพที่ 4.20 ค่า X-loading weight ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง.....</p>	90
<p>ภาพที่ 4.21 ค่า X-loading weight ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง.....</p>	91

- ภาพที่ 4.22** ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ในวันที่ 1-5 ของการบ่ม ภาพ [ก]-[ง] แสดงลักษณะของเมล็ดข้าวกล้องที่ไม่มีการเจริญของรา และภาพ [จ]-[ฎ] แสดงลักษณะของเมล็ดข้าวกล้องที่มีการเจริญของรา..... 102
- ภาพที่ 4.23** สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของรา และมีการเจริญของราบนเมล็ด ในวันที่ 1-5 ของการบ่ม..... 104
- ภาพที่ 4.24** สเปกตรัมที่ได้จากวิธีการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร ของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของรา และมีการเจริญของราบนเมล็ด ในวันที่ 1-5 ของการบ่ม 104
- ภาพที่ 4.25** สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ปี 1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม..... 108
- ภาพที่ 4.26** สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร ของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม..... 108

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	สารอาหารในข้าวกล้องและประโยชน์	7
ตารางที่ 2.2	การเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการต่อข้าว 100 กรัม ระหว่างข้าวกล้อง และข้าว ขาว	9
ตารางที่ 2.3	รายชื่อประเทศที่มีผลผลิตข้าวมากที่สุด 10 อันดับแรกของโลก ในปี 2557/58.....	12
ตารางที่ 2.4	สถิติการส่งออกข้าวกล้องในปี พ.ศ. 2557-2558 ตามใบรับรองมาตรฐานสินค้า.....	13
ตารางที่ 2.5	สารพิษจากรา ราที่ผลิต และผลผลิตทางการเกษตรที่พบการปนเปื้อน.....	15
ตารางที่ 2.6	โครงสร้างและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน.....	17
ตารางที่ 2.7	การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหาร.....	21
ตารางที่ 2.8	การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าว.....	22
ตารางที่ 2.9	ตัวอย่างข้อกำหนดระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารของ คณะกรรมการอาหารยุโรป.....	23
ตารางที่ 2.10	แนวทางในการอธิบายความสามารถของแบบจำลองแคลิเบรชันด้วยค่า R^2	40
ตารางที่ 2.11	แนวทางในการอธิบายประสิทธิภาพและการนำแบบจำลองไปใช้ด้วยค่า RPD และ RER.....	41
ตารางที่ 2.12	การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการวิเคราะห์องค์ประกอบใน ผลผลิตทางการเกษตร.....	46
ตารางที่ 3.1	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	53
ตารางที่ 4.1	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง	65
ตารางที่ 4.2	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่าง ข้าวกล้อง.....	66
ตารางที่ 4.3	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่พบในตัวอย่างข้าวกล้อง	68
ตารางที่ 4.4	ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) ของผู้วิจัย	69
ตารางที่ 4.5	ค่าความสามารถในการวัดเหมือน (Reproducibility) ของผู้วิจัย	69

ตารางที่ 4.6 การสั้นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ (ภาพที่ 4.6).....	72
ตารางที่ 4.7 ชุดตัวอย่างที่นำมาทดลองสร้างแบบจำลอง.....	76
ตารางที่ 4.8 ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบไขว้ (cross validation).....	78
ตารางที่ 4.9 ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation)	78
ตารางที่ 4.10 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	80
ตารางที่ 4.11 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	81
ตารางที่ 4.12 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวกล้อง.....	83
ตารางที่ 4.13 การสั้นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่พบในกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.16, 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ).....	87
ตารางที่ 4.14 การสั้นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่พบในกราฟ X-loading weight plot ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา ราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนี สีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.19, 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ).....	92
ตารางที่ 4.15 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA.....	95
ตารางที่ 4.16 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA	95

ตารางที่ 4.17 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าและเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA.....	96
ตารางที่ 4.18 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าและเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA.....	96
ตารางที่ 4.19 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลือง ด้วยวิธี SIMCA.....	98
ตารางที่ 4.20 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลือง ด้วยวิธี PLS-DA	98
ตารางที่ 4.21 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA.....	98
ตารางที่ 4.22 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคโลนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA.....	99
ตารางที่ 4.23 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม ด้วยวิธี SIMCA	100
ตารางที่ 4.24 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม ด้วยวิธี PLS-DA.....	100
ตารางที่ 4.25 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า และมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA.....	101
ตารางที่ 4.26 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า และมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี PLS-DA.....	101
ตารางที่ 4.27 การสันสະเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดียวที่มีการเจริญของราต่างกัน (ภาพที่ 4.24).....	105
ตารางที่ 4.28 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดียวที่มีและไม่มีการเจริญของราด้วยวิธี SIMCA	106

ตารางที่ 4.29 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีสารเจริญของ ราด้วยวิธี PLS-DA.....	107
ตารางที่ 4.30 การสันเสทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่ พบจากสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่าง ข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ปนเปื้อนอะพลาทอกซินปี 1 (ภาพที่ 4.26).....	109
ตารางที่ 4.31 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะพลา ทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA.....	111
ตารางที่ 4.32 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะ พลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี PLS-DA	111
ตารางที่ 4.33 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะ พลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ และมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วย วิธี SIMCA.....	112
ตารางที่ 4.34 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะ พลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ และมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วย วิธี PLS-DA	112

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารที่เกิดจากการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของราสกุล *Aspergillus* section *Flavi* เช่น *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* (Zaboli และคณะ, 2010) โดยเฉพาะ *A. flavus* เป็นราสำคัญที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (AFB₁) และ อะฟลาทอกซินบี 2 (AFB₂) ราชนิดนี้มีโคโคนีสีเขียวอมเหลือง ลักษณะเวซิเคิล (vesicle) เป็นรูปทรงรีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20-45 ไมโครเมตร และโคนิเดีย (conidia) มีรูปร่างกลมผนังเรียบขนาดประมาณ 3-6 ไมโครเมตร พบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในดิน เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส และที่ความชื้นประมาณ 14-30 เปอร์เซ็นต์ (Klich, 2007; Coppock และคณะ, 2012; Chase L. E. และคณะ, 2013)

อะฟลาทอกซินที่พบในธรรมชาติมี 4 ชนิด คือ AFB₁, AFB₂, AFG₁ และ AFG₂ (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2557) พบปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด โดยเฉพาะธัญพืชต่างๆ รวมทั้งข้าว (Coppock และคณะ, 2012) อะฟลาทอกซินเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากสารพิษชนิดนี้เป็นพิษต่อตับ ซึ่งโรคที่เกิดจากอะฟลาทอกซิน เรียกว่า อะฟลาทอกซิโคซิส (aflatoxicosis) ทำให้เกิดพิษมีทั้งแบบเฉียบพลันซึ่งทำให้เกิดตับวายเฉียบพลันอาจทำให้เสียชีวิตได้ และเกิดพิษแบบเรื้อรังในคนแสดงอาการคล้ายกับโรคตับอักเสบเรื้อรัง ระบบภูมิคุ้มกันต่ำลง และนำไปสู่มะเร็งตับในที่สุด (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2555)

ข้าวกล้อง คือ ข้าวที่สีเอาเปลือก (แกลบ) ออกไป แต่ยังมีจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (รำ) อยู่ ซึ่งทำให้มีสารอาหารมากกว่าข้าวสารหรือข้าวขาว (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2553) ข้าวกล้องมีปริมาณธาตุเหล็กมากกว่าข้าวขาว 60 เปอร์เซ็นต์ และมีวิตามินบี 1 มากกว่าข้าวขาว 80 เปอร์เซ็นต์ (Babu และคณะ, 2009) สารอาหารในข้าวกล้อง ได้แก่ โปรตีน วิตามิน เช่น วิตามินบีรวม วิตามินอี ไนอะซิน และเกลือแร่ต่างๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ทองแดง และสังกะสี ซึ่งช่วยให้ร่างกายทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ข้าวกล้องมีใยอาหารสูงช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้อีกด้วย (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2553)

ข้าวกล้องถูกจัดอยู่ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในประเภทข้าว ซึ่งในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นอันดับ 3 ของโลก และมีปริมาณการส่งออก 6.6 ล้านตัน มูลค่า 133,842 ล้านบาท (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2556) ซึ่งการจะครองส่วนแบ่งการตลาดของข้าวในตลาดโลกและ

อาเซียนนั้น ประเทศไทยต้องพัฒนาคุณภาพและสายพันธุ์ของข้าว ตลอดจนการลดต้นทุนการผลิตเพื่อแข่งขันกับประเทศที่ส่งออกข้าวรายอื่นในตลาดโลก อย่างไรก็ตาม ข้าวกล้องเป็นสินค้าเกษตรชนิดหนึ่งที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้เช่นเดียวกับธัญพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในข้าวส่งผลกระทบต่อคุณภาพ ทำให้ผลผลิตมีราคาต่ำ และอาจถูกปฏิเสธจากประเทศผู้นำเข้า สูญเสียผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อประเทศอย่างมาก จึงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของข้าวให้เป็นไปตามมาตรฐาน เช่น ข้าวที่ส่งให้ประเทศในสหภาพยุโรปจะต้องมีระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมทุกชนิดในข้าวได้ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2010) สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ว่าต้องมีอะฟลาทอกซินอยู่ในอาหารทุกชนิดไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529)

การตรวจวัดการปนเปื้อนของราในผลผลิตทางการเกษตรเป็นวิธีการหนึ่งที่จะบ่งชี้ความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อนของสารพิษจากราตามมา ซึ่งวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารนั้นนิยมใช้วิธีจุลชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การนับจำนวนรา การคัดแยกราจากตัวอย่างอาหาร การจำแนกและระบุชนิดของราที่คัดแยกได้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตจากลักษณะที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า และการสังเกตโครงสร้างของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แม้ว่าจะเป็นวิธีมาตรฐานแต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ ใช้เวลานานและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ (Magan, 1993) ปัจจุบันวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากวิธีนี้มีความจำเพาะและมีความไวสูง (Konietzny และคณะ, 2003) สามารถใช้จัดจำแนกและระบุชนิดของรา อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบราที่ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรได้ (Niessen, 2007) อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องความซับซ้อนของวิธีการในการวิเคราะห์ สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ และการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด (Santos และคณะ, 2010)

การวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารมีขั้นตอนการวิเคราะห์ 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย (1) การสกัดสารพิษจากราในตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลาย เช่น อะซีโทไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (2) การกำจัดสิ่งรบกวน (clean up) นิยมใช้ solid phase extraction (SPE) และ immunoaffinity column (IAC) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากสารสกัด (Roseanu และคณะ, 2010) และ (3) การวิเคราะห์สารพิษจากรา โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์และภูมิคุ้มกันวิทยา วิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography หรือ TLC), โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography หรือ HPLC) และแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography หรือ GC) (Rahmani และคณะ, 2009) วิธีเหล่านี้มีความแม่นยำและความไวสูง แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากใช้สารเคมีปริมาณมาก และ

อุปกรณ์ในขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวนไม่สามารถนำกลับมาให้ซ้ำได้ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งเกิดปัญหาสารเคมีตกค้างซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญในการวิเคราะห์ (Tripathi และคณะ, 2009) ส่วนวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นิยมใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็ว ปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกพัฒนาให้ใช้งานง่ายและรวดเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ยังคงมีขั้นตอนเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ มีการใช้สารเคมี และเอนไซม์รวมไปถึงเครื่องมือหรือชุดสำเร็จที่มีความจำเพาะ ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และอาจประสบปัญหาความไม่เสถียรของน้ำยาที่ใช้ทดสอบเมื่อมีการทดสอบเป็นระยะเวลานาน (Fernández-Ibañez และคณะ, 2009)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (near infrared spectroscopy, NIRS) เป็นการใช้ประโยชน์จากคลื่นเนียร์อินฟราเรด ซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า มีความยาวคลื่นระหว่าง 800-2500 นาโนเมตร (Roggo และคณะ, 2007) เมื่อโมเลกุลของสารดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดเข้าไป จะมีผลต่อระดับการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล เรียกปฏิกิริยาดังกล่าวว่าการเกิดอันตรกิริยา โดยสารที่สามารถเกิดอันตรกิริยาได้นั้นโมเลกุลต้องประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน (X-H อะตอม X ได้แก่ C, O, N และ S) สารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันจะดูดกลืนพลังงานแสงเนียร์อินฟราเรดที่ความยาวคลื่นต่างๆ ได้แตกต่างกัน ซึ่งจะแสดงในรูปของเส้นสเปกตรัมเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ในเชิงปริมาณและคุณภาพต่อไป (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552; สนธิสุข ชีระชัยชยติ, 2554) ข้อเด่นของ NIRS คือ เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง สะดวก รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองงบประมาณในการวิเคราะห์ เนื่องจากไม่ใช้สารเคมีทำให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง อีกทั้งเทคโนโลยีนี้ยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ถูกนำมาใช้เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ยา เครื่องสำอาง การเกษตร อาหารและเครื่องดื่ม เป็นต้น ด้านอุตสาหกรรมการเกษตรรวมทั้งอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มใช้ NIRS เพื่อตรวจไขมัน โปรตีน และความชื้นในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ นม และอาหารทะเล (Prieto และคณะ, 2009; Liu และคณะ, 2013) นอกจากนี้ ยังใช้เพื่อตรวจหาสารเคมีอันตราย ราและสารพิษจากราที่ตกค้างในอาหาร (Teye และคณะ, 2013) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Fernández-Ibañez และคณะ (2009) ศึกษาและประยุกต์ใช้ FT-NIR spectrometer เพื่อตรวจหาอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ที่มีระดับความชื้นต่างๆ เพื่อให้ราเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินในระดับต่างๆ พบว่าเทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็วเพื่อควบคุมคุณภาพของเมล็ดธัญพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับข้าวโพดได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธี standard normal variate and detrending (SNVD) ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.82 และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SECV) เท่ากับ 0.200 สำหรับข้าวบาร์เลย์แบบจำลองซึ่ง

พัฒนาโดยใช้วิธี SNVD จัดการกับสเปกตรัมให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.84 และค่า SECV เท่ากับ 0.183 งานวิจัยของ รุ่งนภา ไกลถิ่น และคณะ (2554) ศึกษาการใช้ NIRS เพื่อตรวจหาเมล็ดข้าวสารที่ถูกทำลายด้วย *A. flavus* ที่ผสมอยู่กับข้าวสารปกติในระดับการปนเปื้อนต่างๆ ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis, PCA) พบว่า NIRS สามารถแยกเมล็ดข้าวปกติกับเมล็ดข้าวที่มีการปนเปื้อนต่ำสุดตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักขึ้นไป จากตัวอย่างการศึกษาดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีการปรับภาวะของตัวอย่างเพื่อให้ได้ค่าองค์ประกอบที่ต้องการวัดที่หลากหลาย การเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อความคลาดเคลื่อนในการตรวจสอบค่าด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2545) ดังนั้น การเลือกตัวอย่างที่ดีจะต้องเป็นตัวแทนที่มีค่าองค์ประกอบที่ต้องการวัดเป็นแบบสม่ำเสมอ (uniform distribution) จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำนายของแบบจำลองที่ดีขึ้น (ริณภา พุทธิง, 2556)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่างโดยใช้วิธี ELISA เป็นวิธีมาตรฐาน และการตรวจสอบการเจริญของ *A. flavus* ที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบนเมล็ดข้าวกล้องเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะฟลาทอกซินรวมในข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่าง

2) เพื่อตรวจสอบการเจริญของ *Aspergillus flavus* บนเมล็ดข้าวกล้องโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ข้าวกล้อง

ข้าวจัดเป็นพืชตระกูลหญ้า (Family Gramineae) สกุลออริซา (Genus *Oryza*) ลักษณะโดยทั่วไปเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลำต้นเป็นปล้อง สามารถปลูกได้ในทุกทวีปของโลก ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกาเนื่องจากมีพื้นที่เต็มไปด้วยน้ำแข็ง (เฉลิมวุฒิ สุษตีกุล, 2549) ข้าวมีประมาณ 23 ชนิด (species) สามารถแบ่งข้าวออกได้ 2 จำพวก คือ ข้าวปลูก (cultivated rice) และข้าวป่า (wild rice) ข้าว *Oryza Sativa* เป็นข้าวปลูกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก แบ่งออกได้ 3 พวก ได้แก่ อินдика (indica type) ปลูกมากในประเทศเขตร้อนของทวีปเอเชียและประเทศไทย จาปอนิกา (japonica type) ปลูกมากในประเทศเขตอบอุ่นหรือกึ่งร้อน เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และจาวานิกา (javanica type) เป็นข้าวที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลูกเฉพาะในประเทศอินโดนีเซียและพม่า (กล้า เมธากานต์, 2552)

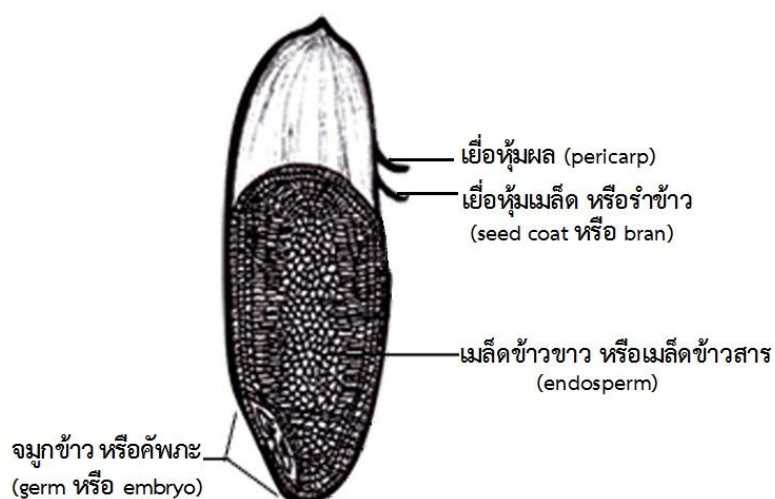
ข้าวกล้อง (cargo rice, loonzain rice, brown rice, husked rice) หมายถึง ข้าวที่ผ่านการกะเทาะเปลือก (hull หรือ husk) ออกเท่านั้น (กระทรวงพาณิชย์, 2556) จึงยังคงมีส่วนของจมูกข้าว และเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นแหล่งของสารอาหารต่างๆ ทำให้ข้าวกล้องยังคงมีคุณค่าทางอาหารอยู่มาก ข้าวที่ได้หลังการเก็บเกี่ยว เรียกว่า ข้าวเปลือก ซึ่งต้องมีการแปรสภาพข้าวเปลือกให้เป็นข้าวสารก่อนจะนำไปหุงให้สุกและบริโภคได้ ในสมัยโบราณมีวิธีการแปรสภาพข้าวเปลือกอย่างง่ายโดยการตำ ข้าวที่ได้ เรียกว่า ข้าวซ้อมมือ ปัจจุบันเทคโนโลยีได้รับการพัฒนามากขึ้น มนุษย์จึงคิดค้นเครื่องมือเพื่อทุ่นแรง และลดระยะเวลาในการแปรสภาพข้าวขึ้นมา โดยวิธีการแปรสภาพข้าวด้วยเครื่องจักร เรียกว่า การสีข้าว (rice milling) ซึ่งเป็นกรรมวิธีในการแปรรูปข้าวเปลือกให้เป็นข้าวสารหรือข้าวกล้อง หลังจากที่แยกสิ่งแปลกปลอมออกจากข้าวเปลือกแล้ว ข้าวเปลือกจะถูกนำมากะเทาะด้วยเครื่องกะเทาะเพื่อให้เปลือกหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (husk) หลุดออก เครื่องกะเทาะที่นิยมใช้ คือ เครื่องกะเทาะแบบโม้หิน (under runner disc) และเครื่องกะเทาะแบบลูกยาง (rubber rolls) เพื่อให้เกิดการเสียดสี กะเทาะให้แกลบหลุดออกจากตัวเมล็ดข้าว ข้าวที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่าข้าวกล้อง ซึ่งจะมีเยื่อหุ้มผล (pericarp) และคัพพะ (embryo) ติดอยู่ จากนั้น จึงแยกแกลบและข้าวเปลือกที่ยังไม่ถูกกะเทาะออกจากข้าวกล้อง สีของข้าวกล้องมีตั้งแต่สีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม สีแดงอ่อน สีม่วง และสีดำ ซึ่งสีที่เห็นนั้นเป็นสีของเยื่อหุ้มผล (pericarp) ด้วยเหตุนี้ ข้าวกล้องจึงมีหลายสีขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าว หากนำข้าวกล้องไปขัดเอาชั้นรำออกให้เหลือแต่ชั้นแป้งซึ่งทำให้สูญเสียคุณค่าทาง

อาหารไป เรียกขั้นตอนนี้ว่า การขัดขาว ข้าวที่ได้ เรียกว่า ข้าวสาร หรือข้าวขาว (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2558)

2.2 ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวกล้อง

ข้าวกล้องมีผิวเมล็ดไม่เรียบ สีของข้าวกล้องมีสีเดียวกับสีของเยื่อหุ้มผล (pericarp) ซึ่งอยู่ติดกับเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) (น้ำทิพย์ เรืองดี, 2555) ลักษณะของเมล็ดข้าวกล้องแสดงดังภาพที่ 2.1 ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

- เยื่อหุ้มผล (pericarp) มีลักษณะเป็นเส้นใยผนังเซลล์ประกอบด้วยโปรตีน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส
- เยื่อหุ้มเมล็ด หรือรำข้าว (seed coat หรือ bran) อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผลเข้าไป ประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้นเรียงกันเป็นแถว และมีสารประเภทไขมันเป็นส่วนประกอบด้วย
- จมูกข้าว หรือคัพภะ (germ หรือ embryo) อยู่ติดกับเนื้อเมล็ดทางด้านเปลือกใหญ่ที่หุ้มเมล็ด และเป็นส่วนที่เจริญเป็นต้นต่อไป จึงเป็นส่วนที่มีโปรตีนและไขมันสูง
- เมล็ดข้าวขาว หรือเมล็ดข้าวสาร (endosperm) เป็นส่วนที่อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด ซึ่งประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ แป้งในเมล็ดข้าวมี 2 ชนิด คือ แอมิโลส (amylose) และ แอมิโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งสัดส่วนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของข้าว นอกจากนี้ ยังประกอบไปด้วยโปรตีน ไขมัน และเส้นใยอีกด้วย



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวกล้อง (ดัดแปลงจาก อรอนงค์ นัยวิกุล (2556))

2.3 สารอาหารและประโยชน์ของข้าวกล้อง

เมล็ดข้าวกล้องมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน โยอาหาร วิตามิน แกลีอแร่ และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท วิตามิน และกลีอแร่ หรือ เอนไซม์ ทำหน้าช่วยป้องกันร่างกายจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ประโยชน์ของสารอาหารแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2.1 สารอาหารในข้าวกล้องสามารถช่วยป้องกัน โรคที่เกิดจากการขาดวิตามินต่างๆ ได้ เช่น โรคเหน็บชาจากการขาดวิตามินบี 1 โรคปากนกกระจอก จากการขาดวิตามินบี 2 โรคโลหิตจางที่มีสาเหตุมาจากการขาดธาตุเหล็ก วิตามินบี และโปรตีน โรคนี้ซึ่ง เกิดจากการได้รับโปรตีนและฟอสฟอรัสไม่เพียงพอ อาการท้องผูกเพราะรับประทานอาหารที่มีเส้นใย น้อย โรคทางระบบประสาทบางชนิดและโรคปลายประสาทอักเสบจากการขาดวิตามินบีรวม (สำนัก พัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว, 2552)

ตารางที่ 2.1 สารอาหารในข้าวกล้องและประโยชน์

สารอาหาร (วิตามิน)	ประโยชน์
วิตามินเอ	ช่วยในการเจริญเติบโตและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ป้องกันโรคตาฟางในเวลา กลางคืน และช่วยในการพัฒนากระดูกและฟัน
วิตามินบี 1	ช่วยให้กลไกในร่างกายย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดีขึ้น และช่วยสนับสนุนระบบ การทำงานของประสาท หัวใจ และกล้ามเนื้อ
วิตามินบี 2	ช่วยสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และเม็ดเลือดแดง ช่วยรักษาระดับการหายใจ ของเซลล์ รวมทั้งช่วยในการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน
วิตามินบี 3	ช่วยกระตุ้นการหมุนเวียน และลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ลดความดัน เลือด ช่วยให้ดูดซึมโปรตีน ไขมัน และน้ำตาล
วิตามินบี 5	ช่วยสร้างเซลล์ใหม่ และสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยพัฒนาระบบประสาท ส่วนกลาง และช่วยผ่อนคลายความเครียด
วิตามินบี 6	ช่วยสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ รักษาสมดุลของโซเดียม และฟอสฟอรัสใน ร่างกาย รวมทั้งมีส่วนในการสร้างกรดอะมิโน
วิตามินซี	ช่วยสมานแผล รักษาฟัน เหงือก กระดูก ช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็ก สร้าง ภูมิคุ้มกันโรค เพิ่มความแข็งแรงให้เส้นเลือด และช่วยป้องกันการเกิดสาร มะเร็งจากไนเตรต
วิตามินดี	ช่วยในการดูดซึมแคลเซียม และฟอสฟอรัส ช่วยในการทำงานของหัวใจ รวมทั้งระบบประสาทส่วนกลาง

ตารางที่ 2.1 สารอาหารในข้าวกล้องและประโยชน์ (ต่อ)

สารอาหาร (วิตามิน)	ประโยชน์
วิตามินอี	ช่วยชะลอความแก่ของเซลล์ ช่วยในการกระจายออกซิเจนในกระแสเลือด ป้องกันการสะสมของแคลเซียมภายในหลอดเลือด ทั้งยังเป็นสารหลักของสารต้านอนุมูลอิสระ
กรดโฟลิก	เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการสร้าง DNA และ RNA สำคัญต่อการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง และต่อการเติบโตของระบบสืบพันธุ์
แคลเซียม	ใช้สร้างกระดูกและฟัน ควบคุมการเต้นของหัวใจ ลดความดันเลือด ช่วยในการทำงานของไตเป็นปกติ
โพแทสเซียม	ช่วยรักษาระดับการเต้นของหัวใจให้เป็นปกติ กระตุ้นการทำงานของไต ลดความดันเลือด และรักษาสุขภาพผิว
แมกนีเซียม	ช่วยให้ร่างกายใช้แคลเซียมและวิตามินซีได้ดี ช่วยในการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ และรักษาระดับการเต้นของหัวใจให้เป็นปกติ
ฟอสฟอรัส	ช่วยให้ร่างกายสามารถใช้ออกซิเจนได้ดี
เหล็ก	เป็นส่วนสำคัญของฮีโมโกลบินซึ่งใช้ส่งออกซิเจนจากปอดไปสู่เซลล์ต่างๆ ช่วยทำให้เลือดมีความต้านทานต่อเชื้อโรค
สังกะสี	ช่วยในการสร้างโปรตีน ช่วยในการทำงานของกล้ามเนื้อ ช่วยรักษาเสถียรภาพของเลือด จำเป็นต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศชาย ทั้งยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
แมงกานีส	ช่วยในการย่อยกรดอะมิโน ช่วยในการนำวิตามินบี 1 และ อี ไปใช้ในการย่อยอาหาร ไขมัน และคอเลสเตอรอล ช่วยในการสร้างกระดูก และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ
ทองแดง	ช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็ก ช่วยให้ร่างกายนำวิตามินซีไปใช้สร้างกล้ามเนื้อ เซลล์ เม็ดเลือดแดง และกระดูก
ไอโอดีน	ช่วยในการพัฒนาต่อมไทรอยด์ ช่วยเผาผลาญไขมันส่วนเกิน และควบคุมพลังงานในร่างกาย
ซีลีเนียม	เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการทำงานของระบบต่างๆ มีประสิทธิภาพช่วยปรับสมดุลของฮอร์โมนเอสโตรเจน

ที่มา: ดัดแปลงจาก นิตดา หงษ์วิวัฒน์ (2552)

รำข้าวและจมูกข้าวเป็นส่วนที่มีสารอาหารอยู่มาก แต่ในกระบวนการขัดสีข้าว รำข้าวและจมูกข้าวจะถูกกำจัดออกไปเกือบหมด ทำให้สารอาหารต่างๆ ในเมล็ดข้าวหายไปด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการต่อข้าว 100 กรัม ระหว่างข้าวกล้อง และข้าวขาว

ค่าโภชนาการต่อข้าว 100 กรัม	ข้าวกล้อง	ข้าวขาว	ปริมาณที่สูญหาย (%)
โปรตีน (กรัม)	7.0	6.40	19
วิตามินบีรวม			
วิตามินบี1 (มิลลิกรัม)	0.34	0.07	385
วิตามินบี2 (มิลลิกรัม)	0.05	0.03	66
ไนอะซิน (มิลลิกรัม)	0.62	0.11	463
กรดแพนโทเทนิค (มิลลิกรัม)	1.50	0.25	81
กรดโฟลิก (มิลลิกรัม)	20.00	3.00	455
เกลือแร่			
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.6	0.8	100
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	32.0	24.0	33
แมกนีเซียม (มิลลิกรัม)	52.0	14.0	271
แมงกานีส (มิลลิกรัม)	1.5	0.9	67
สังกะสี (มิลลิกรัม)	1.9	1.5	27
โคบอลต์ (ไมโครกรัม)	4.2	0.9	367
ทองแดง (ไมโครกรัม)	360	230	57
ซีลีเนียม (ไมโครกรัม)	38.8	31.8	22
ไอโอดีน (ไมโครกรัม)	2.2	2.0	10

ที่มา: ดัดแปลงจาก นิตดา หงษ์วิวัฒน์ (2552)

2.4 ชนิดและมาตรฐานข้าวกล้อง

2.4.1 ประกาศกระทรวงพาณิชย์

ประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่อง กำหนดให้ข้าวหอมมะลิไทยเป็นสินค้ามาตรฐาน และมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิไทย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2556 ได้แบ่งสินค้ามาตรฐานข้าวหอมมะลิ ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวขาว และข้าวกล้อง และกำหนดให้สินค้ามาตรฐานข้าวหอมมะลิไทยทุกชั้น ประเภท และชนิด ต้องมีมาตรฐานดังต่อไปนี้ (กระทรวงพาณิชย์, 2556)

- 1) ความชื้นไม่เกินร้อยละ 14.0
- 2) มีลักษณะโดยทั่วไปเมื่อผ่านกระบวนการสีแล้ว เป็นข้าวเมล็ดยาว มีความขาว ท้อง ใสน้อยโดยธรรมชาติ
- 3) ไม่มีแมลงที่ยังมีชีวิตอยู่
- 4) มีขนาดเมล็ด ดังนี้
 - ความยาวเฉลี่ยของข้าวเต็มเมล็ด ที่ไม่มีส่วนใดหักต้องไม่ต่ำกว่า 7.0 มิลลิเมตร
 - อัตราส่วนความยาวเฉลี่ยต่อความกว้างเฉลี่ยของข้าวเต็มเมล็ดที่ไม่มีส่วนใดหัก ต้องไม่ต่ำกว่า 3.2 : 1
- 5) มีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้
 - มีปริมาณอมิโลส ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 13.0 และไม่เกินร้อยละ 18.0 ที่ระดับ ความชื้นร้อยละ 14.0
 - มีค่าการสลายเมล็ดข้าวในต่าง ระดับ 6-7

2.4.2 ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ประกาศข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: ข้าว มาตรฐานเลขที่ มกษ 4004-2555 ไว้เป็นมาตรฐานทั่วไป รายละเอียดมาตรฐานสำหรับข้าวกล้องมีดังต่อไปนี้ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555)

- 1) ข้าวกล้องแบ่งเป็น 4 ชั้นคุณภาพ ดังนี้
 - 1.1) ข้าวกล้อง 100 เปอร์เซ็นต์
 - 1.2) ข้าวกล้อง 5 เปอร์เซ็นต์
 - 1.3) ข้าวกล้อง 10 เปอร์เซ็นต์
 - 1.4) ข้าวกล้อง 15 เปอร์เซ็นต์

- 2) ลักษณะเฉพาะของข้าวกล้อง
 - 2.1) ไม่มีกลิ่นผิดปกติ เช่น กลิ่นเหม็นเปรี้ยว
 - 2.2) ปราศจากแมลงและไรที่มีชีวิต
 - 2.3) ความชื้นไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์
 - 2.4) มีข้าวในกลุ่มเดียวกัน ไม่น้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
- 3) ข้อกำหนดด้านสุขลักษณะ
 - 3.1) การเก็บรักษา

สถานที่เก็บรักษาข้าวกล้องต้องสะอาด ถูกสุขลักษณะ สามารถป้องกันข้าวจากการเปียกน้ำและป้องกันอันตรายจากการปนเปื้อนสัตว์พาหะนำเชื้อ เช่น หนู แมลง นก ป้องกันการเข้าทำลายของแมลงศัตรูข้าว รวมทั้งสัตว์เลื้อย ที่จะทำให้เกิดอันตรายและไม่เหมาะสมต่อการบริโภค สถานที่เก็บรักษาควรมีการหมุนเวียนอากาศที่ดี เพื่อไม่ให้เกิดความชื้นและความร้อนสะสม กรณีที่เก็บรักษาข้าวกล้องในกระสอบควรจัดเรียงกระสอบให้ห่างจากผนังอย่างเพียงพอ เพื่อให้เกิดการระบายอากาศได้ดี สะดวกต่อการเข้าไปทำความสะอาด และสามารถตรวจสอบความเรียบร้อยได้ ควรตรวจสอบความเรียบร้อยของข้าวกล้องที่เก็บรักษาเป็นระยะ เพื่อประเมินความเสียหาย และดำเนินการแก้ไขต่อไป

3.2) การบรรจุข้าวกล้อง

ต้องบรรจุในภาชนะที่เก็บรักษาเมล็ดข้าวได้เป็นอย่างดี วัสดุที่ใช้ต้องสะอาด มีคุณภาพที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก มีคุณสมบัติทนทานต่อการขนส่ง และสามารถป้องกันความเสียหายอันจะมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดข้าว การแสดงฉลากต้องไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของหมึกพิมพ์หรือกาวลงบนข้าวที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค

2.5 สถานการณ์การผลิตและการส่งออกข้าว

2.5.1 สถานการณ์การผลิตข้าว

กระทรวงเกษตร ประเทศสหรัฐอเมริกาได้สรุปสถานการณ์การผลิตข้าวของโลกในปีการผลิต 2556/57 ว่ามีพื้นที่เก็บเกี่ยวรวม 1009.63 ล้านไร่ ผลผลิตข้าวเปลือกเฉลี่ย 706 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตข้าวสารรวม 478.1 ล้านตัน พร้อมทั้งประเมินเบื้องต้นว่าในปีการผลิต 2557/58 มีพื้นที่เก็บเกี่ยวรวม 1001 ล้านไร่ ผลผลิตข้าวเปลือกเฉลี่ย 709 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตข้าวสารรวม 476.2 ล้านตัน โดยรายชื่อประเทศที่มีผลผลิตข้าวมากที่สุด 10 อันดับแรกของโลก ในปี 2557/58 แสดงในตาราง 2.3 จากการพยากรณ์ของกระทรวงเกษตร ประเทศสหรัฐอเมริกา ณ เดือน สิงหาคม ปี พ.ศ

2558 คาดว่าในปีการผลิต 2558/59 จะมีพื้นที่การเก็บเกี่ยวรวม 1006.38 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นจากปีก่อน 5.38 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 0.54 และผลผลิตข้าวเปลือกเฉลี่ยที่คาดว่าจะได้รับในปีนี้เป็น 709 กิโลกรัมต่อไร่ เท่ากับผลผลิตข้าวเปลือกเฉลี่ยที่ได้รับในปีที่ผ่านมา และคาดว่าจะมีผลผลิตข้าวสารรวม 479.65 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปีที่แล้ว 2.43 ล้านตันข้าวสาร คิดเป็นร้อยละ 0.51 (กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558)

สำหรับประเทศไทยที่ผ่านมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553-2557 ไทยมีเนื้อที่สำหรับปลูกข้าวเฉลี่ยปีละ 78.97 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 36.27 ล้านตันข้าวเปลือก ผลผลิตต่อไร่เฉลี่ย 459 กิโลกรัม โดยในปี 2557/58 ไทยมีผลผลิตจัดเป็นอันดับที่ 6 ของโลก มีปริมาณผลผลิต 20.50 ล้านตันข้าวสาร (ตารางที่ 2.3) และในปี พ.ศ. 2558 ประมาณการโดยสำนักเศรษฐกิจการเกษตร ณ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2558 มีเนื้อที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด 70.61 ล้านไร่ ผลผลิต 32.62 ล้านตันข้าวเปลือก ผลผลิตต่อไร่ 462 กิโลกรัม (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ข้าว, 2558)

ตารางที่ 2.3 รายชื่อประเทศที่มีผลผลิตข้าวมากที่สุด 10 อันดับแรกของโลก ในปี 2557/58

ประเทศ	ผลผลิต (ล้านตันข้าวสาร)
จีน	144.00
อินเดีย	102.00
อินโดนีเซีย	37.00
บังกลาเทศ	34.60
เวียดนาม	28.00
ไทย	20.50
ฟิลิปปินส์	12.20
เมียนมาร์	12.15
บราซิล	8.35
ญี่ปุ่น	7.70

ที่มา: ดัดแปลงจาก สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2557)

2.5.2 การส่งออกข้าวกล้อง

สำหรับการส่งออกข้าวกล้องของไทยในปี พ.ศ. 2557 มีปริมาณการส่งออก 19,087,653 กิโลกรัม และมูลค่าการส่งออก 709,059,661 บาท (สำนักงานมาตรฐานสินค้า กรมการค้าต่างประเทศ, 2557) ในปี พ.ศ. 2558 ไทยมีปริมาณการส่งออกข้าวกล้อง 20,173,553 กิโลกรัม และมีมูลค่าการส่งออก 725,823,567 บาท (สำนักงานมาตรฐานสินค้า กรมการค้าต่างประเทศ, 2559b) โดยภาพรวมในปี พ.ศ. 2558 ไทยมีการส่งออกข้าวกล้องเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2557 ทั้งด้านปริมาณและมูลค่าการส่งออก รายละเอียดสถิติการส่งออกข้าวกล้องในปี พ.ศ. 2557 และ 2558 แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 สถิติการส่งออกข้าวกล้องในปี พ.ศ. 2557-2558 ตามใบรับรองมาตรฐานสินค้า

ชนิดของข้าวกล้อง	ปี 2557		ปี 2558	
	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
ข้าวกล้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ชั้น 1	1,473,100	67,890,381	1,454,400	69,046,135
ข้าวกล้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ชั้น 2	13,496,600	503,190,704	13,542,661	485,874,479
ข้าวกล้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ชั้น 3	276,437	10,099,133	395,305	11,852,078
ข้าวกล้อง 5 เปอร์เซ็นต์	3,763,350	125,054,692	3,947,475	128,600,464
ข้าวกล้อง 10 เปอร์เซ็นต์	78,166	2,824,751	254,354	9,312,491
ข้าวกล้อง 15 เปอร์เซ็นต์	0	0	579,358	21,137,920
รวม	19,087,653	709,059,661	20,173,553	725,823,567

ที่มา: ดัดแปลงจาก (สำนักงานมาตรฐานสินค้า กรมการค้าต่างประเทศ, 2559a)

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย โดยประเทศไทยมีคู่แข่งที่สำคัญ ได้แก่ เวียดนาม และอินเดีย ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อ การส่งออกข้าวไทยขึ้นอยู่กับราคาข้าว นโยบายข้าว ผลผลิตและสต็อกข้าวของประเทศคู่แข่ง ภัยธรรมชาติที่ส่งผลกระทบต่อ การผลิตข้าวของแต่ละประเทศ การระบาดของโรคติดต่อร้ายแรงที่ส่งผลกระทบต่อ การขนส่งสินค้าของ ไทย และค่าเงินบาท ทำให้กระทบต่อราคาการส่งออก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2557)

การปนเปื้อนสารพิษจากราในข้าวกล้องเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของข้าวกล้อง ทำให้ราคาของผลผลิตตกต่ำ และอาจถูกปฏิเสธการนำเข้าสินค้า เนื่องจาก มีการปนเปื้อนของสารพิษจากรามากเกินเกณฑ์ของแต่ละประเทศกำหนด ทำให้สูญเสียรายได้เป็นอย่างมาก เช่น จากข้อมูลของสถาบันอาหาร เรื่อง รายงานสรุปการกักกัน/ปฏิเสธการนำเข้าสินค้าอาหารไทยในตลาดญี่ปุ่นปี พ.ศ. 2554 ระบุว่า สินค้ากลุ่มข้าวและธัญพืชถูกกักกันและปฏิเสธการนำเข้า ณ ด่านนำเข้าของประเทศญี่ปุ่น เนื่องจาก มีการตรวจพบว่ามีปัญหาด้านสุขอนามัยซึ่งไม่ถูกต้องตามกฎหมาย Food Sanitation Law โดยถูกปฏิเสธมากที่สุดจำนวน 51 ครั้ง ปัญหาหลัก คือ พบการปนเปื้อนของราในข้าวสาร และปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในธัญพืชเกินมาตรฐานที่ญี่ปุ่นกำหนดไว้ (จूरिरदन पाक़ासि, 2554) และปี พ.ศ. 2555 สินค้ากลุ่มข้าวและธัญพืชจากไทยถูกปฏิเสธการนำเข้าในตลาดญี่ปุ่นจำนวน 29 ครั้ง โดยปัญหาหลักยังคงเป็นการปนเปื้อนของราในข้าวสาร (จूरिरदन पाक़ासि, 2555)

