การตรวจหาการปนเปื้อนราและโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร
โดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

นางสาวพัณณ์ชิตา ธราดลศิริฐิติกุล

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 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE DETECTION OF FUNGAL CONTAMINATION AND OCHRATOXIN A IN GREEN COFFEE BEANS USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Miss Panchita Taradolsirithitikul

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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาการปนเปื้อนราและโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
โดย	นางสาวพัณณ์ชิตา ธราดลศิริฐิติกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ศุมาพร เกษมสำราญ)

พัณณ์ชิตา ธราดลศิริฐิติกุล : การตรวจหาการปนเปื้อนราและโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (THE DETECTION OF FUNGAL CONTAMINATION AND OCHRATOXIN A IN GREEN COFFEE BEANS USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์, 147 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ และโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณในการทำนายปริมาณความชื้น การปนเปื้อนรา และโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ถูกสร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* section *Nigri* และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* section *Circumdati*) กับข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนคลื่นเนียร์อินฟราเรดบนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (เส้นสเปกตรัมที่ผ่านและไม่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์) โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) แบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทำนายปริมาณความชื้นสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (mean normalization) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; *r*) เท่ากับ 0.970 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบแบบจำลอง (standard error of prediction; *SEP*) เท่ากับ 0.176% และค่า bias เท่ากับ -0.012% แบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (range normalization) (*r* = 0.835, *SEP* = 15.205%, bias = 0.718%) แบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* section *Nigri* สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (*r* = 0.865, *SEP* = 19.051%, bias = -1.478%) และแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* section *Circumdati* สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธุ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธุ์ทุกๆ 21 จุด (*r* = 0.972, *SEP* = 7.704%, bias = 0.351%) สำหรับแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ พบว่า แบบจำลองในการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* section *Circumdati* ด้วยวิธี partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มโดยรวมถูกต้องที่สุด เท่ากับ 100% แบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณในการทำนายระดับการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอสร้างจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิธีวิเคราะห์ทางเคมี (ปริมาณโอคราทอกซินเอ) กับข้อมูลเชิงแสงที่ผ่านและไม่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ ที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 3 แบบ (เมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด เมล็ดกาแฟสารบด และสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร) โดยใช้วิธี PLSR แบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธุ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธุ์ทุกๆ 21 จุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias อยู่ที่ 0.814, 1.965 µg/kg และ 0.358 µg/kg ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ พบว่า แบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 µg/kg และมากกว่า 5 µg/kg ที่สร้างจากวิธี PLS-DA มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงที่สุด เท่ากับ 100%

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	....
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	....

5572060323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: NEAR INFRARED SPECTROSCOPY / OCHRATOXIN A / ASPERGILLUS SECTION NIGRI / ASPERGILLUS SECTION CIRCUMDATI / GREEN COFFEE BEANS

PANCHITA TARADOLSIRITHITIKUL: THE DETECTION OF FUNGAL CONTAMINATION AND OCHRATOXIN A IN GREEN COFFEE BEANS USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY. ADVISOR: ASST. PROF. CHEEWANUN DACHOUPAKAN SIRISOMBOON, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PANMANAS SIRISOMBOON, Ph.D., 147 pp.

This research aims to apply near infrared spectroscopy (NIRS) for the detection of total fungal, ochratoxigenic *Aspergillus* and ochratoxin A contamination in green coffee beans. Quantitative models for predicting moisture content, fungal contamination and ochratoxin A contamination in green coffee bean samples were developed from the correlation between laboratory data (percentage of moisture content, percentage of total fungal infection, percentage of *Aspergillus* section *Nigri* infection and percentage of *Aspergillus* section *Circumdati* infection) and optical data (raw spectra and mathematically pretreated spectra) from NIR scanning on the green coffee bean samples by using the method of partial least square regression (PLSR). The best model for predicting moisture content was developed from the mean normalization pretreated spectra, with the coefficient of correlation (*r*) of 0.970, standard error of prediction *(SEP)* of 0.176% and bias of -0.012%. The best model for predicting total fungal contamination was developed from the range normalization pretreated spectra (*r* = 0.835, *SEP* = 15.205%, bias = 0.718%). The best model for predicting *Aspergillus* section *Nigri* contamination was developed from the multiplicative scatter correction pretreated spectra (*r* = 0.865, *SEP* = 19.051%, bias = -1.478%). The best model for predicting *Aspergillus* section *Circumdati* contamination was developed from the second derivative by Savitzky-Golay method of 21 points pretreated spectra (*r* = 0.972, *SEP* = 7.704%, bias = 0.351%). For qualitative models, the classification models of *Aspergillus* section *Circumdati* contamination in green coffee bean samples developed using partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) provided the highest percentage of overall correct classification of 100%. The quantitative models analysis of ochratoxin A contamination were developed from the correlation between chemical analysis data (ochratoxin A concentration) and optical data (raw spectra and mathematically pretreated spectra) obtained using NIR scanning on 3 types of green coffee bean samples (whole green coffee beans, grounded green coffee beans and crude extract from green coffee beans) by using the method of PLSR. The best model for predicting ochratoxin A contamination in green coffee bean samples was developed from optical data of whole green coffee bean samples with the first derivative by Savitzky-Golay method of 21 points pretreated spectra, with the *r*, *SEP* and bias of 0.814, 1.965 μg/kg and 0.358 μg/kg, respectively. For qualitative analysis, the classification models of ochratoxin A contamination (≤5 and >5 μg/kg) developed using PLS-DA provided the highest percentage of overall correct classification of 100%.

Department:	Microbiology	Student's Signature	....
Field of Study:	Industrial Microbiology	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 26 และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมถึงช่วยตรวจทานแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์ ในฐานะที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้ความรู้ด้านเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ให้การอนุเคราะห์เครื่องมือทดสอบเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ และยังกรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ เพื่อปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และดร.ศุมาพร เกษมสาราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคุณสุนันท์ รังศรีกาญจน์ส่อง ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในการอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานวิจัยนี้

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

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา นางสาวพันธุ์ทิพย์ วงศ์ทิพย์ และนางสาวชลธิชา สีเหนี่ยง สมาชิกห้องวิจัย 1904/14 เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาที่น่ารักทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัย รวมถึงให้ข้อคิดเห็น และคำแนะนำ ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกประทับใจ มีกำลังใจ และมีช่วงเวลาที่ดีตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยเป็นที่ปรึกษาอย่างดี คอยสนับสนุนช่วยเหลือ เป็นแรงใจและให้กำลังใจมาโดยตลอดการทำงานวิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์ของผู้วิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้แต่โดยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญภาพ .... ฐ

สารบัญตาราง .... ถ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 5

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม 6

2.1 กาแฟ 6

2.2 องค์ประกอบของผลกาแฟ 7

2.3 องค์ประกอบทางเคมีของกาแฟ 8

2.4 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ 11

2.5 สถานการณ์การผลิตและการค้าเมล็ดกาแฟ 13

2.6 สารพิษจากรา 17

2.7 โอคราทอกซินเอ 18

2.7.1 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ 18

2.7.2 ราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ 19

2.7.3 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร 21

2.7.4 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร 22

2.7.5 โอคราทอกซินเอในกาแฟ 24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.8 การตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหาร 26
2.8.1 วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาแบบดั้งเดิม 26
1) Direct examination 26
2) Direct plating 26
3) Dilution plating 27
4) การจัดจำแนกและระบุชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 27
2.8.2 วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล 28
2.9 การตรวจหาสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร 28
2.9.1 การสกัดสารพิษจากราออกจากอาหาร (mycotoxin extraction) 28
2.9.2 การกำจัดสิ่งรบกวน (clean up) 29
2.9.3 การวิเคราะห์สารพิษจากรา (analysis) 30
1) วิธีทางเคมีวิเคราะห์ 30
2) วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา 31
2.10 เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) 32
2.11 หลักการพื้นฐานของเนียร์อินฟราเรดเสปกโทรสโกปี 34
2.12 เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ 37
2.13 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี 39
2.13.1 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์ 39
2.13.2 การวิเคราะห์ข้อมูล 42
2.13.3 ขั้นตอนการทำแคลิเบรชัน 44
2.13.4 ขั้นตอนการทำแวลิเดชัน 45
2.13.5 ค่าทางสถิติที่ใช้พิจารณาความแม่นยำของแบบจำลอง 46
2.14 ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี 49

หน้า

2.15 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในอุตสาหกรรม 50
2.16 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและสารพิษจาราที่ปนเปื้อน ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร 53
2.17 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในกาแฟ 54
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ 57
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 57
เคมีภัณฑ์ 60
วิธีการดำเนินงานวิจัย 61
3.1 การเก็บตัวอย่าง 61
3.2 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราทั้งหมดและราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 61
3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง 61
3.2.2 การสแกนตัวอย่างโดยใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรด 63
3.2.3 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 64
3.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 64
3.2.3.2 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่าง 64
3.2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 66
3.2.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ 68
3.3 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 68
3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง 70
3.3.2 การสแกนตัวอย่างโดยใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรด 70
3.3.3 การตรวจหาโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.3.4 การทดสอบสมรรถนะการวัดปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารของผู้วิจัย (laboratory performance) 73

3.3.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอเชิงปริมาณ 73

3.3.6 การสร้างแบบจำลองเพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพ 73

บทที่ 4 ผลการทดลอง 74

4.1 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราทั้งหมด และราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 74

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 74

4.1.1.1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 74

4.1.1.2 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 75

4.1.1.3 ความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ 77

4.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด 78

4.1.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 85

4.1.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์ความชื้น 86

4.1.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด 88

4.1.3.3 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล Aspergillus โคโลนีสีดำ 90

4.1.3.4 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล Aspergillus โคโลนีสีเหลือง 92

4.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ 94

4.2 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 99

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 99

4.2.1.1 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 99

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

4.2.1.2 การทดสอบสมรรถนะการวัดปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารของผู้วิจัย (laboratory performance) 101
4.2.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด 103
4.2.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 108
4.2.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด 109
4.2.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด 114
4.2.3.3 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร 116
4.2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ 119
4.3 การพิจารณาระดับโมเลกุลจากกราฟ regression coefficient 123
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 127
5.1 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราทั้งหมด และราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 127
5.1.1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 127
5.1.2 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 127
5.1.3 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด 128
5.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 129
5.1.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ 130
5.2 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 131
5.2.1 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 131
5.2.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด 132

หน้า

5.2.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 132

5.2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ 134

รายการอ้างอิง 136

ภาคผนวก... 154

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 161

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของผลกาแฟ [ก] ภาพตัดขวางผลกาแฟมองจากด้านบน (De Castro และคณะ, 2006), [ข] ภาพจำลองผลกาแฟ (Farah และคณะ, 2015)............ 7

ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก [ก], กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้ง [ข] http://bonaverde.com/mag/en/magazine/coffee-4/coffee-guide/production/coffee-processing/ 12

ภาพที่ 2.3 เมล็ดกาแฟชนิดต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแต่ละขั้นตอน กาแฟเชอร์รี่ [ก], กาแฟกะลา [ข], เมล็ดกาแฟสาร [ค], กาแฟคั่ว [ง].. 12

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอ (Gupta, 2011) 18

ภาพที่ 2.5 ตำแหน่งของรังสีเนียร์อินฟราเรดในสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า (ดัดแปลงมาจาก ศุมาพร เกษมสำราญ (2552)) 33

ภาพที่ 2.6 รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาของรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร (ดัดแปลงมาจาก ศุมาพร เกษมสำราญ (2552)) 34

ภาพที่ 2.7 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างน้ำตาลผลึก (a), น้ำตาลผลึกที่ผ่านการบด (b), แป้งสาลี (c) และแป้งสาลีที่ผ่านการทำให้แห้ง (d) แกนนอนแสดงความยาวคลื่นในหน่วยนาโนเมตร และแกนตั้งแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเมื่อวัดแสงที่สะท้อน (reflectance) (Pasquini, 2003)... 35

ภาพที่ 2.8 องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (ดัดแปลงมาจาก ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ (2552))... 38

ภาพที่ 2.9 รูปแบบวิธีการวัดด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี; การส่องผ่าน (transmittance) [ก], การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) [ข], การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) [ค], อินเทอร์แอกแทนซ์ (interactance) [ง], การส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงแสง (transmittance through scattering medium) [จ] (S = sample, I_p = incident light, I_s = light comes from the sample) (Pasquini, 2003).. 39

ภาพที่ 2.10 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง [ก] และผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง [ข] ของตัวอย่างข้าวที่ระดับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา

ทั้งหมดที่ต่างกัน ในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร (Dachoupakan Sirisomboon และคณะ, 2013) 41

ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี 43

ภาพที่ 2.12 สเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเมล็ดกาแฟสาร [ก] และเมล็ดกาแฟคั่ว [ข] (Páscoa และคณะ, 2015) 55

ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาการปนเปื้อนราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี 62

ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่าง [ก], เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform - Near infrared spectrometer; FT-NIR) รุ่น MPA [ข] 63

ภาพที่ 3.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี 69

ภาพที่ 3.4 ภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างที่มีการวางเครื่องมือที่ทำให้เกิดการสะท้อน (transflection device) [ก], การสแกนสารสกัดหยาบด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ [ข] 72

ภาพที่ 4.1 การแจกแจงความถี่ของปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด 200 ตัวอย่างย่อย 74

ภาพที่ 4.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ด้วยวิธี direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DG18 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยภาพ [ก] แสดงการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และภาพ [ข] แสดงการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง 75

ภาพที่ 4.3 การแจกแจงความถี่ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (total fungi) ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ (black fungi) และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง (yellow fungi) จากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา รวมทั้งหมด 232 ตัวอย่างย่อย 77

ภาพที่ 4.4 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำสุด (7.51 เปอร์เซ็นต์) และสูงสุด (14.17 เปอร์เซ็นต์) 79

ภาพที่ 4.5 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ 79

ภาพที่ 4.6 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ 80

ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ 80

ภาพที่ 4.8 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำสุด (7.51 เปอร์เซ็นต์) และสูงสุด (14.17 เปอร์เซ็นต์) (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3) 81

ภาพที่ 4.9 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3) 82

ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3) 82

ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3) 83

ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (mean normalization) 88

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (range normalization) 90

ภาพที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ 92

ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด 94

ภาพที่ 4.16 การกระจายตัวของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีระดับการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ 98

ภาพที่ 4.17 การแจกแจงความถี่ของปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอตามธรรมชาติ และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอรวมทั้งหมด 224 ตัวอย่างย่อย 100

ภาพที่ 4.18 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร 104

ภาพที่ 4.19 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร 104

ภาพที่ 4.20 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร 105

ภาพที่ 4.21 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3) 105

ภาพที่ 4.22 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3) 106

ภาพที่ 4.23 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ค่า a ถึง g แสดงในตารางที่ 4.19) 106

ภาพที่ 4.24 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด 111

ภาพที่ 4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด 114

ภาพที่ 4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารบดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด 116

ภาพที่ 4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมดั้งเดิมของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร 118