2.6 ราและสารพิษจากรา

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิของราสายใย โดยเฉพาะราในสกุล *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* สารพิษจากราที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ฟูโมนิซิน (fumonisin) ดีออกซินิวาลินอล (deoxynivalenol) ที-2 ทอกซิน (T-2 toxin) และซีราลิโนน (zearalenone) (Zheng และคณะ, 2006) ตารางที่ 2.5 แสดงสารพิษจากราและราที่ผลิตที่พบมากในผลผลิตทางการเกษตร สารพิษเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ ทำให้เกิดโรค หรือเรียกว่า ไมคอทอกซิโคซิส (mycotoxicosis) ซึ่งมีทั้งชนิดที่แสดงอาการแบบเฉียบพลัน (acute) และแบบเรื้อรัง (chronic) (Pereira และคณะ, 2014) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณสารพิษที่ได้รับ อายุ และสุขภาพของผู้ที่ได้รับสารพิษ (Peraica และคณะ, 1999) สารพิษจากราเหล่านี้มักพบปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะในถั่วลิสง และธัญพืช ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต และข้าว การปนเปื้อนสามารถเกิดได้ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บเกี่ยว และในขณะที่เก็บรักษาผลผลิต (Köppen และคณะ, 2010)

ตารางที่ 2.5 สารพิษจากรา ราที่ผลิต และผลผลิตทางการเกษตรที่พบการปนเปื้อน

สารพิษจากรา	ชนิดของรา	อาหารที่ปนเปื้อน
อะฟลาทอกซิน	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A.</i> <i>minisclerotigenes</i> , <i>A. ochraceoroseus</i>	ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าว ข้าวฟ่าง เครื่องเทศ ถั่ว อัลมอนต์ นม ไข่ เนื้อสัตว์
ฟูโมนิซิน	<i>Alternaria alternate</i> , <i>Fusarium</i> <i>anthophilum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillodes</i> , <i>F. diamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. nygamai</i>	ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าว นม
เซราลีโนน	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ธัญพืช
โอคราทอกซิน	<i>A. alutaceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. glaucus</i> <i>A. albertensis</i> , <i>A. citricus</i> , <i>A. lanosus</i> <i>A. ochraceus</i> , <i>A. sclerotiorum</i>	กาแฟ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ ไวน์ ผลองุ่น น้ำองุ่น เครื่องเทศ ธัญพืช
ที-2 ทอกซิน	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. myrothecium</i> <i>Cephalosporium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp.	ธัญพืช ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช
ดีออกซีนิวาเลนอล	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	ธัญพืช ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช

ที่มา : ดัดแปลงจาก Köppen และคณะ (2010)

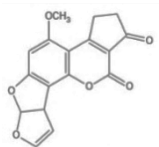
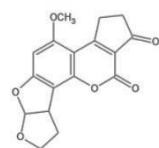
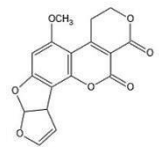
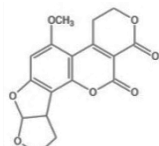
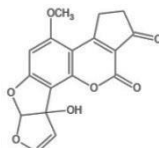
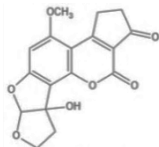
2.7 อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิของราสายใยในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* โดยเฉพาะ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* ซึ่งเป็นราที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน อากาศ และผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ (Liu และคณะ, 2006) สารพิษชนิดนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1961 หลังจากเกิดโรคระบาดในไก่งวงที่ประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1960 และเรียกโรคดังกล่าวว่า Turkey X disease (Richard, 2008) และต่อมาได้ตั้งชื่อตามรา *A. flavus* ว่า aflatoxin โดยตัวอักษร “a” มาจาก *Aspergillus*, “fla” มาจาก *flavus* และเติมคำว่า toxin ซึ่งแปลว่าสารพิษ (Agag, 2004)

2.7.1 ชนิดและสมบัติของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินที่พบตามธรรมชาติมี 4 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1 และจี 2 โดยอะฟลาทอกซินบี 1 และ บี 2 เรืองแสงเป็นสีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนอะฟลาทอกซินจี 1 และ จี 2 เรืองแสงเป็นสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Dhanasekaran และคณะ, 2011) เมื่อเข้าสู่ร่างกายของคนหรือสัตว์อะฟลาทอกซินบี 1 และ บี 2 จะถูกเปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 และเอ็ม 2 ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในน้ำนมของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 และ บี 2 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.6) ซึ่งทำให้ความรุนแรงของการเกิดพิษแตกต่างกันไป โดยโครงสร้างที่มีพันธะคู่อยู่ในวงแหวนที่ 1 และไม่มีกลุ่มแลคโตนอยู่ในวงแหวนที่ 5 จะมีความเป็นพิษสูง (Cousin และคณะ, 2005) ดังนั้น อะฟลาทอกซินบี 1 จึงมีความเป็นพิษสูงกว่าอะฟลาทอกซินชนิดอื่นๆ อะฟลาทอกซินสามารถละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม เบนซีน และอะซิโตน คุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของอะฟลาทอกซิน คือ การทนความร้อนได้ที่ระดับอุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส ดังนั้น การหุงต้มทั่วไปไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ แต่สารพิษนี้เสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสงแดด และรังสีแกมมา (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2557)

ตารางที่ 2.6 โครงสร้างและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน

ชนิดและโครงสร้าง ¹	สูตรเคมี	น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	ชื่อทางเคมี
 Aflatoxin B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.3	268-269	(6aR,9aS)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[c]furo-(3',2':4,5)furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione
 Aflatoxin B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.3	286-289	(6aR,9aS)-2,3,6a,8,9,9a-Hexahydro-4-methoxycyclopenta[c]-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione
 Aflatoxin G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.3	244-246	(7aR,10aS)-3,4,7a,10a-Tetrahydro-5-methoxy-1H,12H-furo-[3',2':4,5]furo[2,3-h]pyrano[3,4-c][l]benzopyran-1,12-dione
 Aflatoxin G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.3	237-240	(7aR,10aS)-3,4,7a,9,10,10a-Hexahydro-5-methoxy-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pyrano[3,4-c][l]benzopyran-1,12-dione
 Aflatoxin M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.3	299	(6aR,9aR)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione
 Aflatoxin M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.3	293	2,3,6a,8,9,9a-Hexahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo-(3',2':4,5)furo[2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione

ที่มา : ¹ ดัดแปลงจาก IARC (2002); Yunus และคณะ (2011)

2.7.2 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน

โรคที่เกิดจากอะฟลาทอกซินเรียกว่า อะฟลาทอกซิโคซิส (aflatoxicosis) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ ภาวะของการบริโภคอาหาร ปริมาณและเวลาที่ได้รับสารพิษ (ซุติมา ภูมิวิณิชา, 2549) องค์การอนามัยโลกจัดให้อะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งที่ร้ายแรงที่สุดในชนิดหนึ่ง (potent carcinogen) อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นชนิดที่มีความเป็นพิษรุนแรงมากที่สุดในสัตว์ รองลงมา คือ อะฟลาทอกซินจี 1, บี 2 และจี 2 ตามลำดับ (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) องค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดอะฟลาทอกซินรวม (บี 1 บี 2 จี 1 และจี 2) เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (กลุ่มที่ 1) (IARC, 2012) และอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 อาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (กลุ่ม 2บี) (IARC, 2002) โรคที่เกิดจากอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในคน ได้แก่ โรคมะเร็งตับ โรคตับอักเสบ โรคตับแข็ง และโรคสมองอักเสบ (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2555) นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินยังส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และเกิดความบกพร่องของตัวอ่อนในครรภ์ทั้งในคนและสัตว์ (Kamkar และคณะ, 2011)

อาการของโรคอะฟลาทอกซิโคซิสที่พบในคนมี 2 แบบ คือ การเกิดพิษแบบเฉียบพลัน (acute aflatoxicosis) และการเกิดพิษแบบเรื้อรัง (chronic aflatoxicosis) ซึ่งการเกิดพิษแบบเฉียบพลันมักเกิดในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ โดยจะมีอาการชักและหมดสติเนื่องจากความผิดปกติของตับและสมอง น้ำตาลในเลือดลดลงต่ำ สมองบวม มีอาการคั่งของไขมันในอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต หัวใจ และปอด บางครั้งอาจตรวจพบอะฟลาทอกซินในตับของผู้ป่วยด้วย ซึ่งอาการที่เกิดในเด็กจะคล้ายกับอาการของเด็กที่เป็นโรค Reye's syndrome ในผู้ใหญ่หากได้รับอะฟลาทอกซินในปริมาณมากจะเกิดพยาธิสภาพที่ตับ และอวัยวะภายในอย่างเฉียบพลัน เกิดอาการตับวายเฉียบพลัน มีการตกเลือดภายใน เนื้อตายที่ตับ มีอาการบวมหน้า หายใจลำบาก และเข้าสู่ภาวะหมดสติ หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงทีจะเสียชีวิตในที่สุด (ดุจดาว ชูน้อย, 2555) ส่วนการเกิดพิษแบบเรื้อรัง เกิดจากการได้รับสารพิษในปริมาณน้อยแต่ได้รับเป็นเวลานาน ส่งผลให้เซลล์ตับเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง ผู้ป่วยจะมีอาการคล้ายโรคตับอักเสบเรื้อรัง ระบบภูมิคุ้มกันต่ำลง ทำให้เจ็บป่วยได้ง่าย โปรตีนในเลือดต่ำ หลังจากนั้นจะถูกพัฒนาไปสู่โรคมะเร็งตับในที่สุด (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2555)

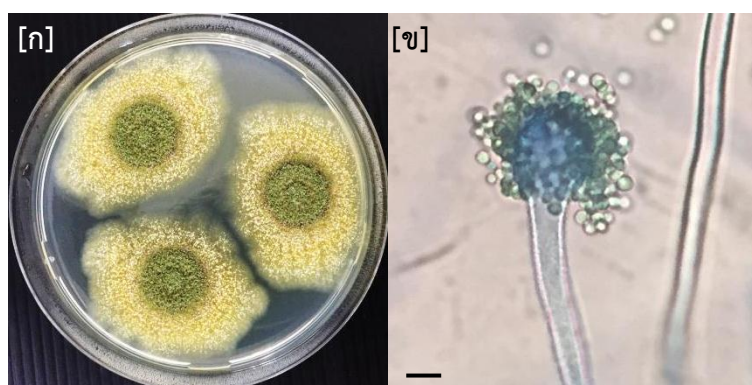
จากรายงานของ Verma (2004) ระบุว่าอะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอและนำไปสู่การเป็นมะเร็งตับในมนุษย์ และในปี ค.ศ. 2004 พบการเกิดพิษแบบเฉียบพลันของอะฟลาทอกซินในเคนยา มีผู้ป่วยด้วยอาการตับวายเฉียบพลันจำนวน 317 คน และมีผู้เสียชีวิต 125 คน (Barrett, 2005) และก่อนหน้านี้ เกิดการระบาดของโรคตับอักเสบ ในปี ค.ศ. 1974 ที่ประเทศอินเดีย ทำให้มีผู้เสียชีวิตจำนวน 100 คน สาเหตุมาจากการบริโภคข้าวโพดที่

ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน (Santini และคณะ, 2013) จากเหตุการณ์เหล่านี้ ทำให้เห็นว่าการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินเป็นอันตรายต่อสุขภาพและอาจถึงแก่ชีวิตได้

2.7.3 ราที่ผลิตอะฟลาทอกซิน

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตรเกิดขึ้นเมื่อมีความชื้นสูง ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารพิษของราทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ราที่มีความสามารถผลิตอะฟลาทอกซิน คือ ราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* ราในกลุ่มนี้ส่วนมากมีโคนิเดียรูปร่างกลมผนังขรุขระ สีของโคนิและโคนิเดียลเฮด (conidial heads) มีตั้งแต่สีเขียวอมเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล (Rigó และคณะ, 2002; Varga และคณะ, 2011) สายพันธุ์ที่สำคัญของราในกลุ่มนี้ได้แก่ *A. flavus* ซึ่งผลิตอะฟลาทอกซินบี *A. parasiticus* และ *A. nomius* สามารถผลิตได้ทั้งอะฟลาทอกซินบีและจี (IARC, 2002) นอกจากราที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังพบว่า มีราในสกุล *Aspergillus* หลายชนิดที่ผลิตอะฟลาทอกซินได้ เช่น *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus* และ *A. minisclerotigenus* (Varga และคณะ, 2011)

A. flavus เป็นหนึ่งในราที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมักพบการปนเปื้อนมากในธัญพืชต่างๆ *A. flavus* มีความสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบีที่มีความเป็นพิษสูง (Zhuang และคณะ, 2016) ลักษณะโคนิเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) มีสีเขียวอมเหลือง โคนิเดียรูปร่างกลมไปจนถึงรูปไข่ ผนังขรุขระ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 ไมโครเมตร (Klich และคณะ, 1988; Klich, 2007) (ภาพที่ 2.2) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารพิษ คือ 12-40 องศาเซลเซียส (Piotrowska และคณะ, 2013)



ภาพที่ 2.2 *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA [ก], ลักษณะโคนิเดียลเฮดและโคนิเดียของ *A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเกล = 10 ไมโครเมตร กำลังขยาย 40X [ข]

2.7.4 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหาร

อะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง พริก ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และข้าว สาเหตุหลักของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหาร คือ การที่อาหารนั้นถูกปนเปื้อนด้วยราที่มีความสามารถผลิตอะฟลาทอกซิน ซึ่งสามารถเกิดการปนเปื้อนได้ในทุกขั้นตอน ตั้งแต่ระหว่างการปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการเก็บรักษา (Piotrowska และคณะ, 2013) ในบริเวณประเทศที่มีภูมิอากาศแบบเขตร้อน (tropical) และเขตกึ่งร้อน (subtropical) มักพบปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินสูงกว่าบริเวณอื่นๆ (Miller, 1995)

ตารางที่ 2.7 แสดงรายงานการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารจากประเทศต่างๆ จากการศึกษารายงานของ Waenlor และคณะ (2003) ซึ่งรวบรวมงานวิจัยต่างๆ ที่สำรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารที่ขายในตลาดของประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ. 1967-2001 พบว่า ตัวอย่างจำนวน 1,248 ตัวอย่าง (คิดเป็น 38.9 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด) มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในปริมาณสูง และตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสูง คือ ถั่วลิสง นม และเนื้อไก่ จากการศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในสมุนไพรไทยจำนวน 28 ตัวอย่าง พบตัวอย่างสมุนไพรมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบอยู่ในช่วง 1.7-14.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Tassaneeyakul และคณะ, 2004) จากการสำรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารที่ถูกนำเข้ามาในประเทศอิตาลี ได้แก่ ถั่ว และผลิตภัณฑ์จากถั่ว องุ่น ธัญพืชต่างๆ และกาแฟ ทั้งหมด 345 ตัวอย่าง พบว่า มีตัวอย่างที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 7 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด และมี 1.2 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเกินกว่าข้อกำหนดของคณะกรรมการยุโรป โดยพบปนเปื้อนสูงสุดในผล แอปริคอต เท่ากับ 70.69 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Imperato และคณะ, 2011) จากการสำรวจผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวสาลี จำนวน 147 ตัวอย่างจากประเทศปากีสถาน พบว่า ตัวอย่างส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเกินกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่สหภาพยุโรปกำหนด (4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยปริมาณอะฟลาทอกซินสูงสุดที่ตรวจพบ คือ 9.61 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Iqbal และคณะ, 2014) และจากงานวิจัยของ Schwartzbord และคณะ (2015) พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง ผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง และข้าวโพดในประเทศเฮติ ปริมาณอะฟลาทอกซินสูงสุดพบในถั่วลิสง (2,720.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

ตารางที่ 2.7 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหาร

ประเทศ	อาหาร	ปริมาณการปนเปื้อน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
ไทย	นม	>0.05	Waenlor และคณะ (2003)
ไทย	สมุนไพรไทย	1.70-14.30	Tassaneeyakul และคณะ (2004)
อิตาลี	แอปเปิ้ล	70.69	Imperato และคณะ (2011)
กรีซ	ถั่วพิตาชิโอ	>1000.00	Georgiadou และคณะ (2012)
อิตาลี	เกาลัด	188.78	Pietri และคณะ (2012)
ไต้หวัน	ผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง	0.20-513.40	Chen และคณะ (2013)
อิหร่าน	แป้งข้าวสาลี	1.99	Ghasemi-Kebria และคณะ (2013)
บราซิล	ถั่วลิสง	0.05-36.70	Jager และคณะ (2013)
	ข้าวโพด	0.05-8.30	
กาตาร์	พริก	71.01	Hammami และคณะ (2014)
ปากีสถาน	ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวสาลี	9.61	Iqbal และคณะ (2014)
ปากีสถาน	เมล็ดแตงโมอบแห้ง	2.45±0.11	Masood และคณะ (2015)
เฮติ	ถั่วลิสง	2720.00	Schwartzbord และคณะ (2015)
	ถั่ว	7.89±0.99	

2.7.5 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าว

ข้าวเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา (Babu และคณะ, 2011) โดยเฉพาะข้าวกล้องซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารที่ราสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ราที่สามารถพบได้ในข้าว ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium* และ *Alternaria* (Gautam และคณะ, 2012) ข้าวจึงมีโอกาสปนเปื้อนด้วยสารพิษจากราหลายชนิดรวมทั้งอะฟลาทอกซินด้วย ตัวอย่างงานวิจัยที่ตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวแสดงดังตารางที่ 2.8

จากการศึกษาของ Reiter และคณะ (2010) ที่ตรวจอะฟลาทอกซินในข้าวที่ขายในประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ ข้าวบาสมาดิ ข้าวหอมมะลิ และข้าวกล้อง รวมทั้งหมด 81 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินจำนวน 24 ตัวอย่าง และปริมาณของอะฟลาทอกซินที่พบอยู่ในช่วง 0.45-11.36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และงานวิจัยในประเทศปากีสถานตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้อง 250 ตัวอย่าง จากตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด 262 ตัวอย่าง โดยปริมาณของอะฟลาทอกซินที่พบอยู่ในช่วง 1.07-27.27 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 3.89 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Asghar และคณะ, 2014)

Bansal และคณะ (2011) ได้สำรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวที่ขายในประเทศแคนาดา ได้แก่ ข้าวขาว ข้าวบาสมาดิ ข้าวกล้องบาสมาดิ ข้าวกล้องแดง ข้าวกล้องดำ และข้าวหอมมะลิ รวมทั้งหมด 200 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดมีปริมาณอะฟลาทอกซินเฉลี่ย เท่ากับ 0.19 นาโนกรัมต่อกรัม โดยตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสูง ได้แก่ ข้าวบาสมาดิที่นำเข้าจากประเทศอินเดียและปากีสถาน ข้าวกล้องดำ และข้าวกล้องแดงจากประเทศไทย โดยข้าวกล้องบาสมาดิมีปริมาณอะฟลาทอกซินมากที่สุด คือ 7.10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จากการตรวจอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องที่ขายในประเทศไทยจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่า มีจำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน 4 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด และปริมาณอะฟลาทอกซินเฉลี่ยเท่ากับ 0.16 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Tansakul และคณะ, 2013) และจากการศึกษาของอมรา ชินภูติ และคณะ (2552) ตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องและข้าวขาวในกรุงเทพมหานคร รวม 50 ตัวอย่าง พบว่า ข้าวกล้องมีปริมาณการปนเปื้อนมากกว่าข้าวขาว โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในข้าวกล้องและข้าวขาว เท่ากับ 2.91 และ 0.70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 2.8 การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าว

ประเทศ	ประเภทข้าว	ปริมาณการปนเปื้อน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
ไทย	ข้าวกล้อง และข้าวขาว	2.91 และ 0.70	อมรา ชินภูติ และคณะ (2552)
จีน	ข้าวกล้อง	0.88	Liu และคณะ (2006)
สวีเดน	ข้าว	8.00-25.30	Fredlund และคณะ (2009)
ออสเตรีย	ข้าวกล้อง และข้าวขาว	0.45-11.36	Reiter และคณะ (2010)
ตุรกี	ข้าว	<0.05-21.40	Aydin และคณะ (2011)
แคนาดา	ข้าวกล้องบาสมาดิ	7.10	Bansal และคณะ (2011)
อินเดีย	ข้าว	<15.00	Siruguri และคณะ (2012)
ปากีสถาน	ข้าวกล้อง	8.23	Majeed และคณะ (2013)
ไทย	ข้าวกล้อง	0.16	Tansakul และคณะ (2013)
ปากีสถาน	ข้าวกล้อง	1.07-27.27	Asghar และคณะ (2014)
เกาหลี	ข้าว	0.16	Ok และคณะ (2014)
จีน	ข้าว	0.65	Lai และคณะ (2015)
บราซิล	รำข้าว	>25.00	Prietto และคณะ (2015)

2.7.6 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร

เนื่องจากการปนเปื้อนของราที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าว ข้าวโพด และข้าวสาลี ซึ่งนำไปสู่การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร และส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อประเทศที่ส่งออกอาหารเหล่านั้น นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินยังเป็นพิษร้ายแรงต่อสุขภาพของผู้บริโภคด้วย ดังนั้น หลายประเทศและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการรักษามาตรฐานความปลอดภัยของอาหารจึงตระหนักถึงความอันตรายของอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหาร จึงได้มีมาตรการและข้อกำหนดต่างๆ เพื่อควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหาร เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European commission) (ตารางที่ 2.9) กำหนดให้ระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดในธัญพืชไม่เกิน 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสูงสุดในข้าวโพด และข้าวไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2010) สำหรับประเทศไทยมีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4(2) ระบุไว้ว่าสามารถพบอะฟลาทอกซินอยู่ในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529)

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างข้อกำหนดระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารของคณะกรรมาธิการยุโรป

ชนิดอาหาร	ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินรวม (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ธัญพืช และผลิตภัณฑ์แปรรูป	4
ข้าวโพด ข้าว	10
อัลมอนต์ ถั่วพิสตาชิโอ	10
เกาลัด ถั่วบราซิล	10
ถั่วลิสง	4
ผลไม้แห้ง	4
เครื่องเทศ	10

ที่มา: ดัดแปลงจาก European Commission (2010)

2.8 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหาร

แนวทางในการจัดการด้านความปลอดภัยของอาหารจากปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากราสามารถทำได้โดยการป้องกันและการลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของราซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพและนำไปสู่การเกิดปัญหาด้านสุขภาพของผู้บริโภค วิธีการตรวจหาราในอาหารสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เช่น การนับจำนวน คัดแยก และระบุชนิดของรา และวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

2.8.1 วิธีพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

1) Direct examination

เป็นวิธีการตรวจสอบการเจริญของราที่ปนเปื้อนในอาหารด้วยตาเปล่า หรือตรวจติดตามการเจริญของราด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) ในการสังเกตและติดตามการเจริญของราจะต้องทำโดยทันที หากมีการเคลื่อนย้ายตัวอย่างอาหารอาจทำให้โครงสร้างของราที่ต้องการสังเกตหลุดออกไป หลังจากตรวจสอบการเจริญของราแล้วจึงทำการคัดแยกราไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อไป (Samson และคณะ, 2004)

2) Direct plating

เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับความนิยมใช้สำหรับการตรวจหา นับจำนวน และคัดแยกราที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่ลักษณะเป็นชิ้นเล็กๆ เช่น เมล็ดธัญพืช และเมล็ดถั่ว เป็นต้น โดยการวางตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ตัวอย่างอาหารจะถูกฆ่าเชื้อบริเวณผิวก่อนนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อกำจัดฝุ่นผงหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณผิวของตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงปริมาณราที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นอย่างแท้จริง การฆ่าเชื้อบริเวณผิวทำได้โดยแช่ตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ลงในสารละลายคลอรีน 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสม หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ แล้วจึงนำตัวอย่างอาหารนั้นไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีปลอดเชื้อจำนวน 6-20 เมล็ดต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้น นับเมล็ดที่มีการติดเชื้อราแล้วรายงานผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (Pitt และคณะ, 2009)

3) Dilution plating

เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนในอาหารที่เป็นของเหลวหรือเป็นผง หรือใช้ในกรณีที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ปริมาณราทั้งหมดที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นๆ การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ทำโดยการผสมตัวอย่างกับสารละลายเพปโทนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) เพื่อให้รากระจายออกจากอาหารได้ดี กรณีที่ตัวอย่างอาหารเป็นเมล็ดและแข็ง เช่น เมล็ดธัญพืชหรือเมล็ดถั่ว ควรแช่ตัวอย่างอาหารในสารละลายเพปโทนก่อนเป็นเวลา 30-60 นาที แล้วจึงนำไปตีบด จากนั้น จึงเจือจางตัวอย่างจนมีระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนี แล้วรายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Units (CFU) ต่อมิลลิลิตร หรือต่อกรัม (Samson และคณะ, 2004)

4) การจัดจำแนกและระบุชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

วิธีการจัดจำแนกและระบุชนิดของราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะโครงสร้างของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic characters) เช่น ลักษณะโคนิเดีย โคนิดีโอฟอร์ และโคนิเดียลเฮด (Samson และคณะ, 2004; Pitt และคณะ, 2009)

การตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารโดยใช้วิธีพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทำได้โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อน แต่วิธีการเหล่านี้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ และต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญ นอกจากนี้ ยังพบปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานการทดสอบและข้อผิดพลาดที่เกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการทดสอบ (Atkins และคณะ, 2004)

2.8.2 วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ปัจจุบันการตรวจหาการปนเปื้อนของราด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น วิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถจำแนก ระบุชนิด และปริมาณราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรได้ (Mostafa และคณะ, 2012) แม้ว่าการตรวจหาการปนเปื้อนของราด้วยวิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะมีประสิทธิภาพสูง แต่วิธีนี้ยังคงมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เช่น วิธีการที่ซับซ้อน การเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด และค่าใช้จ่ายที่สูงเนื่องจากเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์มีราคาแพง (Konietzny และคณะ, 2003)

2.9 การตรวจหาการปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหาร

การตรวจหาสารพิษจากราในอาหารประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดสารพิษจากตัวอย่าง โดยใช้สารเคมีเป็นตัวทำละลาย การกำจัดสิ่งรบกวนที่ไม่ต้องการออกจากสารสกัด และการตรวจและวัดปริมาณสารพิษ รายละเอียดของขั้นตอนที่สำคัญ มีดังนี้

การสกัดสารพิษจากราออกจากตัวอย่าง (Mycotoxin extraction)

โดยทั่วไปสารพิษจากราจะถูกสกัดออกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น ธัญพืชต่างๆ โดยใช้ น้ำหรือตัวทำละลายที่มีขั้วอื่นๆ เช่น เมทานอล หรือ อะซิโตรไนไตรล์ เรียกการสกัดลักษณะนี้ว่า solid-liquid extraction (Turner และคณะ, 2009) ซึ่งวิธีการสกัดขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของสารพิษ และคุณสมบัติการมีขั้วของสารพิษที่ต้องการสกัด จึงนิยมใช้สารเคมีประเภทตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดเพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพ ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เช่น นม หรือน้ำผลไม้ นิยมใช้วิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction (Razzazi-Fazeli และคณะ, 2011))

การกำจัดสิ่งรบกวน (clean up)

เป็นขั้นตอนที่ทำหลังจากการสกัดสารพิษจากราออกจากตัวอย่าง เนื่องจากในตัวอย่งที่นำมาวิเคราะห์มักมีปริมาณของสารพิษจากราอยู่ต่ำ ดังนั้น จึงต้องเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ได้ด้วยการกำจัดสิ่งรบกวนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการออกไปก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี ในปัจจุบันนิยมใช้วิธี solid-phase extraction (SPE) และ immunoaffinity column (IAC) ในการกำจัดสิ่งรบกวนที่ไม่ต้องการออกจากสารสกัด (Razzazi-Fazeli และคณะ, 2011) หลักการของ SPE เกี่ยวข้องกับการแยกส่วนระหว่างของแข็งกับของเหลวซึ่งจะทำให้สารสกัดเข้มข้นและบริสุทธิ์ขึ้น โดยการใส่ตัวอย่างให้ไหลผ่านตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง เช่น ซิลิกา (silica) หรือ อะลูมินา (alumina) ซึ่งถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารที่สนใจจะถูกดูดซับไว้ในตัวดูดซับ จากนั้น ล้างสารที่จับกับตัวดูดซับได้น้อยออก แล้วเติมตัวทำละลายเพื่อชะสารที่สนใจออกจากตัวดูดซับ แล้วนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป (Zwir-Ferenc และคณะ, 2006) ส่วนวิธี IAC เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน โดยในคอลัมน์จะบรรจุด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารพิษจากรา ซึ่งแอนติบอดีจะถูกตรึงอยู่บนสารที่เป็นของแข็ง (solid support) เช่น อะกาโรส (agarose) หรือ ซิลิกา (silica) สิ่งรบกวนจะไหลผ่านคอลัมน์ออกไป เหลือเพียงสารพิษจากราที่จับกับแอนติบอดีอยู่ในคอลัมน์ จากนั้น ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสารพิษจากราออกจากคอลัมน์เพื่อนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์ต่อไป (Wacoo และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตาม ทั้งวิธี SPE และ IAC มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และต้องมีการกำจัดสารเคมีที่เป็นของเสียจากการวิเคราะห์ นอกจากนี้

วิธี IAC มีราคาแพง และไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เนื่องจาก แอนติบอดีจะเสียสภาพจากตัวทำละลายที่ใช้ชะสารพิษจากราออกจากคอลัมน์ (Kralj Cigić และคณะ, 2009)

การวิเคราะห์สารพิษจากรา (Analysis)

สารพิษจากราส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วซึ่งละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว ดังนั้น จึงสามารถใช้วิธีทางโครมาโทกราฟี (chromatographic techniques) มาวิเคราะห์สารพิษจากราได้ วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography หรือ TLC) แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography หรือ GC) และโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography หรือ HPLC) เป็นต้น (Shephard และคณะ, 2011) นอกจากนี้ การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunochemical method) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เช่น enzyme-link immunosorbance assay (ELISA) เนื่องจากสามารถให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว (Goryacheva และคณะ, 2011)

โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางเป็นเทคนิคแรกที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษจากรา และยังคงได้รับความนิยมในการใช้วิเคราะห์สารพิษจากราอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในประเทศกำลังพัฒนา เพราะราคาถูก (Shephard และคณะ, 2011) เทคนิคนี้ประกอบด้วยเฟสหยุดนิ่งที่ทำจากซิลิกาเจล อะลูมินาหรือ ผงเซลลูโลส ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับและเคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือพลาสติก และเฟสเคลื่อนที่ คือ ตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอล หรือ อะซีโตนไตรัล เฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ สามารถสังเกตตำแหน่งของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราได้หลายๆ ชนิดในเวลาเดียวกัน ใช้คัดกรองตัวอย่างจำนวนมากได้ ราคาถูก สะดวกและง่ายต่อการอ่านผล แต่วิธีนี้มีข้อด้อย คือ ต้องอาศัยผู้วิเคราะห์ที่มีความชำนาญ ไม่เหมาะกับการแยกสารในปริมาณมาก และเหมาะสำหรับการคัดกรองอย่างรวดเร็ว (Wacoo และคณะ, 2014)

วิธีแก๊สโครมาโทกราฟีจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหาร แต่ไม่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์สารพิษจากรา เนื่องจากสารพิษจากราส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วและเป็นสารที่ไม่ระเหยจึงต้องมีการเตรียมปฏิกิริยานอนุพันธ์ (derivatization) ก่อนที่จะฉีดลงไปแก๊สโครมาโทกราฟีคอลัมน์ (Shephard และคณะ, 2011)

โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการนำมาตรวจวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ (Wacoo และคณะ, 2014) และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์สารพิษจากรา เนื่องจาก วิธีนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ และได้รับการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์สารพิษจากราที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ (Pittet, 2005; Roseanu และคณะ, 2010) แต่ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ต้องใช้ตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์มากใช้การตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวน เช่น immunoaffinity column เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาสูง อีกทั้งการวิเคราะห์ผลโดยวิธี HPLC นั้นต้องใช้ผู้วิเคราะห์ที่มีความชำนาญ วิธีนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น (Wacoo และคณะ, 2014)

Enzyme-link immunosorbance assay (ELISA) อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีหรือที่เรียกว่า immunoassays มี 2 แบบ คือ วิธีแบบแข่งขัน (competitive) และวิธีแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) สำหรับชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจหาสารพิษจากราในอาหารมักใช้วิธีแบบแข่งขัน (Wacoo และคณะ, 2014) ซึ่งแบ่งออกเป็นแข่งขันแบบอ้อม (indirect competitive immunoassay) และแข่งขันแบบตรง (direct competitive immunoassay)

หลักการของวิธีแข่งขันแบบอ้อม คือ สารพิษมาตรฐานจะติดฉลากกับโปรตีนและถูกเคลือบอยู่บนผิวของหลุมทดสอบ แอนติบอดีตัวแรกที่จำเพาะต่อสารพิษจะถูกแข่งขันทำปฏิกิริยาระหว่างสารพิษจากราในตัวอย่างที่เรียกว่าสารพิษอิสระและสารพิษที่เคลือบอยู่ในหลุมทดสอบ เมื่อใส่แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์บ่งชี้ ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรกลงไป ในหลุมทดสอบ จะสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาของแอนติบอดีตัวที่สองกับแอนติบอดีตัวแรก โดยสังเกตจากความเข้มของหลุมทดสอบ หากของเหลวในหลุมมีสีเข้มแสดงว่าตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีปริมาณสารพิษอยู่น้อย (Contreras-Medina และคณะ, 2013)

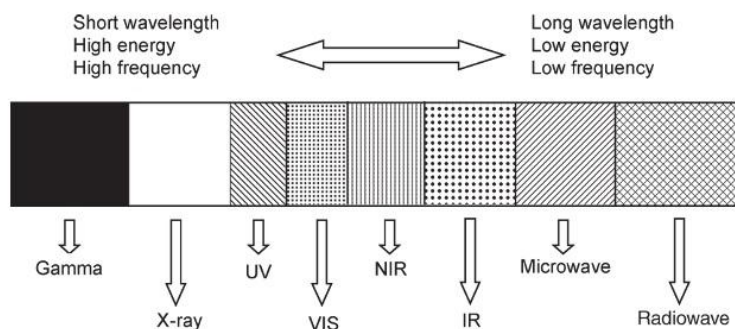
วิธีการแข่งขันแบบตรงมีหลักการ คือ สารพิษจากราในตัวอย่าง ที่เรียกว่า สารพิษอิสระ จะถูกนำไปแข่งขันกับสารพิษจากราที่ติดฉลากกับเอนไซม์ที่จะบ่งชี้เมื่อไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ในหลุมทดสอบ หลังจากบ่มแล้วของเหลวในหลุมทั้ง สารพิษอิสระและสารพิษที่ติดกับเอนไซม์ที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดีจะถูกล้างออกไป เมื่อเติมสารตั้งต้นลงไปเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนสีขึ้น หากในหลุมทดสอบมีสีเข้มแสดงว่าสารพิษอิสระในตัวอย่างนั้นมีปริมาณน้อย และหากมีสีจางแสดงว่าในตัวอย่างมีสารพิษอิสระอยู่ในปริมาณมาก (Contreras-Medina และคณะ, 2013)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนา ELISA เป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจสารพิษจากรา (ELISA kits) ผลิตและจำหน่ายในเชิงพาณิชย์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากใช้งานง่าย สะดวกรวดเร็ว สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ไม่ต้องมีขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่าง และเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้วิเคราะห์ และได้รับการยอมรับจากองค์การ Association of Analytical Communities (AOAC International) ว่าเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้วิเคราะห์สารพิษจากราหลายชนิดที่ปนเปื้อนในธัญพืช ได้แก่ อะฟลาทอกซินรวม อะฟลาทอกซินบี 1 เซราลีโนน และฟูโมนิซินรวม (Pascale, 2009) อย่างไรก็ตาม ชุดทดสอบสามารถวิเคราะห์สารพิษจากราได้อย่างแม่นยำในช่วงของความเข้มข้นที่จำกัด มีราคาสูง (Contreras-Medina และคณะ, 2013) นอกจากนี้ วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้แรงงานมาก และมีขั้นตอนการล้างหลุมทดสอบ อาจทำให้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ (Wacoo และคณะ, 2014)

2.10 เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิควิเคราะห์การดูดกลืนพลังงานแสงของสารต่างๆ ในช่วงเนียร์อินฟราเรด เทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ยา เครื่องสำอาง สีน้าเกษตร อาหารและเครื่องดื่ม (Teye และคณะ, 2013) เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว มีวิธีการที่ไม่ซับซ้อน และไม่ทำให้ตัวอย่างเสียหายหรือไม่ทำลายตัวอย่าง จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้วิเคราะห์แบบไม่ทำลายตัวอย่าง (nondestructive technique) (สนธิสุข ธีระชัยชยุติ, 2554)

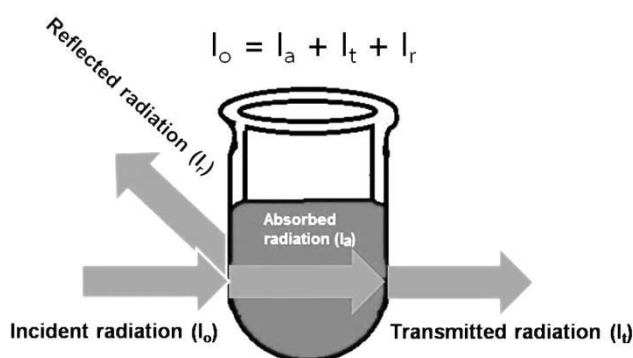
รังสีเนียร์อินฟราเรด (near infrared radiation) เป็นรังสีที่อยู่ในกลุ่มของรังสีอินฟราเรด ถูกพบครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1800 โดย William Herschel (Roggo และคณะ, 2007) ซึ่งได้อธิบายไว้ว่ารังสีอินฟราเรดเป็นรังสีที่มองไม่เห็น (invisible) อยู่หลังจากแสงสีแดงในช่วงการมองเห็น (visible red light) โดยเขาได้ทดลองให้แสงส่องผ่านปริซึมแล้วใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิบริเวณนอกช่วงแสงที่มองเห็นและอยู่ใกล้กับสีแดง พบว่ามีอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งช่วงแสงดังกล่าว คือ ช่วงแสงของรังสีอินฟราเรด (Infrared (IR) region) ย่านของรังสีอินฟราเรดจะอยู่ในช่วงระหว่างย่านวิซิเบิล (visible) และย่านไมโครเวฟ (microwave) (ภาพที่ 2.3) รังสีอินฟราเรดถูกแบ่งย่อยเป็น 3 ช่วง ได้แก่ อินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared radiation) มีความยาวคลื่นระหว่าง 800-2,500 นาโนเมตร อินฟราเรดย่านกลาง (mid infrared radiation) มีความยาวคลื่นระหว่าง 2,500-25,000 นาโนเมตร และอินฟราเรดย่านไกล (far infrared radiation) ซึ่งมีความยาวคลื่นระหว่าง 25,000-100,000 นาโนเมตร (Jamrógiewicz, 2012)



ภาพที่ 2.3 ตำแหน่งรังสีเนียร์อินฟราเรดในแถบแม่เหล็กไฟฟ้า (Singh และคณะ, 2011)

2.10.1 หลักการพื้นฐานของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

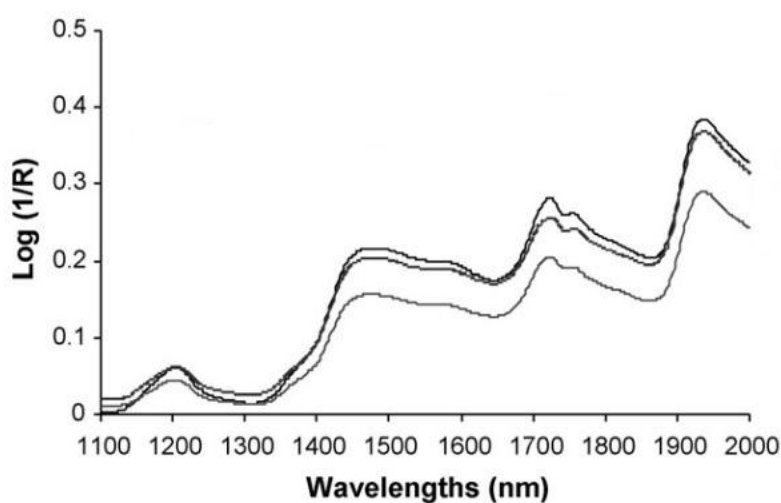
เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นการศึกษาอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสารที่มีโมเลกุลประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน (X-H) อะตอม X ได้แก่ C, O, N, S อันตรกิริยา คือ การที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดเข้าไปทำให้เกิดการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล เมื่อรังสีเนียร์อินฟราเรดถูกส่งไปยังตัวอย่าง รังสีบางส่วนถูกดูดกลืนไว้ (absorption) บางส่วนผ่านออกมา (transmission) และบางส่วนเกิดการสะท้อน (reflection) ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้ อาจเกิดพร้อมกัน หรืออาจเกิดเพียงเหตุการณ์เดียว ดังแสดงในภาพที่ 2.4 (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)