ภาพที่ 4.28 การกระจายตัวของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม 122

ภาพที่ 4.29 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการปรับค่าเป็นมาตรฐาน (mean normalization) เพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ที่ PCs = 6 125

ภาพที่ 4.30 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการปรับค่าเป็นมาตรฐาน (range normalization) เพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ที่ PCs = 6 125

ภาพที่ 4.31 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด เพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ที่ PCs = 6 126

ภาพที่ 4.32 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด เพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ที่มีการทดสอบแบบจำลองโดยวิธี full cross validation ที่ PCs = 6 126

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟและเมล็ดกาแฟคั่วของกาแฟอะราบิกาและโรบัสตา 10

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องดื่มกาแฟที่ชงจากเมล็ดกาแฟที่มีการคั่วระดับกลาง ... 10

ตารางที่ 2.3 ผลผลิตกาแฟของประเทศผู้ผลิตสำคัญ 10 อันดับแรก ปี พ.ศ. 2556/57 13

ตารางที่ 2.4 ผลผลิตรายภาคของเมล็ดกาแฟในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2556/57 14

ตารางที่ 2.5 การส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และผลิตภัณฑ์กาแฟของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2558 15

ตารางที่ 2.6 การนำเข้าเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์กาแฟของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2558 16

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างราที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษจากราชนิดต่างๆ 17

ตารางที่ 2.8 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ 22

ตารางที่ 2.9 ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารแต่ละชนิด 23

ตารางที่ 2.10 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร เมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูป 25

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างวิธีทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราชนิดต่างๆ 31

ตารางที่ 2.12 แนวทางในการอธิบายความสามารถและการนำแบบจำลองไปใช้ด้วยค่า r และ r^2 ... 47

ตารางที่ 2.13 แนวทางในการอธิบายประสิทธิภาพและการนำแบบจำลองไปใช้ด้วยค่า RPD และ RER 48

ตารางที่ 2.14 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดในด้านต่างๆ 52

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 76

ตารางที่ 4.2 การผลิตโอคราทอกซินเอของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 78

ตารางที่ 4.3 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (ภาพที่ 4.8-4.11) (Osborne และคณะ, 1993) 84

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลอง และกลุ่มทำนาย 86

ตารางที่ 4.5 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์) 87

ตารางที่ 4.6 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์) 89

ตารางที่ 4.7 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์) 91

ตารางที่ 4.8 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์) 93

ตารางที่ 4.9 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA 95

ตารางที่ 4.10 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA 95

ตารางที่ 4.11 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA 96

ตารางที่ 4.12 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA 96

ตารางที่ 4.13 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA 96

ตารางที่ 4.14 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA 97

ตารางที่ 4.15 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA 97

ตารางที่ 4.16 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA 97

ตารางที่ 4.17 ปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 100

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารของผู้วิจัย (laboratory performance) 102

ตารางที่ 4.19 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร (ภาพที่ 4.23) (Osborne และคณะ, 1993) 107

ตารางที่ 4.20 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทำนาย 109

ตารางที่ 4.21 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) 110

ตารางที่ 4.22 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ใช้สำหรับการสร้างแบบจำลอง 112

ตารางที่ 4.23 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่มีการทดสอบแบบจำลองด้วยวิธี full cross validation (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) 113

ตารางที่ 4.24 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) 115

ตารางที่ 4.25 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) 117

ตารางที่ 4.26 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีและไม่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี SIMCA 120

ตารางที่ 4.27 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีและไม่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLS-DA 120

ตารางที่ 4.28 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี SIMCA 121

ตารางที่ 4.29 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLS-DA........ 121

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A, OTA) เป็นสารพิษจากราที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราสายใยในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โอคราทอกซินเอเป็นพิษต่อไต ระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอ่อนในครรภ์มารดา และระบบประสาท (Varga และคณะ, 2006) International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้โอคราทอกซินเอเป็นสารที่อาจก่อมะเร็งได้ในมนุษย์ (IARC, 1993) สารพิษจากราชนิดนี้พบปนเปื้อนในอาหาร อาหารสัตว์ และผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ถั่ว องุ่น เมล็ดโกโก้ เครื่องเทศ ผลไม้อบแห้ง เบียร์ ไวน์ รวมทั้งเมล็ดกาแฟ กาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูป (SCOOP, 2002)

กาแฟเป็นพืชเครื่องดื่มที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย มูลค่าการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และผลิตภัณฑ์กาแฟในปี พ.ศ. 2557 สูงกว่า 356.30 ล้านบาท ในปีดังกล่าวมีพื้นที่เพาะปลูกกาแฟมากกว่า 263,602 ไร่ แหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ใน ภาคเหนือและภาคใต้ สายพันธุ์ที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์โรบัสตา ซึ่งนิยมปลูกทางภาคใต้ รองลงมาคือพันธุ์อะราบิกาที่มีแหล่งผลิตสำคัญในภาคเหนือ (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) สำหรับการบริโภคภายในประเทศนั้นมีแนวโน้มเติบโตมากขึ้น คนไทยนิยมดื่มกาแฟเป็นประจำเพิ่มมากขึ้น เฉลี่ยคนละ 1 กรัมต่อวัน (FAOSTAT, 2009) จึงทำให้ความต้องการบริโภคกาแฟภายในประเทศสูงขึ้น กาแฟจึงเป็นสินค้าเกษตรที่สำคัญ ทั้งเพื่อบริโภคในประเทศและเพื่อการส่งออกต่างประเทศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กาแฟเป็นหนึ่งในพืชเกษตรที่พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ การควบคุมขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดกาแฟที่ไม่เหมาะสม เช่น การตากแห้งที่ไม่เพียงพอและการเก็บที่ไม่ถูกต้อง ทำให้เมล็ดกาแฟมีความเสี่ยงสูงที่จะถูกเข้าทำลายด้วยรา โดยเฉพาะราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ ราที่เป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. carbonarius* ซึ่งพบปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟจากหลายพื้นที่ทั่วโลก (Noonim และคณะ, 2008; Vecchio และคณะ, 2012) และราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ได้แก่ *A. westerdijkiae, A. ochraceus,* และ *A. steynii* ที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟเช่นกัน (Noonim และคณะ, 2008)

สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาตัวอย่างเมล็ดกาแฟพันธุ์โรบัสตาจากพื้นที่เพาะปลูกภาคใต้และกาแฟพันธุ์อะราบิกาจากภาคเหนือ พบว่าตัวอย่างกาแฟจากทั้งสองพื้นที่มีการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* section *Nigri* โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างกาแฟโรบัสตามีการปนเปื้อนของ *A. carbonarius* มากที่สุด ซึ่งเป็นราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด ในขณะที่กาแฟอะราบิกาจากภาคเหนือพบรา *Aspergillus* section *Circumdati* เป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะ *A. westerdijkiae* ตัวอย่างกาแฟ 98 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ซึ่งในตัวอย่างกาแฟอะราบิกาพบปริมาณโอคราทอกซินเอตั้งแต่ระดับ < 0.6 – 5.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และตัวอย่างกาแฟโรบัสตาพบตั้งแต่ระดับ 1 – 27 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Noonim และคณะ, 2008)

จากความเป็นพิษและอุบัติการณ์ปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดทั่วโลก ทำให้ในหลายประเทศออกข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรรวมทั้งกาแฟ เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้มีโอคราทอกซินเอในกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูปได้ไม่เกิน 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (European Commission, 2006) สำหรับประเทศไทยมีประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสตา (มกษ. 5700-2552) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552a) และอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552b) ให้มีการตรวจปริมาณโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร (green coffee beans) และพบได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การตรวจพบราที่ผลิตโอคราทอกซินเอและการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอตั้งแต่วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหรือระหว่างกระบวนการผลิตเป็นสิ่งสำคัญที่จะลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์จากเมล็ดกาแฟ วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารนั้น นิยมใช้วิธีทางจุลชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ เช่น การนับจำนวนรา การคัดแยกราจากตัวอย่างอาหาร การจำแนกและระบุชนิดของราที่คัดแยกได้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Pitt และคณะ, 2009) ซึ่งวิธีเหล่านี้ใช้เวลานานและต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ นอกจากนี้ ยังพบปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานการทดสอบและข้อผิดพลาดที่เกิดจากการปนเปื้อนระหว่างทดสอบ (Atkins และคณะ, 2004) ปัจจุบันวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างสูง เพราะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถจัดจำแนกและระบุชนิดของราและยังสามารถตรวจสอบราที่ปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรได้ (Niessen, 2007) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดบาง

ประการ เช่น ความซับซ้อนของวิธีการในการวิเคราะห์ สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ อีกทั้งการเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด (Santos และคณะ, 2010)

การวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหาร แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนสำคัญ คือ (1) การสกัดสารพิษจากราออกจากอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้ตัวทำละลายในการสกัด เช่น อะซีโตไนไตรล์ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (2) การ clean up ซึ่งนิยมใช้ Immunoaffinity column (IAC) เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ได้ซึ่งจะทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำเพิ่มมากขึ้น (Flajs และคณะ, 2009) และ (3) การวิเคราะห์สารพิษจากรา โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์และภูมิคุ้มกันวิทยา วิธีทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้กันโดยทั่วไป เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography (GC) (Visconti และคณะ, 1999) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำและความไวสูง แต่มีค่าใช้จ่ายสูง สารเคมีที่ใช้เป็นพิษต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ อีกทั้งต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ในการวิเคราะห์ที่มีความเชี่ยวชาญ (Bellí และคณะ, 2002) การวิเคราะห์สารพิษจากราโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น วิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่มีความไวสูง สะดวก รวดเร็ว จึงเหมาะกับการใช้เป็นการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid screening) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ ELISA มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องใช้สารเคมี เอนไซม์ เครื่องมือหรือชุดสำเร็จที่มีความจำเพาะเจาะจง น้ำยาที่ใช้ทดสอบไม่มีความเสถียรเมื่อมีการทดสอบเป็นระยะเวลานาน (Fernández-Ibañez และคณะ, 2009)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) เป็นการศึกษาการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสสารในช่วงความยาวคลื่น 800 – 2500 นาโนเมตร ซึ่งสสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับคลื่นเนียร์อินฟราเรดได้ คือ สสารที่โมเลกุลมีพันธะไฮโดรเจน โดยระดับการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะแสดงในรูปของเส้นสเปกตรัม เพื่อที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณต่อไป (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552) ปัจจุบันได้มีการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาใช้จริงในกลุ่มอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งอุตสาหกรรมอาหารและไม่ใช่อาหาร เช่น อุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอ หรืออุตสาหกรรมเคมี ปิโตรเคมีและพอลิเมอร์ ข้อดีของการใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรดในการวิเคราะห์ตัวอย่าง คือ เป็นการวัดคุณภาพของสินค้าโดยไม่ทำลายตัวอย่าง เพราะไม่ใช้สารเคมีในการทดสอบ สะดวก รวดเร็ว สามารถทำนายค่าทางเคมีได้หลาย ค่าในเวลาเดียวกัน (Berardo และคณะ, 2005)

ในอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตรนิยมใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ โดยใช้ตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่น ปริมาณความชื้น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดไขมัน (วารุณี ธนะแพสย์, 2552) หรือใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในด้านที่เฉพาะเจาะจง เช่น ใช้แยกความแตกต่างระหว่างเมล็ดข้าวโพดและถั่วเหลืองที่ปกติกับเมล็ดที่มีความเสียหาย (Esteve Agelet และคณะ, 2012) ใช้ทำนายคุณภาพของเนื้อวัวแบบทันทีในโรงฆ่าสัตว์ (De Marchi, 2013)

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น Berardo และคณะ (2005) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในข้าวโพด พบว่าสามารถใช้ทำนายการปนเปื้อนของรา *Fusarium verticillioides* ปริมาณของเออร์โกสเทอรอล และฟูโมไนซินบี 1 ได้อย่างแม่นยำด้วยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; r^2) เท่ากับ 0.78, 0.81 และ 0.78 ตามลำดับ Tripathi และคณะ (2009) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาทำนายระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่น โดยจากงานวิจัยสามารถสร้างแบบจำลองที่มีค่า r^2 เท่ากับ 0.98 ซึ่งสามารถใช้ทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่นในช่วง 15-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ Dachoupakan Sirisomboon และคณะ (2013) ได้รายงานความเป็นไปได้ที่จะใช้เนียร์อินฟราเรด สเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.668 และ 0.437 ตามลำดับ

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอและโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรสชาติเป็นเอกลักษณ์ เป็นที่นิยมบริโภค และมีมูลค่าการซื้อขายสูง วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีคุณสมบัติเด่น คือ สามารถวัดค่าคุณภาพและปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ภายในเวลารวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบไม่ถูกทำลาย อีกทั้งสามารถลดต้นทุนในการใช้สารเคมี ไม่เป็นพิษต่อวิ่งแวดล้อม จึงเหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกาแฟต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ และโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 กาแฟ

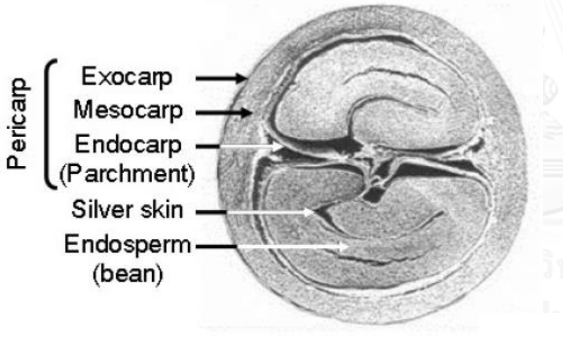
กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบันจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจโลก มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลกมีการปลูกกาแฟและส่งเป็นสินค้าออกที่สำคัญ (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2558) แต่เดิมกาแฟเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเอธิโอเปีย ทวีปแอฟริกา ซึ่งต่อมาถูกนำมาปลูกในประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศศรีลังกา โดยเฉพาะในประเทศบราซิล (กาญจน์มุนี ศรีวิศาลภพ, 2546)

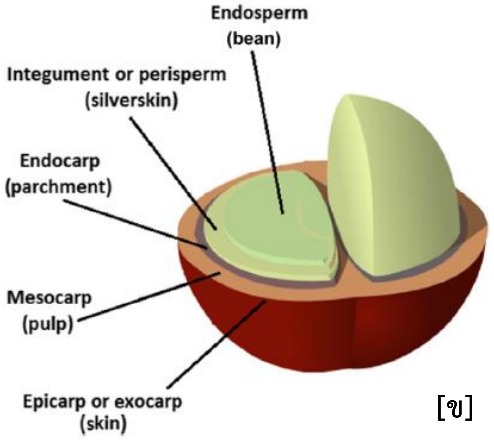
กาแฟจัดเป็นพืชวงศ์เข็ม (Family Rubiaceae) สกุลกาแฟ (Genus *Coffea*) ในสกุลนี้ประกอบไปด้วยพืชอีกหลายชนิดที่มีความสำคัญและนำมาบริโภคได้มีอยู่ 4 ชนิด คือ กาแฟอะราบิกา (Arabica coffee: *Coffea arabica*) กาแฟโรบัสตา (Robusta coffee: *Coffea canephora* var. *Robusta*) กาแฟเอกเซลซา (Excelsa coffee: *Coffea excelsa*) และกาแฟลิเบอริกา (Liberica coffee: *Coffea liberica*) กาแฟเอกเซลซาและกาแฟลิเบอริกาเป็นกาแฟที่ใช้ประโยชน์ในแง่ของการใช้เป็นแหล่งศึกษาพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ส่วนกาแฟอะราบิกาและกาแฟโรบัสตาเป็นกาแฟชนิดที่ที่นิยมศึกษาและมีความสำคัญในเชิงการค้า (ชวลิต กอสัมพันธ์, 2555)