ภาพที่ 2.4 รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

จากทฤษฎีกลศาสตร์ควอนตัม อธิบายว่าโมเลกุลของสสารประกอบด้วยอะตอมที่เชื่อมกันด้วยพันธะเคมี พันธะในโมเลกุลจะเกิดการสั่นอยู่ตลอดเวลา เรียกว่า การสั่นในสถานะพื้น (vibrational ground state) ซึ่งจะสั่นด้วยความถี่ที่มีค่าเฉพาะ ถ้าโมเลกุลเกิดอันตรกิริยากับรังสีเนียร์อินฟราเรดจะดูดกลืนรังสีที่มีความถี่ตรงกับความถี่ค่าเฉพาะ จนทำให้เกิดการสั่นในสถานะ

กระตุ้น (vibration excited state) ระดับโอเวอร์โทน แต่โมเลกุลไม่สามารถอยู่ในสถานะกระตุ้นได้ จึงต้องมีการคายพลังงานออกมาในรูปความร้อน เพื่อให้กลับไปอยู่ในสถานะพื้นตามเดิม เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าแทรนซิชัน (transition) (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552) ผลของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะปรากฏในสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด ซึ่งนิยมแสดงในรูปของกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) หรือ $\log(1/R)$ ในแนวแกนตั้ง และความยาวคลื่น (wavelength) หรือจำนวนคลื่น (wavenumber) ในแนวแกนนอน ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของพริกหยวกแดง แกนนอนแสดงความยาวคลื่นในหน่วยนาโนเมตรและแกนตั้งแสดงค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดแสงที่สะท้อน (reflectance) (ดัดแปลงจาก Hernández Hierro และคณะ (2008))

รังสีอินฟราเรดที่ส่องไปยังตัวอย่างสามารถเกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างได้หลายรูปแบบ ทำให้มีวิธีการวัดได้หลายรูปแบบ ดังนี้ การส่องผ่าน (transmittance) การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) อินเทอร์แอคแตนซ์ (interactance) และการส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงแสง (transmittance through scattering medium) (ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ, 2552)

กฎของการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับสเปกโทรสโกปีมี 2 กฎ

1) กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's law) กล่าวว่า เมื่อแสงสีเดียวหรือแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว เป็นสัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้ โดยไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มแสงเริ่มต้นที่กระทบตัวกลางนั้น และความเข้มแสงจะถูกแต่ละชั้นของตัวกลางดูดกลืนไว้ในสัดส่วนที่เท่ากัน ดังนั้น ตัวกลางชนิดเดียวกันที่มีความหนาเท่ากันจะดูดกลืนพลังงานแสง

ได้เท่ากัน และเมื่อแสงความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียวกัน ความเข้มของลำแสงจะลดลงขึ้นอยู่กับความหนาของตัวกลาง (Osborne และคณะ, 1993; นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์, 2545)

2) กฎของเบียร์ (Beer's law) กล่าวว่า เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกตัวกลางดูดกลืนไว้จะแปรโดยตรงกับปริมาณของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงนั้น ดังนั้น เมื่อโมเลกุลของสารแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน และไม่มีอิทธิพลจากตัวทำละลายจะทำให้สารดูดกลืนความเข้มแสงได้เท่ากัน (Osborne และคณะ, 1993; นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์, 2545)

ปริมาณความเข้มข้นของแสงที่ถูกดูดกลืนจะขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่ลำแสงส่องผ่าน จึงมีการรวมกฎของทั้งสองเข้าด้วยกันเรียกว่า กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert's law) เขียนในรูปสมการได้ดังนี้

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

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

ดังนั้น

$$\text{กรณีวัดแสงส่องผ่าน (transmittance)} \quad A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc = \log \frac{1}{T}$$

เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

T = ค่าการส่องผ่านของแสง (transmittance)

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง ปกติเปลี่ยนแปลงตามความยาวคลื่นและอุณหภูมิ (โมลต่อลิตร)

b = ความหนาของตัวอย่าง (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้นของสาร (โมลต่อลิตร)

I_0 = ความเข้มแสงเริ่มต้น หรือความเข้มแสงก่อนผ่านตัวอย่าง

I = ความเข้มแสงสุดท้าย หรือความเข้มแสงเมื่อผ่านตัวอย่าง

ทั้งนี้ กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต ตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ไม่มีแสงสะท้อนจากสารละลาย (reflectance เป็นศูนย์) จึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความเข้มแสงที่สะท้อนจากตัวอย่าง (reflectance) ได้โดยตรง

จากทฤษฎีของ Kubelka และ Munk (Kubelka-munk theory) พบว่าวัสดุที่มีความหนาเป็นอนันต์ (ไม่มีแสงทะลุผ่าน) ค่าความเข้มแสงที่สะท้อนจากตัวอย่างขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับแสงและการกระเจิงแสงของวัสดุนั้น (Osborne และคณะ, 1986) ดังสมการ

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

ต่อมา Norris ทดลองวัดค่าการสะท้อนแสงของสารละลายและเปรียบเทียบกับค่าการสะท้อนแสงของวัสดุมาตรฐานที่ไม่มีการดูดซับแสง (non-absorbing standard) พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ดีกับค่าความเข้มชั้นของสารละลาย (Osborne และคณะ, 1986)

ดังสมการ

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

เนื่องจากวัสดุมาตรฐานไม่มีการดูดซับแสง ทำให้ค่าการสะท้อนแสงของวัสดุมาตรฐานเข้าใกล้ 1 และทำให้ค่า $\log R' \rightarrow 0$ (Osborne และคณะ, 1986)

จึงได้สมการ

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

ดังนั้น กรณีวัดแสงสะท้อนจะประมาณค่าการดูดกลืนแสงว่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากสมการ $\log \frac{1}{R}$

เมื่อ R_{∞} = ค่าสะท้อนแสงที่มีความหนาของตัวอย่างเป็นอนันต์

k = สัมประสิทธิ์การดูดซับแสง

s = สัมประสิทธิ์การกระเจิงแสง

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง

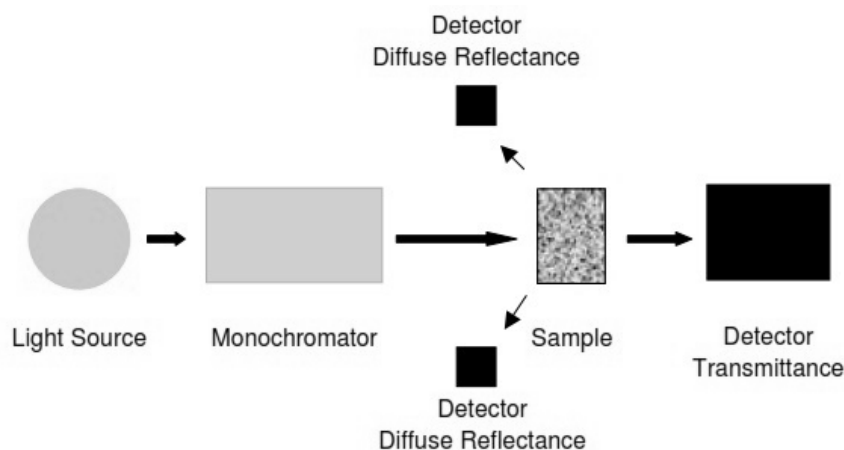
c = ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

R' = ค่าสะท้อนแสงของวัสดุมาตรฐาน

R = ค่าสะท้อนแสงของตัวอย่าง

2.10.2 เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ประกอบด้วย แหล่งกำเนิดแสง (light source) อุปกรณ์แยกแสง (beam splitter system) อุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง (sample holder) ตัวรับแสง (optical detector หรือ sensor) และเครื่องจะต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ (computer) ซึ่งมีโปรแกรมสำหรับเก็บข้อมูลและแสดงผลการวัดบนหน้าจอ (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (ดัดแปลงจาก Reich (2005))

- แหล่งกำเนิดแสง (light source) เป็นแหล่งให้พลังงานแสง โดยปกติใช้หลอดทังสแตนฮาโลเจน (tungsten halogen lamp) เนื่องจาก มีขนาดเล็ก ราคาถูก และแข็งแรง แต่ข้อเสียของหลอดทังสแตน คือ มีอายุการใช้งานสั้น ทำให้เกิดความแปรปรวนของตำแหน่งแสงและมุมตกกระทบ นอกจากนี้ หลอดแบบแอลอีดี (laser emission diode; LED) ได้ถูกนำมาใช้กับเครื่องเนียร์อินฟราเรด ข้อดีของหลอดแบบแอลอีดี คือ สามารถปรับความเข้มแสงให้สอดคล้องกับช่วงความยาวคลื่นต่างๆ ได้ แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจาก มีราคาแพง (Reich, 2005; Cen และคณะ, 2007)

- อุปกรณ์แยกแสง (beam splitter system) ทำหน้าที่แยกแสงหลายความยาวคลื่นออกเป็นความยาวคลื่นเดี่ยว เพื่อควบคุมให้อยู่ในความยาวคลื่นที่ต้องการ อุปกรณ์แยกแสงมีหลายชนิด เช่น ไลท์ฟิลเตอร์ (light filter) อินเตอร์เฟอโรมิเตอร์ (interferometer) และเกรตติ้ง (grating) (Reich, 2005; Osborne, 2006)

- อุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง (sample holder) อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างมีหลายแบบ ทั้งแบบอยู่นิ่ง เคลื่อนที่ และหมุนขณะสแกนตัวอย่าง ซึ่งอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างแบบต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นจะมีรูปร่างและขนาดต่างกัน และอาจจะมีฝากระจกปิดตัวอย่างหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับวิธีการฉายแสงซึ่งมีทั้งฉายแสงจากด้านบนและด้านล่าง สำหรับอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างหลายๆ แบบ แสงจะส่องผ่านกระจกใส

ก่อนถึงตัวอย่าง ซึ่งกระจัดกล่าวอาจทำจากแก้วหรือควอทซ์ โดยวัสดุทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบต่างกันทำให้มีอิทธิพลต่อสเปกตรัมของตัวอย่างด้วย การเลือกใช้อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างควรเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง เนื่องจากอุปกรณ์เหล่านี้มีอิทธิพลต่อการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและส่งผลกระทบต่อสเปกตรัมที่ได้ (Cen และคณะ, 2007; ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ, 2552)

- ตัวรับแสง (optical detector หรือ sensor) เป็นอุปกรณ์ที่วัดความเข้มของแสงหรือค่าการดูดกลืนแสง โดยตำแหน่งของตัวรับแสงจะขึ้นอยู่กับรูปแบบของการวัด เช่น การส่องผ่าน (transmittance) การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) การสะท้อนกลับจากด้านใน (interactance) และการส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงแสง (transmittance through scattering medium) (ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ, 2552)

- คอมพิวเตอร์ (computer) เมื่อระบบอ่านสัญญาณออกมาแล้ว จะแสดงผลในรูปแบบของกราฟ ซึ่งจะถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์ (Cen และคณะ, 2007)

หลักการทำงานของเครื่อง คือ เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเนียร์อินฟราเรดจากแหล่งกำเนิดแสงที่มีการกระจายแสงควบคุมด้วยอุปกรณ์แยกแสงให้อยู่ในความยาวคลื่นที่ต้องการแล้วส่องไปยังตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดการดูดกลืนแสง แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลของตัวอย่าง โดยเกิดการบิด-งอ หรือยืด-หดในรูปแบบต่างๆ และทำการตรวจวัดคลื่นแสงที่ไม่ถูกดูดกลืน สะท้อน หรือส่องผ่านออกมา โดยสามารถตรวจวัดด้วยตัวรับแสงแล้วประมวลผลเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ เกิดเป็นสเปกตรัมซึ่งถูกบันทึกและแสดงไว้ในคอมพิวเตอร์ (รุ่งนภา ไกลถิ่น, 2555)

2.11 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.11.1 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

การถูกบดบังโดยสเปกตรัมของน้ำ และการที่สเปกตรัมมีความซับซ้อนเนื่องจากการรวมกันของโอเวอร์โทนและคอมบิเนชันของกลุ่มฟังก์ชันต่างๆ สัญญาณรบกวนในเครื่องมือสภาพแวดล้อม และแหล่งความแปรปรวนอื่นๆ ส่งผลให้การระบุความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงของกลุ่มของฟังก์ชันเฉพาะเป็นไปได้ยาก ดังนั้น ก่อนนำสเปกตรัมไปวิเคราะห์ควรมีการดึงข้อมูลที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากสเปกตรัมก่อน โดยการปรับแต่งสเปกตรัม ซึ่งใช้เทคนิคทางสถิติแบบตัวแปรพหุ (multivariate statistic technique) หรือที่เรียกว่า เคโมเมทริกซ์ (chemometrics) (อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล, 2552) การปรับแต่งสเปกตรัมมีด้วยกันหลายวิธี เช่น

1) การแปลงค่าด้วยวิธีอนุพันธ์ (derivative transformation) การหาค่าอนุพันธ์ (derivative) เป็นวิธีที่ใช้แก้ปัญหาการทับซ้อนกันของจุดยอดของสเปกตรัมและการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม การแปลงค่าเป็นอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative) ช่วยแก้ปัญหาที่สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น (เบสไลน์ออฟเซต) โดยการหาค่าความชัน (slope) ของสเปกตรัมที่แต่ละความยาวคลื่น ซึ่งทำให้เส้นสเปกตรัมเลื่อนมาชิดติดกัน แต่ยังไม่สามารถแยกพิคที่ซ้อนทับกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้น จึงต้องมีการแปลงค่าเป็นอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) จะทำให้เกิดการแยกกันของจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันออกมา สเปกตรัมที่ได้จะมีจุดยอดตรงกับจุดยอดของสเปกตรัมดั้งเดิมแต่เป็นจุดยอดที่กลับหัวลงมาด้านล่าง (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

2) การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction; MSC) เป็นเทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อลดผลที่เกิดจากการกระเจิงแสง (scattered light) ต่อสเปกตรัมที่ได้จากการวัดแบบการสะท้อนแพร่ (diffuse reflectance) และแบบส่องผ่าน (transmittance) การทำ MSC คือ การหามุขสเปกตรัมของแต่ละตัวอย่างให้มาตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ยรูปร่างของสเปกตรัมหลังจากทำ MSC แล้วจะมีรูปร่างไม่แตกต่างจากสเปกตรัมก่อนการปรับแก้มาก ในขณะที่การทำอนุพันธ์อันดับสองจะให้สเปกตรัมที่ต่างจากสเปกตรัมดั้งเดิมอย่างชัดเจน (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

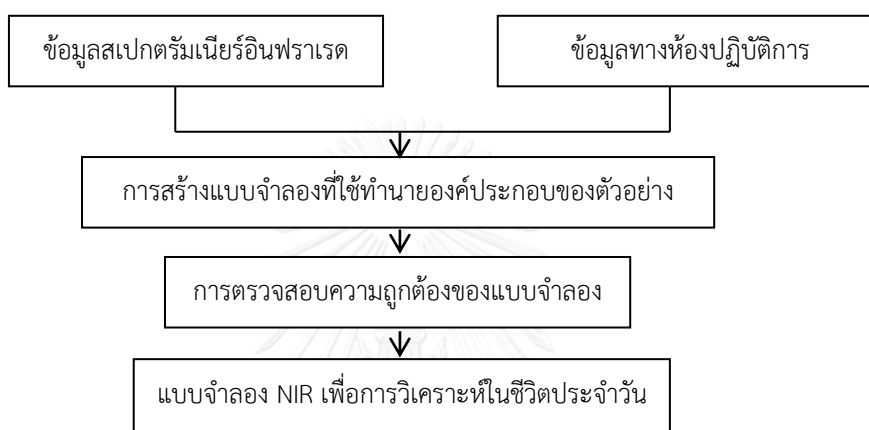
3) การปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานและการปรับแนวโน้ม (standard normal variate; SNV และ detrending) วิธี SNV เป็นวิธีที่ใช้สำหรับกำจัดอิทธิพลของการกระเจิงแสงออกจากสเปกตรัม โดยมักเป็นวิธีที่ใช้คู่กับการปรับแนวโน้มของเส้นสเปกตรัม (detrending) ซึ่งจะช่วยให้อยอดของสเปกตรัมเด่นขึ้น กระบวนการปรับแก้แบบ SNV จะแตกต่างกันกับวิธีปรับแก้แบบ MSC แต่ผลที่ได้จากการปรับแก้ด้วยวิธีดังกล่าวจะคล้ายคลึงกับวิธีปรับแก้แบบ MSC (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

4) การปรับเป็นค่ามาตรฐาน (normalization) เป็นการปรับแก้กลุ่มของสเปกตรัมเพื่อให้ได้สเปกตรัมที่มีจุดสำคัญที่เด่นขึ้น และเป็นการกำจัดความแปรปรวนจากปัจจัยต่างๆ ที่ไม่ต้องการออกไป ช่วยลดความซับซ้อนของข้อมูลและนำข้อมูลสเปกตรัมไปทำการเปรียบเทียบได้ง่ายขึ้น (อนุพันธ์ เทอดวงศัรกุล, 2552)

5) การลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) วิธีนี้ใช้แก้ปัญหาคความเอียงเชิงเส้นของการขยับขึ้นของเบสไลน์ โดยในแต่ละช่วงความถี่เส้นตรงเส้นหนึ่งจะถูกพิคเส้นสเปกตรัมด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน แล้วลบเส้นตรงนี้ออกจากเส้นสเปกตรัม (Conzen, 2006)

2.11.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

การสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายองค์ประกอบของตัวอย่างด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ต้องใช้ข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด (optical data หรือ NIR data) และข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ (reference data) ของกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการทำนาย การสร้างแบบจำลองจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การสร้างแบบจำลองที่ใช้ทำนาย (calibration) และการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองที่ใช้ทำนาย (validation) ก่อนนำแบบจำลองไปใช้เพื่อการวิเคราะห์ในชีวิตประจำวัน (ภาพที่ 2.7) แต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้



ภาพที่ 2.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.11.2.1 การสร้างแบบจำลองที่ใช้ทำนาย หรือ การทำแคลิเบรชัน (calibration)

กำหนดให้ข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด (optical data หรือ NIR data) เป็นตัวแปรอิสระ (independent variable) หรือ ตัวแปร X ซึ่งอาจเป็นค่าที่ได้จากความยาวคลื่นทั้งหมด (full-spectrum) ความยาวคลื่นใดคลื่นหนึ่ง (fixed wavelength) หรือบางความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องกับสารที่จะทำการวิเคราะห์ (selected wavelength) ทั้งนี้ ข้อมูลสเปกตรัมที่นำมาใช้อาจเป็นสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง (raw spectral data) หรือถูกปรับแต่งด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectral data) ซึ่งเป็นการนำเทคนิคทางคณิตศาสตร์มาใช้ในการแปลงข้อมูลก่อนนำไปวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลของตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามมากขึ้น ส่วนค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (reference data) กำหนดให้เป็นตัวแปรตาม (dependent variable) หรือ ตัวแปร Y (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552) แล้วสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันโดยอาศัยหลักการและวิธีทางสถิติมาช่วยในการสร้างแบบจำลอง ได้แก่ การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principle components regression; PCR) และวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square; PLS)

การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลักเป็นวิธีการลดจำนวนตัวแปรอิสระ (X) เดิมลงแล้วสร้างองค์ประกอบหรือตัวแปรใหม่ (new factors) ขึ้นมาก่อน แล้วจึงนำค่าของตัวแปรใหม่ มาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (Y) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน เพื่อสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันโดยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple regression analysis) เริ่มโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis; PCA) ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติในการการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัว (multivariate analysis) โดยใช้เทคนิคการลดจำนวนตัวแปรอิสระด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่าปัจจัย หรือ องค์ประกอบ (factors หรือ principle components; PC) (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนเป็นเทคนิคการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) และเป็นเทคนิคที่ใช้การลดจำนวนตัวแปรลงเช่นเดียวกับวิธี PCR แต่แตกต่างกันที่ ข้อมูลตัวแปรตาม (Y) จะถูกนำเข้ามาร่วมในการสร้างตัวแปรใหม่สำหรับการจัดกลุ่มเพื่อลดจำนวนตัวแปร ตัวแปรใหม่ที่ได้เรียกว่า ค่าคะแนนปัจจัย (factors loading) จะเห็นว่าวิธี PLS ไม่ต้องสร้างแบบจำลองด้วยวิธีทางสถิติการถดถอย (regression) อีก เนื่องจากค่าปัจจัยที่สร้างขึ้นใหม่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามอยู่แล้ว การนำเทคนิค PLS มาใช้สร้างแบบจำลองแคลิเบรชันสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การสร้างสมการถดถอยแบบ PLS1 และ PLS2 โดยวิธีการถดถอยแบบ PLS1 คือการสร้างแบบจำลอง 1 แบบจำลอง สำหรับทำนายตัวแปรเพียง 1 ตัว ในขณะที่วิธีการถดถอยแบบ PLS2 คือ การใช้แบบจำลองเดียวมาทำนายค่าตัวแปรตามหลายตัว ซึ่งแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS1 จะให้ค่าความถูกต้องของการทำนายที่ดีกว่าวิธี PLS2 (ธงชัย สุวรรณสิขณน์ และคณะ, 2552)

การใช้ full spectrum ในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันจะให้ความแม่นยำมากกว่าการเลือกช่วงความยาวคลื่นบางช่วง โดยในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันด้วยการถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression; MLR) การเลือกความยาวคลื่นจะเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อแบบจำลองแคลิเบรชัน แต่จะมีผลกระทบน้อยเมื่อใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square; PLS) (รุ่งนภา ไกลถิ่น, 2555)

2.11.2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองที่สร้างขึ้นมา หรือ การทำแวลิดเดชัน (validation) หรือ การทวนสอบ (verification)

หลังจากได้แบบจำลองแคลิเบรชันที่เหมาะสมแล้ว ต้องมีการทวนสอบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นนั้นสามารถทำนายข้อมูลชุดอื่นๆ ที่เป็นกลุ่มเดียวกันได้หรือไม่ วิธีนิยมใช้ ได้แก่ การทวนสอบแบบไขว้ (full cross validation) และการทวนสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) เมื่อได้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือแล้ว จึงจะนำแบบจำลองที่ได้ไปใช้ทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการศึกษาจากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่วัดมาได้

การทวนสอบแบบไขว้เป็นการทดสอบแบบจำลองภายใน (internal validation) ตัวอย่างที่นำมาทดสอบแบบจำลองเป็นตัวอย่างชุดเดียวกับตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากการตัดตัวอย่างตัวที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน แล้วนำตัวอย่างที่เหลือมาสร้างแบบจำลองแวลิดเดชัน นำแบบจำลองที่ได้มาประเมินค่าทางองค์ประกอบของตัวอย่างที่ 1 ที่ถูกตัดออก จากนั้น ใส่ตัวอย่างตัวที่ 1 กลับคืน แล้วตัดตัวอย่างตัวที่ 2 ออกจากชุดตัวอย่าง ทำขั้นตอนซ้ำจนครบทุกตัวอย่าง ดังนั้น ตัวอย่างทุกตัวอย่างจะถูกตัดออกจากชุดตัวอย่าง 1 ครั้งเท่านั้น แล้วพิจารณาค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation; *RMSECV*) วิธีนี้เหมาะสมกับการใช้ทดสอบกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย เช่น น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง (Williams, 2007)

การทวนสอบแบบชุดทดสอบเป็นการทดสอบแบบจำลองภายนอก (external validation) โดยการนำกลุ่มตัวอย่างชุดใหม่ (testing set) มาทดสอบค่าจากแบบจำลองที่ได้ ตัวอย่างชุดใหม่ที่นำมาทดสอบ ต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง การวัดสเปกตรัม ปัจจัยต่าง ๆ ในระหว่างการวิเคราะห์ และการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมเหมือนกับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ตัวอย่างที่นำมาทดสอบจะถูกสแกนเพื่อให้ได้ค่าสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด แล้วนำไปแทนค่าในแบบจำลองที่สร้างขึ้นเพื่อทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการทราบ (predicted value) จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานได้เป็นค่าวัดจริง (actual value) แล้วเปรียบเทียบค่าที่วัดได้จริงกับค่าทำนาย ว่ามีความถูกต้องเพียงใด โดยพิจารณาความแม่นยำจากค่าสถิติ ได้แก่ ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) และค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการทำนาย (root mean square error of prediction; *RMSEP*) ถ้าผลของการทำนายค่าองค์ประกอบใกล้เคียงกับผลของค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานและมีค่าทางสถิติที่ดี แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างต่อไปได้ถูกต้อง (รุ่งนภา ไกลถิ่น, 2555)

2.11.3 ค่าทางสถิติที่ใช้พิจารณาความแม่นยำของแบบจำลอง

1) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2)

เป็นค่าที่แสดงสัดส่วนของความแปรปรวนในข้อมูล X ที่สามารถอธิบายโดยความแปรปรวนในข้อมูล Y ค่าของ R^2 จะเป็นบวกเสมอ เช่น $R^2 = 0.941$ หมายถึง 94.1 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนในข้อมูล X และ 5.9 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนในข้อมูล X เกิดขึ้นจากตัวแปรอื่น เช่น การเตรียมตัวอย่าง วิธีการทดลองอ้างอิง และอื่นๆ ค่า R^2 เป็นบวกเสมอ (ตารางที่ 2.10)

ตารางที่ 2.10 แนวทางในการอธิบายความสามารถของแบบจำลองแคลิเบรชันด้วยค่า R^2

R^2	ความหมาย
0-0.25	ไม่ควรใช้ใน NIRS calibration
0.26-0.49	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ ควรหาเหตุผล
0.50-0.64	ความสามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบ
0.66-0.81	ความสามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบและประมาณค่าเบื้องต้น
0.83-0.90	ควรใช้งานอย่างระมัดระวังในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัย
0.92-0.96	ใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ
0.98 ขึ้นไป	ดีเยี่ยม สามารถนำไปใช้ได้กับทุกงาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Williams (2007)

2) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias)

หมายถึงความแตกต่างระหว่างค่าจากการวัดด้วยวิธีมาตรฐาน หรือค่าวัดจริง (actual value) และค่าที่ทำนายโดยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (predicted value) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้วัดความแม่นยำโดยรวมของแบบจำลอง ดังนั้น แบบจำลองที่ดีควรมีค่า bias ต่ำ

3) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการทำนาย (root mean square error of prediction; $RMSEP$)

เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ของความแตกต่างระหว่างค่าวัดจริงและค่าทำนาย การคำนวณค่า $RMSEP$ มีการนำค่า bias มาคำนวณด้วย ซึ่งค่า $RMSEP$ เป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของแบบจำลองที่มีการทวนสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) แบบจำลองที่ดีควรมีค่า $RMSEP$ ต่ำ (Williams, 2007)

4) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation; *RMSECV*)

เป็นการหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่วัดได้จริงและค่าทำนายในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สำหรับทดสอบแบบจำลองที่มีการทวนสอบแบบ cross validation ที่ใช้กลุ่มตัวอย่างในการทดสอบชุดเดียวกันกับกลุ่มที่นำมาสร้างแบบจำลอง ค่า *RMSECV* เกิดจากการนำค่า bias มาใช้คำนวณร่วมด้วย ดังนั้น เมื่อรายงานผลจึงไม่จำเป็นต้องรายงานค่า bias และค่าที่ได้ควรมีค่าน้อยเช่นเดียวกัน (Williams, 2007)

5) อัตราส่วนระหว่าง *SEP* กับ *SD* (ratio of *SEP* to the *SD*; *RPD*)

เป็นอัตราส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้จริงของข้อมูลกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบแบบจำลองกับค่าความผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (standard error of prediction ; *SEP*) โดยค่า *SEP* คือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่วัดได้จริงและค่าทำนายในกลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบแบบจำลอง ดังนั้น ค่า *RPD* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของแบบจำลองที่ได้ และค่าที่ได้ควรมีค่ามาก (Williams, 2007) (ตารางที่ 2.11)

6) อัตราส่วนระหว่าง *SEP* ต่อช่วงกว้างของข้อมูล (ratio of standard error of prediction validation to range; *RER*)

เป็นอัตราส่วนระหว่างช่วงกว้างของค่าที่วัดได้จริงของข้อมูลในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบแบบจำลองกับค่า *SEP* ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่ามาก (Williams, 2007) (ตารางที่ 2.11)

ตารางที่ 2.11 แนวทางในการอธิบายประสิทธิภาพและการนำแบบจำลองไปใช้ด้วยค่า *RPD* และ *RER*

ค่า <i>RPD</i>	ค่า <i>RER</i>	การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง	การนำไปประยุกต์ใช้
0.0-2.3	0-6	ไม่ดีมาก	ไม่แนะนำ
2.4-3.0	6-12	ไม่ดีพอ	แบ่งกลุ่มแบบหยาบ
3.1-4.9	13-20	พอใช้	แบ่งกลุ่ม
5.0-6.4	21-30	ดี	ประกันคุณภาพ
6.5-8.0	31-40	ดีมาก	ควบคุมกระบวนการ
8.1 ขึ้นไป	41 ขึ้นไป	ดีเยี่ยม	ใช้ได้กับทุกงาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Williams (2007)

วิธีที่กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ (qualitative analysis) สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (quantitative analysis) คือ การวิเคราะห์จำแนกประเภท (discriminant analysis) เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ 1 ตัวขึ้นไป กับตัวแปรตามที่เป็นตัวแปรเชิงคุณภาพ 1 ตัว ซึ่งหลักการของการวิเคราะห์จำแนกประเภทคล้ายกับการวิเคราะห์แบบถดถอย แต่ต่างกันที่ประเภทของตัวแปรตาม (กัลยา วาณิชยบัญชา, 2552) เทคนิคที่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์จำแนกประเภท ได้แก่ การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) และวิธีซอฟอินดิเพนเดนตโมเดลลิงออฟคลาสอนาล็อก (soft independent modeling of class analog; SIMCA) (Frank และคณะ, 1989; Brereton และคณะ, 2014) ความแม่นยำของแบบจำลองพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องในการแบ่งกลุ่ม

2.12 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

ความคลาดเคลื่อน คือ ความแตกต่างระหว่างค่าที่วัดได้จริงกับค่าที่วัดได้จากการทำนายโดยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ซึ่งความคลาดเคลื่อนสามารถเกิดขึ้นได้ทุกเมื่อ ดังนั้น จึงต้องมีการควบคุมปัจจัยที่จะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนต่อการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (วารุณี ณะแพสย์ และคณะ, 2552)

2.12.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือ

การใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์จะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ที่ดีต้องสามารถกำหนดระยะความยาวคลื่นได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งประสิทธิภาพของเครื่องมือขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของชิ้นส่วนประกอบ หรืออะไหล่ นอกจากนี้ อุณหภูมิภายในตัวเครื่อง และความสะอาดของส่วนประกอบที่เกี่ยวข้องกับการให้แสงก็มีผลกระทบต่อระบบแสงเช่นเดียวกัน หากปัจจัยเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปจะมีผลต่อความบริสุทธิ์และความเสถียรของแสง โดยแสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงมีผลต่อระยะความยาวคลื่นและระดับความเข้มแสง นอกจากนี้ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศเกี่ยวข้องกับตำแหน่งพีคที่เกี่ยวข้องกับน้ำ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์เปลี่ยนไปก็จะทำให้ตำแหน่งที่เกิดพีคของน้ำคลาดเคลื่อนไปด้วย และจะทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่แม่นยำ การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมืออย่างสม่ำเสมอเป็นสิ่งจำเป็น เพราะเมื่อชิ้นส่วนประกอบของเครื่องมือชำรุดและต้องมีการเปลี่ยนชิ้นส่วนใหม่ แม้ว่าจะเป็นส่วนเดียวกันก็อาจจะให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันได้ (วารุณี ณะแพสย์ และคณะ, 2552)

2.12.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่าง

1) องค์ประกอบทางเคมี

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างกันขององค์ประกอบของตัวอย่างและหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนคลื่นแสงมีผลกระทบต่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ ซึ่งมักจะเกิดกับผลิตภัณฑ์ทางเภสัชและอาหาร การเกิดปฏิกิริยาระหว่างองค์ประกอบทางเคมีภายในตัวอย่างแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง อิทธิพลขององค์ประกอบทางเคมีต่อลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง และสถานภาพความชื้นในตัวอย่าง

องค์ประกอบทางเคมีที่มักจะเกิดปฏิกิริยากันในตัวอย่างที่เป็นอาหาร ได้แก่ น้ำมันกับโปรตีน แป้งกับโปรตีน เส้นใยกับโปรตีน น้ำมันกับเส้นใย และแป้งกับเส้นใย องค์ประกอบเหล่านี้สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงแม้ว่าจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม และหากมีในปริมาณมากจะทำให้เกิดการบดบังการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบอื่นที่มีปริมาณน้อยกว่า ดังนั้นควรเลือกใช้เครื่องมือที่สามารถเลือกช่วงคลื่นได้ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่มีปริมาณและความเข้มข้นน้อยกว่าได้ (วารุณี ธนะแพสย์ และคณะ, 2552)

เมื่อบดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลงเพื่อความสม่ำเสมอของขนาดก่อนการวิเคราะห์ แต่องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างอาจจะส่งผลให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของตัวอย่างที่บดแล้ว เช่น

- ตัวอย่างที่มีโปรตีนสูง เมื่อบดแล้วจะเกิดการจับกันของโปรตีน ทำให้เกิดอนุภาคของตัวอย่างที่ไม่สม่ำเสมอ

- ตัวอย่างที่น้ำมันสูง เมื่อบดแล้วจะจับกันเป็นก้อนไปจนถึงมีลักษณะคล้ายแป้งเปียก ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำมันที่มีในตัวอย่าง โดยมากปริมาณน้ำมันจะมีอิทธิพลต่อการวัดแบบสะท้อนแสงแบบแพร่ เนื่องจาก ลักษณะทางกายภาพมีผลต่อพื้นผิวของตัวอย่าง เมื่อบดตัวอย่างที่มีน้ำมันสูงจึงไม่ควรเก็บไว้เป็นเวลานาน ควรวิเคราะห์ตัวอย่างภายใน 1-2 วัน

- องค์ประกอบที่เป็นเส้นใยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบและความหนาแน่น (bulk density) ทำให้พื้นผิวเปลี่ยนไป ดังนั้น การกำหนดทิศทางของแสง และขนาดอนุภาคของตัวอย่างที่เป็นเส้นใย มีผลอย่างมากในการวัดแบบสะท้อนแบบแพร่

- การวัดตัวอย่างที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กันสูง ทำให้ผลการวัดไม่เป็นอิสระต่อกัน เช่น การวัดกรดอะมิโนในตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ด้วย การทำนายจะสะท้อนถึงปริมาณโปรตีนมากกว่าปริมาณกรดอะมิโน ซึ่งสามารถแก้ไขโดยการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบที่สนใจ

นอกจากนี้ ความชื้นของตัวอย่างมีผลต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์ จึงไม่ควรบดตัวอย่างที่มีความชื้นสูง เพราะหลังจากบดตัวอย่างที่มีความชื้นสูงแล้วเป็นเรื่องยากที่จะทำตัวอย่างดังกล่าวให้เกิดความสม่ำเสมอทั้งขนาด รูปร่าง และการกระจาย (วารุณี ณะแพสย์ และคณะ, 2552)

2) ความหนาแน่นจำเพาะ

มีผลกับปริมาณและการปรับตัวของตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นผง หรือ เมล็ด เมื่อถูกบรรจุลงในอุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง หากตัวอย่างมีความหนาแน่นจำเพาะต่ำจะส่งผลให้พื้นผิวของตัวอย่างมีความเรียบไม่สม่ำเสมอ ทำให้มีผลต่อสัญญาณแสงจากผิวหน้าเมื่อวัดด้วยการสะท้อนแสงแบบแพร่และอาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดได้ (Shah และคณะ, 2016; วารุณี ณะแพสย์ และคณะ, 2552)

3) ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง

เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสะท้อนแสงแบบแพร่ ซึ่งลักษณะทางกายภาพ หมายถึง องค์ประกอบและโครงสร้างของตัวอย่าง ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ส่งผลต่อสัญญาณแสง เช่น ตัวอย่างมีขนาดใหญ่เกินไปสามารถแก้ไขโดยการลดขนาดตัวอย่างลง นอกจากนี้ ปัจจัยเสริมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างในกรณีที่ตัวอย่างเป็นผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ สายพันธุ์ สภาพอากาศระหว่างการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา ควรเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ และมีอากาศถ่ายเทได้ดี เพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย (วารุณี ณะแพสย์ และคณะ, 2552)

4) อุณหภูมิ

อุณหภูมิของตัวอย่างและอุณหภูมิของห้องขณะวัดมีผลกระทบต่อความแม่นยำของวิธีเนียร์อิฟราเรดสเปกโทรสโกปีทั้งสิ้น เนื่องจาก อุปกรณ์ภายในตัวเครื่องมีความไวต่ออุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิของตัวอย่างและอุณหภูมิห้องขณะทำการวัดตัวอย่างด้วยวิธีเนียร์อิฟราเรดสเปกโทรสโกปีในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน อาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ (Shah และคณะ, 2016; วารุณี ณะแพสย์ และคณะ, 2552)

5) แพกเตอร์สำหรับการแปรผกผัน

ควรเลือกใช้วิธีมาตรฐานที่เหมาะสมในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สนใจ เพื่อให้ได้ค่าที่ต้องการวัดอย่างแท้จริง และเป็นการลดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ด้วยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (วารุณี ธนะแพสย์ และคณะ, 2552)

การสแกนเมล็ดธัญพืชด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีควรให้ความสำคัญกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่าง รวมไปถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ในธัญพืช ได้แก่ ขนาดเมล็ด สิ่งปนเปื้อน ความหนาของตัวอย่าง การบรรจุตัวอย่าง สี ปริมาณความชื้น และอุณหภูมิ หากปัจจัยเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการสแกนตัวอย่าง และอาจทำให้สเปกตรัมที่ได้มีลักษณะต่างกัน (วารุณี ธนะแพสย์ และคณะ, 2552)

2.12.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่

เจ้าหน้าที่ซึ่งมีหน้าที่ดำเนินการวิเคราะห์มีส่วนสำคัญต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เพื่อให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพเจ้าหน้าที่ควรระมัดระวังเรื่องต่างๆ ได้แก่ แนวทางปฏิบัติการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันทั้งการเลือกใช้จำนวนตัวอย่างมีมากเพียงพอ ควรเลือกวิธีสำหรับวิเคราะห์ค่าอ้างอิงที่เหมาะสมกับตัวอย่างเพื่อให้ได้แบบจำลองที่ดีเยี่ยม ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ควรเป็นตัวแทนอย่างแท้จริงของประชากรทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องมีการผสมตัวอย่างให้ทั่วถึงและแบ่งแยกอีกครั้งก่อนการวิเคราะห์ สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ อาจต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ โดยการบดตัวอย่างให้เล็กลงและผสมตัวอย่างให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบ (Shah และคณะ, 2016) ในการสแกนตัวอย่างควรบรรจุตัวอย่างลงในอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างให้เต็มแน่นพอดี เพื่อให้ไม่เกิดช่องว่างระหว่างตัวอย่างเมื่อสแกนด้วยระบบหมุน (Workman, 2008) หากจำเป็นต้องมีการเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ในครั้งต่อไป ควรเลือกวิธีเก็บรักษาที่เหมาะสมกับสภาพอากาศและชนิดของตัวอย่าง เช่น ในพื้นที่อบอุ่นควรเก็บรักษาตัวอย่างในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท ซึ่งจะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำของตัวอย่าง (วารุณี ธนะแพสย์ และคณะ, 2552)

2.13 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในผลผลิตทางการเกษตร

ปัจจุบันเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้รับความสนใจมากขึ้นในการนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของผลผลิตทางการเกษตร โดยมีจุดประสงค์เพื่อการควบคุมคุณภาพของสินค้าในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ ธัญพืช เครื่องดื่มต่างๆ นมและผลิตภัณฑ์จากนม (Huang และคณะ, 2008) องค์ประกอบที่วิเคราะห์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ขนาด สี รูปร่าง ความหวาน และค่าความชื้นของตัวอย่าง (Porep และคณะ, 2015a) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในผลผลิตทางการเกษตรแสดงในตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการวิเคราะห์องค์ประกอบในผลผลิตทางการเกษตร