กาแฟอะราบิกาเจริญได้ดีในที่ราบสูงซึ่งเป็นบริเวณที่อุณหภูมิไม่สูงมากนัก และลำต้นสามารถเจริญได้สูงสุดถึง 6 เมตร ร้อยละ 60 ของผลผลิตกาแฟทั่วโลกมาจากกาแฟชนิดนี้ สำหรับกาแฟโรบัสตาเจริญได้ดีในที่ราบต่ำซึ่งเป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงกว่า มีความทนทานต่อโรค และลำต้นสามารถเจริญได้สูงสุดถึง 10 เมตร แต่มีมูลค่าการซื้อขายและปริมาณผลผลผลิตต่ำกว่ากาแฟอะราบิกา (Farah และคณะ, 2015) ต้นกาแฟทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกัน คือ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นตรง มีกิ่งก้านแตกแผ่ออกโดยรอบ ตามข้อกิ่งมีใบสีเขียวเข้ม ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ดอกมีสีขาว เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบยาวปลายแหลมเรียงซ้อนกันและมีกลิ่นหอม ส่วนลักษณะที่แตกต่างกัน คือ ลำต้นของกาแฟโรบัสตาจะมีแขนง ในขณะที่ลำต้นของกาแฟอะราบิกานั้นไม่มีแขนง ต้นกาแฟจะให้ผลตั้งแต่อายุ 3 ปี ถึง 30-50 ปี ทั้งนี้ปริมาณผลที่ได้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุ สภาพดินฟ้าอากาศ และองค์ประกอบอื่นๆ (นิดดา หงษ์วิวัฒน์, 2550)

2.2 องค์ประกอบของผลกาแฟ

ผลกาแฟ (cherry coffee) มีลักษณะกลมหรือกลมรี ก้านผลสั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ผลกาแฟประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนของผนังผล (pericarp) และส่วนของเนื้อเมล็ด (perisperm) ผนังผลประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น ได้แก่ (1) ผนังผลชั้นนอก (exocarp หรือ epicarp หรือ skin) เริ่มแรกมีสีเขียว แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อผลสุกเต็มที่ (2) ผนังผลชั้นกลาง (mesocarp หรือ pulp) มีลักษณะเป็นเมือกๆ ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในปริมาณสูง ซึ่งจะเกาะติดอยู่กับผนังผลชั้นใน และ (3) ผนังผลชั้นใน (endocarp หรือ parchment) มีลักษณะแข็ง ทำหน้าที่ปกป้องเมล็ดที่อยู่ด้านใน ส่วนของเนื้อเมล็ดประกอบด้วย (1) silverskin ทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ด มีส่วนประกอบหลัก คือ พอลิแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โมโนแซ็กคาไรด์ โปรตีน และพอลิฟีนอล และ (2) เมล็ดจริง (endosperm หรือ seed หรือ bean) ประกอบไปด้วยเมล็ดที่มีลักษณะกลมรีคล้ายไข่ 2 เมล็ด (ภาพที่ 2.1) (De Castro และคณะ, 2006; Farah และคณะ, 2015)





ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของผลกาแฟ [ก] ภาพตัดขวางผลกาแฟมองจากด้านบน (De Castro และคณะ, 2006), [ข] ภาพจำลองผลกาแฟ (Farah และคณะ, 2015)

2.3 องค์ประกอบทางเคมีของกาแฟ

องค์ประกอบทางเคมีของกาแฟอาจเปลี่ยนแปลงตามสายพันธุ์และชนิดของกาแฟ เช่น เมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) เมล็ดกาแฟคั่ว (roasted coffee bean) หรือกาแฟที่ผ่านการชงแล้ว (brewed coffee) แต่อย่างไรก็ตามกาแฟทุกชนิดทุกสายพันธุ์มีองค์ประกอบที่คล้ายกัน (ตารางที่ 2.1) องค์ประกอบหลักที่พบในกาแฟ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ ลิพิด และโปรตีน องค์ประกอบรองที่พบในกาแฟ ได้แก่ สารประกอบจำพวก *N*-methyl เช่น คาเฟอีน (caffeine; *N*-methylxanthine) และไตรโกเนลไลน์ (trigonelline; *N*-methylnicotinic acid) กรดคลอโรจินิก (chlorogenic acids) น้ำตาลอิสระ โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งองค์ประกอบรองเหล่านี้เป็นสารสำคัญเนื่องจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดกลิ่นหอมของกาแฟ (Wei และคณะ, 2015) เมื่อกาแฟมีการผ่านกระบวนการ เช่น การคั่วกาแฟ หรือการชงกาแฟ สารบางชนิดในเมล็ดกาแฟอาจเปลี่ยนไป (ตารางที่ 2.1) ทั้งปริมาณที่อาจเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือสารประกอบมีการเปลี่ยนรูป เช่น เมล็ดกาแฟสารมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ที่ 50.0-55.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อผ่านการคั่ว พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงเหลือประมาณ 24.0-39.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเท่านั้น (Wei และคณะ, 2015) สารพอลิแซ็กคาไรด์อาจมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น เช่น อะราบิโนกาแล็กแตน แมนแนน และกลูแคน หรืออาจมีสารประกอบชนิดใหม่เกิดขึ้น เช่น กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) และเมลานอยดิน (melanoidins) ซึ่งจะพบในเมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วแล้วเท่านั้น เมื่อนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วแล้วไปชง พบว่า มีปริมาณสารเปลี่ยนแปลงไป (ตารางที่ 2.2) เช่น มีปริมาณคาเฟอีนโดยเฉลี่ยลดลงเหลือเพียง 50-380 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เท่านั้น (Farah, 2012)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารประกอบที่พบมากที่สุดในเมล็ดกาแฟสารโดยมีปริมาณถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยโพลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ อะราบิโนกาแล็กแตน (arabinogalactan) แมนแนน (mannan) และเซลลูโลส (cellulose) พอลิแซ็กคาไรด์ของกาแฟอะราบิกาและโรบัสตาประกอบด้วยโพลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้เช่นเดียวกัน แต่กาแฟอะราบิกามีปริมาณอะราบิโนกาแล็กแตนมากกว่าประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเมล็ดกาแฟไปคั่ว โครงสร้างและปริมาณของสารประกอบเหล่านี้จะเปลี่ยนไปอย่างมีนัยสำคัญ (Wei และคณะ, 2015)

ลิพิดเป็นสารประกอบที่พบรองลงมาจากพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols) สเตอรอล (sterols) และโทโคฟีรอล (tocopherols) อีกทั้ง ยังพบน้ำมันกาแฟ (coffee oil) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวก kaurene diterpenes ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 20 ของปริมาณลิพิดทั้งหมด ลิพิดส่วนใหญ่สะสมอยู่ในบริเวณ endosperm ของผลกาแฟ กาแฟอะราบิกามี

ปริมาณลิพิดประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่ากาแฟโรบัสตาที่มีปริมาณลิพิดเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ (Wei และคณะ, 2015)

โปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ เป็นสารประกอบไนโตรเจน (nitrogenous compounds) ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดกลิ่นหอมของกาแฟ การเกิดกลิ่นหอมของกาแฟและการเกิดสีน้ำตาลของเมล็ดกาแฟเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และกรดอะมิโน เปปไทด์ หรือโปรตีน ซึ่งเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปถึงขั้น condensation จะได้สารประกอบไนโตรเจนสีน้ำตาลที่เรียกว่า เมลานอยดิน (Wei และคณะ, 2015)

คาเฟอีน (caffeine; 1,3,7-*N*-trimethylxanthine) เป็นสารที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในกาแฟ เนื่องจากเป็นสารที่มีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางกายภาพและบ่งบอกถึงความขมของกาแฟ ปริมาณคาเฟอีนในกาแฟแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น กาแฟโรบัสตามีปริมาณคาเฟอีนประมาณ 2.2-2.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กาแฟอะราบิกามีปริมาณคาเฟอีนเพียง 0.6-1.2 เปอร์เซ็นต์ (Wei และคณะ, 2015)

ไตรโกเนลไลน์ในกาแฟแต่ละชนิดมีปริมาณต่างกัน กาแฟอะราบิกามีปริมาณไตรโกเนลไลน์มากกว่ากาแฟโรบัสตา ดังนั้น จึงใช้ความแตกต่างของปริมาณไตรโกเนลไลน์นี้ในการแบ่งแยกชนิดของกาแฟได้ ไตรโกเนลไลน์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระหว่างกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ โดยจะเปลี่ยนเป็น *N*-methylpyridium และกรดนิโคตินิก ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารที่ใช้ชี้วัดระดับการคั่วของเมล็ดกาแฟ (Wei และคณะ, 2015)

กรดคลอโรจินิกเป็นสารในกลุ่มเอสเตอร์ที่เกิดจาก quinic acid กับ *trans*-cinnamic acids (caffeic), *p*-coumaric และ ferulic acid กรดคลอโรจินิกที่พบในเมล็ดกาแฟส่วนใหญ่เป็นไอโซเมอร์ของ caffeoylquinic acids ได้แก่ 5-*O*-caffeoylquinic acid (5-CQA), 4-*O*-caffeoylquinic acid (4-CQA), and 3-*O*-caffeoylquinic acid (3-CQA) กรดคลอโรจินิกเป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอลซึ่งสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Wei และคณะ, 2015)

ซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ชนิดอื่นๆ ซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่พบมากที่สุดในเมล็ดกาแฟสารและยังเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบอีกหลายชนิด เช่น ฟูแรน (furans) แอลดีไฮด์ (aldehydes) และกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) สารเหล่านี้เป็นสารที่ส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของกาแฟ (Wei และคณะ, 2015)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟและเมล็ดกาแฟคั่วของกาแฟอะราบิกาและโรบัสตา

องค์ประกอบ	กาแฟอะราบิกา		กาแฟโรบัสตา	
	เมล็ดกาแฟ	เมล็ดกาแฟคั่ว	เมล็ดกาแฟ	เมล็ดกาแฟคั่ว
พอลิแซ็กคาไรด์	50.0-55.0	24.0-39.0	37.0-47.0	-
โอลิโกแซ็กคาไรด์	6.0-8.0	0-3.5	5.0-7.0	0-3.5
ลิพิด	12.0-18.0	14.5-20.0	9.0-13.0	11.0-16.0
กรดอะมิโนอิสระ	2.0	0	2.0	0
โปรตีน	11.0-13.0	13.0-15.0	11.0-13.0	13.0-15.0
กรดคลอโรจินิก	5.5-8.0	1.2-2.3	7.0-10.0	3.9-4.6
คาเฟอีน	0.9-1.2	0-1.0	1.6-2.4	0-2.0
ไตรโกเนลไลน์	1.0-1.2	0.5-1.0	0.6-0.8	0.3-0.6
กรดไขมัน	1.5-2.0	1.0-1.5	1.5-2.0	1.0-1.5
แร่ธาตุ	3.0-4.2	3.5-4.5	4.0-4.5	4.6-5.6
เมลานอยดิน	-	16.0-17.0	-	16.0-17.0

หน่วย : เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ที่มา: Wei และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องดื่มกาแฟที่ชงจากเมล็ดกาแฟที่มีการคั่วระดับกลาง

องค์ประกอบ	ปริมาณความเข้มข้น (มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)
ไฟเบอร์ที่ละลายน้ำได้ (soluble fiber)	200-800
โปรตีน	100
คาเฟอีน	50-380
ไตรโกเนลไลน์	40-50
ไขมัน	0.8
แร่ธาตุ	250-700
กรดคลอโรจินิก	35-500
เมลานอยดิน	500-1500
สารระเหย (volatile compounds)	-

ที่มา: Farah (2012)

2.4 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ

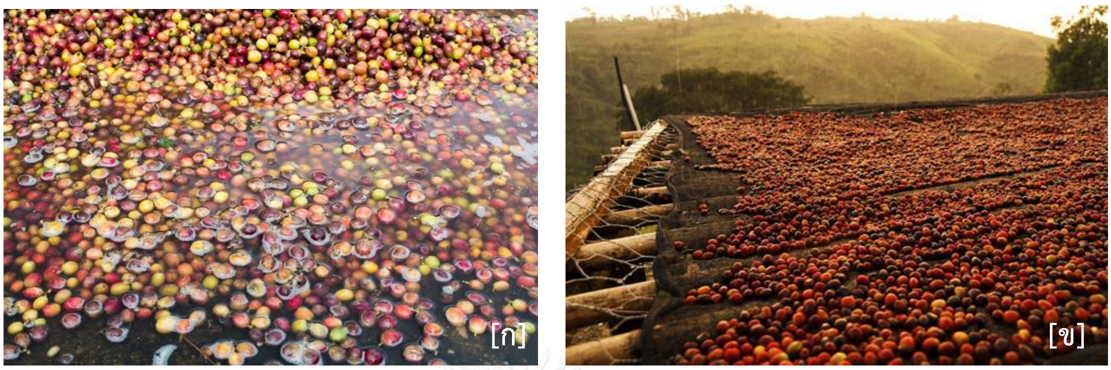
ต้นกาแฟจะเริ่มออกดอกหลังปลูกไปเป็นเวลา 2 ปี ดอกจะออกหลังจากผ่านการพักตัวจากสภาพอากาศแห้งแล้ง แล้วเริ่มบานหลังจากมีฝน ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณเดือนมีนาคมถึงเมษายนของทุกปี ในแต่ละปีต้นกาแฟที่ให้ผลผลิตแล้วต้องผ่านระยะพักตัว ระยะออกดอกติดผล ระยะที่ผลเจริญเติบโตจนกระทั่งผลสุกและเก็บเกี่ยว ระยะการเก็บเกี่ยวผลกาแฟอยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ และระยะที่ผลกาแฟติดอยู่บนต้น คือ ตั้งแต่ช่วงเดือนเมษายนจนกระทั่งเก็บเกี่ยว กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟหลังจากการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้เป็นเมล็ดกาแฟชนิดที่เรียกว่าเมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) นั้น โดยทั่วไปมี 2 กระบวนการ คือ กระบวนการแบบเปียก (wet process) และกระบวนการแบบแห้ง (dry process) (ชวลิต กอสัมพันธ์, 2555)

กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก (wet process) (ภาพที่ 2.2 [ก]) เป็นการนำผลกาแฟสุกที่เก็บจากต้น มีลักษณะผลสีแดงหรือเรียกว่าเชอร์รี่ (cherry) (ภาพที่ 2.3 [ก]) มาปอกเปลือกโดยนำเข้าเครื่องปอกเปลือก แล้วกำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีลักษณะเป็นเมือก โดยนำผลกาแฟที่ปอกเปลือกแล้วไปหมักในน้ำ เวลาที่ใช้ในการหมักขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและลักษณะของเมล็ดกาแฟ ซึ่งโดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 36-72 ชั่วโมง จากนั้น ล้างทำความสะอาดเมล็ดกาแฟที่ผ่านการหมักด้วยน้ำเปล่า คัดสิ่งเจือปน เมล็ดแตก ผลเขียว และเปลือกที่ติดมากับเมล็ดออก นำเมล็ดกาแฟไปล้างทำความสะอาดอีกครั้งแล้วนำไปตากแดดจนเมล็ดกาแฟแห้ง และระหว่างการตากแดดควรมีการเกลี่ยเมล็ดกาแฟทุกๆ ชั่วโมง เมล็ดกาแฟที่ผ่านขั้นตอนนี้แล้วเรียกว่ากาแฟกะลา (parchment coffee) (ภาพที่ 2.3 [ข]) หลังจากนั้นบรรจุกาแฟกะลาที่แห้งดีแล้วลงในกระสอบเพื่อรอการสีเป็นเมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) (ภาพที่ 2.3 [ค]) ต่อไป กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกจะให้เมล็ดกาแฟที่มีคุณภาพดี เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ง่าย อีกทั้งยังเชื่อว่ากระบวนการหมักกาแฟเป็นขั้นตอนที่เพิ่มกลิ่นและรสชาติของกาแฟ (พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์, 2531; ชวลิต กอสัมพันธ์, 2555)

กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้ง (dry process) (ภาพที่ 2.2 [ข]) เป็นการนำผลกาแฟสุกมาตากให้แห้งแล้วกะเทาะเปลือกออกด้วยเครื่องสีกาแฟเพื่อให้ได้เมล็ดกาแฟสาร

ชนิดของกาแฟเมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟนั้น แบ่งได้เป็น 4 ชนิด (ภาพที่ 2.3) คือ (1) กาแฟเชอร์รี่ (cherry coffee) คือ ผลกาแฟสุกที่มีลักษณะสีแดง (2) กาแฟกะลา (parchment coffee) คือ เมล็ดกาแฟที่ได้จากผลกาแฟสุกที่ผ่านการตากแห้งแล้ว ซึ่งจะมีการนำส่วนของเปลือกและเนื้อของผลออก แต่ยังคงมีผนังผลชั้นในหรือที่เรียกว่ากะลาติดอยู่ (3) กาแฟสาร หรือ

เมล็ดกาแฟ (green coffee) คือ กาแฟกะลาที่ผ่านการสีกะลาออกแล้ว และ (4) กาแฟคั่ว (roasted coffee) คือ กาแฟสารที่ผ่านการคั่ว ได้สีน้ำตาล มีกลิ่นหอมสามารถนำไปบดเป็นผงเพื่อชงเป็นเครื่องดื่มกาแฟต่อไป



ภาพที่ 2.2 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก [ก], กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้ง [ข]

http://bonaverde.com/mag/en/magazine/coffee-4/coffee-guide/production/coffee-processing/

http://oilslickcoffee.com/products/beloya

(สืบค้นเมื่อวันที่ 5 กรกฎาคม 2558)

ภาพที่ 2.3 เมล็ดกาแฟชนิดต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแต่ละขั้นตอน กาแฟเชอร์รี่ [ก], กาแฟกะลา [ข], เมล็ดกาแฟสาร [ค], กาแฟคั่ว [ง]

http://whatboundaries.com/blog2/kona-coffee-farm-wwoof-diary-3/

http://michaelkaiser.blogspot.com/2012/07/coffee-dry-milling-parchment-remover.html

http://www.huffingtonpost.com/india-mandelkern/coffee-history_b_4209452.html

https://www.masterappliance.com/blog/diy-homemade-gifts/13-08-26/heat-tool-applications-diy-coffee-roasting

(สืบค้นเมื่อวันที่ 5 กรกฎาคม 2558)

2.5 สถานการณ์การผลิตและการค้าเมล็ดกาแฟ

กาแฟเพาะปลูกได้ดีในบริเวณพื้นที่ใกล้เส้นศูนย์สูตร ที่เรียกกันว่า “Coffee belt” ซึ่งกาแฟที่สำคัญและนิยมปลูกเพื่อการค้ามี 2 ชนิด ได้แก่ กาแฟอะราบิกาและกาแฟโรบัสตา (ชวลิต กอสัมพันธ์, 2555) ในปี พ.ศ. 2556-2557 ทั่วโลก มีผลผลิตเมล็ดกาแฟสารรวมประมาณ 8.78 ล้านตัน (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) แหล่งเพาะปลูกกาแฟที่ใหญ่ที่สุดและมีผลผลิตต่อปีมากที่สุดของโลก ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2552-2557) ได้แก่ ประเทศบราซิล ซึ่งมีผลผลิตกาแฟในปี 2556/57 เท่ากับ 3.22 ล้านตัน รองลงมา ได้แก่ ประเทศเวียดนาม ซึ่งมีผลผลิตกาแฟในปีเดียวกัน เท่ากับ 1.74 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยในปี พ.ศ. 2549-2552 มีผลผลิตอยู่ในช่วง 50,442-56,315 ตัน แต่ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2552-2557) ประเทศไทยมีผลผลิตกาแฟที่ลดลง โดยในปี 2556/57 มีผลผลิตลดลงจากปี 2552/53 จาก 48,955 ตัน เป็น 38,463 ตัน หรือลดลงร้อยละ 5.88 ต่อปี เนื่องจากเกษตรกรเปลี่ยนไปปลูกยางพารา และปาล์มน้ำมัน ซึ่งให้ผลตอบแทนสูงกว่า (ตารางที่ 2.3) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558)

ตารางที่ 2.3 ผลผลิตกาแฟของประเทศผู้ผลิตสำคัญ 10 อันดับแรก ปี พ.ศ. 2556/57

ประเทศ	ผลผลิต (ล้านตัน)
บราซิล	3.222
เวียดนาม	1.739
อินโดนีเซีย	0.570
โคลัมเบีย	0.660
เอธิโอเปีย	0.381
อินเดีย	0.300
ฮอนดูรัส	0.276
เปรู	0.255
เม็กซิโก	0.228
กัวเตมาลา	0.205
ไทย	0.051

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2558)

ประเทศไทยมีแหล่งเพาะปลูกกาแฟที่สำคัญอยู่ในภาคเหนือและภาคใต้ พื้นที่เพาะปลูกรวมประมาณ 263,602 ไร่ และมีผลผลิตโดยรวมประมาณ 38,452 ตัน กาแฟที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นกาแฟโรบัสตา (ร้อยละ 80) ซึ่งนิยมปลูกทางภาคใต้ โดยเฉพาะในจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง รองลงมาคือ กาแฟอะราบิกา มีพื้นที่เพาะปลูกร้อยละ 20 ซึ่งนิยมปลูกในภาคเหนือ โดยเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงราย ในปี พ.ศ. 2556/57 มีผลผลิตกาแฟโรบัสตาประมาณ 30,336 ตัน และกาแฟอะราบิกาประมาณ 7,989 ตัน (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ผลผลิตรายภาคของเมล็ดกาแฟในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2556/57

ภาค	ผลผลิต (ตัน)
ภาคใต้	30,336
ภาคเหนือ	7,989
ภาคกลาง	127
ภาคอีสาน	4
รวมทั้งประเทศ	38,452

ที่มา: กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ (2558)

สำหรับมูลค่าการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และผลิตภัณฑ์กาแฟของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2557 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2556 โดยมีมูลค่าการส่งออกรวมอยู่ที่ 356.30 ล้านบาท จากเดิม 272.64 ล้านบาท (ตารางที่ 2.5) (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) ตลาดส่งออกเมล็ดกาแฟดิบที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ประเทศแคนาดา (ร้อยละ 31.21) สหรัฐอเมริกา (ร้อยละ 15.24) และอินโดนีเซีย (ร้อยละ 13.22) ตลาดส่งออกเมล็ดกาแฟคั่วที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ประเทศกัมพูชา (ร้อยละ 32.77) สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์ (ร้อยละ 30.44) และแคนาดา (ร้อยละ 12.17) และตลาดส่งออกผลิตภัณฑ์กาแฟ (กาแฟผงสำเร็จรูป) ที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ เมียนมาร์ (ร้อยละ 30.68) เวียดนาม (ร้อยละ 14.37) และฟิลิปปินส์ (ร้อยละ 9.57) (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2557)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 2.5 การส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และผลิตภัณฑ์กาแฟของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2558

	ปี 2556	ปี 2557	ปี 2558 (มกราคม-กุมภาพันธ์)
เมล็ดกาแฟดิบ			
ปริมาณ (ตัน)	327.56	435.82	114.50
มูลค่า (ล้านบาท)	61.05	72.64	22.02
เมล็ดกาแฟคั่ว			
ปริมาณ (ตัน)	78.52	140.01	33.59
มูลค่า (ล้านบาท)	23.63	40.34	7.50
ผลิตภัณฑ์กาแฟ			
ปริมาณ (ตัน)	593.63	697.89	70.09
มูลค่า (ล้านบาท)	187.96	243.32	35.55
รวม			
ปริมาณ (ตัน)	999.71	1,273.72	218.18
มูลค่า (ล้านบาท)	272.64	356.30	65.07

ที่มา: กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ (2558)

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่นิยมดื่มกันทั่วโลก โดยเฉลี่ยคนละ 3 กรัมต่อวัน และในปัจจุบันคนไทยก็นิยมดื่มกาแฟเพิ่มขึ้นเช่นกัน เฉลี่ยคนละ 1 กรัมต่อวัน (FAOSTAT, 2014) ทำให้ความต้องการบริโภคกาแฟภายในประเทศสูงขึ้น จึงทำให้ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยมีอัตราการนำเข้าเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์กาแฟรวมอยู่ที่ 5,082.17 ล้านบาทซึ่งเพิ่มสูงขึ้นจากปี พ.ศ. 2556 ที่มีมูลค่าการนำเข้ารวมอยู่ที่ 3,307.19 ล้านบาท (ตารางที่ 2.6) (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) ซึ่งแหล่งนำเข้าเมล็ดกาแฟที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ประเทศเวียดนาม (ร้อยละ 78.63) อินโดนีเซีย (ร้อยละ 17.68) และลาว (ร้อยละ 1.98) แหล่งนำเข้าผลิตภัณฑ์กาแฟที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ประเทศมาเลเซีย (ร้อยละ 46.54) สาธารณรัฐเกาหลี (ร้อยละ 22.88) และเนเธอร์แลนด์ (ร้อยละ 7.20) (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2557)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 2.6 การนำเข้าเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์กาแฟของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2558

	ปี 2556	ปี 2557	ปี 2558 (มกราคม-กุมภาพันธ์)
เมล็ดกาแฟ			
ปริมาณ (ตัน)	35,300.37	48,047.35	1,421.36
มูลค่า (ล้านบาท)	2,376.03	3,361.36	127.89
ผลิตภัณฑ์กาแฟ			
ปริมาณ (ตัน)	3,952.44	6,351.68	1,129.11
มูลค่า (ล้านบาท)	931.16	1,720.81	313.01
รวม			
ปริมาณ (ตัน)	39,252.81	54,399.03	2,550.47
มูลค่า (ล้านบาท)	3,307.19	5,082.17	440.90

ที่มา: กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ (2558)

กาแฟเป็นสินค้าอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจโลก เนื่องจากมีอัตราการบริโภคเพิ่มสูงขึ้นเป็นสองเท่าในระยะเวลา 40 ปีที่ผ่านมา และมีการคาดการณ์ว่าอัตราการบริโภคกาแฟจะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 9 ล้านตันในปี พ.ศ. 2562 (Taniwaki และคณะ, 2014) ดังนั้น ความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากกาแฟมักประสบปัญหาการถูกทำลายโดยศัตรูพืชเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งนำไปสู่การปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมถึงราที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษจากรา (mycotoxin) ซึ่งปัญหาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราถือเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการเพาะปลูกและส่งออกกาแฟเป็นอย่างมากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Levi และคณะ, 1974; Baker, 2001) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในสภาวะที่มีความร้อนและความชื้นเพิ่มขึ้น จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟและการปนเปื้อนสารพิษจากราในเมล็ดกาแฟเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากรา ซึ่งปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศนี้ถือเป็นปัญหาที่ต้องได้รับการพิจารณาอย่างเร่งด่วน (Paterson และคณะ, 2010; Paterson และคณะ, 2011)

2.6 สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของราสายใย โดยเฉพาะราสายใยในสกุล *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium, Claviceps* และ *Alternaria* (Huwig และคณะ, 2001) (ตารางที่ 2.7) สารพิษจากราส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์อย่างมีนัยสำคัญ สารพิษจากรามีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง เช่น เป็นพิษต่อตัวอ่อนในครรภ์มารดา และพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Siegel และคณะ, 2011) International Agency for Research on Cancer ได้จัดให้สารพิษจากราชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 1993) อีกทั้งสารพิษจากรายังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการค้าระหว่างประเทศ สารพิษจากราที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อมนุษย์มากที่สุดได้แก่ อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ฟูโมนิซิน (fumonisins) ดีออกซีนิวาลินอล (deoxynivalenol) และนิวาลินอล (nivalenol) (Bryden, 2012)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างราที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษจากราชนิดต่างๆ

ชนิดของรา	สารพิษจากรา
Aspergillus flavus, A. parasiticus	อะฟลาทอกซิน
A. ochraceus, A. carbonarius, Penicillium verrucosum	โอคราทอกซินเอ
P. citrinum, P. expansum	ซิตรินิน
Fusarium sporotrichioides, F. poae	ที-2 ทอกซิน
F. culmorum, F. graminearum	ดีออกซีนิวาลินอล
F. culmorum, F. graminearum	ซีราลีโนน
F. verticillioides, F. proliferatum	ฟูโมนิซิน
Claviceps purpurea	เออร์กอท อัลคาลอย

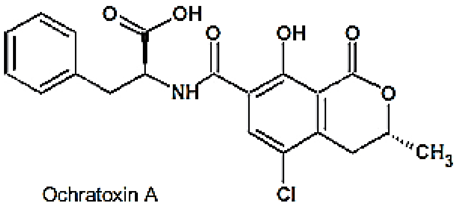
ที่มา: Bryden (2012)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.7 โอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A, OTA) เป็นสารพิษจากรา ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Van Der Merwe และคณะ (1965) ซึ่งได้รายงานว่าโอคราทอกซินเอเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตจาก *Aspergillus ochraceus* หลังจากนั้นมีรายงานการค้นพบว่าโอคราทอกซินเอเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ถูกผลิตได้จากราสายใยหลายชนิดในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Cabanes และคณะ, 2002)