ตัวอย่าง	องค์ประกอบที่วิเคราะห์	อ้างอิง
ข้าวสาลี	โปรตีน	Long และคณะ (2008)
มันฝรั่ง	ไขมัน	Pedreschi และคณะ (2010)
ลูกแพร์	ความหวาน	Xu และคณะ (2012)
ข้าวกล้อง	โปรตีนและความชื้น	Li และคณะ (2013)
น้ำนมดิบ	ไขมัน โปรตีน น้ำตาลแลคโตส	Melfsen และคณะ (2013)
โอลีฟ	ไขมัน	Salguero-Chaparro และคณะ (2014)
แตงโม	ความหวาน	Jie และคณะ (2014)
องุ่น	ปริมาณน้ำตาล	Porep และคณะ (2015b)

2.14 การประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในธัญพืช

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในธัญพืชในเชิงปริมาณ มีดังนี้

Mirghani และคณะ (2001) ศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 จี 1 และ จี 2 ในถั่วลิสงโดยการทำให้อตัวอย่างเกิดการปนเปื้อนในช่วงความเข้มข้น 0-1200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-NIR) วัดในระบบสะท้อน (reflectance) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 750-4000 ต่อเซนติเมตร และใช้วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบางเป็นวิธีมาตรฐาน ตัวอย่างกลุ่มสร้างแบบจำลองมีปริมาณเฉลี่ยของอะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 จี 1 และ จี 2 เท่ากับ 476.55, 461.26, 439.58 และ 430.92 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ได้แบบจำลองที่มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9911, 0.9859, 0.9986 และ 0.9789 ตามลำดับ

Berardo และคณะ (2005) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหารา และสารพิษจากรา (เออโกสเตอรอล และฟูโมนิซิน) ในเมล็ดข้าวโพดและแป้งข้าวโพดที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ และถูกทำให้ปนเปื้อน โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และ ELISA เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากรา และวิธี direct plating ในการตรวจหารา โดยสแกนในระบบสะท้อน (reflectance) ที่ความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร ผลการทดลองพบการปนเปื้อนของเออโกสเตอรอลและฟูโมนิซินเฉลี่ยเท่ากับ 7.7 และ 5.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แบบจำลองที่ดีที่สุดที่ทำนายการปนเปื้อนของ *F. verticilloides* ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด มีค่า R^2 เท่ากับ 0.80

Fernández-Ibañez และคณะ (2009) ใช้ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-NIR) ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร (1112-2500 นาโนเมตร) ตรวจหาอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพด 66 ตัวอย่าง และข้าวบาร์เลย์ 76 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี ELISA และ lateral flow immunochromatographic assay เป็นวิธีมาตรฐาน ได้แบบจำลองที่ดีที่สุดมีค่า R^2 เท่ากับ 0.80 และ 0.85 ซึ่งแบบจำลองสามารถใช้แบ่งกลุ่มอย่างหยาบ

Shenderoy และคณะ (2010) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราก่อโรคในแอปเปิ้ล จำนวน 955 ผล โดยการวัดแบบส่องผ่าน (transmittance) ที่ช่วงวิซิเบิล (visible) และเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 400-1000 นาโนเมตร จากการทดลองได้ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (SEP) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.036 และ 0.71 ตามลำดับ

Porep และคณะ (2015c) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจวัดเออโกสเตอรอล (ergosterol) ในองุ่นทั้งหมด 177 ตัวอย่าง สแกนที่ช่วงความยาวคลื่นซึ่งอยู่ในช่วงวิซิเบิลและเนียร์อินฟราเรด (400-1800 นาโนเมตร) ในระบบสะท้อน (reflectance mode) และใช้วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นวิธีมาตรฐาน จากผลการทดลองแสดงค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดยกกำลังสองเฉลี่ยของการทำนาย (RMSEP) และอัตราส่วนระหว่าง SD ต่อ SEP (RPD) เท่ากับ 0.726, 0.84 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.0 ตามลำดับ

สำหรับการประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพในธัญพืช มีดังนี้

Wang และคณะ (2003) แบ่งกลุ่มเมล็ดข้าวเหลืองที่มีคุณภาพดีกับเมล็ดที่ถูกราเข้าทำลาย ต่างกัน 4 กลุ่ม ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในระบบสะท้อน (reflectance) ด้วยเครื่องแบบ ไดโอด-อาร์เรย์ (diode-array NIR spectrometer) ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-1700 นาโนเมตร แบบจำลองจากการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยวิธีการกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square, PLS) ได้จากการแบ่งกลุ่มของข้าวเหลืองออกเป็น 2 กลุ่ม มีค่าการทำนายที่แม่นยำสูงที่สุด มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์

Shahin และคณะ (2012) ประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีร่วมกับช่วงวิซิเบิล (400-1000 นาโนเมตร) และ hyperspectral imaging ในระบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance mode) เพื่อจำแนกกลุ่มเมล็ดข้าวสาลีจำนวน 7 สายพันธุ์ ระหว่างเมล็ดปกติและที่มีการปนเปื้อนรา *Fusarium* sp. รวม 5,221 เมล็ด พบว่า แบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA สามารถจำแนกกลุ่มข้าวสาลีดังกล่าวอย่างถูกต้อง โดยมีค่าการทำนายถูกต้องเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

Moscetti และคณะ (2013) จำแนกกลุ่มเมล็ดข้าวสาลีที่ปกติกับเมล็ดที่มีตำหนิจากการปนเปื้อนของราและที่ถูกแมลงเข้าทำลาย โดยใช้วิสิเบิล/เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Vis/NIR spectroscopy) สแกนโดยใช้เครื่องชนิดไดโอดอาร์เรย์และวัดแบบสะท้อน (reflectance) ในช่วง 944.5-1710.9 นาโนเมตร แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA รายงานเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายผิดพลาด เท่ากับ 5.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าแบบจำลองสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์แบบรวดเร็วได้

Wang และคณะ (2014) สร้างแบบจำลองเชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีโดยใช้ระบบ hyperspectral imaging สแกนในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 1000-2500 นาโนเมตร ในเมล็ดข้าวโพดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ ค่าการทำนายเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าต่ำสุดที่สามารถจำแนกได้ คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Wang และคณะ (2015) ประยุกต์ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีร่วมกับ hyperspectral imaging ในการตรวจวัดเชิงคุณภาพของอะฟลาทอกซินบี 1 ในเมล็ดข้าวโพดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *A. flavus* ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 1729 และ 2344 นาโนเมตร พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องมากที่สุดเท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสามารถใช้ในวิเคราะห์เชิงคุณภาพในเมล็ดข้าวโพดได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
2. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 22 x 28 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Manzel-Glaser, Germany
3. กระดาษกรอง ขนาด 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman No.1, England
4. กระจกพอยล์บรรจุอาหาร บริษัท ยูเนียน อินตา จำกัด, Thailand
5. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอร์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
6. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอร์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
7. ขวดใส่สารละลาย ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
8. ขวดรูปخمพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
9. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
10. ขวดแก้ว ขนาด 20 มิลลิลิตร
11. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 ยี่ห้อ Tomy, Japan
13. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer; FT-NIR) รุ่น MPA บริษัท Bruker optik, Germany
14. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer; FT-NIR) รุ่น NIRFlex N-500 บริษัท Buchi, Switzerland
15. เครื่องปั่นผสม (Vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
16. เครื่องปั่นอนุภาคประสมค์ รุ่น HR-2001 ยี่ห้อ Philips, Indonesia

17. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (micro plate reader) บริษัท Neogen, USA/Canada
18. งานเพาะเชื้อแก้ว บริษัท Pyrex, England
19. งานเพาะเชื้อพลาสติก บริษัท Greiner bio – one, Thailand
20. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service
21. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Lab Micro, Thailand
22. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
23. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
24. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
25. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
26. ตู้อบแห้ง บริษัท Conthem Scintific, New Zealand
27. ถังมือยาง ยี่ห้อ SemperGuard บริษัท สยามแซมเพอร์เมจ จำกัด, Thailand
28. โถดูดความชื้น บริษัท เบคไทย กรุงเทพมหานครเคมีภัณฑ์ จำกัด, Thailand
29. ปีกเกอร์ ขนาด 200, 600 และ 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
30. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
31. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2.5, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
32. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler, Thailand
33. สไลด์ ขนาด 25.6 x 76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sali Brand, China
34. ฮีมาไซโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Boeco, Germany

เคมีภัณฑ์

1. กลีเซอรอล 85% (glycerol 85%) บริษัท Merck, Germany
2. ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Veratox Aflatoxin Quantitative test kit) บริษัท Neogen, USA ในชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ประกอบด้วย
 - อะฟลาทอกซินกับเอนไซม์ (conjugate solution)
 - สารละลายสับสเตรต (substrate solution)
 - สารละลายหยุดปฏิกิริยา (stop solution)
 - สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินรวมที่ความเข้มข้น 0, 5, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. เมทานอล (CH₃OH) บริษัท Merck, Germany
5. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 จาก *Aspergillus flavus* บริษัท Sigma, USA.
6. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ บริษัท Kao Industrial, Thailand
7. อะซิโตนไตรัล (CH₃CN) บริษัท Labscan, Thailand
8. เอทานอล (C₂H₅OH) บริษัท J.T. Baker, USA
9. Potato Dextrose Agar (PDA Agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
10. Tween 80 บริษัท Merck, Germany

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิจากตลาดสด ห้างสรรพสินค้า ร้านสะดวกซื้อ และโรงสี ในพื้นที่กรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง (ภาคผนวก ง) ในช่วงปี พ.ศ. 2556-2557 จำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 กิโลกรัม ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ในถุงซิปลาสติก แล้วใส่กล่องพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรักษาความชื้นสำหรับการทดสอบขั้นต่อไป

3.2 การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่าง

ขั้นตอนการปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่างแสดงในภาพที่ 3.1 โดยหลังจากเก็บตัวอย่างและปรับภาวะของตัวอย่างแล้ว ตัวอย่างทุกชนิดจะถูกนำไปสแกนด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงแสงหรือสเปกตรัม ตัวอย่างที่สแกนแล้วจะถูกนำไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ จากนั้น ตรวจสอบข้อมูลผิดปกติของข้อมูลเชิงแสงและข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ แล้วนำข้อมูลทั้งสองชนิดไปสร้างแบบจำลองและทดสอบแบบจำลองที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.1 การปรับภาวะข้าวกล้อง

การปรับภาวะข้าวกล้อง ประกอบด้วย การปรับความชื้น และการปรับการปนเปื้อนของราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินในข้าวกล้อง เพื่อกระตุ้นการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของรา ทำให้มีความหลากหลายและการกระจายตัวที่สม่ำเสมอของการปนเปื้อนราและอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง เริ่มจากนำตัวอย่างข้าวกล้องในข้อ 3.1 หนึ่งตัวอย่าง แยกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่มีการปรับความชื้น ชุดที่สองเป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับความชื้นเท่ากับ 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น ตัวอย่างแต่ละชุดถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ (natural infection) และกลุ่มตัวอย่างที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificial infection) ทำให้ได้จำนวนตัวอย่างในแต่ละภาวะ 20 ตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง คือ 120 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่าง	ไม่ปรับความชื้น	ปรับความชื้น	
		14 เปอร์เซ็นต์	18 เปอร์เซ็นต์
ปนเปื้อนราตามธรรมชาติ	20	20	20
ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา	20	20	20
รวม	40	40	40

3.2.1.1 การปรับความชื้น

1) การวิเคราะห์ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (moisture content initial, M_{ci})

นำถั่วอะลูมิเนียมที่มีฝาปิดมาซึ่งน้ำหนัก จากนั้น นำข้าวกล้องหอมมะลิ 5 ± 1 กรัม ใส่ในถั่วอะลูมิเนียมดังกล่าว แล้วนำไปชั่งน้ำหนักก่อนอบ (E) จากนั้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 130 ± 3 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 45 นาที ชั่งน้ำหนักข้าวหลังผ่านการอบ (m) แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความชื้นของข้าวเริ่มต้น (M_{ci}) ตามสูตร (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555)

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

เมื่อ M_{ci} คือ ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์ฐานเปียก)

E คือ น้ำหนักข้าวก่อนอบ (กรัม)

m คือ น้ำหนักข้าวหลังอบ (กรัม)

2) การปรับความชื้นของข้าว

นำค่าความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างข้าว (M_{ci}) มาคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องการเติม (W_w) ลงในตัวอย่างข้าวกล้อง 130 กรัม เพื่อให้ได้ความชื้นตามที่ต้องการ (M_{cf}) คือ 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตร (Mahjoub และคณะ, 2014)

$$W_w = W_f - W_i$$

และ

$$W_f = \left(\frac{1 - M_{ci}}{1 - M_{cf}} \right) W_i$$

เมื่อ	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)

จากนั้น เติมน้ำตามปริมาตรที่คำนวณได้ลงในตัวอย่างข้าวกล้อง คลุกเคล้าให้น้ำกระจายอย่างทั่วถึงภายในกล่องที่ปิดสนิท นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คลุกข้าวให้เข้ากันทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน แบ่งข้าวใส่จานเพาะเชื้อ เพื่อนำไปปรับการปนเปื้อนของราในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.1.2 การปรับการปนเปื้อนของรา

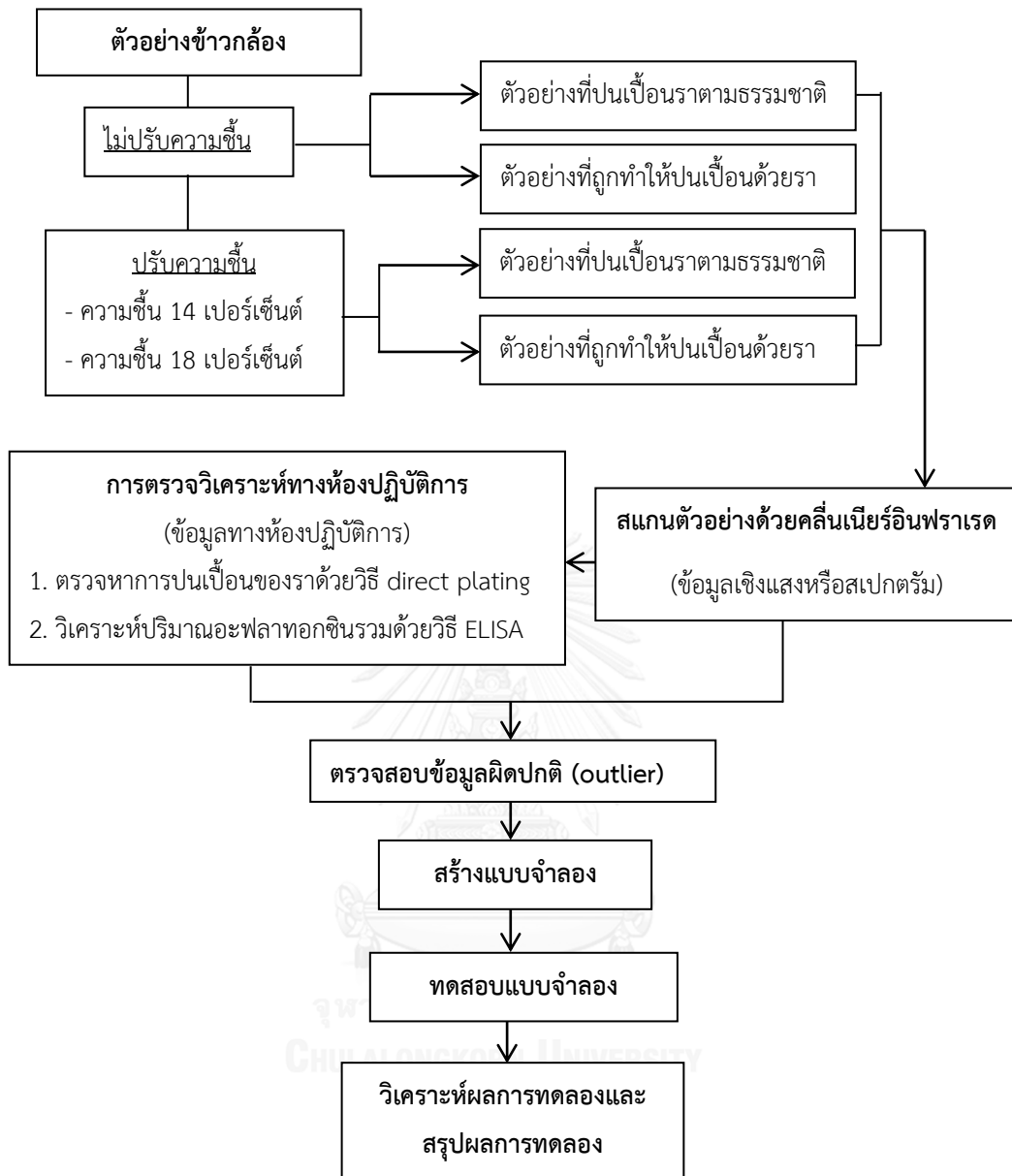
1) การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์รา

นำรา *A. flavus* M3T8R4G3 ที่แยกได้จากข้าวและมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซิน (โนทัย กิตติกำแหง, 2554) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยเก็บสปอร์ราด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโทมิเตอร์ในการนับจำนวนสปอร์

2) การเติมสปอร์ของ *A. flavus* ลงในข้าว

นำข้าวกล้องกลุ่มที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้น ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของ *A. flavus* M3T8R4G3 ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้กระจายทั่วทุกเมล็ด โดยนำข้าวใส่ลงไปในจานเพาะเชื้อทีละชั้น แล้วฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงไปให้ทั่วทั้งชั้น ทำเช่นนี้จนข้าวเต็มจานเพาะเชื้อ

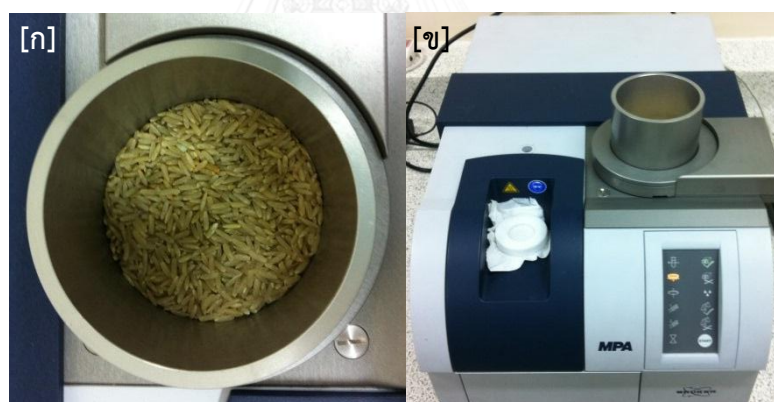
เมื่อปรับภาวะของตัวอย่างแล้วจะมีตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1) ตัวอย่างทุกภาวะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำไปสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดทันที



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะของตัวอย่าง

3.2.2 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

บรรจุตัวอย่างข้าวจากงานเลี้ยงเชื้อจำนวน 130 กรัม ลงในถ้วยเปิดสำหรับสแกนตัวอย่างที่กั้นภาชนะทำด้วยควอตซ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 85 มิลลิเมตร ลึก 89 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer; FT-NIR) (MPA, Bruker, Germany) (ภาพที่ 3.2) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร) ในระบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) ที่ความละเอียด 16 จำนวนคลื่นต่อเซนติเมตร ตัวอย่างถูกสแกนภายใต้อุณหภูมิห้องที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยตัวอย่างข้าวกล้อง 1 ตัวอย่าง ถูกแบ่งเป็น 2 ตัวอย่างย่อย แต่ละตัวอย่างย่อยถูกนำมาสแกน 3 ครั้ง ดังนั้น จะได้เส้นสเปกตรัม 3 เส้นต่อหนึ่งตัวอย่างย่อย จากตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) ทำให้ได้ข้อมูลเชิงแสง (สเปกตรัม) ทั้งหมด 720 เส้น เก็บข้อมูลค่าการดูดกลืนแสง หรือข้อมูลเชิงแสง (สเปกตรัม) ด้วยโปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker optik GmbH, Germany) เพื่อการวิเคราะห์ทางเคโมเมทริกซ์ (chemometrics) แล้วจึงนำตัวอย่างที่สแกนแล้วไปตรวจหาการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินรวมในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างข้าวกล้องที่บรรจุในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่าง [ก], การสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer; FT-NIR) รุ่น MPA [ข]

3.2.3 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.2.3.1 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้องโดยวิธี direct plating

วิธี direct plating เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารประเภทธัญพืช (Samson และคณะ, 2004; Pitt และคณะ, 2009) ทำได้โดยการสูมหยิบเมล็ดข้าวที่สแกนแล้วบริเวณก้นภาชนะที่ใช้สแกน จำนวน 50 เมล็ด ต่อ 1 ตัวอย่าง วางบนอาหารแข็ง PDA ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ โดยวางเมล็ดข้าว 10 เมล็ด ต่อจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนเมล็ดข้าวที่พบการเจริญของราทั้งหมดและราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะเป็นราในสกุล *Aspergillus section Flavi* ที่มีความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซิน เพื่อนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.2.3.2 การสกัดอะฟลาทอกซินและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินรวมโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

นำข้าวกล้องที่อยู่บริเวณก้นภาชนะซึ่งผ่านการสแกนด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์แล้ว มาสกัดตามวิธีการของ AOAC Official Method (990.32) (Lupo และคณะ, 2010) โดยปั่นข้าวกล้องให้ละเอียด จากนั้น นำตัวอย่างที่ปั่นแล้วปริมาณ 10 กรัม ไปสกัดด้วยเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 7:3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินรวมด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Neogen's Veratox® for aflatoxin, USA) ที่ได้รับการยอมรับจาก AOAC Reserch Institute (AOAC-RI 050901) (Lupo และคณะ, 2010) โดยนำสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารคอนจูเกตระหว่างอะฟลาทอกซินกับเอนไซม์ (horseradish peroxidase, HRP) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วดูดสารผสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับอะฟลาทอกซิน จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง เคาบน้ำที่อยู่ในหลุมออกจนหมดแล้วเติมสารละลายยับยั้งเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่านาน 10-20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วเติมสารละลายหยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับยับยั้งเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร อ่านค่าความเข้มข้นของแสงผ่านเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (micro plate reader) (Neogen, USA/Canada) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของแสงของตัวอย่างกับชุดควบคุม (สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินรวมที่ความเข้มข้น 0, 5, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ชีตความสามารถในการตรวจวัดของชุด

ทดสอบอยู่ในช่วง 2-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หากความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่างสูงเกินช่วงดังกล่าวจำเป็นต้องทำการเจือจางก่อนการวิเคราะห์

3.2.4 การทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะของผู้วิจัย (Laboratory performance)

การทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพการทำงานในห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะของผู้วิจัย สามารถวัดได้จากค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) และค่าความสามารถในการวัดเหมือน (reproducibility) ซึ่งการเลือกกลุ่มตัวอย่างสำหรับการทดสอบทำโดยอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ผู้วิจัยมาแทรกในระหว่างทำการทดลองปกติเป็นระยะ เพื่อให้ผู้วิจัยวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมโดยที่ผู้วิจัยไม่ทราบว่าเป็นตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมอยู่ในระดับใด

ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ โดยใช้ตัวอย่างที่ซ้ำกับตัวอย่างในการทดลองปกติ (กลุ่มตัวอย่าง duplication) จำนวน 6 คู่ มาวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม จากนั้น คำนวณค่าความสามารถในการวัดซ้ำ โดยการหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอย่างชุด duplication

สำหรับค่าความสามารถในการวัดเหมือน ซึ่งใช้ตัวอย่างที่ผู้วิจัยไม่ทราบเลยว่าเป็นตัวอย่างใด (กลุ่มตัวอย่าง blind) จำนวน 6 ตัวอย่างในการทดสอบ จากนั้น คำนวณค่าความสามารถในการวัดเหมือน โดยหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ในชุดตัวอย่าง blind กับชุดตัวอย่างจริง

3.2.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

3.2.5.1 การตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outliers)

ตรวจสอบค่าผิดปกติจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินรวม) โดยใช้เงื่อนไข

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

เมื่อ	x	คือ ค่าที่ได้จากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
	\bar{x}	คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างทั้งหมด
	SD	คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมด

ตรวจสอบค่าผิดปกติของข้อมูลเชิงแสง (optical data) โดยใช้การสังเกตสเปกตรัมด้วยตาเปล่า

3.2.5.2 การสร้างแบบจำลองจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

นำข้อมูลค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และปริมาณอะฟลาทอกซิน) มาแบ่งออกเป็น 6 ชุดตัวอย่าง ตามภาวะต่างๆ ดังนี้

ชุดตัวอย่างที่ 1 คือ ตัวอย่างที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ไม่ปรับความชื้น
จำนวน 20 ตัวอย่าง (จำนวนสเปกตรัม 120 เส้น)

ชุดตัวอย่างที่ 2 คือ ตัวอย่างที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ถูกปรับความชื้น
เป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 ตัวอย่าง
(จำนวนสเปกตรัม 240 เส้น)

ชุดตัวอย่างที่ 3 คือ ตัวอย่างที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ไม่ปรับความชื้น
และถูกปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์
จำนวน 60 ตัวอย่าง (จำนวนสเปกตรัม 360 เส้น)

ชุดตัวอย่างที่ 4 คือ ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและปรับความชื้น
เป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 ตัวอย่าง
(จำนวนสเปกตรัม 240 เส้น)

ชุดตัวอย่างที่ 5 คือ ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่ไม่ปรับความชื้น
และถูกปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์
จำนวน 60 ตัวอย่าง (จำนวนสเปกตรัม 360 เส้น)

ชุดตัวอย่างที่ 6 คือ ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด จำนวน 120 ตัวอย่าง
(จำนวนสเปกตรัม 720 เส้น)

จากนั้น นำค่าจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา และปริมาณอะฟลาทอกซิน) กับข้อมูลเชิงแสง (สเปกตรัม) ของตัวอย่างแต่ละชุดที่ตัดข้อมูลผิดปกติออกแล้ว มาสร้างแบบจำลองด้วยโปรแกรม OPUS 7.0.129 ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) ซึ่งข้อมูลที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองมีทั้งข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นและที่มีการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีทางคณิตศาสตร์ ดังนี้

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

ทดสอบแบบจำลองของชุดตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยกว่า 100 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการทวนสอบแบบไขว้ (cross validation) และวิธีการทวนสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) สำหรับชุดตัวอย่างที่มีจำนวนมากกว่า 100 ตัวอย่าง โดยแบ่งข้อมูลเป็นกลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (test set) ในอัตราส่วน 1:1 สำหรับแบบจำลองของอะฟลาทอกซิน และ 16:9 สำหรับแบบจำลองของราทั้งหมดและราเขียววมเหลือง หลังจากทดสอบแบบจำลองแล้วเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าทางสถิติ ได้แก่ ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) สูงที่สุด ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation, $RMSECV$) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการทำนาย (root mean square error of prediction, $RMSEP$) และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) ที่มีค่าต่ำที่สุด

3.2.6 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

สร้างแบบจำลองเชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่ม (classification model) 3 แบบจำลอง ได้แก่

- 1) แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด
- 2) แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเซียวมเหลือง

- 3) แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) โดยใช้วิธีซอฟต์แวร์อินดิเพนเดนตโมเดลลิงออฟคลาสอานาล็อก (soft independent modeling of class analogy, SIMCA) การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square – discriminant analysis, PLS-DA) และการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis, PCA) เมื่อได้แบบจำลองแล้วนำข้อมูลกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลองแล้วคัดเลือกแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด

3.3 การตรวจสอบการเจริญของ *A. flavus* และปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อตรวจสอบการเจริญของรา

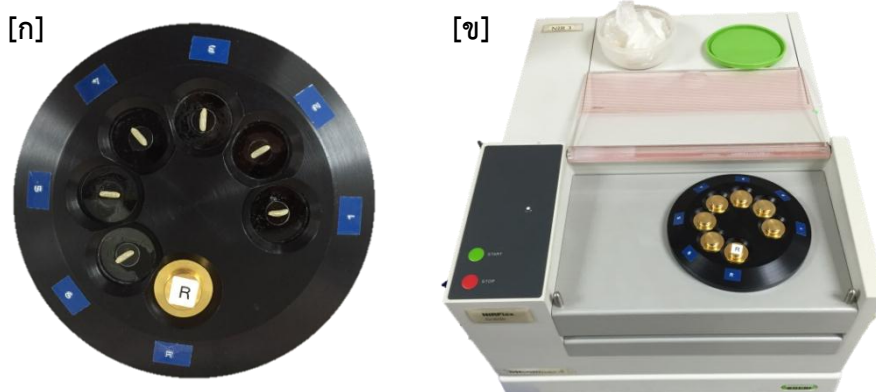
นำตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้อง จำนวน 20 เมล็ด มาฆ่าเชื้อบริเวณผิวตามวิธีของ Pitt และคณะ (2009) โดยนำเมล็ดข้าวกล้องแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น นำมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) เป็นเวลา 2 นาที แล้วจุ่มเมล็ดข้าวกล้องดังกล่าวลงในสารแขวนลอยสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างไปวางบนอาหารแข็ง PDA จำนวน 10 เมล็ด จากนั้นเตรียมเมล็ดข้าวอีก 20 เมล็ด ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ไม่จุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ราเพื่อใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนรา ตัวอย่างทั้งหมดถูกบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 5 ของการบ่ม

3.3.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1

นำสารละลายอะฟลาทอกซินปี 1 จากสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินปี 1 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) ความเข้มข้นละ 50 มิลลิลิตร จากนั้น นำเมล็ดข้าวกล้องจุ่มลงในสารละลายอะฟลาทอกซินปี 1 ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 100 เมล็ด เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

3.3.3 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

นำตัวอย่างข้าวเมล็ดเดี่ยวไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) รุ่น NIRFlex N-500 (Buchi, Switzerland) ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยบรรจุตัวอย่างลงในภาตใส่ข้าวแบบ 6 หลุม ที่มีฝาครอบทำจากโลหะเคลือบด้วยทองคำ วางตัวอย่างบนตำแหน่งรับคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่น 1000-2500 นาโนเมตร) ดังภาพที่ 3.3 วัดในระบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance mode) ที่ความละเอียด 16 จำนวนคลื่นต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) ตัวอย่างที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของรา 1 เมล็ด สแกน 1 ครั้ง ต่อ 1 วัน ทำการสแกนตัวอย่างเป็นเวลา 5 วัน ดังนั้น จะได้เส้นสเปกตรัมทั้งหมด 200 เส้น สำหรับตัวอย่างที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 (AFB₁) 1 เมล็ด สแกน 1 ครั้ง โดยตัวอย่าง 1 ความเข้มข้นมีจำนวน 100 เมล็ด ดังนั้น จะได้เส้นสเปกตรัม 500 เส้น เก็บข้อมูลด้วยโปรแกรม NIRWare Operator และตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outlier) ของข้อมูลสเปกตรัม จากนั้น นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ทางเคโมเมทริกซ์ (chemometrics) ต่อไป



ภาพที่ 3.3 ตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่บรรจุในภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่าง [ก], เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-NIR) รุ่น NIRFlex N-500 [ข]

3.3.4 การติดตามการเจริญของราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ

ติดตามการเจริญของราสกุล *A. section Flavi* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ โดยการสังเกตความหนาแน่นของราดังกล่าวบนผิวเมล็ดข้าวกล้องด้วยตาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (Olympus, Japan) สังเกตการเจริญของราทุกวันหลังจากที่สแกนตัวอย่างด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแล้ว อ่านผลโดยกำหนดให้

- + หมายถึง มีความหนาแน่นของราน้อย
- ++ หมายถึง มีความหนาแน่นของราปานกลาง
- +++ หมายถึง มีความหนาแน่นของรามาก
- ++++ หมายถึง มีความหนาแน่นของรามากที่สุด

3.3.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

สร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวเมล็ดเดี่ยว 2 แบบจำลอง ได้แก่

- 1) แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามการปนเปื้อนของรา *A. flavus*
- 2) แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1

จากนั้น สร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามวิธีในข้อที่ 3.2.6

บทที่ 4

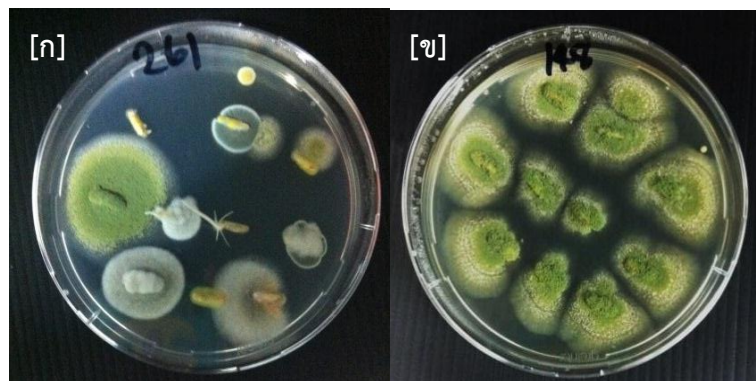
ผลการทดลอง

4.1 การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะข้าวกล้อง

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

4.1.1.1 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง รวมทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ด้วยวิธี direct plating (ภาพที่ 4.1) พบว่า เพอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (total fungi infection) อยู่ในช่วง 2-100 เพอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อความชื้นของตัวอย่างสูงขึ้น ทั้งในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (ตารางที่ 4.1) ตัวอย่างข้าวกล้องที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ไม่ได้ปรับความชื้น และที่ถูกนำมาปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เพอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 75.30 ± 29.62 , 88.80 ± 20.43 และ 100 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่ไม่ได้ปรับความชื้น และที่ถูกปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เพอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 95.35 ± 6.03 , 99.70 ± 1.40 และ 100 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดจำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 93.19 ± 17.23 เพอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1)

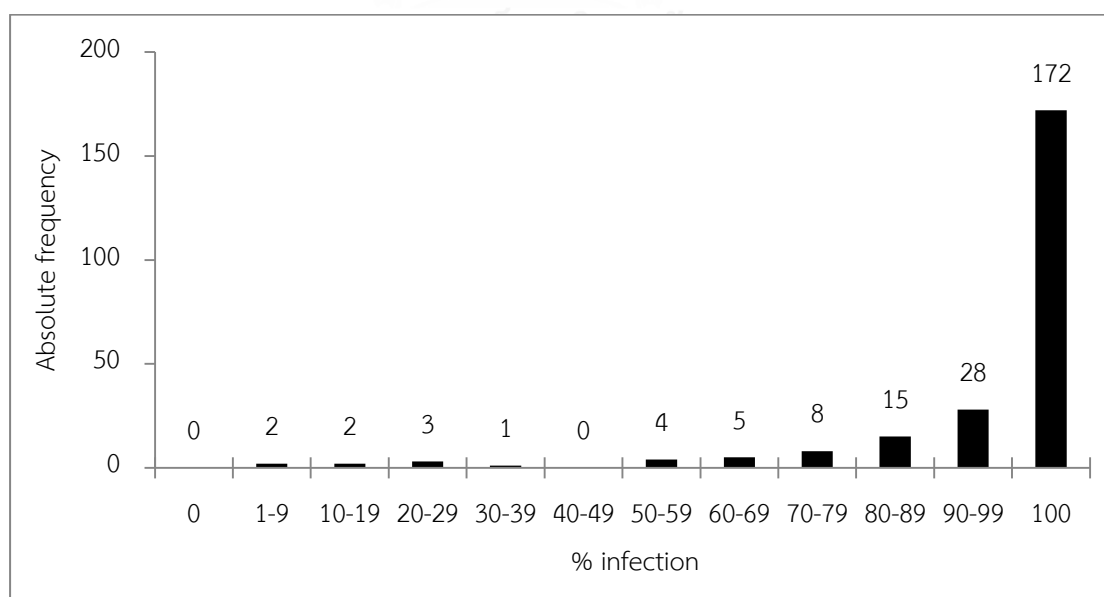


ภาพที่ 4.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง ด้วยวิธี direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยภาพ [ก] แสดงการติดเชื้อของราทั้งหมด และภาพ [ข] แสดงการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตัวอย่าง	ความชื้น	จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่างย่อย)	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด		
			ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
ปนเปื้อนราตามธรรมชาติ	ไม่ได้ปรับความชื้น	20 (40)	2.00	100.00	75.30±29.62
	ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	20.00	100.00	88.80±20.43
	ความชื้น 18 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	100.00	100.00	100.00±0.00
ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา	ไม่ได้ปรับความชื้น	20 (40)	80.00	100.00	95.35±6.03
	ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	92.00	100.00	99.70±1.40
	ความชื้น 18 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	100.00	100.00	100.00±0.00
รวม		120 (240)	2.00	100.00	93.19±17.23

ภาพที่ 4.2 แสดงการแจกแจงความถี่ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ในตัวอย่างข้าวกล้องจำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) พบว่า การกระจายตัวของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดไม่สม่ำเสมอ ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสูง 172 ตัวอย่างย่อย มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 71.66 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราอยู่ในช่วง 90-99 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 28 ตัวอย่างย่อย คิดเป็น 11.67 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 8 ตัวอย่างย่อย คิดเป็น 3.33 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด



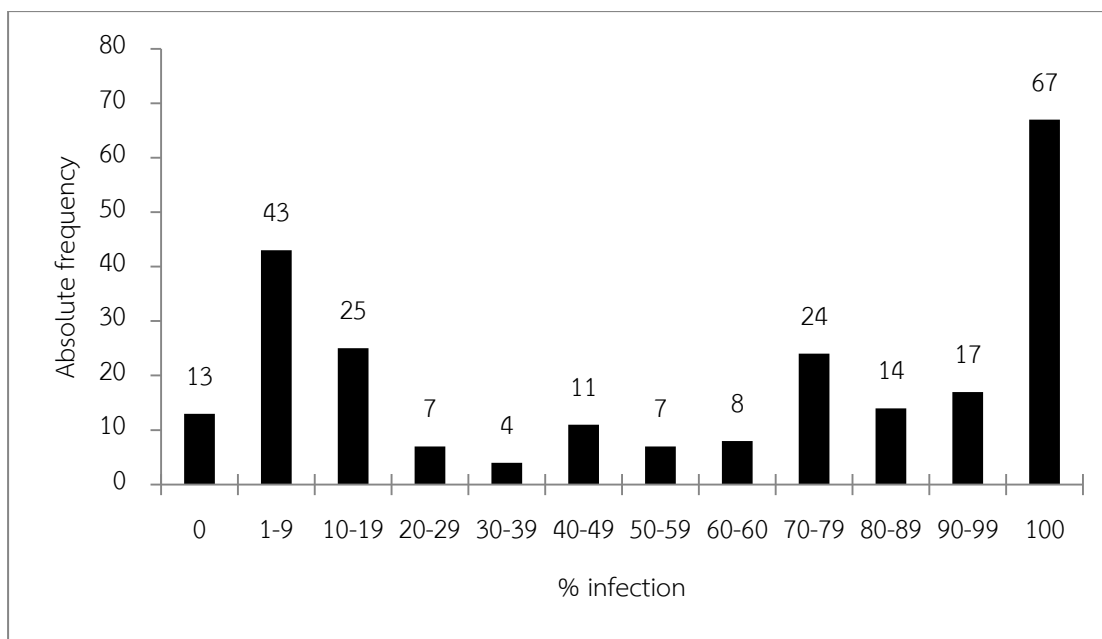
ภาพที่ 4.2 การแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้องปรับ ภาวะ 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย)

สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองของตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) มีค่าอยู่ในช่วง 0-100 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 56.02 ± 40.23 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) ตัวอย่างข้าวกล้องที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ไม่ได้ปรับความชื้น และปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเฉลี่ยเท่ากับ 15.55 ± 23.12 , 9.30 ± 14.80 และ 44.85 ± 29.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา พบว่า ตัวอย่างที่ปรับความชื้นเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองสูงที่สุดเท่ากับ 97.90 ± 8.31 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ตัวอย่างที่ปรับความชื้นเป็น 18 เปอร์เซ็นต์ (92.45 ± 21.97 เปอร์เซ็นต์) และที่ไม่ได้ปรับความชื้น (76.05 ± 13.03 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตัวอย่าง	ความชื้น	จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่างย่อย)	ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา		
			ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
ปนเปื้อนราตามธรรมชาติ	ไม่ปรับความชื้น	20 (40)	0.00	100.00	15.55 ± 23.12
	14 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	0.00	74.00	9.30 ± 14.80
	18 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	0.00	96.00	44.85 ± 29.17
ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา	ไม่ปรับความชื้น	20 (40)	48.00	96.00	76.05 ± 13.03
	14 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	54.00	100.00	97.90 ± 8.31
	18 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	4.00	100.00	92.45 ± 21.97
รวม		120 (240)	0.00	100.00	56.02 ± 40.23

การแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองที่พบในตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดจำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) แสดงในภาพที่ 4.3 พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองมีการกระจายตัวที่ต่ำกว่าค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 103 ตัวอย่างย่อย ใกล้เคียงกับจำนวนตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวน 137 ตัวอย่างย่อย และพบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงสุด (100 เปอร์เซ็นต์) ในตัวอย่างข้าวกล้องจำนวน 67 ตัวอย่างย่อย



ภาพที่ 4.3 การแจกแจงความถี่ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง จากตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ จำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย)

4.1.1.2 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง

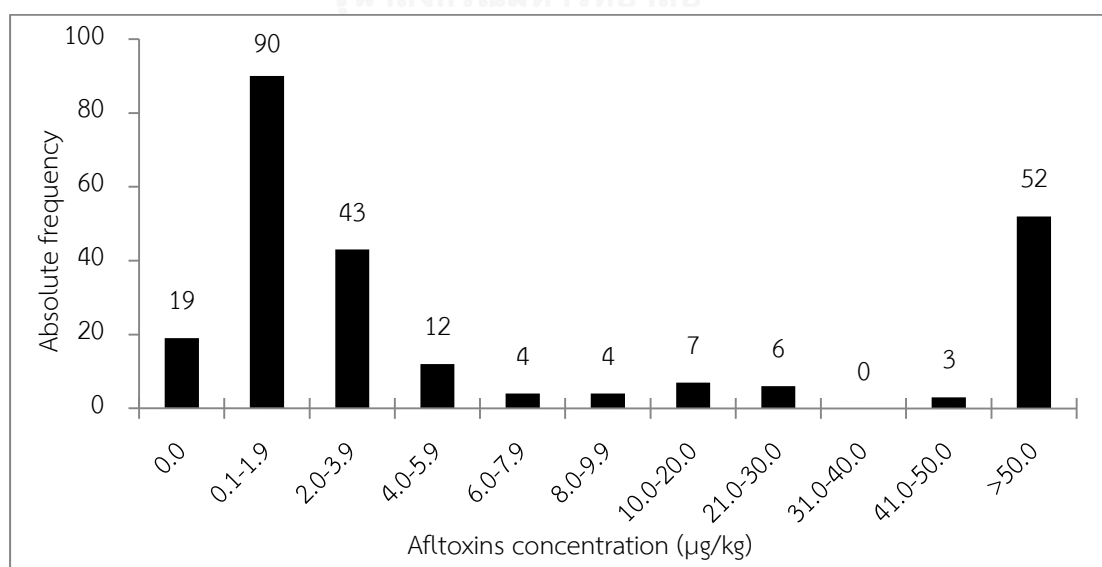
จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวม ในช่วง 0.00-18,300.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยเท่ากับ $459.27 \pm 1,869.20$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างข้าวกล้องที่ปนเปื้อนราตามธรรมชาติมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมต่ำ ตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับความชื้นมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยเท่ากับ 4.35 ± 4.93 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับตัวอย่างที่ปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยเท่ากับ 1.06 ± 1.04 และ 3.71 ± 4.93 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

สำหรับตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่ไม่ได้ปรับความชื้นมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยใกล้เคียงกับตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ เท่ากับ 1.47 ± 1.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ตัวอย่างที่ถูกปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยสูงขึ้นเป็น 30.22 ± 33.35 และ $2,714.80 \pm 3,892.08$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่พบในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตัวอย่าง	ความชื้น	จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่างย่อย)	จำนวน ตัวอย่างย่อย ที่ปนเปื้อน	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
				ช่วง	เฉลี่ย
ปนเปื้อนรา	ไม่ปรับความชื้น	20 (40)	37	0.00-25.80	4.35±4.93
ตามธรรมชาติ	14 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	35	0.00-4.20	1.06±1.04
	18 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	38	0.00-18.85	3.71±4.93
ถูกทำให้ปน	ไม่ปรับความชื้น	20 (40)	34	0.00-10.90	1.47±1.86
ปนเปื้อนด้วยรา	14 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	37	0.00-88.45	30.22±33.35
	18 เปอร์เซ็นต์	20 (40)	40	101.00-18,300.00	2,714.80±3,892.08
รวม	120	120 (240)	221	0.00-18,300.00	459.27±1,869.20

จากภาพที่ 4.4 แสดงการแจกแจงความถี่ของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่พบในตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ จำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย) พบว่า มีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอ โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมต่ำ (0.1-1.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมมีจำนวน 19 ตัวอย่างย่อย คิดเป็น 7.92 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด ตัวอย่างที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมต่ำกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีจำนวน 160 ตัวอย่างย่อย คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีจำนวน 61 ตัวอย่างย่อย คิดเป็น 25.42 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด



ภาพที่ 4.4 การแจกแจงความถี่ของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่พบในตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ จำนวน 120 ตัวอย่าง (240 ตัวอย่างย่อย)

4.1.1.3 ผลการทดสอบสมรรถนะการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะของผู้วิจัย (Laboratory performance)

ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) และ ค่าความสามารถในการวัดเหมือน (reproducibility) ของการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในข้าวกล้องปรับภาวะของผู้วิจัย (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) โดยมีค่าความสามารถในการวัดซ้ำ ซึ่งหมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำ เท่ากับ 0.91 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.41 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับค่าความสามารถในการวัดเหมือนของผู้วิจัย หรือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำตัวอย่างที่ไม่รู้ และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 1.27 และ 1.79 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) ของผู้วิจัย

ตัวอย่างที่	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ความแตกต่างระหว่างซ้ำ
1,2	0.90	0.60	0.30
51,52	46.80	44.60	2.20
83,84	0.00	0.00	0.00
109,110	0.00	0.00	0.00
205,206	2.05	2.40	-0.35
259,260	3.30	3.00	0.30
		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.91
		ค่าเฉลี่ย	0.41

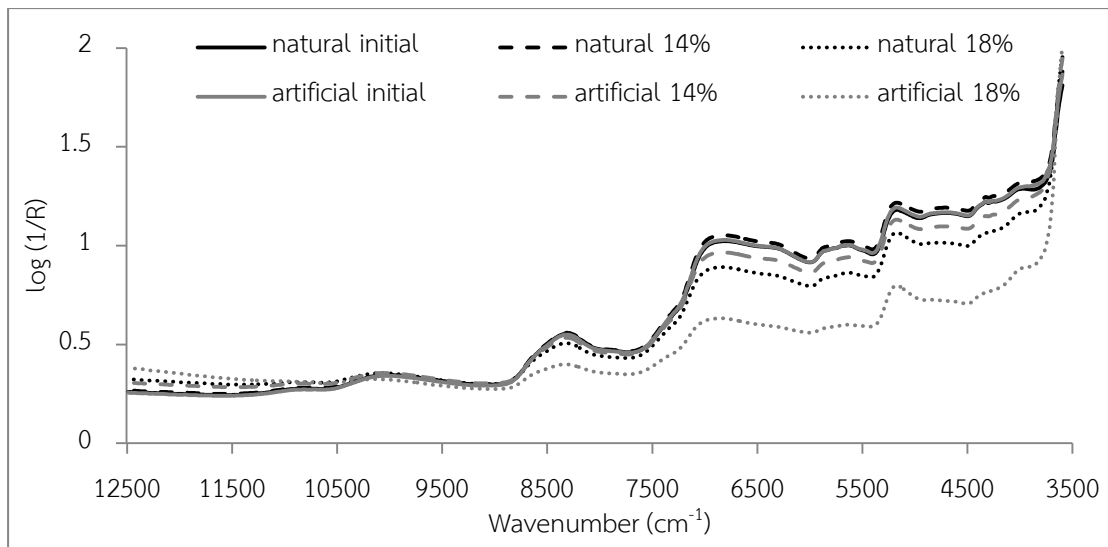
ตารางที่ 4.5 ค่าความสามารถในการวัดเหมือน (Reproducibility) ของผู้วิจัย

ตัวอย่างที่	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ความแตกต่างระหว่างซ้ำ
R1,58	0.00	1.55	-1.55
R2,103	0.00	0.00	0.00
R3,151	0.00	0.85	-0.85
R4,158	0.00	2.45	-2.45
R5,211	0.00	2.3	-2.3
R6,223	0.00	3.6	-3.6
		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.27
		ค่าเฉลี่ย	-1.79

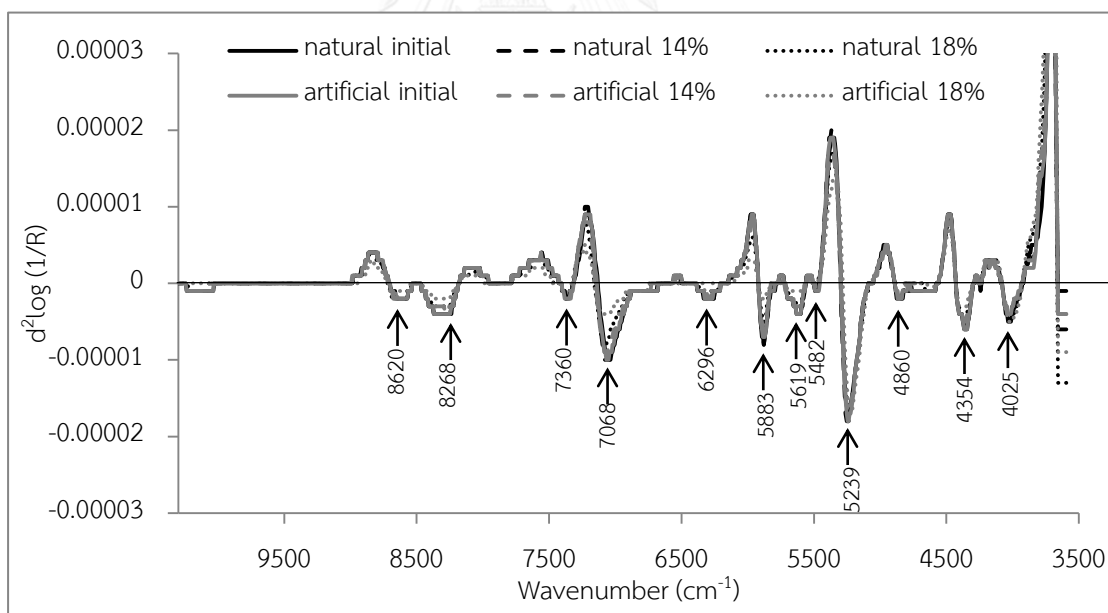
4.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ ในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR) (MPA, Bruker, Germany) ในระบบสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย (raw spectra) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร) ในแนวแกน X กับค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรด ($\log(1/R)$) ในแนวแกน Y ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ และที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่มีปริมาณความชื้นต่างกัน จากกราฟพบว่า ลักษณะเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างแต่ละชนิดมีรูปแบบที่คล้ายกัน แต่มีการลดลงของ $\log(1/R)$ เมื่อปริมาณการปนเปื้อนของราและค่าความชื้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้น

การปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ เช่น การทำอนุพันธ์อันดับที่สอง เป็นวิธีที่ทำให้เห็นพีกและลักษณะของสเปกตรัมได้ชัดเจนขึ้น โดยปรับเส้นสเปกตรัมให้เรียบมากขึ้น เพื่อแก้ปัญหาพีกของเส้นสเปกตรัมถูกบดบังด้วยพีกอื่นๆ ที่มาจากสิ่งรบกวน (noise) ซึ่งเป็นพีกที่ไม่เกี่ยวข้องกับบองค์ประกอบของตัวอย่าง ซึ่งการเกิดสิ่งรบกวนอาจเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหรือขณะสแกนตัวอย่าง (อนุพันธ์ เทอตวงค์วอร์กูล, 2552) ดังนั้น เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำขึ้นจึงต้องมีการกำจัดพีกที่ไม่ต้องการออกจากสเปกตรัมของตัวอย่าง ผลการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด (second derivative, 17 points) ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติและที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่มีปริมาณความชื้นต่างกันแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่า พีกที่ปรากฏบนเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการทำอนุพันธ์อันดับที่สองชัดเจนกว่าในสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย โดยมีพีกที่เด่นชัดทั้งหมด 12 พีก ที่อยู่ในตำแหน่งของจำนวนคลื่นประมาณ 8620, 8268, 7360, 7068, 6296, 5883, 5619, 5482, 5239, 4860, 4354 และ 4025 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแต่ละพีกสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พีกที่พบส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบมากในข้าว เช่น พีกที่จำนวนคลื่น 5619 และ 5482 ต่อเซนติเมตร เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H, O-H และ C-O ในเซลลูโลส พีกที่จำนวนคลื่น 5239 ต่อเซนติเมตร เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H ในโมเลกุลของน้ำ พีกที่จำนวนคลื่น 4860 ต่อเซนติเมตร เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H และ C-H ในโมเลกุลของซูโครสและแป้ง และพีกที่จำนวนคลื่น 4025 ต่อเซนติเมตร เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H และ C-C ในโมเลกุลของแป้ง (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 4.5 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ (natural) และที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificial) ที่ความชื้นต่างกัน (initial = ไม่ปรับความชื้น, ปรับความชื้น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4.6 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ (natural) และที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificial) ที่ความชื้นต่างกัน (initial = ไม่ปรับความชื้น, ปรับความชื้น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์)

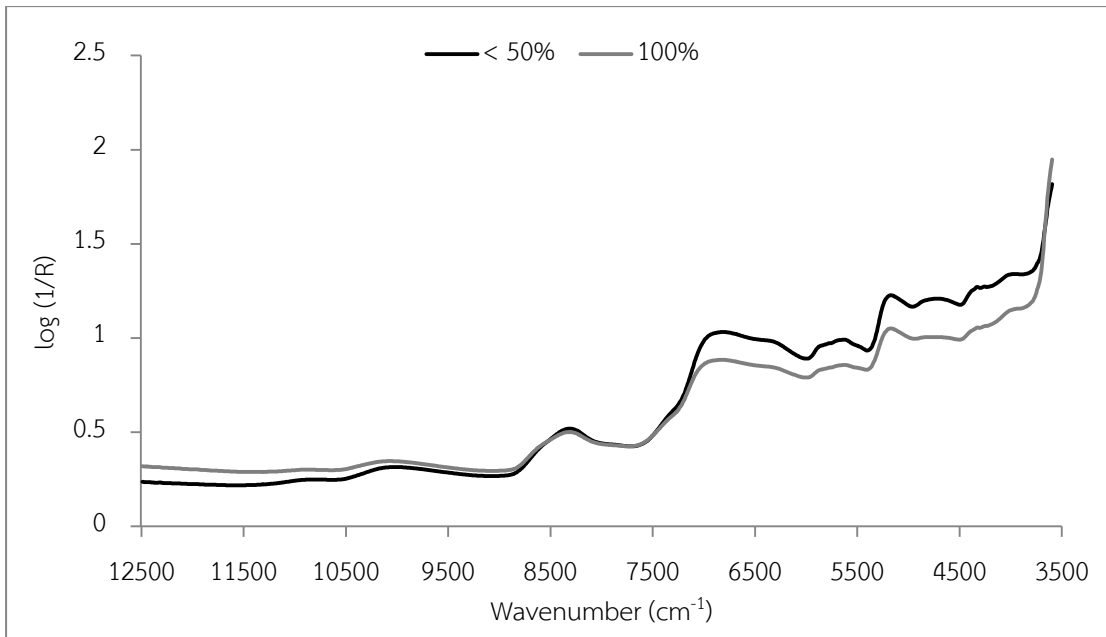
ตารางที่ 4.6 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ของตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะ (ภาพที่ 4.6)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น* (นาโนเมตร)	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
8620	1160	1170	C-H str. second overtone	HC=CH
8268	1209	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
7360	1359	1360	2 x C-H str. + C-H def.	CH ₃
7068	1415	1415	2 x C-H str. + C-H def.	CH ₂
6296	1588	1580	O-H str. first overtone	แป้ง กลูโคส
5883	1700	1705	C-H str. first overtone	CH ₃
5619	1780	1780	C-H str. first overtone	เซลลูโลส
5482	1824	1820	O-H str. + 2 x C-O str.	เซลลูโลส
5239	1909	1940	O-H str. + O-H def.	น้ำ
4860	2058	2080	O-H str. C-H def.	ROH ซูโครส แป้ง
4354	2297	2294	N-H str. + C=O str.	กรดอะมิโน
4025	2485	2488	C-H str. + C-C str.	แป้ง

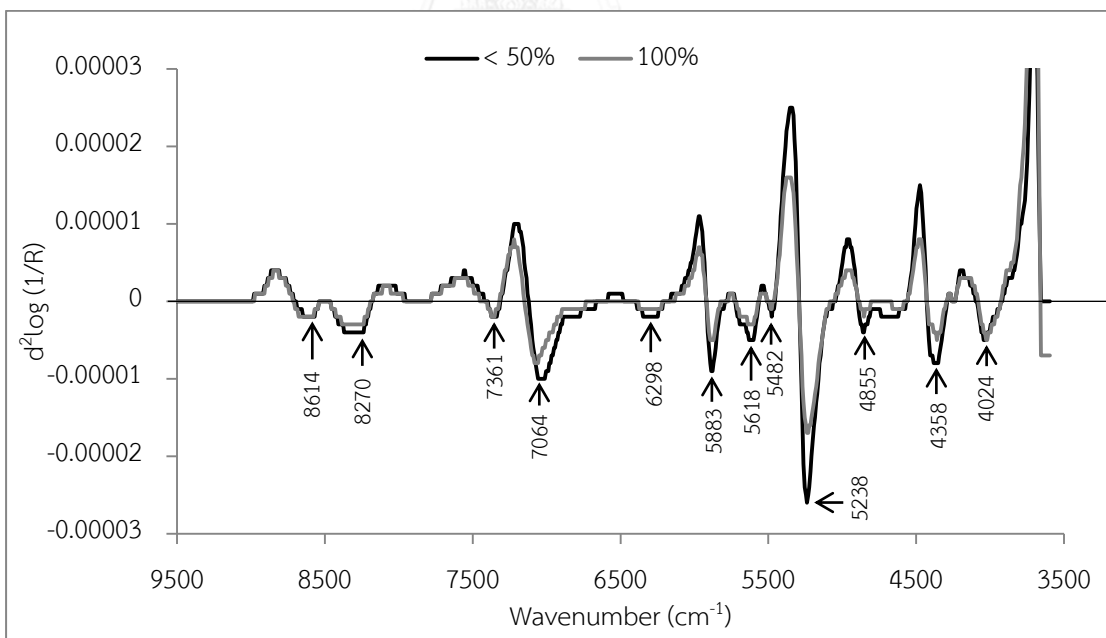
* Osborne และคณะ (1993) def. = deformation str. = stretching

ภาพที่ 4.7, 4.9 และ 4.11 แสดงสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย (raw spectra) ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง และมีปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมต่างกัน ตามลำดับ และผลการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการทำอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด (second derivative, 17 points) แสดงในภาพที่ 4.8, 4.10 และ 4.12 ตามลำดับ พบว่า ลักษณะของเส้นสเปกตรัมของดั้งเดิมเฉลี่ยมีรูปแบบที่เหมือนกัน เช่นเดียวกับในภาพที่ 4.5 และค่า $\log(1/R)$ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงชัดเจนเมื่อค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราและปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเพิ่มขึ้น

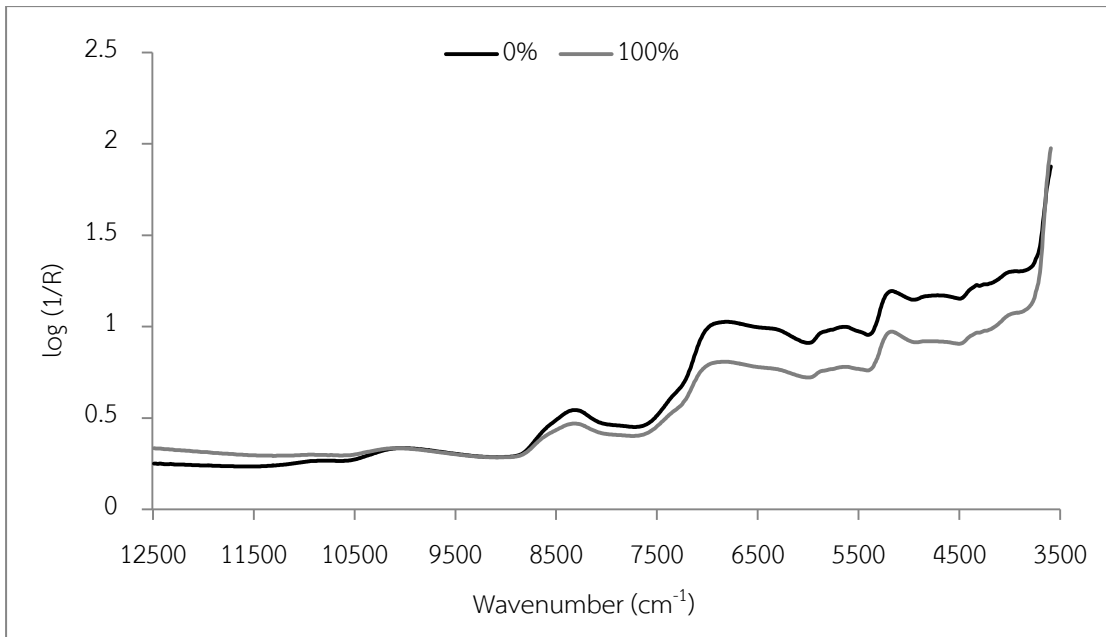
สำหรับผลการปรับแต่งสเปกตรัมพบพีคที่เด่นชัดจำนวน 12 พีค ที่ตำแหน่งของจำนวนคลื่น 8614, 8270, 7361, 7064, 6298, 5883, 5618, 5482, 5238, 4855, 4358 และ 4024 ต่อเซนติเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ใกล้เคียงกับที่ปรากฏในภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.6 เช่น การสั่นของพันธะที่อยู่ในโครงสร้างของ CH₂, CH₃, ROH ซูโครส กลูโคส แป้ง เซลลูโลส น้ำ และกรดอะมิโน ซึ่งพบได้ในข้าวกล้อง



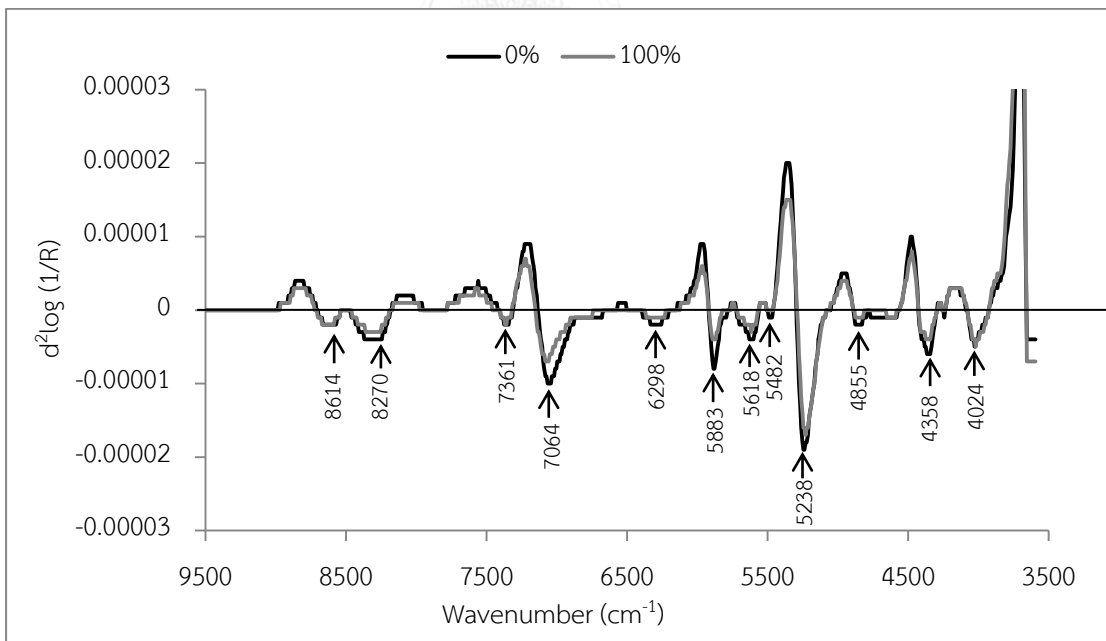
ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



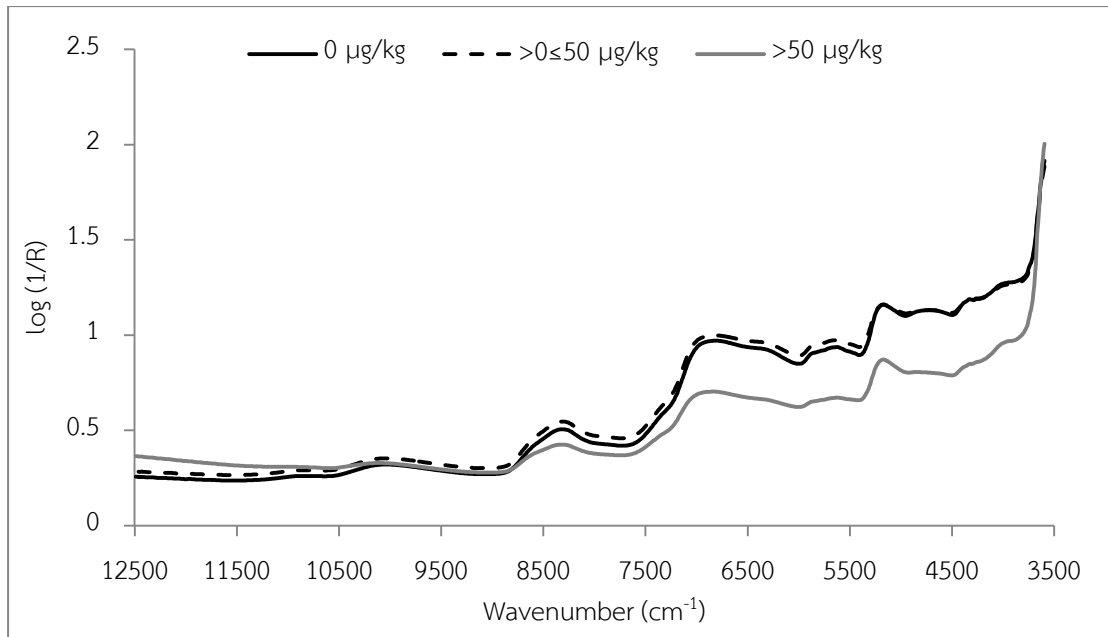
ภาพที่ 4.8 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



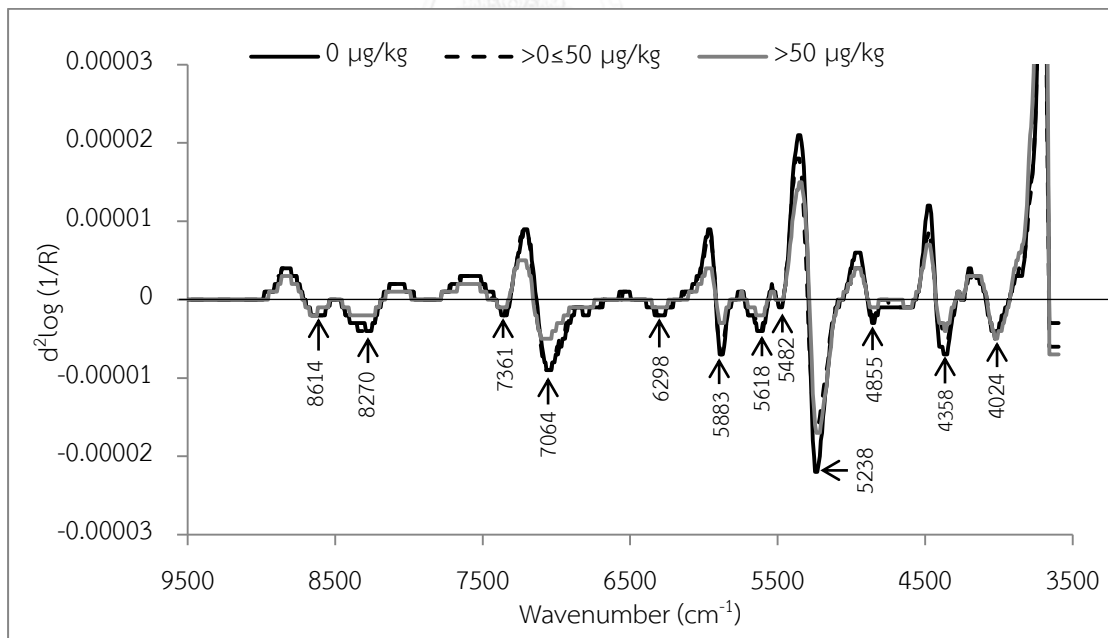
ภาพที่ 4.9 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมเท่ากับ 0, 0.1-50 และมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



ภาพที่ 4.12 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9500-3500 ต่อเซนติเมตร ของเส้นสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมเท่ากับ 0, 0.1-50 และมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

4.1.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

นำข้อมูลสเปกตรัมซึ่งได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) (MPA, Bruker, Germany) ในช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร ที่ไม่มีการจัดการเบื้องต้น (raw spectra) และที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectra) ตามวิธีการทดลองในข้อที่ 3.2.5.2 และข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมาสร้างแบบจำลอง 3 แบบจำลอง ดังนี้

- 1) แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด
- 2) แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง
- 3) แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม

โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) จากโปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker optic GmbH, Germany) โดยทดลองสร้างแบบจำลองจากชุดตัวอย่างที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ชุดตัวอย่างที่นำมาทดลองสร้างแบบจำลอง

ชุดตัวอย่างที่	ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่างย่อย)
1	ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ไม่ปรับความชื้น	20 (40)
2	ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ถูกปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์	40 (80)
3	ปนเปื้อนราตามธรรมชาติที่ไม่ปรับความชื้นและปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (ตัวอย่างชุดที่ 1+ ตัวอย่างชุดที่ 2)	60 (120)
4	ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์	40 (80)
5	ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่ไม่ปรับความชื้นและปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (ตัวอย่างชุดที่ 4 + ตัวอย่างชุดที่ 5)	60 (120)
6	ตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด	120 (240)

ชุดตัวอย่างที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยกว่า 100 ตัวอย่างย่อย (ชุดตัวอย่างที่ 1-5) สร้างแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบไขว้ (cross validation) โดยใช้ตัวอย่างที่นำมาทดสอบกลุ่มเดียวกับที่นำมาสร้างแบบจำลอง การทวนสอบแบบไขว้ทำได้โดยตัดตัวอย่างออกจากกลุ่มสร้างแบบจำลอง 1 ตัวอย่าง แล้วใช้ตัวอย่างที่เหลือสร้างแบบจำลองมาทำนายตัวอย่างดังกล่าว จากนั้นใส่ตัวอย่างที่ถูกตัดออกกลับคืนแล้วทำขั้นตอนข้างต้นซ้ำจนกว่าจะครบทุกตัวอย่าง ดังนั้น ตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองจะถูกตัดออก 1 ครั้ง เท่ากัน ข้อมูลทางสถิติของผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของแบบจำลองที่สร้างโดยชุดตัวอย่างที่ 1-5 ซึ่งประกอบด้วย แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (ตารางที่ 4.8) สำหรับชุดตัวอย่างที่ 6 ซึ่งมีตัวอย่างมากกว่า 100 ตัวอย่างย่อย สร้างแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation) สร้างแบบจำลองจากชุดข้อมูลดังกล่าวโดยแบ่งกลุ่มข้อมูลออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (test set) สำหรับข้อมูลทางสถิติของผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวม แสดงดังตารางที่ 4.9 ซึ่งประกอบด้วยค่าทางสถิติของข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลอง และกลุ่มทำนายของข้อมูลแต่ละแบบจำลอง

จากการตรวจสอบค่าผิดพลาดของข้อมูลทางห้องปฏิบัติการพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดมีข้อมูลผิดพลาดจำนวน 8 ตัวอย่างย่อย เป็นตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราต่ำจึงไม่ตัดค่าผิดพลาดออก เนื่องจาก ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดสูง และต้องการข้อมูลในการสร้างแบบจำลองที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งต่ำและสูง สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองไม่พบข้อมูลผิดพลาดจึงนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างแบบจำลอง สำหรับปริมาณอะฟลาทอกซินรวมพบค่าผิดพลาดจำนวน 4 ตัวอย่างย่อย จึงตัดข้อมูลผิดพลาดออกก่อนนำไปสร้างแบบจำลอง

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบไขว้ (cross validation)

แบบจำลองเพื่อทำนาย	ชุดตัวอย่าง	จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD
ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)	1	120	2.00	100.00	75.30	29.37
	2	240	20.00	100.00	94.40	15.35
	3	360	2.00	100.00	88.03	22.89
	4	240	92.00	100.00	99.85	0.99
	5	360	80.00	100.00	98.35	4.13
ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล <i>Aspergillus</i> โคลนีสีเขียวอมเหลือง (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)	1	120	0.00	100.00	15.55	22.92
	2	240	0.00	96.00	27.08	29.00
	3	360	0.00	100.00	23.23	27.63
	4	240	4.00	100.00	95.18	16.66
	5	360	4.00	100.00	88.80	17.93
ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	1	120	0.00	25.80	4.35	4.89
	2	240	0.00	18.85	2.39	3.77
	3	360	0.00	25.80	3.04	4.27
	4	228	0.00	4,960.00	785.54	1,266.68
	5	348	0.00	4,960.00	515.17	1,090.37

ตารางที่ 4.9 ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบชุดทดสอบ (test set validation)

แบบจำลอง	กลุ่มสร้างแบบจำลอง					กลุ่มทำนาย				
	จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD	จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD
a	413	2.00	100.00	95.14	10.12	232	4.00	100.00	97.47	11.40
b	450	0.00	100.00	54.00	40.78	253	0.00	100.00	59.95	39.91
c	347	0.00	4,960.00	198.02	689.07	339	0.00	4,605.00	202.11	706.04

a = แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)

b = แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)

c = แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

การเลือกแบบจำลองสำหรับทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ แบบจำลองที่ดีควรพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) และค่า RPD ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างค่า SD ต่อ SEP (ratio of standard deviation to standard error of prediction) ที่สูง ร่วมกับการมีจำนวนปัจจัย (rank หรือ PLS factor) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation, $RMSECV$) สำหรับแบบจำลองที่มีการทวนสอบแบบไขว้ หรือ ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการทำนาย (root mean square error of prediction, $RMSEP$) สำหรับแบบจำลองที่มีการทวนสอบแบบชุดทดสอบ และค่าความผิดพลาดในการทำนาย (bias) ที่ต่ำ

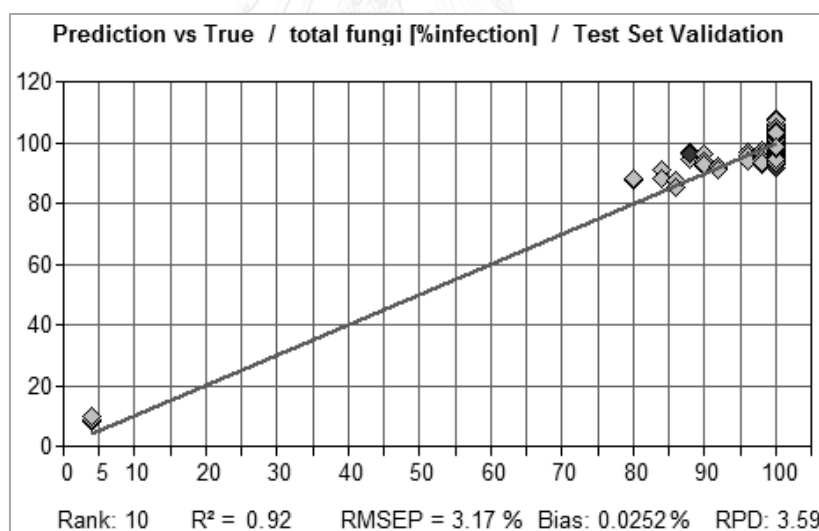
4.1.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด

ตารางที่ 4.10 แสดงแบบจำลองที่ดีที่สุดที่สร้างจากตัวอย่างทั้ง 6 ชุด เพื่อทำนายการติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง จากตารางพบว่า แบบจำลองที่สร้างจากชุดตัวอย่างที่ 6 ให้ผลการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่า R^2 และค่า RPD ที่สูงที่สุด ประกอบกับแบบจำลองมีค่า $RMSEP$ ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองที่มีค่า R^2 ใกล้เคียงกัน (แบบจำลองจากชุดตัวอย่างที่ 2) แบบจำลองดังกล่าวสร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) มีสเปกตรัมที่ถูกพิจารณาว่าเป็นค่าผิดปกติโดยโปรแกรมจำนวน 75 เส้น (จากทั้งหมด 720 เส้น คิดเป็น 10.42 เปอร์เซ็นต์) ถูกตัดออกจากแบบจำลอง มีจำนวนปัจจัย เท่ากับ 10 ค่า R^2 , $RMSEP$, RPD และ bias เท่ากับ 0.92, 3.17 เปอร์เซ็นต์, 3.59 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภาพที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ดีที่สุด

ตารางที่ 4.10 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง

Sample set No.	Wavenumber range (cm ⁻¹)	Preprocessing method	Rank	R^2	RMSECV*	RPD	Bias*
Cross validation							
1	9403.8-5446.3	First derivative 17 point	6	0.71	15.70	1.87	0.53
2	9403.8-4242.9	First derivative 17 point	10	0.84	6.11	2.51	-0.19
3	9403.8-5446.3	First derivative 17 point	8	0.60	14.40	1.59	-0.01
4	9403.8-5446.3 4605.4-4242.9	First derivative 17 point +Straight line subtraction	8	0.56	0.66	1.50	-0.00
5	9403.8-7498.3 6102.0-4242.9	Constant offset elimination	10	0.42	3.13	1.32	-0.07
Test set validation					RMSEP*		
6.	9064.3-6094.3 5454.0-4242.9	Straight line subtraction	10	0.92	3.17	3.59	0.03

* หน่วย: เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากวิธี direct plating (แกนนอน) กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการลบโดยเส้นตรงของชุดตัวอย่างที่ 6 (ตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะทั้งหมด) (แกนตั้ง)

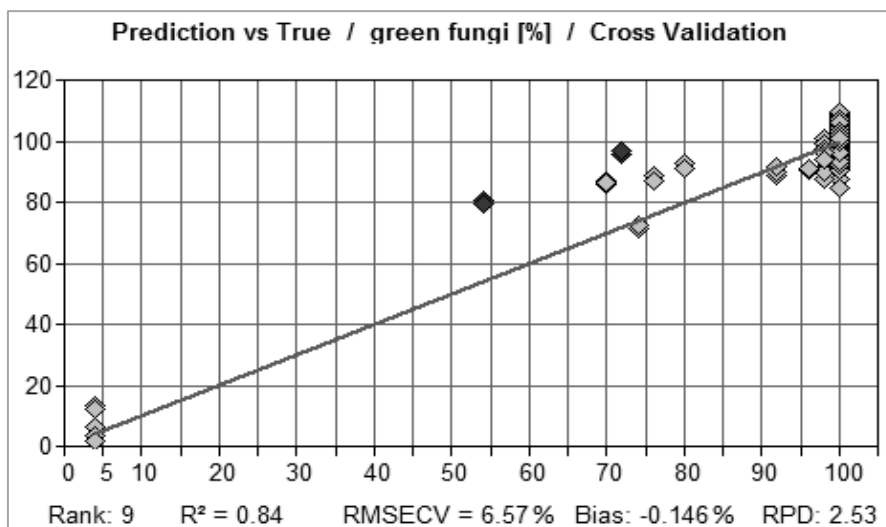
4.1.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลือง

แบบจำลองที่ดีที่สุดที่สร้างจากชุดตัวอย่างทั้ง 6 ชุด เพื่อทำนายการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.11 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากการนำชุดตัวอย่างที่ 4 มาสร้างแบบจำลองและทดสอบแบบจำลองด้วยวิธีการทวนสอบแบบไขว้ โดยใช้สเปกตรัมผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction; MSC) และไม่มีการตัดข้อมูลผิดปกติออก แบบจำลองที่ได้มีจำนวนปัจจัย เท่ากับ 9 ค่า R^2 , $RMSECV$, RPD และ bias เท่ากับ 0.84, 6.57 เปอร์เซ็นต์, 2.53 และ -0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กราฟความสัมพันธ์ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลืองที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ดีที่สุด แสดงในภาพที่ 4.14

ตารางที่ 4.11 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง

Sample set No.	Wavenumber range (cm ⁻¹)	Preprocessing method	Rank	R^2	$RMSECV^*$	RPD	Bias*
Cross validation							
1	9403.8-7498.3 5454.0-4242.9	First derivative 17 point + Vector normalization (SNV)	10	0.82	9.75	2.34	-0.09
2	9403.8-4597.7	First derivative 17 point + Vector normalization (SNV)	9	0.76	14.10	2.05	-0.37
3	9403.8-7498.3 6102.0-5446.3	Min-max normalization	9	0.69	15.40	1.79	-0.01
4	9403.8-7498.3 6102.0-4242.9	Multiplicative scattering correlation (MSC)	9	0.84	6.57	2.53	-0.15
5	9403.8-7498.3 6102.0-4242.9	Multiplicative scattering correlation (MSC)	10	0.71	9.67	1.85	0.08
Test set validation					$RMSEP^*$		
6	9033.5-7498.3 6102.0-5446.3 4605.4-4242.6	Constant offset elimination	10	0.54	27.10	1.47	-0.00