โอคราทอกซินเอมีโครงสร้างเป็น pentaketide (ภาพที่ 2.4) และมีชื่อ IUPAC คือ 7-(L-β-phenylalanylcarbonyl)-carboxyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarin สูตรทางเคมี คือ $C_{20}H_{18}ClNO_6$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 403.8 โอคราทอกซินเอมีลักษณะเป็นก้อนผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่ 169 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว และละลายได้เล็กน้อยในน้ำ (Pohland และคณะ, 1992)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอ (Gupta, 2011)

2.7.1 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอเป็นพิษโดยตรงต่อไต (nephrotoxic) มีรายงานว่าโอคราทอกซินเอมีส่วนทำให้เกิดโรคไตอักเสบเรื้อรัง (Balkan Endemic Nephropathy; BEN) เกิดความผิดปกติที่ไตและมีการเสื่อมของหลอดเลือดไต (Meca และคณะ, 2010) ในประชากรของประเทศในแถบคาบสมุทรบอลข่าน ได้แก่ ประเทศบอสเนีย บัลแกเรีย โครเอเชีย รูมาเนีย และเซอร์เบีย (Mally และคณะ, 2007) โรคไตอักเสบเรื้อรัง BEN ในระยะแรกจะไม่มีอาการของโรค การดำเนินโรคจะมีลักษณะค่อยเป็นค่อยไปจนเริ่มเป็นเรื้อรัง และเกิดภาวะไตวายในที่สุด (Stefanovic และคณะ, 2006) นอกจากนี้ โอคราทอกซินเอทำให้เกิดโรคไตในหนู เกิดเนื้องอกบริเวณไตและพัฒนากลายเป็น

เซลล์มะเร็ง (Lock และคณะ, 2004) โอคราทอกซินเอยังก่อให้เกิดโรคไตและความผิดปกติของไตในหมูได้อีกด้วย (Varga และคณะ, 2006)

นอกจากนี้โอคราทอกซินเอยังเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunotoxic) โดยมีรายงานว่า โอคราทอกซินเอทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์และนิวโทรฟิลล์ในตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคมะเร็งมีจำนวนลดลง อีกทั้งยังทำให้เซลล์ดังกล่าวหลั่งไซโตไคน์ได้น้อยลงอีกด้วย (Odhav และคณะ, 2008) โอคราทอกซินเอเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxic) โดยเฉพาะระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกในการทำลายระบบประสาทที่แน่นอน แต่อาจเกิดจากการที่โอคราทอกซินเอเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา oxidative stress ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน หรือเกิดการรวมตัวกันระหว่างดีเอ็นเอและโอคราทอกซินเอ (formation of OTA–DNA adducts) (Sava และคณะ, 2006) และยังเป็นพิษต่อตัวอ่อนในครรภ์มารดา (teratogenic) (Woo และคณะ, 2012) International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้โอคราทอกซินเออยู่ในกลุ่ม 2 บี ซึ่งหมายความว่า โอคราทอกซินเออาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ได้ (IARC, 1993)

2.7.2 ราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ

สาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลผลิตทางการเกษตรและผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ เกิดจากราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ ราสายใยในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Varga และคณะ, 2006)

P. verrucosum เป็นราสายพันธุ์หลักในสกุล *Penicillium* ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ (Bragulat และคณะ, 2008) เจริญได้ดีที่ค่า water activity (a_w) เท่ากับ 0.80 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส (Duarte และคณะ, 2010) ส่วนใหญ่พบปนเปื้อนมากในธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืชในประเทศเขตอากาศอบอุ่นค่อนไปทางหนาว เช่น ประเทศทางตอนเหนือของยุโรป และแคนาดา และยังพบปนเปื้อนบ้างในธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืชในเขตอากาศอบอุ่น เช่น อิตาลี สเปน ฝรั่งเศส และโปรตุเกส (Logrieco และคณะ, 2003; Bragulat และคณะ, 2008) มี *Penicillium* อีกหลายสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ เช่น *P. nordicum* ซึ่งมักพบปนเปื้อนในอาหารหมัก เช่น เนื้อหมัก และชีส (Lund และคณะ, 2003)

ราในสกุล *Aspergillus* ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Aspergillus* section *Nigri* (black aspergilli) หรือราดำ และ กลุ่ม *Aspergillus* section *Circumdati* (Alborch และคณะ, 2011) ราดำที่เป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ

ได้แก่ *A. carbonarius* และ *A. niger* ที่มักพบเจริญร่วมกันในอาหารและผลไม้ในประเทศเขตร้อนและร้อนชื้น โดยเฉพาะองุ่นและผลไม้แห้ง (Bellí และคณะ, 2006; Lasram และคณะ, 2007; Díaz และคณะ, 2009) โดยเฉพาะ *A. carbonarius* ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอได้มากกว่า *A. niger* ถึงพันเท่า (Abarca และคณะ, 2003; Noonim และคณะ, 2008; Dachoupakan และคณะ, 2009) นอกจากนี้ ยังพบราดำอีกหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ เช่น *A. awamori* (Bragulat และคณะ, 2001), *A. aculeatus* (Leong และคณะ, 2006), *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* (Varga และคณะ, 2011), *A. foetidus*, *A. japonicus* (Chulze และคณะ, 2006) และ *A. tubingensis* (Chiotta และคณะ, 2013)

ราในกลุ่ม section *Circumdati* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* และ *A. steynii* ลักษณะเด่นของราในกลุ่มนี้ คือ มีสปอร์สีน้ำตาลทอง ราทั้ง 3 ชนิดเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 24-31 องศาเซลเซียส มักพบราในกลุ่มนี้ปนเปื้อนในธัญพืชหรือผลไม้แห้งที่มีการเก็บไว้เป็นเวลานาน (Logrieco และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบราในกลุ่มนี้อีกหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ เช่น *A. cretensis, A. flocculosus, A. pseudoelegans, A. roseoglobulosus, A. sulphurous* (Visagie และคณะ, 2014) และ *A. melleus* (Copetti และคณะ, 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.7.3 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร

การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรพบได้หลายชนิดทั่วโลก ทั้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต เช่น ธัญพืช (ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอ้ต และข้าวบาร์เล่ย์) องุ่น เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ เครื่องเทศ เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช น้ำองุ่น เบียร์ ไวน์ กาแฟสำเร็จรูป ผลไม้อบแห้ง และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (SCOOP, 2002) (ตารางที่ 2.8) จากการศึกษาของ Araguás และคณะ (2005) จากประเทศสเปน พบว่ามีตัวอย่างเมล็ดธัญพืชที่ยังไม่ผ่านกระบวนการ (ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ และข้าวโพด) 58 ตัวอย่างจากทั้งหมด 115 ตัวอย่าง ที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 50.4 และมีปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ยอยู่ที่ 0.219 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Rosa และคณะ (2004) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดต่างๆ จากองุ่นในประเทศบราซิล ได้แก่ น้ำองุ่น เนื้อองุ่นแช่แข็ง และไวน์ พบว่าร้อยละ 29.2 ของตัวอย่างน้ำองุ่น ร้อยละ 12.5 ของตัวอย่างเนื้อองุ่นแช่แข็ง และร้อยละ 24 ของตัวอย่างไวน์ (ไวน์แดง ไวน์ขาว และไวน์ชมพู) มีการปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอโดยมีปริมาณเฉลี่ยอยู่ที่ 38, 28.30 และ 33.10 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ Ozbey และคณะ (2012) ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเครื่องเทศชนิดต่างๆ ได้แก่ พริกแดงแห้ง พริกไทยดำป่น และยี่หร่า ที่ได้มาจากตลาดต่างๆ ในประเทศตุรกี พบว่า มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างพริกแดงพริกไทยดำป่น และยี่หร่า ร้อยละ 75, 17.4 และ 5.3 ตามลำดับ โดยมีปริมาณการปนเปื้อนอยู่ที่ 12.34, 0.34 และ 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.8 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ

ชนิดของอาหาร	ประเทศ	ปริมาณ OTA เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
ข้าว	สเปน	3.50	Juan และคณะ (2008)
ข้าวสาลี	เดนมาร์ก	0.30	Jorgensen และคณะ (2002)
เมล็ดธัญพืช	สเปน	0.22	Araguás และคณะ (2005)
เนื้อองุ่นแช่แข็ง	บราซิล	28.30	Rosa และคณะ (2004)
กาแฟคั่ว	ชิลี	0.84	Galarce-Bustos และคณะ (2014)
ขนมปังจากข้าวโพด	โปรตุเกส	0.44	Juan และคณะ (2008)
ขนมปังจากข้าวสาลี	โปรตุเกส	0.02	Juan และคณะ (2008)
เครื่องเทศ	ตูนิเซีย	1.70	Ghali และคณะ (2009)
เมล็ดโกโก้	บราซิล	0.25	Copetti และคณะ (2010)
ผลไม้แห้ง	ตุรกี	9.87	Imperato และคณะ (2011)
กาแฟสำเร็จรูป	อิตาลี	0.44	Vecchio และคณะ (2012)

2.7.4 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร

จากความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอต่อมนุษย์และสัตว์อีกทั้งยังมีรายงานการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดทั่วโลก ทำให้ในหลายประเทศ เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ได้ออกข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารแต่ละชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช เมล็ดกาแฟคั่ว ลูกเกดและเครื่องเทศ อยู่ที่ 3, 5, 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 2.9) (European Commission, 2006) สำหรับประเทศไทยมีประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสตา (มกษ. 5700-2552) และอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) ให้มีการตรวจปริมาณโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร และพบได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552a, 2552b)

ตารางที่ 2.9 ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารแต่ละชนิด

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ธัญพืชที่ไม่ผ่านกระบวนการ	5.0
ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช	3.0
ลูกเกด	10.0
เมล็ดกาแฟคั่ว	5.0
กาแฟสำเร็จรูป	10.0
ไวน์	2.0
น้ำองุ่น	2.0
อาหารทารกที่ผลิตจากธัญพืช	0.5
เครื่องเทศ	30.0
สารสกัดจากชะเอมเทศ	80.0

ที่มา: European Commission (2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.7.5 โอคราทอกซินเอในกาแฟ

การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในกาแฟ มีสาเหตุมาจากราสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* (*A. ochraceus* และ *A. westerdijkiae)* และ section *Nigri* (*A. carbonarius* และ *A. niger* (Joosten และคณะ, 2001; Taniwaki และคณะ, 2003; Morello และคณะ, 2007; Noonim และคณะ, 2008) ราเหล่านี้มักปนเปื้อนตั้งแต่ช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว ช่วงการเก็บเกี่ยว และช่วงหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ กระบวนการแปรรูปกาแฟ การขนส่ง และการเก็บรักษา ราทั้ง 4 ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในไร่กาแฟโดยเฉพาะบริเวณผิวดิน สปอร์ของราถูกพัดจากบริเวณผิวดินไปยังผลกาแฟเชอร์รี่ ดังนั้น ถ้าผลกาแฟมีรอยแตกหรือได้รับความเสียหาย เช่น ถูกทำลายด้วยแมลงศัตรูพืช สปอร์ของราทั้งที่ถูกพัดมาจากบริเวณผิวดินและที่ติดมากับแมลงศัตรูพืช จะเข้าไปเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอในผลกาแฟ การปนเปื้อนโอคราทอกซินเออาจเพิ่มขึ้นในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวผลกาแฟ โดยขึ้นกับปัจจัยชนิดต่างๆ เช่น สภาพอากาศ วิธีการตาก การควบคุมคุณภาพ และสภาวะในการเก็บรักษาผลกาแฟ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสะสมของโอคราทอกซินเอในผลกาแฟเพิ่มขึ้น คือ การตากแดดที่ไม่เพียงพอในช่วงการนำผลกาแฟไปตากแดดเพื่อให้ได้เป็นกาแฟกะลา ทำให้กาแฟกะลายังคงมีความชื้นในปริมาณที่ราสามารถเจริญได้ ซึ่งราที่ปนเปื้อนนั้นอาจปนเปื้อนมาอยู่แล้วตั้งแต่เป็นกาแฟเชอร์รี่ หรืออาจปนเปื้อนเพิ่มมาจากดิน อุปกรณ์ต่างๆ หรือพื้นที่ที่ใช้สำหรับการตากผลกาแฟ (Paterson และคณะ, 2014)

การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอพบได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ ตั้งแต่ผลกาแฟเชอร์รี่ กาแฟกะลา เมล็ดกาแฟสาร เมล็ดกาแฟคั่ว หรือแม้แต่กาแฟสำเร็จรูป Aoyama และคณะ (2010) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูปในประเทศญี่ปุ่น พบว่าร้อยละ 36.7 ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่ว และร้อยละ 95.5 ของตัวอย่างกาแฟสำเร็จรูป มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอสูงสุดถึง 2.75 และ 4.23 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ Noonim และคณะ (2008) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของราและโอคราทอกซินเอในกาแฟสายพันธุ์อะราบิกาและโรบัสตาที่ปลูกในประเทศไทย จากการศึกษาพบว่า ราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในกาแฟสายพันธุ์อะราบิกา ส่วนใหญ่เป็นราสกุล *Aspergillus* ทั้ง section *Circumdati* โดยเฉพาะ *A. westerdijkiae* และ section *Nigri* โดยเฉพาะ *A. niger* ในขณะที่การปนเปื้อนของราในกาแฟสายพันธุ์โรบัสตา ส่วนใหญ่เป็น *Aspergillus* section *Nigri* โดยเฉพาะ *A. carbonarius* และ *A. niger* สำหรับการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ พบว่าร้อยละ 89 ของเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกามีโอคราทอกซินเอปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.6-5.5 ไมโครกรัม

ต่อกิโลกรัม ในขณะที่ของเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์โรบัสตาทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ โดยอยู่ในช่วง 1.5-8.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 2.10 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร เมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูป

ชนิดของกาแฟ	ประเทศ	ปริมาณ OTA (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
เมล็ดกาแฟสาร			
อะราบิกา	บราซิล	0.70-47.80	Leoni และคณะ (2000)
		0.60-4.40	Batista และคณะ (2003)
	อินเดีย	0.20-4.30	Gopinandhan และคณะ (2008)
	ไทย	0.60-5.50	Noonim และคณะ (2008)
โรบัสตา	เวียดนาม	0.40-1.80	Leong และคณะ (2007)
	ไทย	1.30-8.90	Noonim และคณะ (2008)
เมล็ดกาแฟคั่ว	บราซิล	0.99-5.87	Prado และคณะ (2000)
	เยอรมนี	0.21-12.10	Otteneder และคณะ (2001)
	แคนาดา	0.10-2.30	Lombaert และคณะ (2002)
	ญี่ปุ่น	2.75	Aoyama และคณะ (2010)
กาแฟสำเร็จรูป	บราซิล	0.31-1.78	Prado และคณะ (2000)
	เยอรมนี	0.28-4.8	Otteneder และคณะ (2001)
	แคนาดา	0.10-3.10	Lombaert และคณะ (2002)
	บราซิล	0.17-6.29	Almeida และคณะ (2007)
	ญี่ปุ่น	4.23	Aoyama และคณะ (2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.8 การตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหาร

การตรวจพบราที่ปนเปื้อนในอาหารตั้งแต่วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหรือระหว่างกระบวนการผลิตเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในอาหารได้ วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหารนั้น ได้แก่ เช่น วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาแบบดั้งเดิมและวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

2.8.1 วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาแบบดั้งเดิม

1) Direct examination

เป็นวิธีการตรวจสอบการเจริญของราที่ปนเปื้อนในอาหารเบื้องต้นด้วยตาเปล่าหรือใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) ในการตรวจติดตามการเจริญ ควรตรวจสอบทันทีตั้งแต่ราเริ่มเจริญบนพื้นผิวของอาหาร เนื่องจากถ้าอาหารมีการเคลื่อนย้ายอาจทำให้โครงสร้างของราที่เจริญบนพื้นผิวอาหารนั้นหลุดหายไป หลังจากตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอแล้วจึงทำการคัดแยกราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อไป (Samson และคณะ, 2004)

2) Direct plating

เป็นวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการตรวจหา นับจำนวน และคัดแยกราที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีลักษณะเป็นชิ้น (particulate foods) เช่น เมล็ดถั่ว และเมล็ดธัญพืช เป็นต้น ตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์โดยส่วนใหญ่มักผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface disinfection) ก่อนวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดที่เหมาะสม เพื่อลดการปนเปื้อนของเศษฝุ่นหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญบริเวณพื้นผิวของตัวอย่างอาหาร และทำให้ทราบถึงปริมาณราที่แท้จริงที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารนั้นๆ โดยทั่วไปการฆ่าเชื้อบริเวณผิวทำได้โดยแช่ตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายที่มีคลอรีนเป็นส่วนผสมอย่างน้อย 0.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณและระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เหมาะสมด้วยวิธีปลอดเชื้ออย่างน้อย 6-20 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนเมล็ดที่มีการติดเชื้อราแล้วรายงานผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (Samson และคณะ, 2004)

3) Dilution plating

เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนราในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลวหรือผง เมล็ดธัญพืชที่ต้องผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นแป้งสำหรับทำอาหาร หรือใช้ในกรณีที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ปริมาณราทั้งหมดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารชนิดนั้นๆ ต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนทำการวิเคราะห์ โดยผสมตัวอย่างกับสารละลายเพปโทนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) เนื่องจากการตีบดทำให้รากระจายออกจากตัวอาหารได้ดี ในกรณีที่ตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มีลักษณะแข็งหรือเป็นชิ้นเล็กๆ เช่น ธัญพืชหรือถั่ว ควรแช่ตัวอย่างในสารละลายเพปโทนอย่างน้อย 30-60 นาทีก่อนนำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร และอาจมีการเจือจางตัวอย่างตามความเหมาะสม จากนั้น ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 10-150 โคโลนี แล้วรายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Units (CFU) ต่อมิลลิลิตร (Samson และคณะ, 2004)

4) การจัดจำแนกและระบุชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จัดจำแนกและระบุชนิดของราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะของโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic characters) เช่น ลักษณะของ conidia, conidiophores และ conidial heads (Samson และคณะ, 2004; Pitt และคณะ, 2009)

การตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาแบบดั้งเดิมนั้นเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐาน ซึ่งทำได้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้อาจก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น การระบุชนิดของรา ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ และใช้เวลานานในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ ยังพบปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานการทดสอบและข้อผิดพลาดที่เกิดจากการปนเปื้อนระหว่างทดสอบ (Atkins และคณะ, 2004)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.8.2 วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ปัจจุบันการตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหารมักใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างสูง เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีความจำเพาะและความไวสูง สามารถจัดจำแนก ระบุชนิดของรา และปริมาณของราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรได้ ทำให้ความเสี่ยงในการปนเปื้อนของราในอาหารลดลง (Borman และคณะ, 2008; Hayat และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตาม การตรวจหาราที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ความยุ่งยากซับซ้อนของวิธีการ เช่น การเลือกดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์ การเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับราแต่ละชนิด อีกทั้ง สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์มีราคาแพง และไม่สามารถระบุถึงความสามารถในการเพิ่มจำนวนของราที่ปนเปื้อนในอาหารได้ (Santos และคณะ, 2010; Hayat และคณะ, 2012)

2.9 การตรวจหาสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร

การวิเคราะห์สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เสมอ เนื่องจากอาจมีปริมาณสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารน้อยมาก หรือสารประกอบในตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มีความซับซ้อนมาก โดยทั่วไปการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ การสกัดสารพิษจากราออกจากอาหาร การกำจัดสิ่งรบกวน และการวิเคราะห์สารพิษจากรา โดยขั้นตอนการสกัด และการกำจัดสิ่งรบกวน มีความสำคัญอย่างยิ่งในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากรา เนื่องจากสารสกัดที่ได้จาก 2 ขั้นตอนนี้เป็นตัวกำหนดวิธีที่จะใช้วิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากราที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไป อีกทั้งยังเป็นตัวกำหนดความแม่นยำถูกต้องของปริมาณสารพิษจากราที่สกัดได้ (Hayat และคณะ, 2012)

2.9.1 การสกัดสารพิษจากราออกจากอาหาร (mycotoxin extraction)

วิธีในการสกัดสารพิษจากราออกจากอาหารขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสารพิษจากราที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น มีลักษณะเป็นของแข็งหรือของเหลว เป็นสารชนิดมีขั้วหรือไม่มีขั้ว โดยส่วนใหญ่การสกัดสารพิษจากราออกจากอาหารนิยมใช้สารเคมีประเภทตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งอาจใช้สกัดโดยตรงโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว หรือแบ่งสกัดเป็นช่วงๆ ร่วมกับตัวทำละลายชนิดอื่น เทคนิคที่นิยมใช้ในการสกัดสารพิษจากราออกจากอาหาร ได้แก่ solid/liquid extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมที่เป็นของแข็ง และ liquid/liquid extraction ซึ่งเป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสาร

ที่ต้องการออกมาจากสารผสมที่เป็นของเหลว ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เฮกเซน (*n*-hexane) ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) และเมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดโอคราทอกซินเอออกจากอาหาร (Turner และคณะ, 2009)

2.9.2 การกำจัดสิ่งรบกวน (clean up)

เนื่องจากในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มักมีปริมาณสารพิษจากราต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการกำจัดสิ่งรบกวน ซึ่งเป็นขั้นตอนการกำจัดสารอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารพิษจากราที่สกัดได้ วิธีที่นิยมใช้ในการกำจัดสิ่งรบกวน ได้แก่ solid phase extraction (SPE) และ immunoaffinity column (IAC) ซึ่งได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการกำจัดสิ่งรบกวน โดยเฉพาะเมื่อวิเคราะห์สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารหรือผลผลิตทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบซับซ้อน เช่น กาแฟ เบียร์ และไวน์ (Hayat และคณะ, 2012) อีกทั้งการใช้ IAC ในการกำจัดสิ่งรบกวนเป็นวิธีที่ได้การรับรองจากองค์กรหลายองค์กร เช่น The Association of Analytical Communities (AOAC International) และ European Union (EU) (Ali และคณะ, 2010) IAC มีความจำเพาะสูง เนื่องจากอาศัยหลักการการจับกันระหว่างแอนติเจน (สารพิษจากรา) และแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ ตัวแอนติบอดีจะถูกตรึงอยู่บนตัวยึดเกาะที่มีลักษณะเป็นของแข็ง (solid sorbent) ซึ่งจะจับกับสารพิษจากราที่ไหลผ่านคอลัมน์ ส่วนองค์ประกอบอื่นที่ไม่จำเพาะต่อแอนติบอดีจะไหลผ่านคอลัมน์ไป จากนั้น ใช้ตัวทำละลายที่มีความจำเพาะต่อสารพิษจากราชนิดนั้นๆ ชะสารพิษจากราออกจากคอลัมน์เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากราต่อไป (Hayat และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตาม IAC มีข้อจำกัดในเรื่องของราคา นอกจากนี้ การชะคอลัมน์ของ IAC ด้วยตัวทำละลายเพื่อชะเอาสารพิษจากราออกจากคอลัมน์นั้น ทำให้แอนติบอดีภายใน IAC เสียสภาพ จึงไม่สามารถนำคอลัมน์กลับมาใช้วิเคราะห์ซ้ำได้อีก (Moser และคณะ, 2010)

2.9.3 การวิเคราะห์สารพิษจากรา (analysis)

สารพิษจากราแต่ละชนิดมีลักษณะโครงสร้างแตกต่างกัน ดังนั้น การวิเคราะห์สารพิษจากราแต่ละชนิดไม่สามารถใช้วิธีมาตรฐานเดียวกันในการวิเคราะห์ได้ ปัจจุบันการวิเคราะห์สารพิษจากรานิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ (chemical analysis) เช่น โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography หรือ TLC) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography หรือ HPLC) และแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography หรือ GC) และวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological analysis) เช่น enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

1) วิธีทางเคมีวิเคราะห์

ตารางที่ 2.11 แสดงตัวอย่างการใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารชนิดต่างๆ

โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง เป็นวิธีแบบดั้งเดิมที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน จึงเหมาะกับการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้น สามารถให้ผลตรวจสอบที่เป็นเชิงคุณภาพ (qualitative) และกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) เหมาะกับตัวอย่างที่มีจำนวนมาก สะดวก ราคาถูก และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อนในการอ่านผล (Turner และคณะ, 2009)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นวิธีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากรามากที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากสารพิษจากราส่วนใหญ่มีสารประกอบอินทรีย์ที่มีความสามารถในการดูดกลืนคลื่นแสง (chromophore) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล ทำให้สามารถใช้ HPLC ที่มีตัวตรวจจับสัญญาณ (detector) ที่เป็น UV และฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารที่มีปริมาณต่ำถึง 0.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้ง ประสิทธิภาพในการใช้ HPLC ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากรานั้นมีความแม่นยำ น่าเชื่อถือมากกว่าเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์สารพิษจากราด้วยวิธี TLC (Turner และคณะ, 2009)

แก๊สโครมาโทกราฟี เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ไม่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากรา เนื่องจากสารพิษจากราส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่ระเหย (non-volatile compounds) ดังนั้นการวิเคราะห์สารพิษจากราด้วยเทคนิคนี้ จึงจำเป็นต้องให้สารพิษจากราเกิดอนุพันธ์ (derivatisation)

ก่อนการนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การทำปฏิกิริยา silylation หรือการทำปฏิกิริยา polyfluoroacylation เพื่อให้อนุพันธ์ของสารพิษจากราที่สามารถระเหยได้ (Turner และคณะ, 2009)

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างวิธีทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราชนิดต่างๆ

วิธีทางเคมีวิเคราะห์	สารพิษจากรา	ชนิดอาหาร	ที่มา
TLC	อะฟลาทอกซิน	ไวน์ข้าว	Nawaz และคณะ (1992)
	ซิตรินิน	เบียร์	Odhav และคณะ (2002)
HPLC	อะฟลาทอกซินบี 1	ข้าว	Nguyen และคณะ (2007)
	ซิตรินิน	ข้าว	Nguyen และคณะ (2007)
	โอคราทอกซินเอ	ข้าว	Nguyen และคณะ (2007)
	ฟูโมนิซิน	ข้าวโพด	Wang และคณะ (2008)
	พาทูลิน	น้ำแอปเปิ้ล	Spadaro และคณะ (2007)
GC	ดีออกซีนิวาลินอล	ธัญพืช	Onji และคณะ (1998)
	ฟูโมนิซินบี 1	ข้าวบาร์เลย์	Olsson และคณะ (2002)
	ไตรโคทีซีน	ข้าวสาลี	Josephs และคณะ (1998)

การใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากรา โดยเฉพาะเทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography) ดังกล่าวข้างต้น มักประสบปัญหาในเรื่องความยากลำบากในการเตรียมตัวอย่าง และวิธีที่ใช้ในการกำจัดสิ่งรบกวนก่อนการนำมาวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายสูงโดยเฉพาะเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สารเคมีที่ใช้เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ อีกทั้ง ต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ในการวิเคราะห์ที่มีความเชี่ยวชาญ ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีในการวิเคราะห์สารพิษจากราแบบรวดเร็ว (rapid methods) โดยใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่เร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่ใช้ วิธีการขั้นตอนเข้าใจง่ายและสะดวกต่อการใช้งานและต้องสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์นอกห้องปฏิบัติการได้ (Flajs และคณะ, 2009)

2) วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้หลักการด้านความจำเพาะในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่มี

ความจำเพาะสูง อีกทั้ง ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วในระยะเวลาสั้น (high throughput assay) เนื่องจากใช้ปริมาตรของตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อยและมีขั้นตอนในการกำจัดสิ่งรบกวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการกำจัดสิ่งรบกวนก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน เช่น HPLC จากข้อได้เปรียบของเทคนิค ELISA นี้ ทำให้บริษัทต่างๆ ได้พัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้เป็นชุดตรวจสอบสารพิษจากราที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความยุ่งยากซับซ้อน (Hayat และคณะ, 2012) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ ELISA ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราก็มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องใช้สารเคมี เอนไซม์ เครื่องมือหรือชุดสำเร็จที่มีความจำเพาะเจาะจง อีกทั้ง สารเคมีที่ใช้ทดสอบมีอายุการเก็บรักษาสั้น (Fernández-Ibañez และคณะ, 2009)

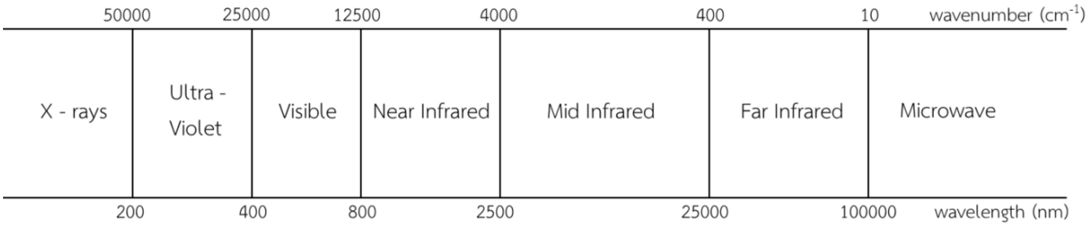
2.10 เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ทำลายตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะมีสถานะใดก็ได้ เช่น ของแข็งในลักษณะที่เป็นผง ชิ้น ก้อน เม็ดหรือผล ของกึ่งแข็งกึ่งเหลว หรือของเหลวข้นหนืด มีวิธีการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย สเปกโทรสโกปีเนียร์อินฟราเรดเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ใช้สารเคมีในการทดสอบจึงไม่ทำลายตัวอย่างที่ทดสอบ อีกทั้งยังสามารถทำนายค่าทางเคมีได้หลายๆ ค่าในเวลาเดียวกัน (Berardo และคณะ, 2005)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นการศึกษาการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าของสสารในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ภาพที่ 2.5) ซึ่งสสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับรังสีเนียร์อินฟราเรดได้ คือ สสารที่โมเลกุลมีพันธะไฮโดรเจน เช่น C-H, O-H, N-H หรือ S-H ระดับการดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะแสดงในรูปของเส้นสเปกตรัม เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพต่อไป (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รังสีเนียร์อินฟราเรดเป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่อยู่ในช่วงรังสีอินฟราเรด (infrared หรือ IR radiation) ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near IR) รังสีอินฟราเรดย่านกลาง (Mid IR) และรังสีอินฟราเรดย่านไกล (Far IR) (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 ตำแหน่งของรังสีเนียร์อินฟราเรดในสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า (ดัดแปลงมาจาก ศุมาพร เกษมสำราญ (2552))