* หน่วย: เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลืองของตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากวิธี direct plating (แกนนอน) กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณของชุดตัวอย่างที่ 4 (ตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์) (แกนตั้ง)

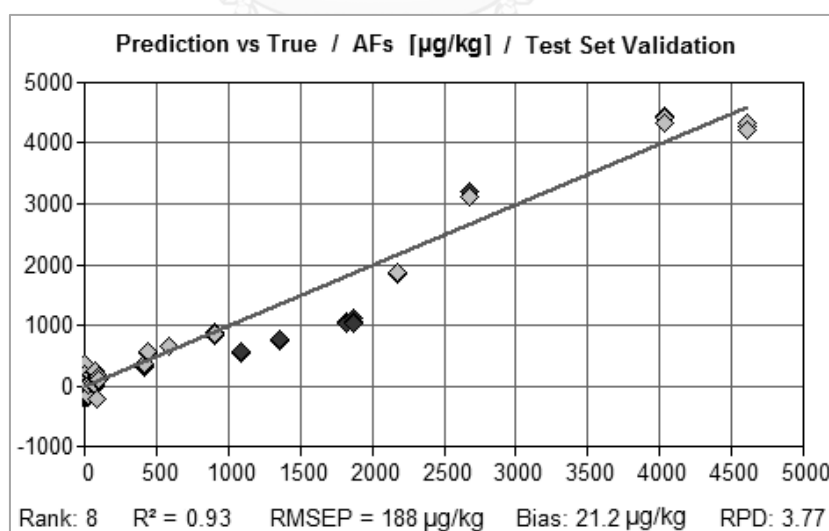
4.1.3.3 แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

ตารางที่ 4.12 แสดงแบบจำลองที่ดีที่สุดที่สร้างจากชุดตัวอย่างทั้ง 6 ชุด จากตารางพบว่า แบบจำลองที่สร้างจากชุดตัวอย่างที่ 6 ให้ผลการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมได้ดีที่สุด แบบจำลองที่สร้างจากชุดตัวอย่างที่ 4, 5 และ 6 ให้ผลการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่มีค่า R^2 สูง (0.90-0.93) แบบจำลองดังกล่าวสร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (vector normalization; SNV) มีสเปกตรัมที่ถูกพิจารณาว่าเป็นค่าผิดปกติโดยโปรแกรมจำนวน 22 เส้น (จากทั้งหมด 708 เส้น คิดเป็น 3.11 เปอร์เซ็นต์) ถูกตัดออกจากแบบจำลอง มีจำนวนปัจจัย เท่ากับ 8 ค่า R^2 , RMSEP, RPD และ bias เท่ากับ 0.93, 188.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, 3.77 และ 21.20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ภาพที่ 4.15 แสดงความสัมพันธ์ของค่าปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ดีที่สุด

ตารางที่ 4.12 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวกล้อง

Sample set No.	Wavenumber range (cm ⁻¹)	Preprocessing method	Rank	R^2	RMSECV*	RPD	Bias*
cross validation							
1	9403.8-7498.3 6102.0-4242.9	Constant offset elimination	10	0.45	3.61	1.35	0.16
2	7506.0-4242.9	Vector normalization (SNV)	9	0.40	2.92	1.29	0.03
3	9403.8-4242.9	First derivative 17 point + Vector normalization	8	0.20	3.81	1.12	0.05
4	9403.8-6094.3 5454.0 -4242.9	Vector normalization (SNV)	10	0.92	368.00	3.44	-9.41
5	9403.8-6094.3 5454.0-4597.7	Vector normalization (SNV)	10	0.90	347.00	3.14	2.95
Test set validation					RMSEP*		
6	9403.8-6094.3 4605.4-4242.9	Vector normalization (SNV)	8	0.93	188.00	3.77	21.20

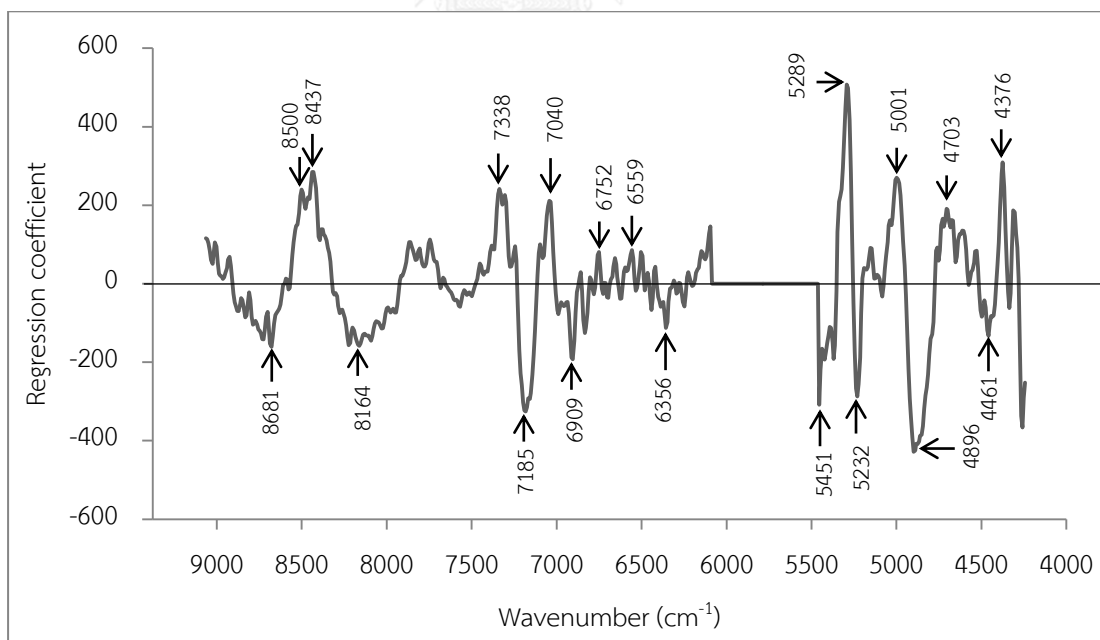
* หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA (แกนนอน) กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานของชุดตัวอย่างที่ 6 (ตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะทั้งหมด) (แกนตั้ง)

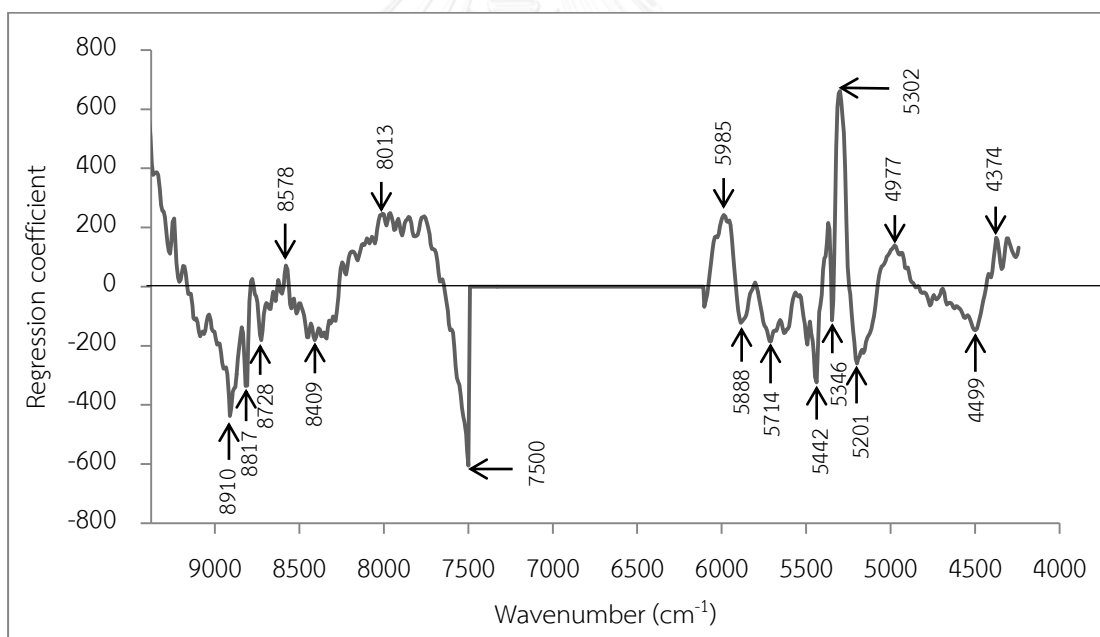
4.1.3.4 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแบบจำลอง (Regression coefficient plot)

ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ถูกใช้เป็นพื้นฐานแรกในการตรวจผลกระทบของความยาวคลื่นค่าต่างๆ (X-variable) ในการทำนายตัวแปรตาม (Y-variable) และค่าสัมบูรณ์ของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีค่าสูงซึ่งได้ถึงความสำคัญของอิทธิพลของความยาวคลื่นนั้นต่อแบบจำลองอย่างมีนัยสำคัญ (เจษฎา โพธิ์สม, 2556) ภาพที่ 4.16 แสดงกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด พบพีกที่มีความสำคัญแบบจำลองที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 8437, 7185, 5451, 5232, 5289, 4896 และ 4376 ต่อเซนติเมตร (1185, 1392, 1834, 1911, 1891, 2043 และ 2285 นาโนเมตร) รายละเอียดของแต่ละพีกแสดงดังตารางที่ 4.13 เช่น พีกที่จำนวนคลื่น 5451 ต่อเซนติเมตร (1834 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของเซลลูโลส (O-H stretch + 2 × C-O stretch) พีกที่จำนวนคลื่น 5232 ต่อเซนติเมตร (1911 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของน้ำ (O-H stretch + O-H deformation) พีกที่จำนวนคลื่น 5289 ต่อเซนติเมตร (1891 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้ง (O-H stretch + 2 × C-O stretch) (Osborne และคณะ, 1993)



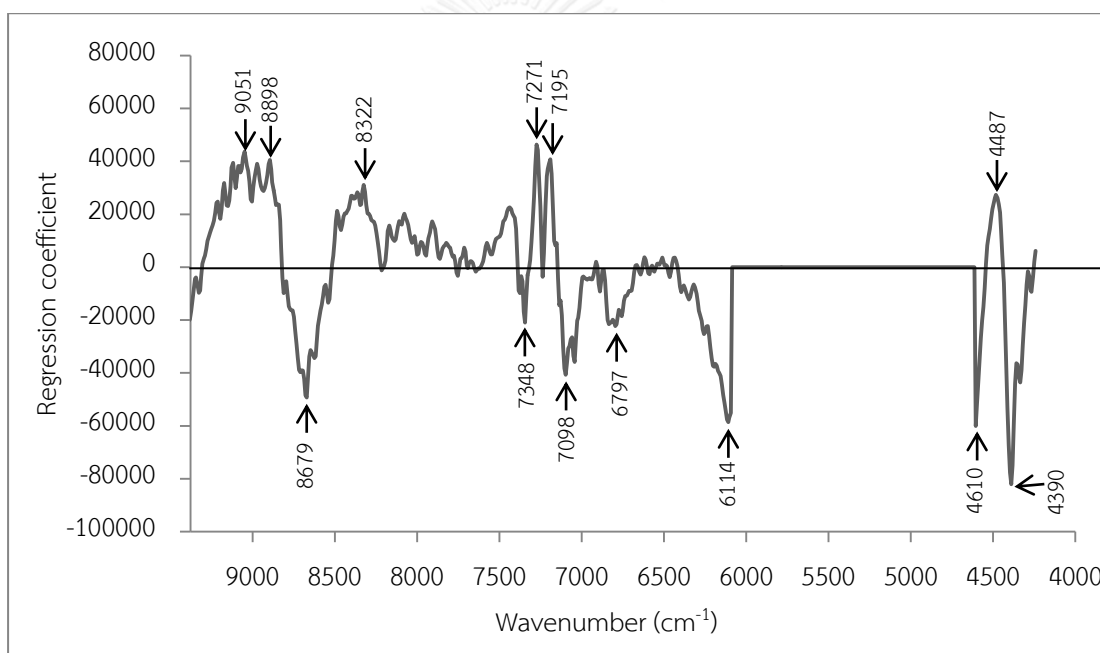
ภาพที่ 4.16 กราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง

ภาพที่ 4.17 เป็นกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอยของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง พบพิคที่มีความสำคัญต่อแบบจำลองที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 8910, 8409, 7500, 5985, 5442, 5346, 5302, 5201 และ 4977 ต่อเซนติเมตร (1122, 1189, 1333, 1671, 1838, 1871, 1886, 1923 และ 2009 นาโนเมตร) แต่ละพิคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังตารางที่ 4.13 เช่น พิคที่จำนวนคลื่น 5442 ต่อเซนติเมตร (1838 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของเซลลูโลส (O-H stretch + 2 × C-O stretch) พิคที่จำนวนคลื่น 5346 และ 4977 ต่อเซนติเมตร (1871 และ 2009 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้ง (O-H stretch + 2 × C-O stretch และ 2 × O-H deformation + C-O deformation) พิคที่จำนวนคลื่น 5302 ต่อเซนติเมตร (1886 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะที่อยู่ในโครงสร้างของหมู่ CONH ในกรดอะมิโน (C-O stretch second overtone) และพิคที่จำนวนคลื่น 5201 ต่อเซนติเมตร (1923 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของน้ำ (O-H stretch + O-H deformation) (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 4.17 กราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง

สำหรับกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอยของแบบจำลองที่ใช้เพื่อทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องแสดงดังภาพที่ 4.18 จากภาพพบพีคที่มีความสำคัญต่อแบบจำลองที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 8679, 7348, 7195, 7098, 4390 และ 4487 ต่อเซนติเมตร (1152, 1361, 1390, 1409, 2278, และ 2229 นาโนเมตร) แต่ละพีคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ (ตารางที่ 4.13) เช่น พีคที่จำนวนคลื่น 7195 ต่อเซนติเมตร (1390 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแอลกอฮอล์ (ROH) พีคที่จำนวนคลื่น 4390 ต่อเซนติเมตร (2278 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้ง พีคที่จำนวนคลื่น 6797 ต่อเซนติเมตร (1471 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของน้ำ และพีคที่จำนวนคลื่น 4487 ต่อเซนติเมตร (2229 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของกรดอะมิโน (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 4.18 กราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตารางที่ 4.13 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่พบในกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโคโลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.16, 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น* (นาโนเมตร)	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
8910 ^b , 9051 ^c	1122 ^b , 1105 ^c	1080	2 x C-H str.+ 2 x C-C str.	เบนซีน
8817 ^b	1134 ^b	1097	2 x C-H str.+ 2 x C-C str.	cyclopropane
8728 ^b , 8898 ^c	1146 ^b , 1124 ^c	1143	C-H str. second overtone	อะโรมาติก
8681 ^a , 8578 ^b , 8679 ^c	1152 ^a , 1166 ^b , 1152 ^c	1152	C-H str. second overtone	CH ₃
8500 ^a	1177 ^a	1170	C-H str. second overtone	HC=CH
8437 ^a , 8409 ^b , 8322 ^c	1185 ^a , 1189 ^b , 1202 ^c	1195	C-H str. second overtone	CH ₃
8164 ^a , 8013 ^b , 7538 ^a	1225 ^a , 1248 ^b , 1327 ^a	1225	C-H str. second overtone	CH
7338 ^a , 7500 ^b , 7348 ^c	1363 ^a , 1333 ^b , 1361 ^c	1360	2 x C-H str.+ C-H def.	CH ₃
7185 ^a , 7271 ^c	1392 ^a , 1375 ^c	1395	2 x C-H str.+C-H def.	CH ₂
7195 ^c	1390 ^c	1410	O-H str. first overtone	ROH
7098 ^c	1409 ^c	1415	2 x C-H str.+ C-H def.	CH ₂
7040 ^a	1420 ^a	1420	O-H str. first overtone	ArOH
6909 ^a	1447 ^a	1440	O-H str. first overtone	ซูโครส แป้ง
6797 ^c	1471 ^c	1450	O-H str. first overtone	แป้ง น้ำ
6752 ^a	1481 ^a	1480	O-H str. first overtone (intramol, H-bond)	กลูโคส
6559 ^a	1525 ^a	1528	O-H str. first overtone (intramol, H-bond)	แป้ง

^a ภาพที่ 4.16

^b ภาพที่ 4.17

^c ภาพที่ 4.18

def. = deformation

str. = stretching

sym. = symmetrical

* Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 4.13 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่พบในกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.16, 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ) (ต่อ)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น* (นาโนเมตร)	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
6356 ^a	1573 ^a	1580	O-H str. first overtone (intermol, H-bond)	แป้ง กลูโคส
6114 ^c	1636 ^c	1620	C-H str. first overtone	CH ₂
5985 ^b	1671 ^b	1685	C-H str. first overtone	อะโรมาติก
5888 ^b	1698 ^b	1695	C-H str. first overtone	CH ₃
5714 ^b	1750 ^b	1765	C-H str. first overtone	CH ₂
5451 ^a , 5442 ^b	1834 ^a , 1838 ^b	1820	O-H str. + 2 x C-O str.	เซลลูโลส
5289 ^a , 5346 ^b	1891 ^a , 1871 ^b	1900	O-H str. + 2 x C-O str.	แป้ง
5302 ^{bc}	1886 ^b	1920	C-O str. second overtone	CONH
5232 ^a , 5201 ^b	1911 ^a , 1923 ^b	1940	O-H str.+ O-H def.	น้ำ
5001 ^a , 4977 ^b	2000 ^a , 2009 ^b	2000	2 x O-H def. + C-O def.	แป้ง
4896 ^a , 4859 ^c	2043 ^a , 2058 ^c	2050	N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
4703 ^a	2126 ^a	2132	N-H str. + C=O str.	กรดอะมิโน
4610 ^c	2169 ^c	2160	2 x amide I + amide III	CONHR
4461 ^a , 4499 ^b ,	2242 ^a , 2223 ^b ,	2242	N-H str. + NH ₃ ⁺ def.	กรดอะมิโน
4487 ^c	2229 ^c			
4390 ^c	2278 ^c	2276	O-H str. + C-C str.	แป้ง
4376 ^a , 4374 ^b	2285 ^a , 2286 ^b	2280	C-H str.+ C-H def.	CH ₃

^a ภาพที่ 4.16

^b ภาพที่ 4.17

^c ภาพที่ 4.18

def. = deformation

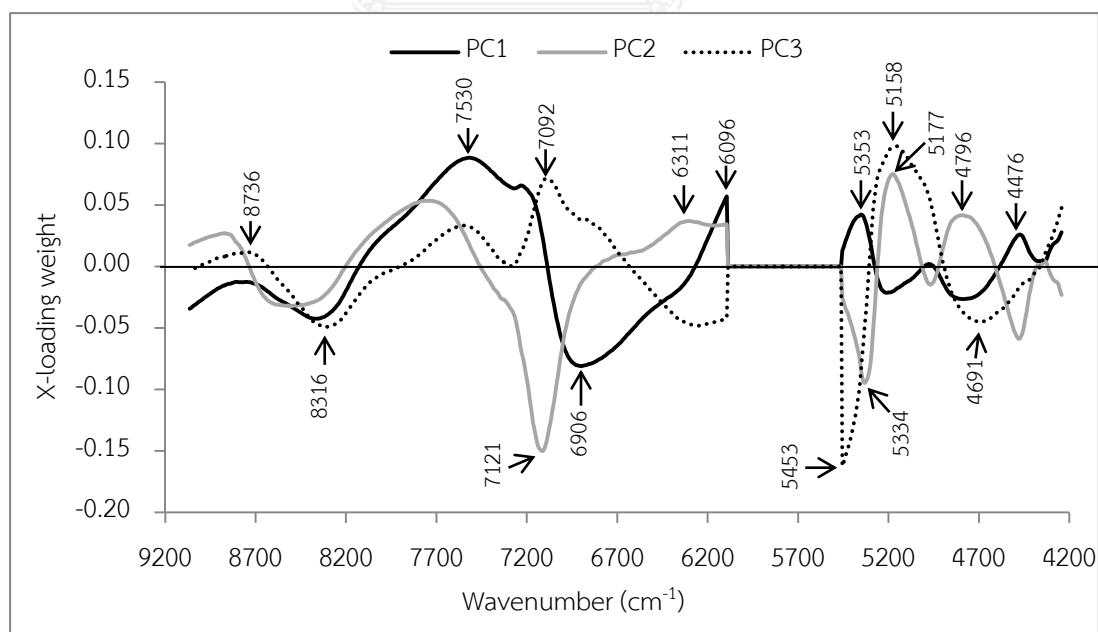
str. = stretching

sym. = symmetrical

* (Osborne และคณะ (1993))

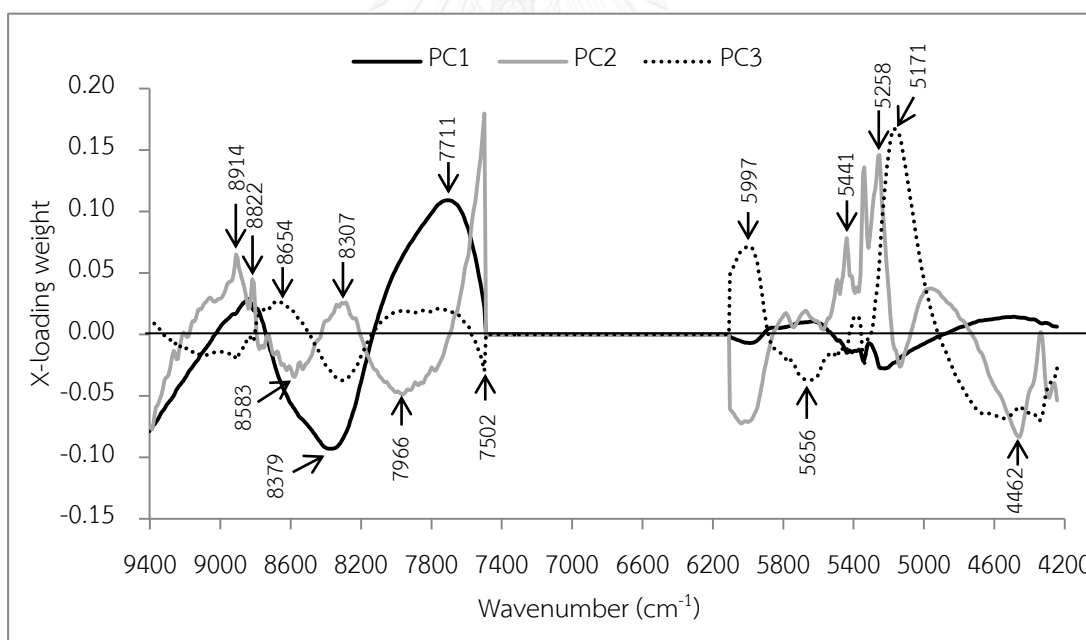
สำหรับค่า X-loading weight คือ ค่าที่ชี้ถึงอิทธิพลของความยาวคลื่นต่อค่าปัจจัย (factor) หรือองค์ประกอบ (principal components, PC) ต่างๆ ที่ใช้ในการสร้างแบบจำลอง ซึ่งแต่ละปัจจัย (factor) มีผลกระทบต่อค่าตัวแปรตาม ดังนั้น หากความยาวคลื่นใดมีค่า X-loading weight สูงแสดงถึงความสำคัญของความยาวคลื่นนั้นต่อการทำนายตัวแปรตาม หรือค่าที่ต้องการทำนาย

ภาพที่ 4.19 เป็นกราฟแสดง X-loading weight plot ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง ซึ่งมีจำนวน 3 ปัจจัย สำหรับปัจจัยที่ 1 (PC 1) พบพีกที่มีความสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 7530, 6906 และ 5353 ต่อเซนติเมตร (1328, 1148 และ 1868 นาโนเมตร) ปัจจัยที่ 2 (PC 2) พบพีกสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 7121, 5334 และ 5177 ต่อเซนติเมตร (1404, 1875 และ 1932 นาโนเมตร) ปัจจัยที่ 3 (PC 3) พบพีกที่มีความสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 7092, 5453 และ 5158 ต่อเซนติเมตร (1410, 1834 และ 1868 นาโนเมตร) แต่ละพีกมีความสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างต่างๆ เช่น พีกที่จำนวนคลื่น 5353 และ 5334 ต่อเซนติเมตร (1868 และ 1875 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้ง (O-H stretch + 2 x C-O stretch) พีกที่จำนวนคลื่น 5177 และ 5158 ต่อเซนติเมตร (1932 และ 1939 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของน้ำ (O-H stretch + O-H deformation) (ตารางที่ 4.14)



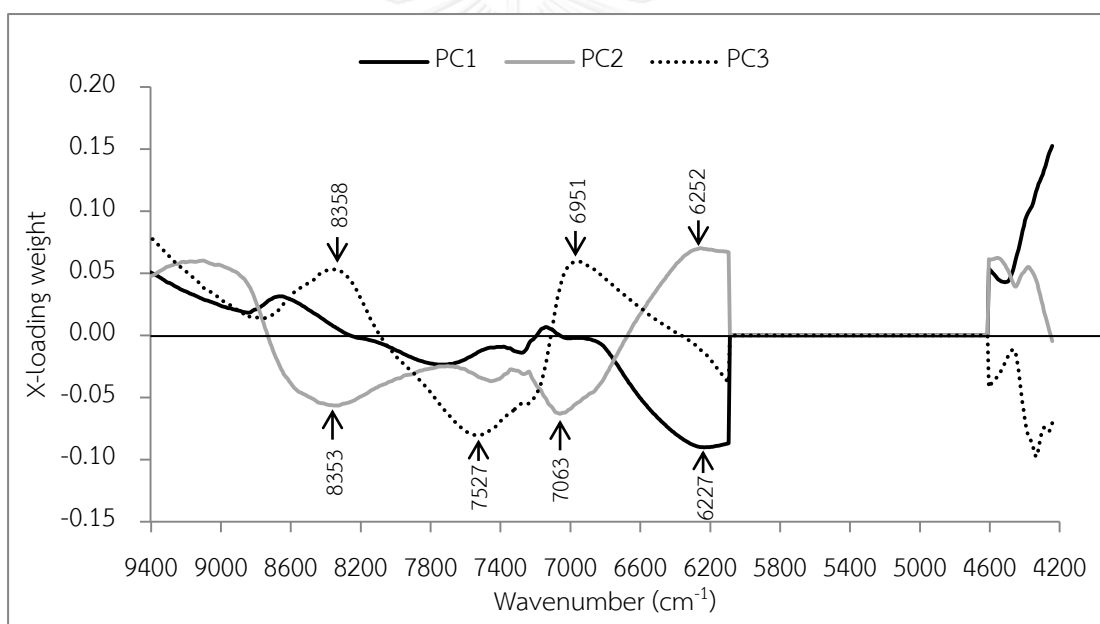
ภาพที่ 4.19 ค่า X-loading weight ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวกล้อง

ภาพที่ 4.20 เป็นกราฟแสดง X-loading weight plot ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง จำนวน 3 ปัจจัย สำหรับปัจจัยที่ 1 (PC 1) พบพีคที่มีความสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 8379 และ 7711 ต่อเซนติเมตร (1193 และ 1297 นาโนเมตร) ปัจจัยที่ 2 (PC 2) พบพีคสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 5441, 5258 และ 4462 ต่อเซนติเมตร (1838, 1902 และ 2241 นาโนเมตร) ปัจจัยที่ 3 (PC 3) พบพีคที่มีความสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 5997, 5656 และ 5171 ต่อเซนติเมตร (1667, 1768 และ 1934 นาโนเมตร) แต่ละพีคมีความสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างต่างๆ เช่น พีคที่จำนวนคลื่น 5441 และ 5656 ต่อเซนติเมตร (1838 และ 1768 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของเซลลูโลส (O-H stretch + 2 x C-O stretch และ C-H str. first overtone) พีคที่จำนวนคลื่น 5258 ต่อเซนติเมตร (1902 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้ง (O-H stretch + 2 x C-O stretch) และพีคที่จำนวนคลื่น 5171 ต่อเซนติเมตร (1934 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของน้ำ (O-H stretch + O-H deformation) (ตารางที่ 4.14)



ภาพที่ 4.20 ค่า X-loading weight ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้อง

ภาพที่ 4.21 เป็นกราฟแสดง X-loading weight plot ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง จำนวน 3 ปัจจัย สำหรับปัจจัยที่ 1 (PC 1) พบพีคที่มีความสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 6227 ต่อเซนติเมตร (1606 นาโนเมตร) ปัจจัยที่ 2 (PC 2) พบพีคสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 8353, 7063 และ 6252 ต่อเซนติเมตร (1197, 1416 และ 1599 นาโนเมตร) ปัจจัยที่ 3 (PC 3) พบพีคที่มีความสำคัญที่จำนวนคลื่น เท่ากับ 8358, 7527 และ 6951 ต่อเซนติเมตร (1196, 1329 และ 1439 นาโนเมตร) แต่ละพีคมีความสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างต่างๆ เช่น พีคที่จำนวนคลื่น 6951 ต่อเซนติเมตร (1439 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้งและน้ำ พีคที่จำนวนคลื่น 6252 ต่อเซนติเมตร (1599 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของแป้งและกลูโคส พีคที่จำนวนคลื่น 8385 และ 8353 ต่อเซนติเมตร (1197 และ 1196 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างของ CH_3 (ตารางที่ 4.14)



ภาพที่ 4.21 ค่า X-loading weight ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง

ตารางที่ 4.14 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่พบในกราฟ X-loading weight plot ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา ราสกุล *Aspergillus* โคลโลนี สีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.19, 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
8914 ^b	1122 ^b	1080	2 x C-H str.+ 2 x C-C str.	benzene
8822 ^b	1133 ^b	1097	2 x C-H str.+ 2 x C-C str.	cyclopropane
8736 ^a	1145	1143	C-H str. second overtone	อะโรมาติก
8654 ^b	1156 ^b	1152	C-H str. second overtone	CH ₃
8583 ^b	1165 ^b	1170	C-H str. second overtone	HC=CH
8379 ^b , 8353 ^c	1193 ^b , 1197 ^c	1195	C-H str. second overtone	CH ₃
8316 ^a , 8307 ^b	1202 ^a , 1204 ^b	1215	C-H str. second overtone	CH ₂
7966 ^b	1255 ^b	1225	C-H str. second overtone	CH
7530 ^a , 7711 ^b , 7527 ^c	1328 ^a , 1297 ^b , 1329 ^c	1360	2 x C-H str.+ C-H def.	CH ₃
7121 ^a , 7502 ^b , 7063 ^c	1404 ^a , 1333 ^b , 1416 ^c	1395	2 x C-H str.+ C-H def.	CH ₂
7092 ^a	1410 ^a	1410	O-H str. first overtone	ROH
6906 ^a , 6951 ^c	1448 ^a , 1439 ^c	1450	O-H str. first overtone	แป้ง น้ำ
6311 ^a , 6227 ^c	1585 ^a , 1606 ^c	1580	O-H str. first overtone (intermol, H bond)	แป้ง กลูโคส
6096 ^a	1640 ^a	1620	C-H str. first overtone	=CH ₂
5997 ^b	1667 ^b	1685	C-H str. first overtone	อะโรมาติก
5656 ^b	1768 ^b	1780	C-H str. first overtone	เซลลูโลส
8914 ^b	1122 ^b	1820	O-H str.+ 2 x C-O str.	เซลลูโลส

^a ภาพที่ 4.19

^b ภาพที่ 4.20

^c ภาพที่ 4.21

def. = deformation

str. = stretching

sym. = symmetrical

* Osborne และคณะ (1993)

ตารางที่ 4.14 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่พบในกราฟ X-loading weight plot ของแบบจำลองที่ใช้ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง (ภาพที่ 4.19, 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ) (ต่อ)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น* (นาโนเมตร)	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
5353 ^a , 5334 ^a , 5258 ^b	1868 ^a , 1875 ^a , 1902 ^b	1900	O-H str.+ 2 x C-O str.	แป้ง
5177 ^a , 5158 ^a , 5171 ^b	1932 ^a , 1939 ^a , 1934 ^b	1940	O-H str.+ O-H def.	น้ำ
4796 ^a	2085 ^a	2080	O-H str.+ O-H def.	ROH ซูโครส แป้ง
4691 ^a	2132 ^a	2132	N-H str.+ C=O str.	กรดอะมิโน
4477 ^a , 4462 ^b	2234 ^a , 2241 ^b	2242	N-H str. + NH ₂ ⁺ def.	กรดอะมิโน

^a ภาพที่ 4.19

^b ภาพที่ 4.20

^c ภาพที่ 4.21

def. = deformation

str. = stretching

sym. = symmetrical

* Osborne และคณะ (1993)

4.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

4.1.4.1 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด

จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของราทั้งหมดด้วยวิธี direct plating เมื่อพิจารณากราฟการแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างเป็นตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะพบว่า 71.66 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ จึงพิจารณาสร้างแบบจำลองที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมด 2 แบบจำลอง โดยแบ่งตามค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา ได้แก่

แบบจำลองที่ 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 51-100 เปอร์เซ็นต์

แบบจำลองที่ 2

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่า 100 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.15 แสดงผลทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 90.61-91.08 เปอร์เซ็นต์ แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างกลุ่มที่ 1 (0-50%) สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ได้อย่างแม่นยำโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูง (100 และ 90.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 (51-100%) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงเฉพาะตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 เท่านั้น (92.27 เปอร์เซ็นต์) สำหรับผลการทำนายการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA แสดงในตารางที่ 4.16 มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 97.18 เปอร์เซ็นต์ โดยแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มสามารถทำนายตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 ได้อย่างแม่นยำ

แต่ไม่สามารถทำนายตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ได้ถูกต้องเลย เนื่องจาก ตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ที่นำมาสร้างแบบจำลองมีจำนวนต่างกันมากเกินไป

จากผลการสร้างแบบจำลองการแบ่งกลุ่มชี้ให้เห็นว่า แบบจำลองจากวิธี SIMCA ที่สร้างโดยตัวอย่างกลุ่มใดก็จะทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มนั้นแม่นยำกว่าตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มอื่น สำหรับวิธี PLS-DA จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองมีผลต่อความสามารถในการแบ่งกลุ่มตัวอย่าง ถ้าในแบบจำลองมีจำนวนตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของกลุ่มใดมากก็จะสามารถทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มนั้นได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 4.15 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (0-50%)	กลุ่มที่ 2 (51-100%)
กลุ่มที่ 1 (0-50%)	6	100	50
กลุ่มที่ 2 (51-100%)	207	90.82	92.27
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		91.08	90.61

ตารางที่ 4.16 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 2 (51-100%)	207	98.55
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		97.18

ตารางที่ 4.17 และ 4.18 แสดงผลของแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าและเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี SIMCA มีค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายเท่ากับ 71.80-81.64 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 86.96 เปอร์เซ็นต์ แบบจำลองที่ได้ให้ผลการทำนายในลักษณะเดียวกันกับผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ คือ แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี SIMCA จากตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ให้ค่าการทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันสูงกว่าค่าการทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มอื่น สำหรับผลการทำนายของแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA กลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากกว่าจะมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงกว่า

ตารางที่ 4.17 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าและเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (<100%)	กลุ่มที่ 2 (100%)
กลุ่มที่ 1 (<100%)	54	85.19	3.70
กลุ่มที่ 2 (100%)	153	80.39	95.42
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		81.64	71.50

ตารางที่ 4.18 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดน้อยกว่าและเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (<100%)	54	75.93
กลุ่มที่ 2 (100%)	153	90.85
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		86.96

4.1.4.2 แบบจำลองที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง

จากการพิจารณารูปการแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองที่พบในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะ (ภาพที่ 4.3) พบว่ามีการกระจายของตัวอย่างดีกว่าการกระจายของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใกล้เคียงกัน จึงพิจารณาสรางแบบจำลองที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง 2 แบบจำลอง ได้แก่

แบบจำลองที่ 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง

แบบจำลองที่ 2

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 51-100 เปอร์เซ็นต์

ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองด้วยวิธี SIMCA แสดงดังตารางที่ 4.19 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 72.86-86.67 เปอร์เซ็นต์ และการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA ให้ผลการทำนายที่แม่นยำกว่าวิธี SIMCA โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 95.71 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.19 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลินีสีเขียวอมเหลือง ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	9	100	0
กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)	201	71.64	90.53
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		72.86	86.67

ตารางที่ 4.20 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลินีสีเขียวอมเหลือง ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	9	0
กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)	201	100
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		95.71

ตารางที่ 4.21 และ 4.22 เป็นผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลินีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 54.29-57.14 และ 74.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.21 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลินีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (0-50%)	กลุ่มที่ 2 (51-100%)
กลุ่มที่ 1 (0-50%)	92	94.54	2.17
กลุ่มที่ 2 (51-100%)	118	27.97	94.92
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		57.14	54.29

ตารางที่ 4.22 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (0-50%)	92	64.13
กลุ่มที่ 2 (51-100%)	118	82.20
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		74.29

จากผลการทดลองพบว่า ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลิโคนีสีเขียวอมเหลืองให้ผลในลักษณะเช่นเดียวกับแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตามค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมที่ได้จากแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA จะสูงกว่าวิธี SIMCA เนื่องจาก แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี SIMCA ได้จากการนำตัวอย่างแต่ละกลุ่มมาสร้างแบบจำลองได้เป็น 2 แบบจำลอง แล้วจึงนำแบบจำลองทั้งสองไปทำนายตัวอย่างกลุ่มทำนายที่อยู่ในกลุ่มตนเองและกลุ่มอื่น ในขณะที่ แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA ได้จากการนำตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมาสร้างแบบจำลอง 1 แบบจำลอง แล้วนำแบบจำลองดังกล่าวไปทำนายตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม

4.1.4.3 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม

จากการพิจารณาข้อกำหนดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมในอาหารของประเทศไทย ซึ่งระบุไว้ว่าสามารถพบอะฟลาทอกซินอยู่ในอาหารทุกชนิดได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) ผู้วิจัยจึงพิจารณาสร้างแบบจำลองที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมทั้งหมด 2 แบบจำลอง ได้แก่

แบบจำลองที่ 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างข้าวกล้องที่ไม่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวม
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวม

แบบจำลองที่ 2

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.23 และ 4.24 แสดงผลการสร้างแบบจำลองเพื่อใช้แบ่งกลุ่มระหว่างตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ตามลำดับ พบว่า แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี SIMCA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมอยู่ในช่วง 37.46-87.79 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมของแบบจำลองที่สร้างโดยวิธี PLS-DA เท่ากับ 94.84 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.23 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	15	80.00	20.00
กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)	198	27.78	92.93
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		31.46	87.79

ตารางที่ 4.24 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มี การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวม ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	15	26.67
กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)	198	100.00
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		94.84

ผลของการสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า และมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การทำนายอยู่ในช่วง 27.70-82.16 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี SIMCA (ตารางที่ 4.25) และ 87.79 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA (ตารางที่ 4.26)

ตารางที่ 4.25 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า และมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 ($<20 \mu\text{g/kg}$)	กลุ่มที่ 2 ($\geq 20 \mu\text{g/kg}$)
กลุ่มที่ 1 ($<20 \mu\text{g/kg}$)	159	89.31	6.29
กลุ่มที่ 2 ($\geq 20 \mu\text{g/kg}$)	54	61.11	90.74
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		82.16	27.70

ตารางที่ 4.26 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า และมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 ($<20 \mu\text{g/kg}$)	159	96.23
กลุ่มที่ 2 ($\geq 20 \mu\text{g/kg}$)	54	62.96
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		87.79