รังสีเนียร์อินฟราเรดแบ่งออกเป็น 2 ช่วงตามระดับพลังงาน ได้แก่ ช่วงคลื่นสั้น และช่วงคลื่นยาว

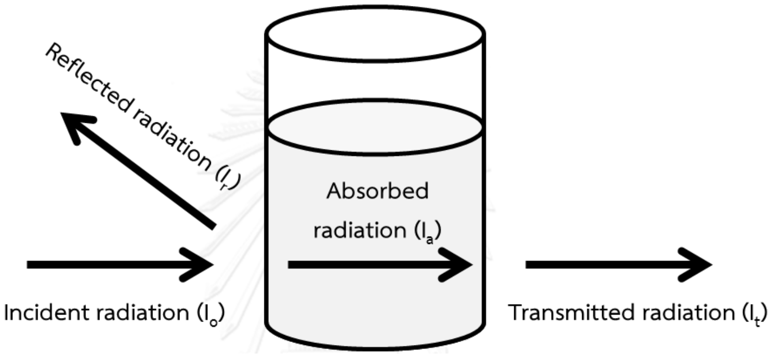
รังสีเนียร์อินฟราเรดช่วงคลื่นสั้น (short wavelength NIR, SWNIR) เป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นในช่วง 800 ถึง 1100 นาโนเมตร มีพลังงานสูงประมาณ 109-150 กิโลจูลต่อโมล ซึ่งสามารถทะลุผ่านตัวอย่างได้ประมาณ 1 เซนติเมตร จึงนิยมใช้รังสีเนียร์อินฟราเรดช่วงคลื่นสั้นในการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบที่อยู่ภายในตัวอย่าง เช่น การหาปริมาณน้ำตาลในอ้อยจากการสแกนด้วยคลื่น SWNIR ที่บริเวณผิว (Mat Nawi และคณะ, 2013)

รังสีเนียร์อินฟราเรดช่วงคลื่นยาว (long wavelength NIR, LWNIR) มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 1100 ถึง 2500 นาโนเมตร มีพลังงานประมาณ 48-109 กิโลจูลต่อโมล ซึ่งมีพลังงานต่ำกว่าช่วงคลื่นสั้น ทำให้รังสีเนียร์อินฟราเรดสามารถทะลุผ่านตัวอย่างได้เพียงประมาณ 5 มิลลิเมตรเท่านั้น จึงเหมาะกับการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างทั่วไป ทั้งของเหลว และของแข็ง เช่น ใช้แยกความแตกต่างระหว่างน้ำมันไบโอดีเซล และน้ำมันดีเซลที่ผสมอยู่รวมกัน (Mazivila และคณะ, 2015)

2.11 หลักการพื้นฐานของเนียร์อินฟราเรดเสปกโทรสโกปี

การเกิดอันตรกิริยาของรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร

เมื่อรังสีเนียร์อินฟราเรดเกิดอันตรกิริยา (interaction) กับสสาร ทำให้เกิดการสั่นสะเทือน (vibration) ของพันธะภายในโมเลกุล รังสีบางส่วนจะถูกดูดกลืน (absorption) บางส่วนจะผ่านออกมา (transmission) และบางส่วนอาจเกิดการสะท้อน (reflection) ซึ่งปรากฏการณ์เหล่านี้อาจเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน หรือเกิดเพียงแค่ปรากฏการณ์เดียว ดังแสดงในภาพที่ 2.6 (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

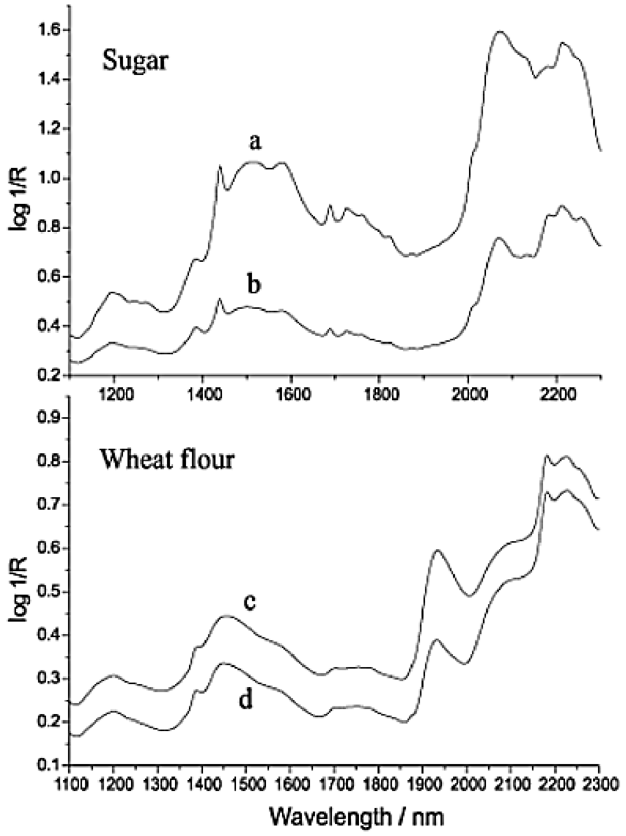


$$I_o = I_a + I_t + I_r$$

ภาพที่ 2.6 รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาของรังสีเนียร์อินฟราเรดกับสสาร (ดัดแปลงมาจาก ศุมาพร เกษมสำราญ (2552))

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อสสารเกิดอันตรกิริยากับรังสีเนียร์อินฟราเรด ความเข้มของแถบการดูดกลืนเนียร์อินฟราเรดสเปกตรัม นิยมแสดงในรูปของกราฟระหว่าง log (1/R) (absorbance) ในแนวแกนตั้ง และความยาวคลื่น (wavelength) หรือจำนวนคลื่น (wavenumber) ในแนวแกวนอนดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างน้ำตาลผลึก (a), น้ำตาลผลึกที่ผ่านการบด (b), แป้งสาลี (c) และแป้งสาลีที่ผ่านการทำให้แห้ง (d) แกนนอนแสดงความยาวคลื่นในหน่วยนาโนเมตร และแกนตั้งแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเมื่อวัดแสงที่สะท้อน (reflectance) (Pasquini, 2003)

Chulalongkorn University

ค่าการดูดกลืนแสงเกี่ยวข้องกับกฎสำคัญ 2 กฎ ดังนี้

1) กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's Law) กล่าวว่า เมื่อมีแสงเดียวหรือแสงความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว เป็นสัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้ไม่ขึ้นกับความเข้มของแสงที่ตกกระทบตัวกลางนั้นและความเข้มของแสงจะถูกแต่ละชั้นของตัวกลางดูดกลืนไว้ในสัดส่วนที่เท่ากัน สรุปได้ว่าเมื่อแสงความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียวกัน ความเข้มของลำแสงจะลดลงขึ้นกับความหนาของตัวกลาง (Osborne และคณะ, 1993; นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์, 2545)

2) กฎของเบียร์ (Beer's Law) กล่าวว่า เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียวสัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางดูดกลืนไว้จะแปรโดยตรงกับปริมาณของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงนั้น สรุปได้ว่า เมื่อโมเลกุลของสารแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน และไม่มีอิทธิพลจากตัวทำละลายจะทำให้สารดูดกลืนความเข้มแสงเท่ากัน (Osborne และคณะ, 1993; นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์, 2545)

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

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

ดังนั้น

กรณีวัดแสงส่องผ่าน (transmittance) $A = log\frac{I_0}{I_t} = \varepsilon bc = log\frac{1}{T}$

เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

T = ค่าการส่องผ่านของแสง (transmittance)

ε = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงปกติเปลี่ยนแปลงตามความยาวคลื่นและอุณหภูมิ (โมลต่อลิตร)

b = ความหนาของตัวอย่าง (เซนติเมตร)

c = ความเข้มของสาร (โมลต่อลิตร)

I_0 = ความเข้มแสงเริ่มต้น หรือความเข้มแสงก่อนผ่านตัวอย่าง

I_t = ความเข้มแสงสุดท้าย หรือความเข้มแสงเมื่อผ่านตัวอย่าง

2.12 เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

การทำงานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์อาศัยหลักการของการดูดกลืนแสงของสสาร ซึ่งระดับการดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะมีค่าไม่เท่ากัน ดังนั้น เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ต้องสามารถแยกลำแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นได้ โดยเมื่อใช้ลำแสงส่องไปยังตัวอย่าง เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์จะทำการวัดค่าความเข้มแสงที่สะท้อนออกมา (reflectance type) หรือความเข้มแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่าง (transmittance type) เปรียบเทียบกับความเข้มแสงที่ส่องเข้าไป โดยทำการวัดทุกๆ ความยาวคลื่นที่กำหนด แล้วแสดงผลเป็นกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น หรือจำนวนคลื่น (ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ, 2552)

องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ ได้แก่ แหล่งกำเนิดแสง (light source) อุปกรณ์แยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นหรือโมโนโครมาเตอร์ (monochromator) ช่องใส่ตัวอย่าง (sample cell) และตัวรับแสง (detector หรือ sensor) (พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์, 2547) ดังแสดงในภาพที่ 2.8

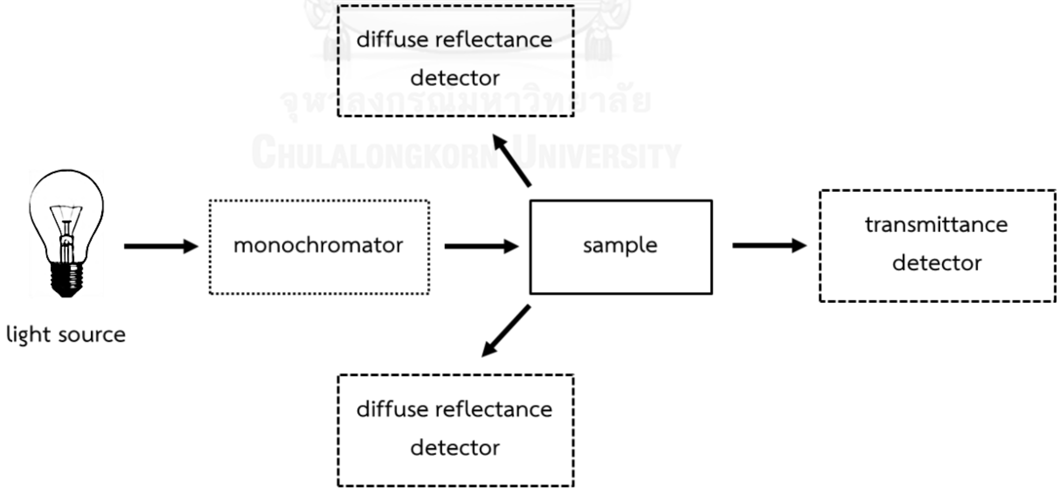
- แหล่งกำเนิดแสง (light source) มี 2 แบบ คือ หลอดฮาโลเจน (halogen lamp) และหลอดแอลอีดี (LED) โดยส่วนใหญ่ใช้หลอดฮาโลเจน เนื่องจากมีราคาถูกและใช้งานได้ทันที มีฟิลเตอร์ช่วยกรองแสงในช่วงความถี่ที่ไม่ต้องการออกและป้องกันไม่ให้ตัวอย่างร้อนเกินไป สำหรับหลอดแอลอีดี เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่มีกำลังไฟฟ้าน้อยจึงพกพาได้ง่าย มีอายุการใช้งานนาน แต่ไม่สามารถให้ความยาวคลื่นในช่วง 1700 ถึง 2500 นาโนเมตรได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

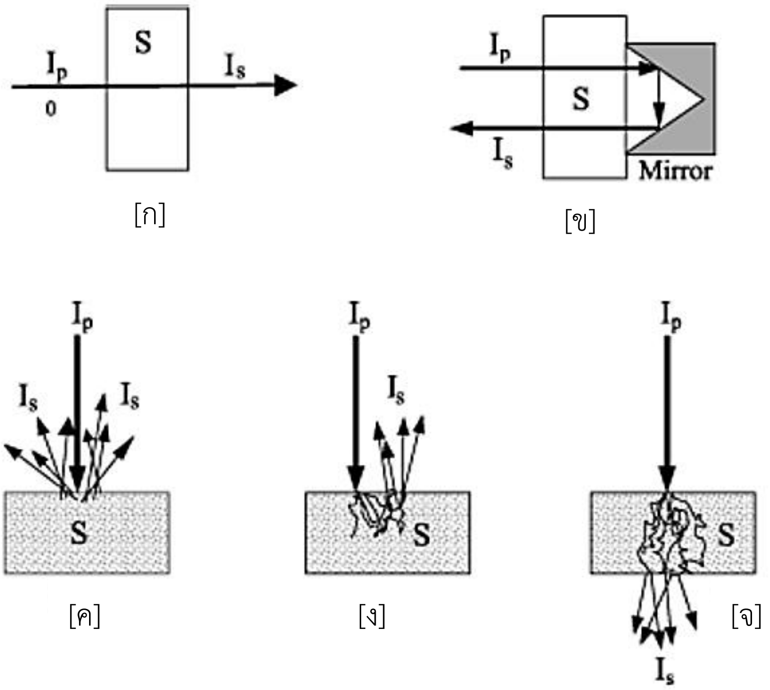
- โมโนโครมาเตอร์ (monochromator) เป็นอุปกรณ์แยกคลื่นแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นที่มีช่องผ่านแสงเข้าและออก เพื่อควบคุมแสงให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการและวัดความเข้มแสงในช่วงที่ทำการศึกษา

- ตำแหน่งวางตัวอย่าง (sample cell) และอุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง ต้องได้รับการออกแบบให้เหมาะสมกับตัวอย่าง ปริมาณของอนุภาคที่ใช้วิเคราะห์ และรูปแบบการวิเคราะห์ของตัวอย่าง ทั้งการวิเคราะห์แบบอยู่นิ่ง เคลื่อนที่ หรือหมุนขณะสแกนตัวอย่าง อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างควรมีลักษณะเป็นฝาเปิดจากด้านบนเพื่อให้น้ำหนักคงที่กดตัวอย่างให้แนบกับก้นอุปกรณ์ และให้มีการฉายแสงจากด้านใต้อุปกรณ์ โดยอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่างแบ่งได้หลายชนิดตามลักษณะของตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างเมล็ดธัญพืช เมล็ดพืชเดี่ยว ตัวอย่างที่เป็นผง ตัวอย่างที่มีลักษณะคล้ายแป้งเปียก ตัวอย่างที่เป็นของเหลว หรือผลไม้