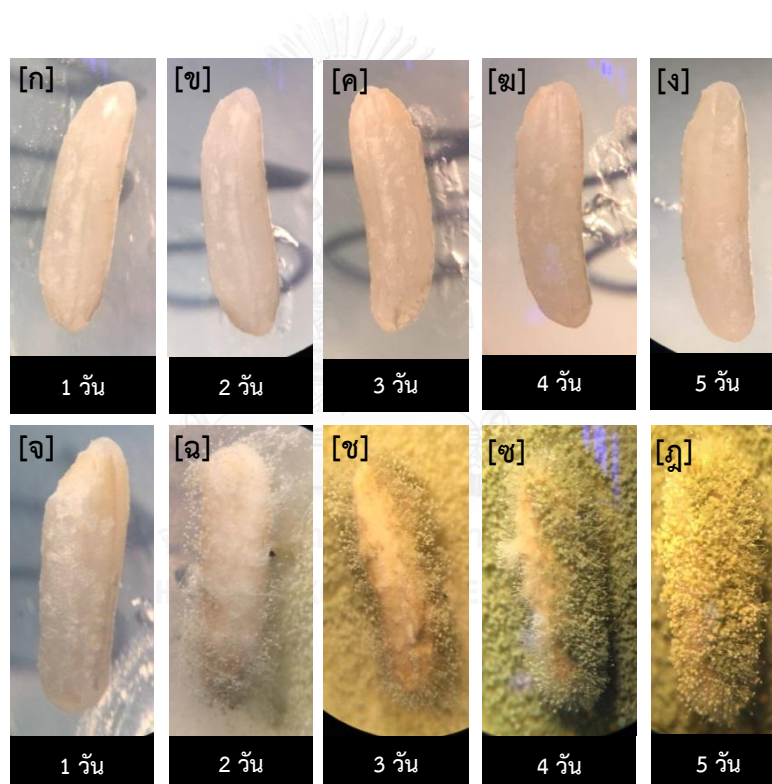
ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมมีลักษณะเดียวกับผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่ผ่านมา คือ แบบจำลองที่สร้างโดยวิธี SIMCA มีค่าการทำนายที่สูงเมื่อใช้ทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับกลุ่มที่สร้างแบบจำลอง และค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมจากแบบจำลองที่สร้างโดยวิธี PLS-DA มีค่าการทำนายที่สูงกว่าวิธี SIMCA อย่างไรก็ตาม ในแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA ถ้าจำนวนตัวอย่างแต่ละกลุ่มที่ใช้สร้างแบบจำลองมีมากขึ้นก็จะทำให้ค่าการทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มนั้นสูงขึ้นด้วย

4.2 การตรวจสอบการเจริญของ *A. flavus* และปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

4.2.1 การตรวจสอบการเจริญของ *A. flavus* บนเมล็ดข้าวกล้อง

4.2.1.1 ลักษณะเมล็ดข้าวกล้องที่ใช้สำหรับตรวจสอบการเจริญของรา

จากการเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการปนเปื้อนและที่ถูกปนเปื้อนด้วยรา *A. flavus* โดยการจุ่มเมล็ดข้าวกล้องลงในสารแขวนลอยสปอร์ของราที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน พบลักษณะการเจริญของราบนเมล็ดข้าวกล้องแสดงดังภาพที่ 4.22



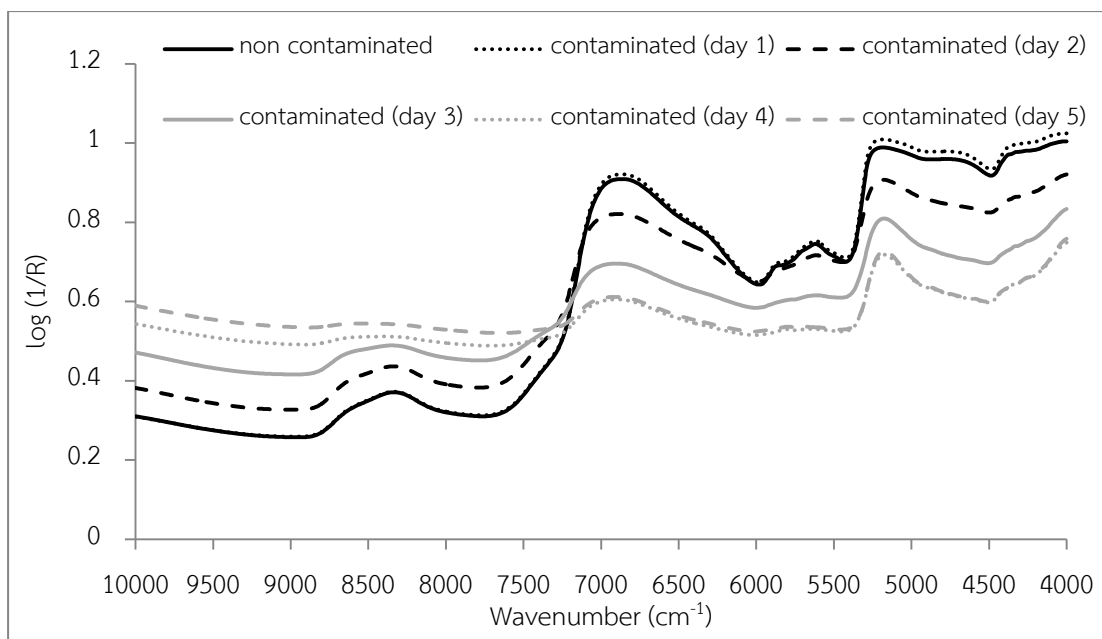
ภาพที่ 4.22 ตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ในวันที่ 1-5 ของการบ่ม ภาพ [ก]-[ง] แสดงลักษณะของเมล็ดข้าวกล้องที่ไม่มีการเจริญของรา และภาพ [จ]-[ฉ] แสดงลักษณะของเมล็ดข้าวกล้องที่มีการเจริญของรา

4.2.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ใช้สำหรับตรวจสอบการเจริญของรา

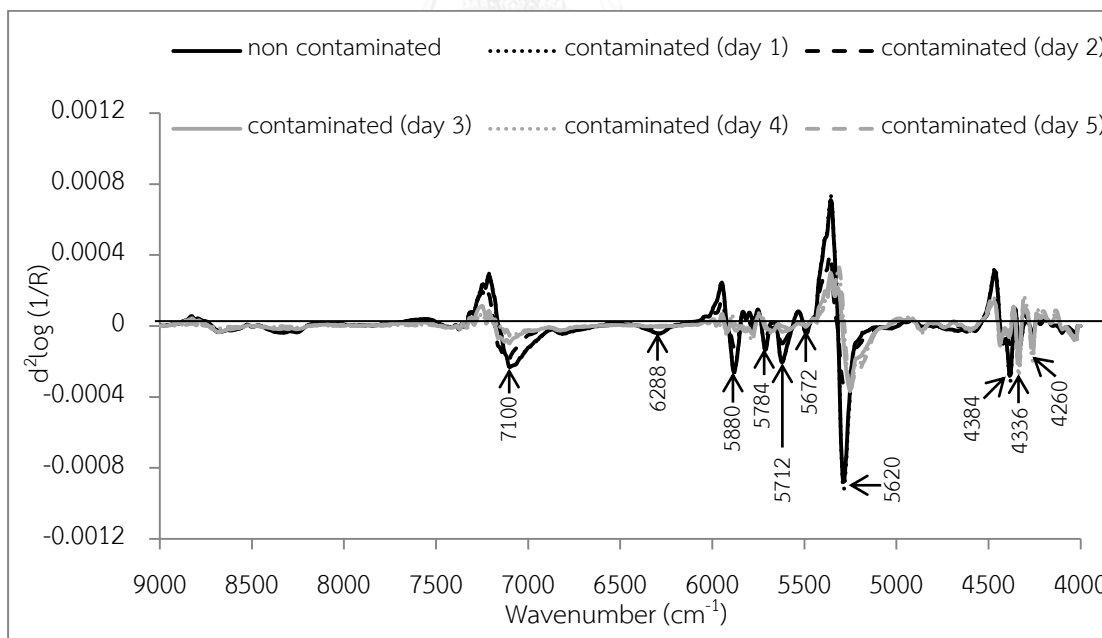
จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) รุ่น NIRFlex N-500 (Buchi, Switzerland) วัดในระบบสะท้อนแบบแพร่ ในช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของราและมีการเจริญของราบนเมล็ดในแต่ละวันของการบ่ม ดังภาพ 4.23 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร) ในแนวแกน X กับค่า $\log(1/R)$ ในแนวแกน Y พบว่า เส้นสเปกตรัมแต่ละเส้นมีรูปแบบที่เหมือนกัน แต่ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่ชัดเจนเมื่อมีการเจริญของราเพิ่มขึ้นบนเมล็ดข้าวกล้อง

ผลของการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด (second derivative, 11 points) ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร ของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการเจริญของราต่างกัน แสดงดังภาพที่ 4.24 พบว่า มีพีคที่เด่นชัดจำนวน 10 พีค ได้แก่ ที่จำนวนคลื่นเท่ากับ 7100, 6288, 5880, 5784, 5712, 5672, 5620, 4384, 4336 และ 4260 ต่อเซนติเมตร (1408, 1590, 1701, 1729, 1751, 1763, 1779, 2281, 2306 และ 2347 นาโนเมตร) ซึ่งแต่ละพีคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะในองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.27

จากภาพที่ 4.24 พบพีคที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างตัวอย่างที่ไม่มีการเจริญของราและมีการเจริญของราสูงสุดบนเมล็ดข้าวกล้อง ได้แก่ พีคที่จำนวนคลื่น 7100 ต่อเซนติเมตร (1408 นาโนเมตร) ซึ่งเป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้าง ROH พีคที่จำนวนคลื่น 5880 และ 4384 ต่อเซนติเมตร (1701 และ 2281 นาโนเมตร) สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของโครงสร้าง CH₃ พีคที่จำนวนคลื่น 5712 ต่อเซนติเมตร (1751 นาโนเมตร) โดยเฉพาะที่จำนวนคลื่น 5620 เซนติเมตร (1779 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างเซลลูโลส (ตารางที่ 4.27) สังเกตได้ว่าในข้าวเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของรา มีการดูดซับของคลื่นที่พีคดังกล่าวสูง ในขณะที่ข้าวเมล็ดเดี่ยวที่มีการเจริญของรา มีการดูดซับของพีคดังกล่าวต่ำลง ผลการทดลองแสดงถึงการลดลงของปริมาณเซลลูโลสในเมล็ดข้าวที่มีการเจริญของรา ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ระบุว่า *A. flavus* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อช่วยให้ราเจริญในแหล่งอาหารที่มีเซลลูโลสได้ (Olutiola, 1976; Ojumu และคณะ, 2003; Murad และคณะ, 2013)



ภาพที่ 4.23 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของรา และมีการเจริญของราบนเมล็ด ในวันที่ 1-5 ของการบ่ม



ภาพที่ 4.24 สเปกตรัมที่ได้จากวิธีการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร ของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของรา และมีการเจริญของราบนเมล็ด ในวันที่ 1-5 ของการบ่ม

ตารางที่ 4.27 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดียวที่มีการเจริญของราต่างกัน (ภาพที่ 4.24)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
7100	1408	1410	O-H str. first overtone	ROH
6288	1590	1580	O-H str. first overtone (intermol, H-bond)	แป้ง กลูโคส
5880	1701	1705	C-H str. first overtone	CH ₃
5784	1729	1725	C-H str. first overtone	CH ₂
5712	1751	1740	S-H str. first overtone	-SH
5672	1763	1765	C-H str. first overtone	CH ₂
5620	1779	1780	C-H str. first overtone	เซลลูโลส
4384	2281	2280	C-H str. + C-H def.	CH ₃
4336	2306	2310	C-H str. + C-H def.	CH ₂
4260	2347	2347	CH ₂ sym. str.+CH ₂ def	HC=CHCH ₂

str. = stretching

def. = deformation

sym. = symmetrical

* Osborne และคณะ (1993)

4.2.1.3 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามการเจริญของ รา

เมื่อได้เส้นสเปกตรัม 200 เส้น จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดแล้ว จึงนำสเปกตรัมทั้งหมดมาสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามการเจริญของรา โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มีการเจริญของรา
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการเจริญของรา

ผลของการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการเจริญของราด้วยวิธี SIMCA แสดงดังตารางที่ 4.28 มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมในช่วง 62.96-75.93 เปอร์เซ็นต์ และตารางที่ 4.29 เป็นผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการเจริญของราด้วยวิธี PLS-DA ซึ่งได้ผลการทำนายที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี SIMCA เท่ากับ 85.19 เปอร์เซ็นต์ และแบบจำลองที่ได้จากวิธี PLS-DA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างในแต่ละกลุ่มได้แม่นยำด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง 88.89 และ 81.48 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ จากผลการทำนายจะเห็นว่า แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี SIMCA ยังคงมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องของกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับกลุ่มที่ใช้สร้างแบบจำลองสูงกว่ากลุ่มอื่น ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะเท่ากัน

ตารางที่ 4.28 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการเจริญของราด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการเจริญ)	กลุ่มที่ 2 (มีการเจริญ)
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการเจริญ)	27	92.59	29.63
กลุ่มที่ 2 (มีการเจริญ)	27	59.26	96.30
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		75.93	62.96

ตารางที่ 4.29 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการเจริญของรา ด้วยวิธี PLS-DA

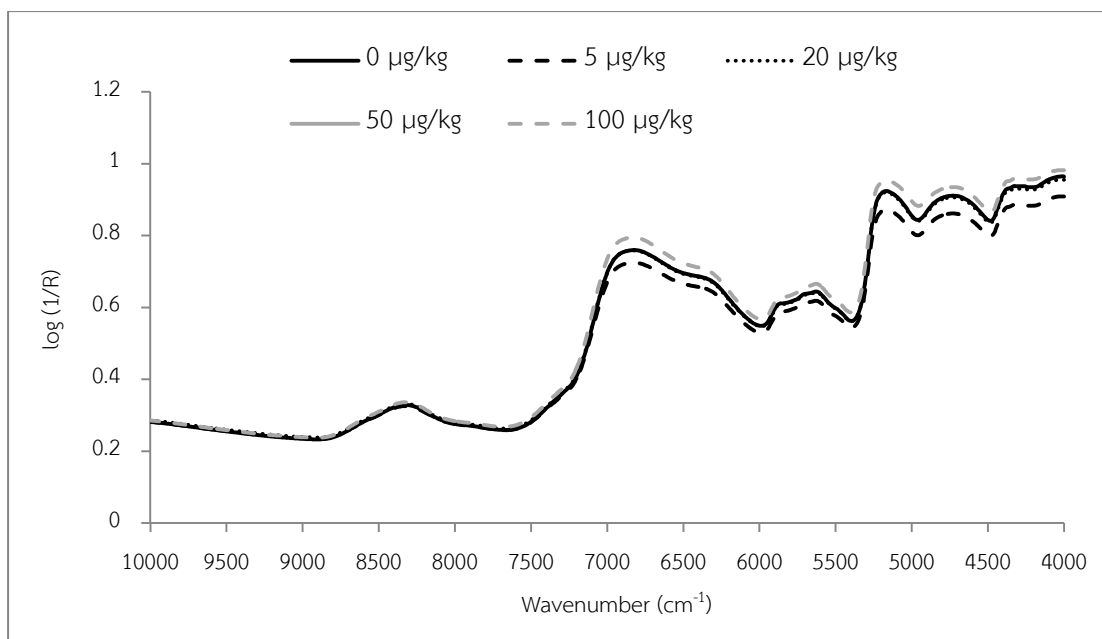
กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการเจริญ)	27	88.89
กลุ่มที่ 2 (มีการเจริญ)	27	81.48
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		85.19

4.2.2 การตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 บนเมล็ดข้าวกล้อง

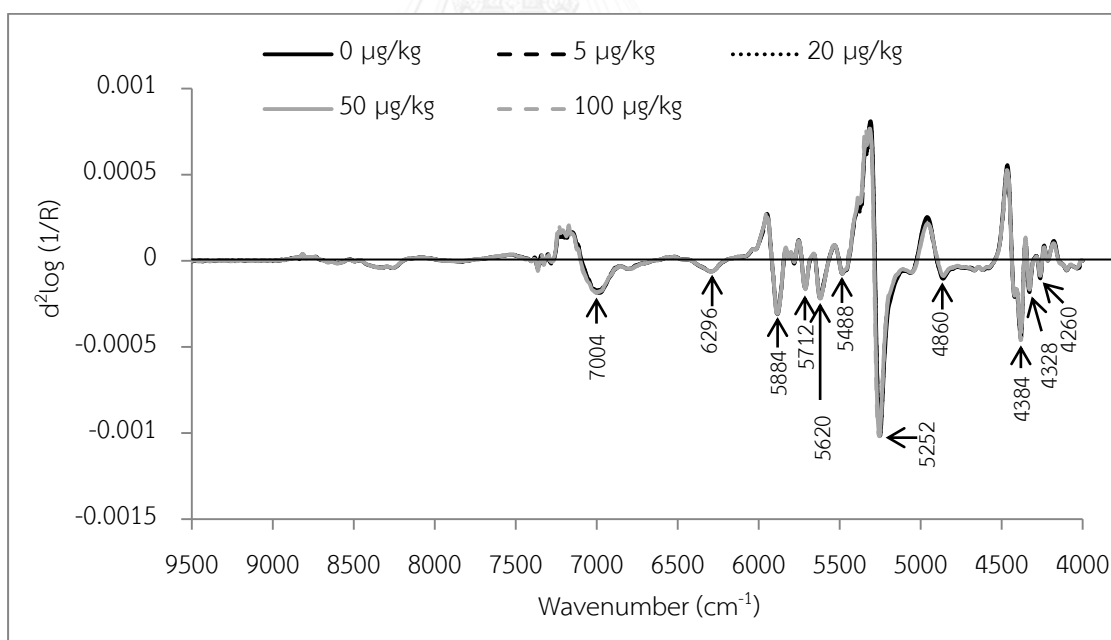
4.2.2.1 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1

เมื่อนำตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) รุ่น NIRFlex N-500 (Buchi, Switzerland) ในระบบสะท้อนแบบแปร ที่ช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยดังภาพที่ 4.25 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงจำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร) ในแนวแกน X กับค่า $\log(1/R)$ ในแนวแกน Y พบว่า สเปกตรัมมีรูปแบบที่เหมือนกัน และเหมือนกับรูปแบบของสเปกตรัมดั้งเดิมของข้าวกล้องในภาพที่ปรากฏก่อนหน้านี้ แต่ค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดไม่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่ชัดเจนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1

สำหรับผลของการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด (second derivative, 11 points) ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร ของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ต่างกัน แสดงดังภาพที่ 4.26 พบว่า มีพีคที่เด่นชัดจำนวน 11 พีค ซึ่งเป็นพีคที่พบในภาพที่ 4.21 จำนวน 7 พีค ได้แก่ ที่ช่วงจำนวนคลื่น 6296, 5884, 5712, 5620, 4384, 4328 และ 4260 ต่อเซนติเมตร (1588, 1700, 1751, 1779, 2281, 2311 และ 2347 นาโนเมตร) และพีคอื่นที่นอกเหนือจากนี้จำนวน 4 พีค ได้แก่ ที่ช่วงจำนวนคลื่น 7004, 5488, 5252 และ 4860 ต่อเซนติเมตร (1428, 1822, 1904 และ 2058 นาโนเมตร) (ตารางที่ 4.30)



ภาพที่ 4.25 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



ภาพที่ 4.26 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงจำนวนคลื่น 9000-4000 ต่อเซนติเมตร ของสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

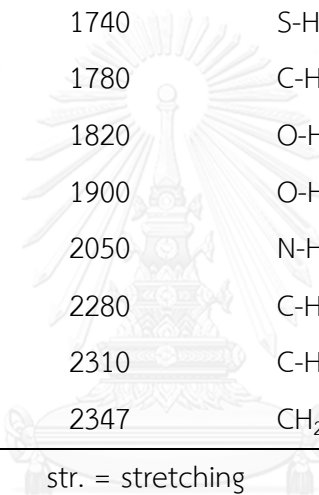
ตารางที่ 4.30 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 (ภาพที่ 4.26)

จำนวนคลื่น (ต่อเซนติเมตร)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่น*	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
7004	1428	1430	N-H str. first overtone	CONH ₂
6296	1588	1580	O-H str. first overtone (intermol, H-bond)	แป้ง กลูโคส
5884	1700	1705	C-H str. first overtone	CH ₃
5712	1751	1740	S-H str. first overtone	-SH
5620	1779	1780	C-H str. first overtone	เซลลูโลส
5488	1822	1820	O-H str. + 2 × C-O str.	เซลลูโลส
5252	1904	1900	O-H str. + 2 × C-O str.	แป้ง
4860	2058	2050	N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
4384	2281	2280	C-H str. + C-H def.	CH ₃
4328	2311	2310	C-H str. + C-H def.	CH ₂
4260	2347	2347	CH ₂ sym. Str.+ =CH ₂ def	HC=CHCH ₂

def. = deformation

str. = stretching

sym. = symmetrical

* Osborne และคณะ (1993)  **ภาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2.2.2 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1

สำหรับสเปกตรัมที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวตามระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 มีทั้งหมด 500 เส้น เป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินปี 1 ตามที่กำหนด คือ 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยตัวอย่างทุกความเข้มข้นมีจำนวนของเส้นสเปกตรัมเท่ากัน จึงพิจารณาสร้างแบบจำลอง 2 แบบจำลอง ดังนี้

แบบจำลองที่ 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

แบบจำลองที่ 2

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.31 แสดงผลการทำนายของแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมอยู่ในช่วง 50.00-53.70 เปอร์เซ็นต์ และแบบจำลองจากวิธี PLS-DA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดดังกล่าวได้อย่างแม่นยำกว่า โดยค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 98.15 เปอร์เซ็นต์ และสามารถทำนายสมาชิกของแต่ละกลุ่มได้อย่างแม่นยำด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มที่ 1 และ 96.30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มที่ 2 (ตารางที่ 4.32)

ตารางที่ 4.31 ผลทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (0 µg/kg)	กลุ่มที่ 2 (100 µg/kg)
กลุ่มที่ 1 (0 µg/kg)	27	100.00	0.00
กลุ่มที่ 2 (100 µg/kg)	27	7.41	100.00
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		53.70	50.00

ตารางที่ 4.32 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (0 µg/kg)	27	100.00
กลุ่มที่ 2 (100 µg/kg)	27	96.30
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		98.15

แบบจำลองที่สร้างจากวิธี SIMCA ให้ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ และมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมอยู่ในช่วง 41.67-61.11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.33) สำหรับแบบจำลองที่สร้างจากวิธี PLS-DA ให้ค่าการทำนายสูงกว่าแบบจำลองที่สร้างโดยวิธี SIMCA เช่นเดียวกับผลการทำนายที่ผ่านมา โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 93.75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.34)

ตารางที่ 4.33 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ และมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 ($\leq 20 \mu\text{g/kg}$)	กลุ่มที่ 2 ($> 20 \mu\text{g/kg}$)
กลุ่มที่ 1 ($\leq 20 \mu\text{g/kg}$)	87	94.25	4.60
กลุ่มที่ 2 ($> 20 \mu\text{g/kg}$)	57	10.53	98.25
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		61.11	41.67

ตารางที่ 4.34 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ และมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 ($\leq 20 \mu\text{g/kg}$)	87	98.85
กลุ่มที่ 2 ($> 20 \mu\text{g/kg}$)	57	85.96
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		93.75

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การปรับปรุงสมรรถนะของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องโดยการปรับภาวะข้าวกล้อง

การเลือกตัวอย่างที่ดีเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการทำนายของแบบจำลองเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ผลของการปรับภาวะข้าวกล้องด้วยการปรับความชื้นและปรับการปนเปื้อนของราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินเพื่อกระตุ้นการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของรา เพื่อทำให้มีความหลากหลายและการกระจายตัวที่สม่ำเสมอของการปนเปื้อนราและอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง สรุปได้ดังนี้

5.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

5.1.1.1 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวกล้อง

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี direct plating พบว่า การปรับความชื้นทำให้การปนเปื้อนของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองเพิ่มขึ้นทั้งในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่ความชื้น 18 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อนของราทั้งหมดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเขียวอมเหลืองเฉลี่ยเท่ากับ 97.90 ± 8.31 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองพบว่า ความชื้นในข้าวกล้องมีผลช่วยส่งเสริมการปนเปื้อนของรา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Abdullah และคณะ (2000) ที่ระบุว่าเราสามารถเจริญได้ในข้าวมีความชื้นสูงกว่า 13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการปนเปื้อนของราในข้าวสามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว และระหว่างการเก็บรักษา เมื่อมีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดการเข้าทำลายของราในข้าวได้ โดยเฉพาะข้าวกล้องซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารที่ราสามารถนำไปใช้ในการเจริญและสร้างสปอร์ได้ (Leslie และคณะ, 2014) จึงควรเก็บรักษาข้าวไว้ที่ความชื้นต่ำกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (Fanse และคณะ, 1970) เพื่อป้องกันการติดเชื้อของราในข้าว Trung และคณะ (2001) ศึกษาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าวจากเวียดนาม พบราในกลุ่ม *Aspergillus* มากที่สุด (43.75 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมด) รองลงมา คือ *Fusarium* และ *Penicillium* (21.8 และ 10.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งการปนเปื้อนของราดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับ

กับการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้องและการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ เช่นเดียวกับ Shanakht และคณะ (2014) ที่ได้สำรวจการปนเปื้อนของราในข้าวที่ปากีสถาน พบการปนเปื้อนของ *A. flavus* มากที่สุด คิดเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ของราที่พบจากตัวอย่างข้าว และความชื้นของเมล็ดข้าวมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับการถูกปนเปื้อนด้วยรา การเก็บข้าวในบรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสมและเก็บในสถานที่ที่มีการระบายอากาศไม่ดีจะเพิ่มความชื้นในข้าวสูงขึ้นและส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของราตามมา

จากกราฟการแจกแจงความถี่ของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (ภาพที่ 4.2) พบว่า การปรับความชื้นของตัวอย่างข้าวกล้องและการปรับปริมาณของเชื้อทำให้ราเจริญได้ดีและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากเดิมที่มีสูงอยู่แล้ว จึงทำให้ตัวอย่างส่วนใหญ่ (71.66 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด) มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีตัวอย่างข้าวกล้องเพียง 3.33 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่ได้มีการกระจายเป็นแบบไม่สม่ำเสมอ แต่สำหรับราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง การปรับภาวะของตัวอย่างข้าวกล้องทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าวมีการกระจายตัวดีขึ้น (ภาพที่ 4.3) เนื่องจาก มีการปนเปื้อนของราชนิดนี้ต่ำในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ เมื่อปรับความชื้นและปริมาณของราให้เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นและได้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่หลากหลาย

5.1.1.2 ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้อง

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า ในตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติที่ไม่ได้ปรับความชื้นมีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 4.35 ± 4.93 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและปรับความชื้นเป็น 18 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ $2,714.80 \pm 3,892.08$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าการปรับความชื้นและการเพิ่มปริมาณราทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างมากขึ้น โดยปริมาณของอะฟลาทอกซินรวมสูงสุด ($18,300.00$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) พบในตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราและมีความชื้น 18 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินที่เพิ่มสูงขึ้นในตัวอย่างข้าวกล้องมีความสัมพันธ์กับความชื้นและค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง เมื่อปริมาณความชื้นสูงขึ้นทำให้ราสามารถเจริญได้ดี ซึ่งราดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินจึงทำให้พบปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานของ Hussain และคณะ (2011) ที่กล่าวว่า เมื่อมีความชื้นเพิ่มขึ้นในข้าวซึ่ง

มีสารอาหารอยู่มากทำให้เกิดการเจริญของราและเกิดการปนเปื้อนสารพิษจากราด้วย ถ้าราที่เจริญเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษได้ และยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ช่วยทำให้เกิดการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราเพิ่มขึ้น เช่น อุณหภูมิ ความสามารถในการสร้างสารพิษของรา และระยะเวลาในการเก็บรักษาข้าว (Nisa และคณะ, 2014)

จากกราฟการแจกแจงความถี่ของอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะ (ภาพที่ 4.4) พบว่า การกระจายเป็นแบบไม่สมมาตร ตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมต่ำ (0.1-1.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) คิดเป็น 37.50 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด รองลงมาเป็นตัวอย่างที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินรวมมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็น 21.67 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด เนื่องจาก ปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในตัวอย่างขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและปริมาณอะฟลาทอกซินเริ่มต้น ซึ่งในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติมีการปนเปื้อนของรานิดนี้ต่ำจึงพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมต่ำด้วย เมื่อปรับความชื้นและเพิ่มปริมาณราที่มีความสามารถผลิตอะฟลาทอกซินทำให้พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราสูงขึ้นและพบในปริมาณสูงมาก ทำให้ตัวอย่างมีปริมาณของอะฟลาทอกซินในช่วงกว้าง (0.00-18,300.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และมีการกระจายแบบไม่สมมาตร

จากผลการปรับภาวะของข้าวกล้องทั้งหมดพบว่า การกระจายตัวของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราและปริมาณอะฟลาทอกซินเป็นแบบไม่สมมาตร เนื่องจาก ค่าดังกล่าวขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและอะฟลาทอกซินเริ่มต้น ซึ่งในตัวอย่างธรรมชาติมีการปนเปื้อนของราทั้งหมดสูง แต่มีการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองและปริมาณอะฟลาทอกซินรวมต่ำ เมื่อราถูกกระตุ้นให้มีการเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินโดยการปรับภาวะของตัวอย่างจึงพบการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินในปริมาณที่สูงขึ้น แต่เนื่องจากการเจริญของราและการผลิตอะฟลาทอกซินของราเป็นสิ่งที่ควบคุมได้ยาก จำนวนตัวอย่างที่มีค่าอยู่ระหว่างค่าต่ำสุดและสูงสุดของค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราและปริมาณอะฟลาทอกซินมีเพียงเล็กน้อยตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีค่าสูงหรือค่าต่ำจึงทำให้ค่าที่ต้องการวิเคราะห์มีการกระจายตัวที่ไม่ดี

5.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวกล้องที่ปรับภาวะด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR) (MPA, Bruker, Germany) ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-3500 ต่อเซนติเมตร และทำการวัดในระบบสะท้อนแบบแพร่พบว่า ลักษณะสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของรา (ภาพที่ 4.5) ค่าเปอร์เซ็นต์ดูดเชื้อของราทั้งหมด (ภาพที่ 4.7) ค่าเปอร์เซ็นต์ดูดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 4.9) และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในระดับที่ต่างกัน (ภาพที่ 4.11) มีรูปแบบที่คล้ายกัน และมีการลดลงของค่า $\log(1/R)$ เมื่อปริมาณของราที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง ค่าความชื้น และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างเพิ่มขึ้น

เมื่อปรับแต่งสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยด้วยวิธีทำอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 17 จุด ทำให้เห็นพีคบนเส้นสเปกตรัมได้ชัดเจนขึ้น ดังภาพที่ 4.6, 4.8, 4.10 และ 4.12 ซึ่งลักษณะของสเปกตรัมที่ปรากฏในทั้ง 4 ภาพ มีรูปแบบที่คล้ายกัน และมีพีคที่เด่นชัดจำนวน 12 พีค ซึ่งเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบที่พบได้ในข้าวกล้อง เช่น ที่จำนวนคลื่นเท่ากับ 6296, 5619, 5482, 5239, 4860, 4354 และ 4025 ต่อเซนติเมตร พีคข้างต้นสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะที่อยู่ในโครงสร้างของ แป้ง กลูโคส ซูโครส เซลลูโลส น้ำ และกรดอะมิโน (Osborne และคณะ, 1993)

จากการสังเกตลักษณะของสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวกล้องที่มีปริมาณความชื้นและการปนเปื้อนของราต่างกัน (ภาพที่ 4.5 และ 4.6) พบว่า ตัวอย่างที่ถูกปรับความชื้นเป็น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีการดูดซับคลื่นที่สัมพันธ์กับโครงสร้างของน้ำ (ในช่วงจำนวนคลื่น 5239 ต่อเซนติเมตร) ต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่ถูกปรับความชื้น ซึ่งไม่เป็นไปตามทฤษฎี เนื่องจาก ความชื้นดังกล่าวเป็นความชื้นเริ่มต้นก่อนการบ่ม เมื่อบ่มให้ราเจริญเป็นระยะเวลา 14 วัน ราจะใช้น้ำในการเจริญเติบโตและเกิดการระเหยของน้ำตลอดระยะเวลาของการบ่มจึงทำให้ปริมาณน้ำในตัวอย่างลดลง จึงทำให้พบการดูดซับของน้ำต่ำลง

5.1.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

จากการแบ่งตัวอย่างออกเป็น 6 ชุด ตามภาวะต่างๆ ดังตารางที่ 4.17 แล้วนำชุดตัวอย่างทั้ง 6 ชุด มาสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การดูดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในข้าวกล้องโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับข้อมูลทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0.129 (Bruker optic GmbH, Germany) สรุปได้ดังนี้

5.1.3.1 แบบจำลองเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดได้จากชุดตัวอย่างที่ 6 (ตัวอย่างทั้งหมด) จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการลบโดยเส้นตรง (straight line subtraction) โดยแบบจำลองมีค่า R^2 ซึ่งเป็นค่าที่ใช้อธิบายถึงประสิทธิภาพของแบบจำลอง เท่ากับ 0.92 จาก Williams (2007) ค่า R^2 ในช่วง 0.92-0.96 หมายถึง สามารถใช้แบบจำลองในการประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ สำหรับอัตราส่วนระหว่างค่า SD ต่อ SEP (ratio of standard deviation to standard error of prediction, RPD) เท่ากับ 3.59 อยู่ในช่วง 3.1-4.9 หมายถึง แบบจำลองมีประสิทธิภาพพอใช้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ (Williams, 2007) ประกอบกับแบบจำลองมีค่า $RMSEP$ ต่ำที่สุด (3.17 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับแบบจำลองที่สร้างจากชุดตัวอย่างที่ 2 (ค่า $RMSECV$ เท่ากับ 6.11 เปอร์เซ็นต์) แม้ว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ของแบบจำลองทั้งสองจะใกล้เคียงกัน ค่า $RMSECV$ หรือ $RMSEP$ เป็นค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่แบบจำลองทำนายได้กับค่าจริงจากห้องปฏิบัติการ ถ้ามีค่าความแตกต่างน้อยแสดงถึงความมีประสิทธิภาพของแบบจำลอง

5.1.3.2 แบบจำลองเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง แบบจำลองที่สร้างจากตัวอย่างชุดที่ 4 ให้ค่าการทำนายที่ดีที่สุดโดยใช้ที่สเปกตรัมผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction; MSC) แบบจำลองที่ได้มีค่า R^2 เท่ากับ 0.84 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.83-0.90 หมายความว่าควรใช้แบบจำลองด้วยความระมัดระวัง รวมถึงสามารถใช้ในการวิจัยได้ (Williams, 2007) ค่า RPD ของแบบจำลอง เท่ากับ 2.53 อยู่ในช่วง 2.4-3.0 หมายถึง สามารถนำแบบจำลองไปใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างแบบหยาบๆ ได้ (Williams, 2007) แบบจำลองมีค่า $RMSECV$ ต่ำที่สุด เท่ากับ 6.57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ถึงประสิทธิภาพของแบบจำลอง ค่า $RMSECV$ เป็นค่าเบี่ยงเบนของความแตกต่างระหว่างค่าที่แบบจำลองทำนายได้กับค่าจริงที่ได้จากวิธีทางห้องปฏิบัติการ แบบจำลองที่ดีควรมีค่าดังกล่าวต่ำ

5.1.3.3 แบบจำลองเพื่อการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะสร้างจากตัวอย่างชุดที่ 6 จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (vector normalization; SNV) ค่า R^2 และ RPD เท่ากับ 0.93 และ 3.77 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 ในช่วง 0.92-0.96 หมายถึง สามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพได้ และค่า RPD ที่ได้อยู่ในช่วง 3.1-4.9 หมายความว่าแบบจำลองมีประสิทธิภาพพอใช้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ (Williams, 2007) แบบจำลองมีค่า $RMSEP$ ต่ำที่สุดในกลุ่มแบบจำลองที่มีค่า R^2 สูง เท่ากับ 188.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และค่า X-loading weight เป็นค่าที่ชี้ถึงผลกระทบของความยาวคลื่นต่อแบบจำลอง ความยาวคลื่นที่มีค่าดังกล่าวสูงแสดงถึงความสำคัญและควมมีอิทธิพลของความยาวคลื่นนั้นต่อแบบจำลอง จากกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient plot) และกราฟแสดงค่า X-loading weight ของแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณทั้งหมด พบว่า พีคที่มีความสำคัญต่อแบบจำลองส่วนใหญ่เป็นพีคที่มีความสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของโครงสร้างของเซลลูโลส น้ำ แป้ง และกรดอะมิโน ซึ่งพบได้ในข้าวกล้อง

จากผลการทดลองพบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดทั้งสามแบบจำลองได้จากชุดตัวอย่างที่ถูกปรับภาวะ โดยแบบจำลองเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และแบบจำลองเพื่อการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวมซึ่งได้จากชุดตัวอย่างที่ 6 (ตัวอย่างข้าวกล้องปรับภาวะทั้งหมด) ให้ค่าการทำนายอยู่ในเกณฑ์ดี สามารถนำไปประยุกต์และใช้ในงานประกันคุณภาพได้ สำหรับแบบจำลองที่ดีที่สุดเพื่อการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง สร้างจากชุดตัวอย่างที่ 4 (ตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราที่ความชื้น 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์) สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยและควรใช้อย่างระมัดระวัง ดังนั้น สรุปได้ว่า การปรับภาวะของตัวอย่างทำให้ค่าที่ต้องการวิเคราะห์มีความหลากหลายและการกระจายตัวมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้ได้แบบจำลองที่มีค่า R^2 และ RPD ที่สูงขึ้น ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินรวม ชุดตัวอย่างที่ 1-3 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ มีค่า R^2 (0.20-0.45) และ RPD (1.12-1.35) ซึ่งต่ำกว่าแบบจำลองที่สร้างจากชุดตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (ชุดตัวอย่างที่ 4-6) ซึ่งมีค่า R^2 และค่า RPD อยู่ในช่วง 0.90-0.93 และ 3.14-3.77 ตามลำดับ เนื่องจาก การปรับภาวะของตัวอย่างทำให้ได้ค่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่หลากหลาย และมีการกระจายของจำนวนตัวอย่างที่ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การกระจายตัวของ

ข้อมูลยังคงเป็นแบบไม่สม่ำเสมอ เนื่องจาก การปรับภาวะของตัวอย่างทำให้การติดเชื้อของราและปริมาณอะฟลาทอกซินในอยู่ในระดับสูงมาก และเป็นสิ่งที่สังเกตได้ว่าแบบจำลองดังกล่าวสามารถทำนายค่าอะฟลาทอกซินที่มีอยู่ในระดับสูงได้แม่นยำ (ภาพที่ 4. 15) เช่นเดียวกับแบบจำลองที่ทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลืองที่สามารถทำนายได้แม่นยำเมื่อตัวอย่างมีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสูง แต่อย่างไรก็ตาม ในธรรมชาติ อาจจะไม่พบการปนเปื้อนในระดับนี้ ดังนั้น แบบจำลองที่สร้างขึ้นจึงเหมาะสำหรับการใช้ในงานวิจัยเท่านั้น เพื่อแสดงให้เห็นว่าการกระจายของตัวอย่างมีความสำคัญต่อความแม่นยำของแบบจำลอง การเลือกใช้ตัวอย่างที่มีการกระจายของค่าที่ต้องการวัดแบบสม่ำเสมอ (uniform distribution) จะทำให้ได้แบบจำลองที่มีค่าการทำนายที่ดี (ค่า R^2 และ RPD) ซึ่งแสดงถึงควมมีประสิทธิภาพของแบบจำลอง

5.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มด้วยวิธีซอฟต์แวร์อินดิเพนเดนตโมเดลลิ่งออฟคลาสอนาล็อก (soft independent modeling of class analogy, SIMCA) และการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square – discriminant analysis, PLS-DA) จากโปรแกรม Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) ซึ่งความสามารถในการจำแนกกลุ่มของแบบจำลองดูได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม สรุปได้ดังนี้

5.1.4.1 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด

จากการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดพบว่า วิธี PLS-DA ให้ผลการทำนายสูงกว่าแบบจำลองที่สร้างจากวิธี SIMCA โดยแบบจำลองที่ทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการทำนายเท่ากับ 97.18 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0-90 เปอร์เซ็นต์ และ 91-100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 82.63 เปอร์เซ็นต์

5.1.4.2 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลือง

แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลืองที่ดีที่สุดได้จากวิธี PLS-DA โดยแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของรา และแบบจำลองการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 95.71 และ 74.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.1.4.3 แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องตามปริมาณอะฟลาทอกซินรวม

แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูงกว่าวิธี SIMCA โดยแบบจำลองการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีและไม่มี การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินรวมมีค่าการทำนายเท่ากับ 94.84 เปอร์เซ็นต์ และแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินรวมน้อยกว่า และมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 87.79 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมดพบว่า แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องโดยรวมสูงกว่าแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี SIMCA โดยหลักการของวิธี SIMCA คือ การสร้างแบบจำลองของแต่ละกลุ่มแล้วค่อยนำแบบจำลองที่สร้างขึ้นไปทำนายตัวอย่างกลุ่มตนเองและกลุ่มอื่นๆ ซึ่งแบบจำลองจากวิธี SIMCA มักจะใช้สำหรับการอธิบายความแปรปรวนของตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม ไม่ได้เป็นวิธีสำหรับการจำแนกกลุ่มตัวอย่างโดยตรง ในขณะที่วิธี PLS-DA เป็นวิธีที่สร้างแบบจำลองสำหรับจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้โดยตรง (Ballabio และคณะ, 2009) โดยแบบจำลองจากวิธี PLS-DA นำตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมาสร้างเป็น 1 แบบจำลองเพื่อทำนายตัวอย่างทุกกลุ่ม ซึ่งความแม่นยำของแบบจำลองขึ้นอยู่กับค่าที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม ถ้าหากตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีค่าต่างกันอย่างชัดเจนจะได้ค่าการทำนายที่สูง เช่น แบบจำลองการแบ่งกลุ่มตัวอย่างมีและไม่มีการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคลิโนสีเขียวอมเหลืองมีค่าการทำนายที่สูงกว่าแบบจำลองการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา เท่ากับ 0-50 เปอร์เซ็นต์ และ 51-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างของแบบจำลอง PLS-DA ถ้าในแบบจำลองมีจำนวนตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของกลุ่มใดมากก็จะสามารถทำนายตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มนั้นได้อย่างแม่นยำ

5.2 การตรวจสอบการเจริญของ *A. flavus* และปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

5.2.1 การตรวจสอบการเจริญของ *A. flavus* บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว

5.2.1.1 ลักษณะเมล็ดข้าวกล้อง

ลักษณะเมล็ดข้าวกล้องที่มีการเจริญและไม่มีการเจริญของ *A. flavus* แสดงในภาพที่ 4.22 โดยสามารถมองเห็นเมล็ดที่มีการเจริญของ *A. flavus* ได้ด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจนเมื่ออายุการบ่มตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป

5.2.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

จากการศึกษาสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยและสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด ของข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญและมีของ *A. flavus* บนเมล็ดในแต่ละวันของการบ่มที่ได้จากการสแกนตัวอย่างด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR spectrometer) รุ่น NIRFlex N-500 (Buchi, Switzerland) วัดในระบบสะท้อนแบบแพร่ ในช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร พบว่าสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มีการเจริญของราและมีการเจริญของราบนเมล็ดในแต่ละวันของการบ่มมีรูปแบบที่เหมือนกัน (ภาพที่ 4.22) และสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด (ภาพที่ 4.23) มีพีคที่เด่นชัดจำนวน 10 พีค และมีพีคที่ต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างตัวอย่างที่ไม่มีการเจริญของราและมีการเจริญของราสูงสุดบนเมล็ดข้าวกล้อง เช่น พีคที่จำนวนคลื่น 5880 และ 4384 ต่อเซนติเมตร (1701 และ 2281 นาโนเมตร) สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของโครงสร้าง CH_3 ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบได้ในเส้นใย (fiber) และน้ำมัน (oil) ที่เป็นองค์ประกอบของข้าวกล้อง (Osborne และคณะ, 1993; Bagchi และคณะ, 2016) พีคที่จำนวนคลื่น 5712 ต่อเซนติเมตร (1751 นาโนเมตร) ซึ่งเป็นการสั่นสะเทือนของโครงสร้างหมู่ซัลไฟไฮไดรล (-SH) ที่เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน และพีคที่จำนวนคลื่น 5620 เซนติเมตร (1779 นาโนเมตร) เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างเซลลูโลส (Osborne และคณะ, 1993) และเมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างแบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) กับสเปกตรัมจากการสแกนตัวอย่างแบบหลายเมล็ด (whole kernel) พบว่า สเปกตรัมของตัวอย่างเมล็ดเดี่ยวมีพีคที่ต่างกันชัดเจนระหว่างเมล็ดที่มีการเจริญและไม่มีการเจริญของรา ซึ่งในสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างแบบหลายเมล็ดก็พบความแตกต่างของพีคที่ปรากฏบนเส้นสเปกตรัมเช่นกันแต่ยังไม่ชัดเจน โดยเฉพาะที่จำนวนคลื่นเท่ากับ 5620 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างเซลลูโลส จากผลการทดลองพบว่า มีการดูดซับของคลื่นที่พีคนี้สูงในข้าวเมล็ดเดี่ยวที่ไม่มี

การเจริญของรา ในขณะที่ข้าวเมล็ดเดี่ยวที่มีการเจริญของรามีการดูดซับของฟีดดังกล่าวต่ำ แสดงถึงการลดลงของปริมาณเซลลูโลสในเมล็ดข้าวที่มีการเจริญของรา ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ระบุว่า *A. flavus* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อช่วยให้ราเจริญในแหล่งอาหารที่มีเซลลูโลสได้ (Olutiola, 1976; Ojumu และคณะ, 2003; Murad และคณะ, 2013)

5.2.1.3 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

แบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของราด้วยวิธี SIMCA ให้ค่าการทำนายในช่วง 62.96-75.93 เปอร์เซ็นต์ และแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าการทำนายสูงกว่า โดยแบบจำลองสามารถทำนายตัวอย่างในแต่ละกลุ่มได้แม่นยำด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องเท่ากับ 81.48 และ 88.89 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมเท่ากับ 85.19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์สูงแสดงว่าแบบจำลองสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ

5.2.2 การตรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 บนข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยว

5.2.2.1 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

จากการสแกนตัวอย่างด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น NIRFlex N-500 (Buchi, Switzerland) ด้วยระบบสะท้อนแบบแพร่ ที่ช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 5, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด (ภาพที่ 4.25 และ 4.26 ตามลำดับ) พบว่า สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีรูปแบบที่เหมือนกัน และเห็นพีคชัดเจนขึ้นเมื่อสเปกตรัมผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองทุกๆ 11 จุด โดยมีพีคที่เด่นชัดจำนวน 11 พีค เช่น ที่ช่วงจำนวนคลื่น 6296, 5884, 5620, 5488, 5252, 4860, 4384, 4328 และ 4260 ต่อเซนติเมตร (1588, 1700, 1779, 1822, 1904, 2058, 2281, 2311 และ 2347 นาโนเมตร) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะในโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของข้าวกล้อง เช่น แป้ง กลูโคส CH_3 เซลลูโลส และโปรตีน (Osborne และคณะ, 1993)

5.2.2.2 แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

จากแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวทั้งหมดพบว่า แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA ให้ค่าการทำนายที่สูงกว่าวิธี SIMCA โดยแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 98.15 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลการแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ และมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม เท่ากับ 93.75 จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มของตัวอย่างข้าวกล้องเมล็ดเดี่ยวค่าจากแบบจำลองที่สร้างจากวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวมสูง แสดงว่าแบบจำลองดังกล่าวสามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่มทั้งหมดพบว่า วิธี PLS-DA ให้ค่าการทำนายที่สูงกว่าแบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี SIMCA ซึ่งการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PLS-DA เป็นการนำตัวอย่างจากทุกกลุ่มมาสร้างเป็น 1 แบบจำลองเพื่อทำนายตัวอย่างชุดทำนายของแต่ละกลุ่ม โดยปัจจัยที่มีผลต่อความแม่นยำของแบบจำลอง คือ จำนวนตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลอง โดยแบบจำลอง PLS-DA ที่ใช้จำนวนตัวอย่างไม่เท่ากันจะทำนายแม่นยำเฉพาะตัวอย่างกลุ่มที่มีจำนวนมากกว่า

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาใช้เพื่อให้วิเคราะห์สารพิษจากราได้อย่างรวดเร็ว แทนการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม เช่น วิธี ELISA วิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง และวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี เนื่องจาก เทคนิคนี้เป็นวิธีการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง (non-destructive) รวดเร็ว มีต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม และไม่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ (Quintelas และคณะ, 2015) ซึ่งแบบจำลองที่ได้ในงานวิจัยฉบับนี้ส่วนใหญ่มีค่าการทำนายที่สูงทั้งแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และแบบจำลองเพื่อการแบ่งกลุ่ม มีงานวิจัยหลายงานที่ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ เช่น Delwiche (2003) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อจัดกลุ่มเมล็ดข้าวสาลีที่เป็นโรคต่างกันได้แบบจำลองที่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างแม่นยำ โดยมีค่าการทำนายเท่ากับ 95 และ 98 เปอร์เซ็นต์ Tripathi และคณะ (2009) ตรวจสอบอะฟลาทอกซินปี 1 ในพริกปนโดยใช้ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-NIR) ได้แบบจำลองที่มีค่า R^2 เท่ากับ 96.7 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์แบบรวดเร็วได้ Siripatrawan และคณะ (2015) ที่ติดตามการเจริญของราบนเมล็ดข้าวกล้องโดยใช้คลื่นในช่วงวิซิเบิล (visible) และช่วงเนียร์อินฟราเรด ได้แบบจำลองที่มีค่า R^2 เท่ากับ 0.97 ซึ่งสามารถใช้ทำนายการติดเชื้อของราบนเมล็ดข้าวได้ Senthilkumar และคณะ (2016) แบ่งกลุ่มข้าวสาลีที่ปนเปื้อนราและโอคราทอกซินเอด้วยเทคนิค

เนียร์อินฟราเรดและ hyperspectral imaging ได้แบบจำลองที่มีค่าการทำนายแม่นยำ เท่ากับ 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เนื่องจาก เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่รวดเร็วและไม่ทำลายตัวอย่าง จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา และการเกษตร โดยนำมาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของสินค้าเพื่อประหยัดเวลาและลดต้นทุนการผลิต เช่น การคัดแยกคุณภาพ ขนาด และความหวานของผลไม้ รวมไปถึงการตรวจสอบความเสียหายที่เกิดจากราในผลิตภัณฑ์การเกษตรด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อตรวจหาสารปนเปื้อนที่มีปริมาณต่ำ คือ มีความไวของการวิเคราะห์ต่ำ (poor sensitivity) เมื่อใช้ในการวิเคราะห์สารเคมีที่ตกค้างในอาหาร เช่นเดียวกับสารพิษจากราในอาหาร (Teye และคณะ, 2013) ซึ่งแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้สามารถทำนายค่าองค์ประกอบทางเคมีในระดับสูงได้อย่างแม่นยำ ต่างกับการทำนายค่าองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในระดับต่ำ ดังนั้น การปรับปรุงให้เทคนิคนี้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์มากขึ้นจึงเป็นเรื่องสำคัญเพื่อใช้ในการตรวจหาสารปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากงานวิจัยนี้พบว่า การปรับภาวะของตัวอย่างทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคลนีสีเขียวอมเหลือง และปริมาณอะฟลาทอกซินรวมในตัวอย่างสูงขึ้น แต่การกระจายของตัวอย่างยังเป็นแบบไม่สม่ำเสมอ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้แบบจำลองที่ให้ผลการทำนายที่ดี จึงสรุปได้ว่า การเลือกตัวอย่างที่ดีเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพการทำนายของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สำหรับแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แบบจำลองที่สร้างด้วยวิธี PLS-DA มีค่าการทำนายที่แม่นยำกว่าวิธี SIMCA โดยปัจจัยที่มีผลต่อความแม่นยำของแบบจำลอง คือ จำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในแต่ละกลุ่มที่ใช้สร้างแบบจำลอง และผลจากการสแกนข้าวกล้องแบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) ทำให้เห็นความแตกต่างของพีคที่ปรากฏในสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่ไม่มีและมีการเจริญของราได้ชัดเจนกว่าการสแกนตัวอย่างแบบหลายเมล็ดรวมกัน (whole kernel) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยทั้งหมดนี้เป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาแบบจำลองเนียร์อินฟราเรดต่อไปเพื่อให้ได้แบบจำลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

รายการอ้างอิง

- Abdullah, N., Nawawi, A. & Othman, I. (2000). Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity (a w). *Journal of Stored Products Research*, 36(1), 47-54.
- Agag, B. I. (2004). Mycotoxins in foods and feeds: 1-aflatoxins. *Assiut University Bulletin of Environmental Researches*, 7(1), 173-205.
- Asghar, M. A., Iqbal, J., Ahmed, A. & Khan, M. A. (2014). Occurrence of aflatoxins contamination in brown rice from Pakistan. *Iranian Journal of Public Health*, 43(3), 291.
- Atkins, S. D. & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, 45(1), 3-15.
- Aydin, A., Aksu, H. & Gunsen, U. (2011). Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. *Environmental Monitoring and Assessment*, 178(1-4), 271-280.
- Babu, G. R., Prasad, M. G. & Prasad, T. (2011). Isolation and Quantification of Aflatoxin from *Aspergillus flavus* Infected Rice. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 5(1), 16-24.
- Babu, P. D., Subhasree, R. S., Bhagyaraj, R. & Vidhyalakshmi, R. (2009). Brown Rice- Beyond the Color Reviving a Lost Health Food - A Review. *American-Eurasian Journal of Agronomy*, 2(2), 67-72.
- Bagchi, T. B., Sharma, S. & Chattopadhyay, K. (2016). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. *Food Chemistry*, 191, 21-27.
- Ballabio, D. & Todeschini, R. (2009). Multivariate classification for qualitative analysis. In, (pp. 83-104): Elsevier: Burlington, MA, USA.
- Bansal, J., Pantazopoulos, P., Tam, J., Cavlovic, P., Kwong, K., Turcotte, A. M., Lau, B. P. Y. & Scott, P. M. (2011). Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(6), 767-774.

- Barrett, J. R. (2005). Liver cancer and aflatoxin: new information from the Kenyan outbreak. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), A837.
- Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A. & Marocco, A. (2005). Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8128-8134.
- Brereton, R. G. & Lloyd, G. R. (2014). Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, 28(4), 213-225.
- Cen, H. & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 72-83.
- Chase L. E., Brown D. L., Bergstrom G. C. & Murphy S.C. (2013). Aflatoxin M1 in Milk. [online]. Available from: <http://www.ansci.cornell.edu/pdfs/2013.Aflatoxin.Facs.pdf> [20 September 2014].
- Chen, Y.-C., Liao, C.-D., Lin, H.-Y., Chiueh, L.-C. & Shih, D. Y.-C. (2013). Survey of aflatoxin contamination in peanut products in Taiwan from 1997 to 2011. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(3).
- Contreras-Medina, L. M., Espinosa-Calderon, A., Fernandez-Jaramillo, A. A., Duarte-Galvan, C., Torres-Pacheco, I., Millan-Almaraz, J. R., Muñoz-Huerta, R. F. & Guevara-Gonzalez, R. G. (2013). Characteristics of Mycotoxin Analysis Tools for Tomorrow: INTECH Open Access Publisher.
- Conzen, J.-P. (2006). Multivariate Calibration. A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry (2 ed.). Germany: Bruker Optik GmbH.
- Coppock, R. W., Christian, R. R. G. & Jacobsen, B. J. (2012). Chapter 88 - Aflatoxins. In R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology (Second Edition)*, (pp. 1181-1199). Boston: Academic Press.
- Cousin, M. A., Riley, R. T. & Pestka, J. J. (2005). Foodborne mycotoxins: chemistry, biology, ecology, and toxicology: Caister Academic Press: Norfolk, UK.

- Delwiche, S. R. (2003). Classification of scab-and other mold-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy. *Transactions of the ASAE*, 46(3), 731.
- Dhanasekaran, D., Panneerselvam, A., Thajuddin, N. & Shanmugapriya, S. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals: INTECH Open Access Publisher.
- European Commission. (2010). Commission Regulation (EC) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of The European Union L50*, 8-12.
- Fanse, H. A. & Christensen, C. M. (1970). Invasion by storage fungi of rough rice in commercial storage and in the laboratory. *Phytopathology*, 60(2), 228-231.
- Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. & de la Roza-Delgado, B. (2009). Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry*, 113(2), 629-634.
- Frank, I. E. & Lanteri, S. (1989). Classification models: discriminant analysis, SIMCA, CART. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 5(3), 247-256.
- Fredlund, E., Thim, A. M., Gidlund, A., Brostedt, S., Nyberg, M. & Olsen, M. (2009). Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. *Food Additives & Contaminants*, 26(4), 527-533.
- Gautam, A. K., Gupta, H. & Soni, Y. (2012). Screening of fungi and mycotoxins associated with stored rice grains in Himachal Pradesh. *International Journal of Theoretical and Applied Sciences*, 4(2), 128-133.
- Georgiadou, M., Dimou, A. & Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, 26(2), 580-586.
- Ghasemi-Kebria, F., Joshaghani, H., Taheri, N. S., Semnani, S., Aarabi, M., Salamat, F. & Roshandel, G. (2013). Aflatoxin contamination of wheat flour and the risk of esophageal cancer in a high risk area in Iran. *Cancer Epidemiology*, 37(3), 290-293.

- Goryacheva, I. Y. & De Saeger, S. (2011). Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection in food and feed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Hammami, W., Fiori, S., Al Thani, R., Kali, N. A., Balmas, V., Migheli, Q. & Jaoua, S. (2014). Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control*, 37, 177-181.
- Hernández Hierro, J. M., Garcia-Villanova, R. J., Rodríguez Torrero, P. & Toruno Fonseca, I. 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(3), 751-756.
- Huang, H., Yu, H., Xu, H. & Ying, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 303-313.
- Hussain, A., Ali, J. & Shafqatullah. (2011). Studies on contamination level of aflatoxins in Pakistani rice. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 33(4), 481-484.
- IARC. (2002). some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 82.
- IARC. (2012). Chemical agents and related occupations: a review of human carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100 F, 682.
- Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A. L., Veneziano, A. & Rastrelli, L. (2011). Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. *Food Control*, 22(12), 1905-1910.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., Jinap, S. & Rashid, U. (2014). Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. *Food Control*, 35(1), 223-226.
- Jager, A. V., Tedesco, M. P., Souto, P. & Oliveira, C. A. F. (2013). Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33(1), 87-92.

- Jamrógiewicz, M. (2012). Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 1-10.
- Jie, D., Xie, L., Rao, X. & Ying, Y. (2014). Using visible and near infrared diffuse transmittance technique to predict soluble solids content of watermelon in an on-line detection system. *Postharvest Biology and Technology*, 90, 1-6.
- Kamkar, A., Khaniki, G. R. J. & Alavi, S. A. (2011). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Ardebil of Iran. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 8(2), 123.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713-722.
- Klich, M. A. & Pitt, J. I. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(1), 99-108.
- Konietzny, U. & Greiner, R. (2003). The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(4), 283-300.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. & Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1595-1612.
- Kralj Cigić, I. & Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 62-115.
- Lai, X., Zhang, H., Liu, R. & Liu, C. (2015). Potential for aflatoxin B 1 and B 2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 176-180.
- Leslie, J. F. & Logrieco, A. (2014). *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*: Wiley.
- Li, R., Kawamura, S., Fujita, H. & Fujikawa, S. (2013). Near-infrared Spectroscopy for Determining Grain Constituent Contents at Grain Elevators. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 6(1), 20-26.

- Liu, D., Zeng, X.-A. & Sun, D.-W. (2013). NIR Spectroscopy and Imaging Techniques for Evaluation of Fish Quality—A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(8), 609-628.
- Liu, Z., Gao, J. & Yu, J. (2006). Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Products Research*, 42(4), 468-479.
- Long, D. S., Engel, R. E. & Siemens, M. C. (2008). Measuring grain protein concentration with in-line near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal*, 100(2), 247-252.
- Lupo, A., Roebuck, C., Dutcher, M., Kennedy, J. & Abouzied, M. (2010). Validation Study of a Rapid ELISA for Detection of Aflatoxin in Corn. *Journal of AOAC International*, 93(2), 587-599.
- Magan, N. (1993). Early detection of fungi in stored grain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32(1-3), 145-160.
- Mahjoub, M., Movahhed, S. & Chenarbon, H. A. (2014). Effective parameters on angle of repose, internal and external friction coefficient in two wheat varieties (Behrang and Shirudi). *International Journal of Biosciences (IJB)*, 5(9), 117-124.
- Majeed, S., Iqbal, M., Asi, M. R. & Iqbal, S. Z. (2013). Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*, 58(3), 446-450.
- Masood, M., Iqbal, S. Z., Asi, M. R. & Malik, N. (2015). Natural occurrence of aflatoxins in dry fruits and edible nuts. *Food Control*, 55, 62-65.
- Melfsen, A., Hartung, E. & Haeussermann, A. (2013). Robustness of near-infrared calibration models for the prediction of milk constituents during the milking process. *Journal of Dairy Research*, 80(01), 103-112.
- Miller, J. D. (1995). Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research*, 31(1), 1-16.
- Mirghani, M. E. S., Man, Y. B. C., Jinap, S., Baharin, B. S. & Bakar, J. (2001). A new method for determining aflatoxins in groundnut and groundnut cake using Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(10), 985-992.

- Moscetti, R., Haff, R. P., Aernouts, B., Saeys, W., Monarca, D., Cecchini, M. & Massantini, R. (2013). Feasibility of Vis/NIR spectroscopy for detection of flaws in hazelnut kernels. *Journal of Food Engineering*, 118(1), 1-7.
- Mostafa, A., Armin, A., Hamid, P. & Reza, A. M. (2012). Rapid Detection Methods for Analysis of Fungi and Mycotoxins in Agriculture Products. *Research Journal of Recent Sciences*, 1, 90-98.
- Murad, H. A. & Azzaz, H. E. D. H. (2013). Cellulase Production from Rice Straw by *Aspergillus flavus* NRRL 552. *Science International*, 1(4), 103-107.
- Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 38-46.
- Nisa, A., Zahra, N. & Hina, S. (2014). Detection of Aflatoxins in Rice Samples. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 49(3), 189-194.
- Ojumu, T. V., Solomon, B. O., Betiku, E., Layokun, S. K. & Amigun, B. (2003). Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal of Biotechnology*, 2(6), 150-152.
- Ok, H. E., Kim, D. M., Kim, D., Chung, S. H., Chung, M.-S., Park, K. H. & Chun, H. S. (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control*, 37, 284-291.
- Olutiola, P. O. (1976). Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 67(2), 265-268.
- Osborne, B. G. (2006). Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Osborne, B. G. & Fearn, T. (1986). Near infrared spectroscopy in food analysis. England: Longman Scientific and Technical.
- Osborne, B. G., Fearn, T. & Hindle, P. H. (1993). Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis: Longman scientific and technical.
- Pascale, M. N. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*(117), 15-25.

- Pedreschi, F., Segtnan, V. H. & Knutsen, S. H. (2010). On-line monitoring of fat, dry matter and acrylamide contents in potato chips using near infrared interactance and visual reflectance imaging. *Food Chemistry*, 121(2), 616-620.
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A. & Pavlović, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754-766.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O. & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96-136.
- Pietri, A., Rastelli, S., Mulazzi, A. & Bertuzzi, T. (2012). Aflatoxins and ochratoxin A in dried chestnuts and chestnut flour produced in Italy. *Food Control*, 25(2), 601-606.
- Piotrowska, M., Biernasiak, J. & Slizewska, K. (2013). Mycotoxins in cereal and soybean-based food and feed: INTECH Open Access Publisher.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. & Diane, A. (2009). Fungi and food spoilage: Methods for Isolation, Enumeration and Identification (Vol. 519): Springer.
- Pittet, A. (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 96(6), 424-444.
- Porep, J. U., Kammerer, D. R. & Carle, R. (2015a). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 211-230.
- Porep, J. U., Mattes, A., Nikfardjam, P., Kammerer, D. R. & Carle, R. (2015b). Implementation of an on-line near infrared/visible (NIR/VIS) spectrometer for rapid quality assessment of grapes upon receipt at wineries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 69-79.
- Porep, J. U., Mrugala, S., Nikfardjam, M. S. P. & Carle, R. (2015c). Online Determination of Ergosterol in Naturally Contaminated Grape Mashes Under Industrial Conditions at Wineries. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1455-1464.
- Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G. & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83(2), 175-186.

- Prietto, L., Moraes, P. S., Kraus, R. B., Meneghetti, V., Fagundes, C. A. A. & Furlong, E. B. (2015). Post-harvest operations and aflatoxin levels in rice (*Oryza sativa*). *Crop Protection*, 78, 172-177.
- Quintelas, C., Mesquita, D. P., Lopes, J. A., Ferreira, E. C. & Sousa, C. (2015). Near-infrared spectroscopy for the detection and quantification of bacterial contaminations in pharmaceutical products. *International Journal of Pharmaceutics*, 492(1), 199-206.
- Rahmani, A., Jinap, S. & Soleimany, F. (2009). Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 202-251.
- Razzazi-Fazeli, E., Reiter, E. V. & Saeger, S. d. (2011). Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments: Woodhead Publishing Ltd.
- Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(8), 1109-1143.
- Reiter, E. V., Vouk, F., Böhm, J. & Razzazi-Fazeli, E. (2010). Aflatoxins in rice—a limited survey of products marketed in Austria. *Food Control*, 21(7), 988-991.
- Richard, J. L. (2008). DISCOVERY OF AFLATOXINS AND SIGNIFICANT HISTORICAL FEATURES. *Toxin Reviews*, 27(3-4), 171-201.
- Rigó, K., Varga, J., Tóth, B., Téren, J., Mesterházy, Á. & Kozakiewicz, Z. (2002). Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48(1), 9-16.
- Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A. & Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(3), 683-700.
- Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M. & Evans, R. W. (2010). MYCOTOXINS: AN OVERVIEW ON THEIR QUANTIFICATION METHODS. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 79-86.

- Salguero-Chaparro, L. & Peña-Rodríguez, F. (2014). On-line versus off-line NIRS analysis of intact olives. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 363-369.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O. & Frisvad, J. C. (2004). Methods for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Santini, A. & Ritieni, A. (2013). Aflatoxins: Risk, Exposure and Remediation: INTECH Open Access Publisher.
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z. & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161(2), 168-175.
- Schwartzbord, J. R. & Brown, D. L. (2015). Aflatoxin contamination in Haitian peanut products and maize and the safety of oil processed from contaminated peanuts. *Food Control*, 56, 114-118.
- Senthilkumar, T., Jayas, D. S., White, N. D. G., Fields, P. G. & Gräfenhan, T. (2016). Detection of fungal infection and Ochratoxin A contamination in stored barley using near-infrared hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 147, 162-173.
- Shah, M., Bhatt, C. & Dave, J. (2016). Temperature Dependent NIR Spectroscopic Analysis for Food Grain Samples. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(9).
- Shahin, M. A. & Symons, S. J. (2012). Detection of fusarium damage in Canadian wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 6(1-4), 3-11.
- Shanakht, H., Shahid, A. A. & Ali, S. W. (2014). CHARACTERIZATION OF FUNGAL MICROBIOTA ON RICE GRAINS FROM LOCAL MARKETS OF LAHORE. *Journal of Hygienic Engineering & Design*, 9, 35-40.
- Shenderoy, C., Shmulevich, I., Alchanatis, V., Egozi, H., Hoffman, A., Ostrovsky, V., Lurie, S., Arie, R. B. & Schmilovitch, Z. e. (2010). NIRS detection of moldy core in apples. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 79-86.

- Shephard, G. S. & Saeger, S. d. (2011). Chromatographic separation techniques for determination of mycotoxins in food and feed. Cambridge, UK: Woodhead publishing limited.
- Singh, C. B. & Jayas, D. S. (2011). Spectroscopic techniques for fungi and mycotoxins detection. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Siripatrawan, U. & Makino, Y. (2015). Monitoring fungal growth on brown rice grains using rapid and non-destructive hyperspectral imaging. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 93-100.
- Siruguri, V., Kumar, P. U., Raghu, P., Rao, M. V. V., Sesikeran, B., Toteja, G. S., Gupta, P., Rao, S., Satyanarayana, K., Katoch, V. M., Bharaj, T. S., Mangat, G. S., Sharma, N., Sandhu, J. S., Bhargav, V. K. & Rani, S. (2012). Aflatoxin contamination in stored rice variety PAU 201 collected from Punjab, India. *The Indian Journal of Medical Research*, 136(1), 89-97.
- Tansakul, N., Limsuwan, S., Böhm, J., Hollmann, M. & Razzazi-Fazeli, E. (2013). Aflatoxins in selected Thai commodities. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 6(4), 254-259.
- Tassaneeyakul, W., Razzazi-Fazeli, E., Porasuphatana, S. & Bohm, J. (2004). Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. *Mycopathologia*, 158(2), 239-244.
- Teye, E., Huang, X.-y. & Afoakwa, N. (2013). Review on the Potential Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the Measurement of Chemical Residues in Food. *American Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 1-8.
- Tripathi, S. & Mishra, H. N. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*, 20(9), 840-846.
- Trung, T. S., Bailly, J. D., Querin, A., Le Bars, P. & Guerre, P. (2001). Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152(7), 555-560.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S. & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168-180.

- Varga, J., Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57-80.
- Verma, R. J. (2004). Aflatoxin cause DNA damage. *International Journal of Human Genetics*, 4(4), 231.
- Wacoo, A. P., Wendi, D., Vuzi, P. C. & Hawumba, J. F. (2014). Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. *Journal of Applied Chemistry*, 2014.
- Waenlor, W. & Wiwanitkit, V. (2003). Aflatoxin contamination of food and food products in Thailand: an overview. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34 Suppl 2, 184-190.
- Wang, D., Dowell, F. E., Ram, M. S. & Schapaugh, W. T. (2003). Classification of fungal-damaged soybean seeds using near-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Properties*, 7(1), 75-82.
- Wang, W., Heitschmidt, G. W., Ni, X., Windham, W. R., Hawkins, S. & Chu, X. (2014). Identification of aflatoxin B 1 on maize kernel surfaces using hyperspectral imaging. *Food Control*, 42, 78-86.
- Wang, W., Lawrence, K. C., Ni, X., Yoon, S.-C., Heitschmidt, G. W. & Feldner, P. (2015). Near-infrared hyperspectral imaging for detecting Aflatoxin B 1 of maize kernels. *Food Control*, 51, 347-355.
- Williams, P. (2007). Near-infrared Technology-Getting the Best Out of Light. In). Nanaimo B.C., Canada PDK project Inc.
- Workman, J. J. (2008). NIR spectroscopy calibration basics. *Practical Spectroscopy Series*, 35, 123.
- Xu, H., Qi, B., Sun, T., Fu, X. & Ying, Y. (2012). Variable selection in visible and near-infrared spectra: application to on-line determination of sugar content in pears. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 142-147.
- Yunus, A. W., Razzazi-Fazeli, E. & Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins*, 3(6), 566-590.
- Zaboli, F., Khosravi, A. R., Gholampourazizi, I., Norouzi, M. & Erfanmanesh, A. (2010). A Study of Aflatoxins Production in Rice Bran from Mazandran Province, Northern Iran. *Global Veterinaria*, 5(1), 39-44.

- Zheng, M. Z., Richard, J. L. & Binder, J. (2006). A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. *Mycopathologia*, 161(5), 261-273.
- Zhuang, Z., Lohmar, J. M., Satterlee, T., Cary, J. W. & Calvo, A. M. (2016). The Master Transcription Factor mtfA Governs Aflatoxin Production, Morphological Development and Pathogenicity in the fungus *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 8(1), 29.
- Zwir-Ferenc, A. & Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique—trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677-690.
- กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2558). สถานการณ์การผลิตและการตลาดข้าวของโลก ปีการผลิต 2558/2559 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.ricethailand.go.th/home/images/august.pdf>. [22 กันยายน 2558].
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2555). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : ข้าว มาตรฐานเลขที่ มกษ 4004-2555 ไว้เป็นมาตรฐานทั่วไป.
- กระทรวงพาณิชย์. (2556). ประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่อง กำหนดให้ข้าวหอมมะลิไทยเป็นสินค้ามาตรฐานและมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิไทย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2556.
- กระทรวงสาธารณสุข. (2529). ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4(2). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://iodinethailand.fda.moph.go.th/food_54/data/announ_moph/P98.pdf [13 สิงหาคม 2557].
- กล้า เมธากานต์. (2552). ข้าวกล้องงอก มหัศจรรย์พันธุ์ข้าวไทย. กรุงเทพฯ: Happy to do.
- กัลยา วานิชย์บัญชา. (2552). การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร. กรุงเทพฯ ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จूरिरัตน์ ปาคำสี. (2554). รายงานสรุปการกักกัน/ปฏิเสธนำเข้าสินค้าอาหารไทยในตลาดญี่ปุ่น ปี 2554. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://fic.nfi.or.th/japan-desk/upload/file/pdf/JP-2554.pdf>. [8 พฤษภาคม 2559].
- จूरिरัตน์ ปาคำสี. (2555). รายงานสรุปการกักกัน/ปฏิเสธนำเข้าสินค้าอาหารไทยในตลาดญี่ปุ่นปี 2555. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://fic.nfi.or.th/japan-desk/upload/file/pdf/JP-2555.pdf>. [8 พฤษภาคม 2559].
- เจษฎา โพธิ์สม. (2556). การพัฒนาเทคนิคการวัดสมบัติเชิงความร้อน ความชื้นปริมาณน้ำมันและค่าความร้อนของซีวมวลโดยวิธีไม่ทำลายด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี: กรณีศึกษา เนื้อใน

- เมสึดสบูดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร คณะ
วิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เฉลิมวุฒิ สถษติกุล. (2549). ข้าวกล้องสด. กรุงเทพฯ: พีเพิล มีเดีย.
- ชุติมา ภูมิวนิชชา. (2549). การศึกษาระดับอะฟลาทอกซิน B1 ต่อความปลอดภัยของอาหารแพะนม
โดยวิธี ELISA. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ดุจดาว ชูน้อย. (2555). การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในพริกป่นที่จำหน่ายในตลาดสดเขตเทศบาล
นครเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาโภชนศาสตร์ศึกษา บัณฑิต
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ธงชัย สุวรรณสิขณณ์ & ปิติพร ฤทธิเรืองเดช. (2552). การวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ: ภาควิชา
พัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี.
- ธนาคารแห่งประเทศไทย. (2556). สถานการณ์สินค้าเกษตรสำคัญ ปี 2556 และแนวโน้มปี 2557.
[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http:// www.bot.or.th](http://www.bot.or.th) [28 กรกฎาคม 2557].
- น้ำทิพย์ เรืองดี. (2555). การผลิตเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มเพื่อสุขภาพจากข้าวเหนียวกำลังงอกโดย
เทคโนโลยีเอ็กซ์ทราซัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- นิตดา หงษ์วิวัฒน์. (2552). ข้าวกล้อง ข้าวอก มหัศจรรย์อาหารต้านโรค. กรุงเทพฯ: แสงแดด.
- นิพนธ์ ตั้งคณานุกรักษ์. (2545). หลักการพื้นฐานของเทคนิคอินฟราเรดย่านใกล้สเปกโทรสโกปี การ
อบรมเชิงปฏิบัติการ การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy
เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการ
เกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โนทัย กิตติกำแพง. (2554). การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และโอครา
ทอกซินในเมล็ดข้าวไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บดินทร์ บุตรอินทร์. (2555). วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เรื่อง สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาท็อก
ซิน ปีที่ 45 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม 2555 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
[http://www.ams.cmu.ac.th/journal/images/stories/journal/201205/20120501.p
df.](http://www.ams.cmu.ac.th/journal/images/stories/journal/201205/20120501.pdf) [21 กรกฎาคม 2557].

- บรรจบ ชุณหสวัสติกุล. (2553). ข้าวกล้องดีต่อสุขภาพ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaicam.go.th/index.php?option=com_attachments&task=download&id=276 [23 กรกฎาคม 2557].
- รินภา พุทธิง. (2556). การตรวจหาการปนเปื้อนราและอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- รุ่งนภา ไกลถิ่น. (2555). การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Aspergillus flavus* ในเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- รุ่งนภา ไกลถิ่น, ธวัชชัย เพชรแก้ว, ปาริชาติ เทียนจุมพล, เกวลิน คุณาศักดากุล, สงวนศักดิ์ ธนาพร พูนพงษ์ & สุชาดา เวียร์ศิลป์. (2554). การตรวจหาเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อ *Aspergillus flavus* เข้าทำลายด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) 361-364.
- วารุณี ธนะแพสย์ & ศุมาพร เกษมสำราญ. (2552). ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ NIRS: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร.
- ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ & อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. (2552). เครื่องมือและอุปกรณ์สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. : ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. (2545). ขั้นตอนการสร้างสมการประเมินค่าทางเคมีและการทดสอบสมการในเทคนิคสเปกโตรสโกปีย่านใกล้อินฟราเรด สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. (2552). หลักการพื้นฐานของสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. (2557). อะฟลาท็อกซิน (Aflatoxin) [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/aflatoxin-2.pdf> [20 กันยายน 2557].
- สนธิสุข ธีระชัยชยติ. (2554). วารสารอุตสาหกรรมเกษตรพระจอมเกล้า เรื่อง การตรวจสอบคุณภาพผลไม้โดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี ปีที่ 3 ฉบับที่ 1. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

http://www.kmitl.ac.th/agroij/EJournal/Vol3._No.1_Jan-Jun_2011/EJV3N1_p44-52.pdf. [18 สิงหาคม 2557].

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). (2558). กรรมวิธีการสีข้าว. [ออนไลน์].

แหล่งที่มา: http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice_product/rice-product4_1.html. [8 ธันวาคม 2558].

สำนักงานมาตรฐานสินค้า กรมการค้าต่างประเทศ. (2557). ข้าวหอมมะลิไทย ปริมาณและมูลค่าที่ส่งออกเป็นรายประเทศตามใบรับรองมาตรฐานสินค้า ในเดือน ธันวาคม 2557 ตั้งแต่เดือน มกราคม - ธันวาคม 2557. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<http://ocs.dft.go.th/UploadDoc/MSUploadFiles/MONCHAI0/2015/15012614414009-รายประเทศ%20เดือน%20ธันวาคม%202557.pdf>. [27 กันยายน 2558].

สำนักงานมาตรฐานสินค้า กรมการค้าต่างประเทศ. (2559a). สถิติการส่งออกสินค้าข้าวหอมมะลิไทยเปรียบเทียบ เดือนธันวาคม 2558. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<http://ocs.dft.go.th/UploadDoc/MSUploadFiles/paradew/2016/16020313522552-สถิติการส่งออกสินค้าข้าวหอมมะลิไทยเปรียบเทียบ%20เดือนธันวาคม%202558.xls>. [20 มีนาคม 2559].

สำนักงานมาตรฐานสินค้า กรมการค้าต่างประเทศ. (2559b). สถิติการส่งออกสินค้าข้าวหอมมะลิไทยรายประเทศ เดือนธันวาคม 2558. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<http://ocs.dft.go.th/UploadDoc/MSUploadFiles/paradew/2016/16020313514637-สถิติการส่งออกสินค้าข้าวหอมมะลิไทยรายประเทศ%20เดือนธันวาคม%202558.xls>. [20 มีนาคม 2559].

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2557). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี2558. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

http://www.oae.go.th/download/document_tendency/journalofecon2558.pdf. [21 กันยายน 2558].

สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ข้าว. (2558). อุตสาหกรรมข้าวของประเทศไทย ปี 2558-2559 :

ทิศทางและศักยภาพการผลิตข้าวไทย (วันที่ 20 พฤษภาคม 2558). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

http://www.dft.go.th/LinkClick.aspx?fileticket=p6iLTgSSD_4%3D&tabid=401.

[22 กันยายน 2558].

สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการค้าข้าว. (2552). มหัตถรย์ข้าวไทย ข้าวกล้องงอก. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

- อนงค์ บิณฑวิท. (2546). สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพฯ โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. (2552). การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์: ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อมรา ชินภูติ & ศุภรา อัครสาระกุล. (2552). การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินปี 1 และสารโคราทอกซินเอในข้าวกล้องและข้าวขาว. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://anchan.lib.ku.ac.th/agnet/bitstream/001/5091/5/rice.journal.v3n2.2009.C03.pdf>.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2556). ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารสำเร็จรูป PDA 39 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายที่ใช้เตรียมสารแขวนลอยสปอร์

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

2. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์

นำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6.67 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 93.33 มิลลิลิตร

3. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

ดูดสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเติมเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 (น้ำปลอดประจุผสมกับอะซิโตไนโตรล์ และเมทานอลในอัตราส่วน 6:2:2) จนครบปริมาตร เพื่อให้ได้สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

1. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อ}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

2. การคำนวณสารละลายอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ 5 ความเข้มข้น

เตรียมสารละลายอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 5, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาตรของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ต้องเติม ตามสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ	C_1	คือ ความเข้มข้นของสารละลายก่อนเจือจาง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
	C_2	คือ ความเข้มข้นของสารละลายหลังเจือจาง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
	V_1	คือ ปริมาตรของสารละลายก่อนเจือจาง (มิลลิลิตร)
	V_2	คือ ปริมาตรของสารละลายหลังเจือจาง (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง.1 สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างข้าวกล้องที่ใช้ในการทดลอง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
กรุงเทพมหานคร	12
ประจวบคีรีขันธ์	7
ร้อยเอ็ด	1
รวม	20



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล: นางสาวพันธุ์ทิพย์ วงศ์ทิพย์

วัน เดือน ปีเกิด: 29 ตุลาคม พ.ศ. 2532

ประวัติการศึกษา 2554: ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาจุลชีววิทยา
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประวัติการศึกษา 2555: เข้ารับการศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา
ทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ปัจจุบัน: 56/169 อาคารนันทน์ภัสเรสซิเดนส์ ตึก K ห้อง 1212 ซ. ลาดพร้าว 18
แยก 2 แขวงจอมพล เขตจตุจักร กทม. 10900

ผลงานเผยแพร่:

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
“TSB 2015: The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and
International Conference” ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรม Mandarin
Hotel Bangkok by Centre Point กรุงเทพฯ ในหัวข้อเรื่อง “Rapid detection of fungi and
aflatoxigenic fungi in brown rice using near infrared spectroscopy”