- อุปกรณ์สำหรับตรวจวัด หรือตัวรับแสง (detector) เป็นตัวตรวจวัดปริมาณแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างออกมา ซึ่งขึ้นอยู่กับรูปแบบวิธีการวัด เช่น การส่องผ่าน (transmittance) การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) อินเทอร์แอกแทนซ์ (interactance) และการส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงแสง (transmittance through scattering medium) ดังแสดงในภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.8 องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (ดัดแปลงมาจาก ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์ และคณะ (2552))



ภาพที่ 2.9 รูปแบบวิธีการวัดด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี; การส่องผ่าน (transmittance) [ก], การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) [ข], การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) [ค], อินเทอร์แอกแทนซ์ (interactance) [ง], การส่องผ่านตัวอย่างที่มีการกระเจิงแสง (transmittance through scattering medium) [จ] (S = sample, I_p = incident light, I_s = light comes from the sample) (Pasquini, 2003)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.13 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.13.1 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์

น้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งน้ำมีความสามารถในการดูดกลืนรังสีเนียร์อินฟราเรดได้ดี ทำให้สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างอาหารหรือผลผลิตทางการเกษตรที่ต้องการวิเคราะห์มักถูกรบกวนและบดบังจากสเปกตรัมของน้ำ นอกจากนี้ สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดเกิดจากการรวมกันของโอเวอร์โทนและคอมเบนิชั่นของกลุ่มฟังก์ชั่นต่างๆ ทำให้ได้สเปกตรัมที่มีความซับซ้อน (ภาพที่ 2.10 [ก]) อีกทั้ง สเปกตรัมยังถูกทำให้ซับซ้อนเพิ่มมากขึ้นจากการกระเจิงแสงที่ส่งผลต่อการดูดกลืนที่แตกต่างกันตามความยาวคลื่น ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง สัญญาณรบกวนจากเครื่องมือ สภาพแวดล้อม และปัจจัยที่ทำให้เกิดความแปรปรวนอื่นๆ ดังนั้น การดึงข้อมูลที่อยู่ในสเปกตรัมมาใช้วิเคราะห์ จำเป็นต้องใช้เทคนิคเคโมเมทริกซ์ (chemometrics) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการทางเคมีร่วมกับหลักทางสถิติ มาใช้ใน

การประมวลผลและจัดการข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง (อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล, 2552) ตัวอย่างวิธีการปรับแต่งสเปกตรัม เช่น

1) การปรับเรียบแบบบซาวิตซ์กีโกเลย์ (Savitzky-Golay smooth) เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับการทำให้สัญญาณสเปกตรัมเรียบ โดยจะเลือกใช้ในกรณีที่ข้อมูลมีสัญญาณรบกวนมาก ต้องการทำให้สัญญาณเรียบและยังคงรูปร่างของสเปกตรัมให้เหมือนสเปกตรัมเริ่มต้น และเมื่อรูปร่างของสเปกตรัมมียอดแหลมเป็นจำนวนมาก

2) การแปลงค่าด้วยวิธีอนุพันธ์ (derivative transformation) การหาค่าอนุพันธ์ (derivative) ของสเปกตรัมเป็นวิธีที่ใช้แก้ปัญหาการซ้อนทับกันของพีค (overlapping) โดยการแปลงอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative) เป็นการหาค่าความชัน (slope) ของสเปกตรัมที่แต่ละความยาวคลื่น เส้นสเปกตรัมจะเลื่อนมาชิดติดกัน แต่พีคของสเปกตรัมยังมีฐานกว้าง ไม่สามารถแยกพีคออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงต้องแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) เนื่องจากทำให้พีคที่มีการซ้อนทับกันแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน และพีคตรงกับพีคของสเปกตรัมดั้งเดิม ทำให้ทราบตำแหน่งของความยาวคลื่น แต่สเปกตรัมที่ได้จะมีลักษณะหัวกลับลงมาด้านล่าง (ภาพที่ 2.10 [ข])

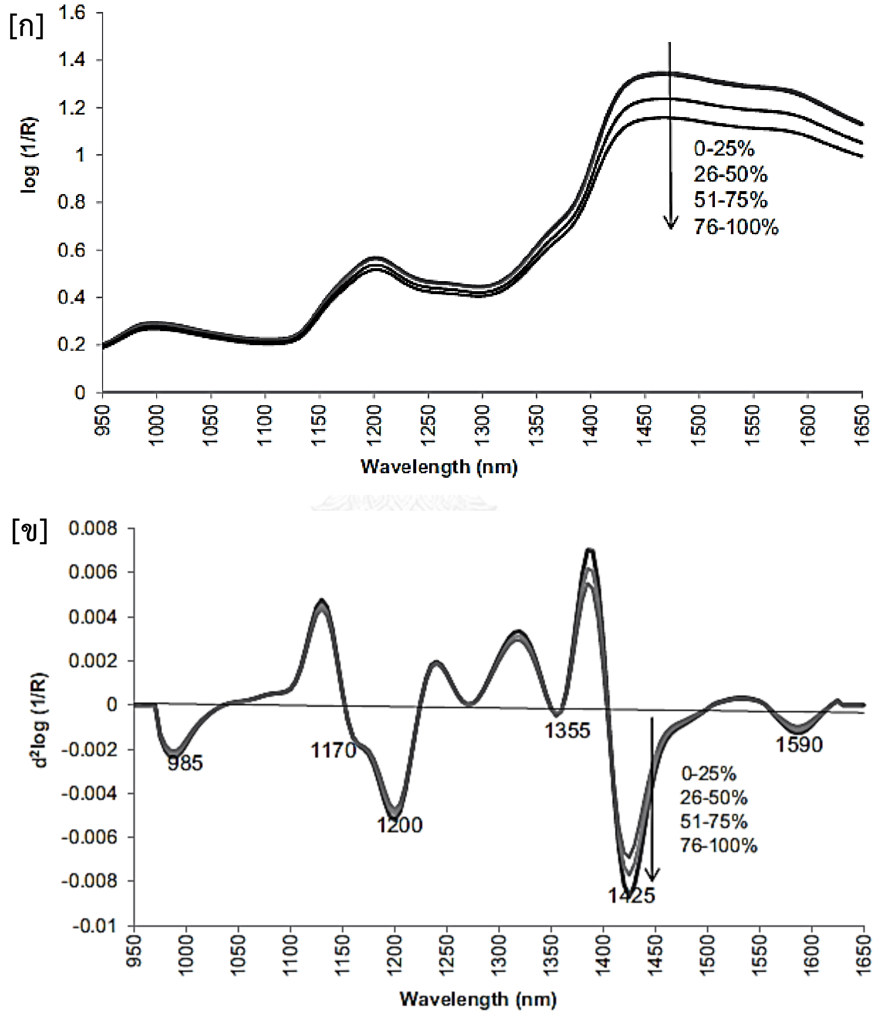
3) การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction; MSC) เป็นการลดการกระเจิงแสง (scattered light) ของสเปกตรัมที่เกิดจากการวัดแบบแพร่สะท้อน (diffuse reflectance) และแบบส่องผ่าน (transmittance) ซึ่งการกระเจิงแสงนั้นทำให้ความชันโดยรวมของสเปกตรัมเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้น MSC จึงเป็นวิธีการลดการกระเจิงแสงโดยการหมุนสเปกตรัมของแต่ละตัวอย่างให้ตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ย รูปร่างสเปกตรัมหลังจากใช้วิธี MSC ไม่แตกต่างจากสเปกตรัมดั้งเดิมมากนัก ในขณะที่รูปร่างของสเปกตรัมหลังจากการทำอนุพันธ์อันดับสองจะแตกต่างจากสเปกตรัมดั้งเดิมอย่างชัดเจน

4) การปรับเป็นค่ามาตรฐาน (normalization) เป็นการปรับแก้กลุ่มของสเปกตรัมเพื่อให้ได้สเปกตรัมมีจุดที่สำคัญเด่นขึ้น และเป็นการกำจัดความแปรปรวนเนื่องจากปัจจัยต่างๆ ที่ไม่ต้องการออกไป ทำให้ความซับซ้อนของข้อมูลลดลง ช่วยให้การทำสมการแคลิเบรชั่นง่ายขึ้น

5) การปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานและการปรับแนวโน้ม (standard normal variation (SNV) และ detrending; SNVD) เป็นวิธีการกำจัดอิทธิพลของการกระเจิงแสงเมื่อตัวอย่างถูกวัดด้วยวิธีสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) โดยเป็นการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (standard normal variation; SNV) แล้วตามด้วยการปรับแก้แนวโน้มหรือการลด

ความโน้มเอียงของสเปกตรัม (detrending) การปรับแก้แบบ SNV จะแตกต่างจากวิธี MSC คือ ไม่จำเป็นต้องมีสเปกตรัมอ้างอิงเหมือนวิธี MSC ที่ต้องใช้สเปกตรัมเฉลี่ยเป็นสเปกตรัมอ้างอิง ในวิธี SNV สเปกตรัมแต่ละเส้นจะถูกปรับแก้โดยปรับค่าการดูดกลืนให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (normalization)

6) การแก้ปัญหาการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม (baseline offset) เป็นการขยับสเปกตรัมให้เลื่อนมาอยู่ ณ จุดๆ หนึ่ง



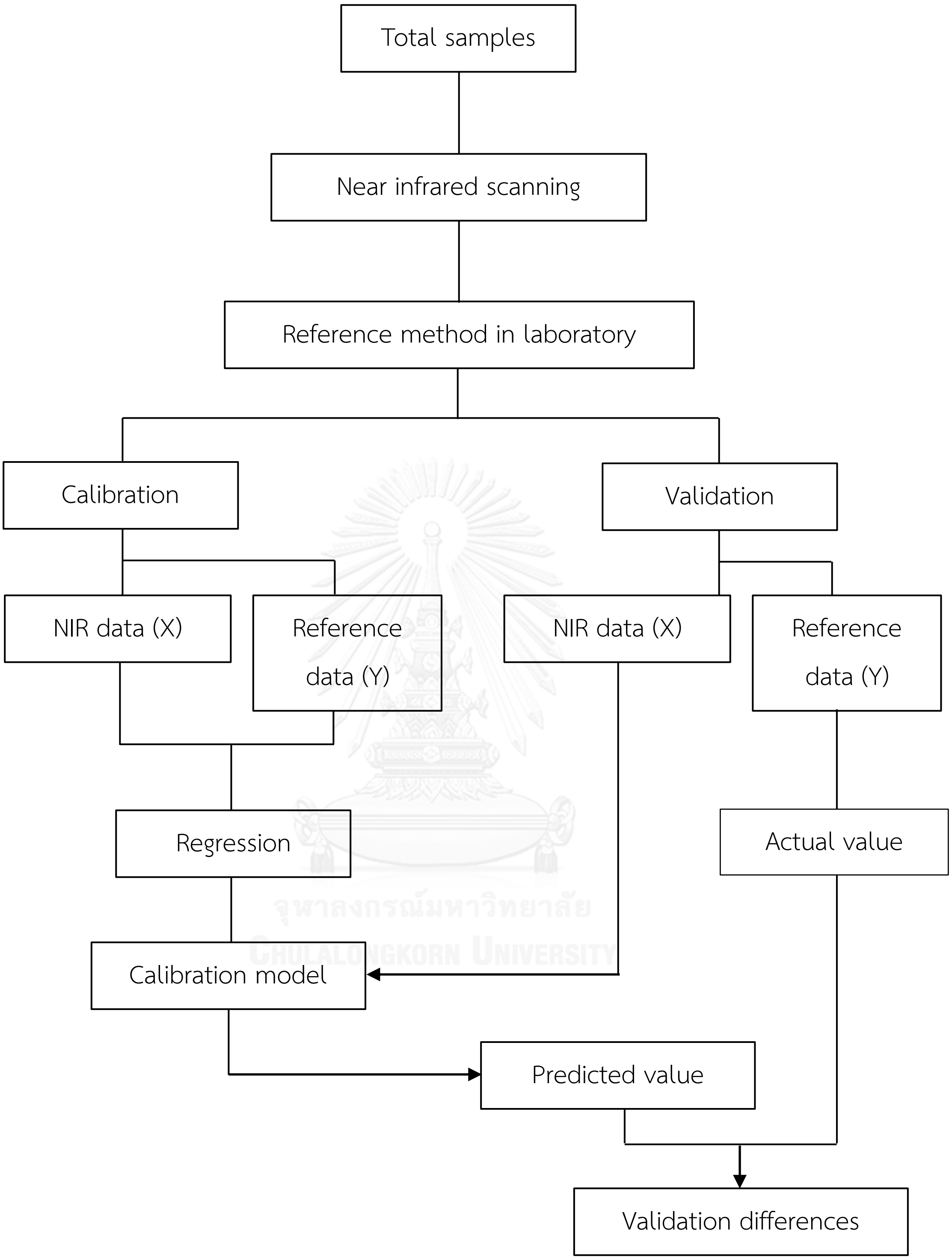
ภาพที่ 2.10 สเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง [ก] และผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สอง [ข] ของตัวอย่างข้าวที่ระดับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ต่างกัน ในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร (Dachoupakan Sirisomboon และคณะ, 2013)

2.13.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ จะอยู่ในรูปของความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น หรือจำนวนคลื่น และค่าการดูดกลืนแสง หรือที่เรียกว่า สเปกตรัม ซึ่งข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถนำมาใช้ในการทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการทราบได้ทันที ดังนั้น ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีทางคณิตศาสตร์ในการวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดที่ได้ รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมที่ได้กับค่าองค์ประกอบของตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (reference หรือ standard method) (ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ, 2552)

ภาพที่ 2.11 แสดงขั้นตอนการสร้างแบบจำลองสำหรับการทำนายค่าองค์ประกอบของตัวอย่างโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ซึ่งต้องใช้กลุ่มตัวอย่างที่ทราบปริมาณองค์ประกอบที่ต้องการทำนาย และข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างนั้นๆ โดยการสร้างแบบจำลองประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ (1) ขั้นตอนการสร้างแบบจำลองที่ใช้ทำนาย เรียกว่า การทำแคลิเบรชัน (calibration) และแบบจำลองที่ได้เรียกว่า แบบจำลองแคลิเบรชัน (calibration model) และ (2) ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของแบบจำลองแคลิเบรชันที่สร้างขึ้น ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า การทำแวลิเดชัน (validation) เมื่อได้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือแล้ว จึงนำแบบจำลองที่ได้ไปใช้ในทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์จากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดต่อไป (ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ, 2552)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

2.13.3 ขั้นตอนการทำแคลิเบรชัน

เป็นขั้นตอนในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน (calibration model) จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่าง หรือข้อมูลเชิงแสง (NIR data หรือ optical data) และข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (reference data) โดยกำหนดให้ค่าที่ได้จากสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดเป็นตัวแปรอิสระ (independent variables) หรือตัวแปร X และค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานเป็นตัวแปรตาม (dependent variables) หรือตัวแปร Y ค่าตัวแปร X อาจเป็นค่าที่ได้จากความยาวคลื่นใดคลื่นหนึ่ง (fixed wavelength) หรือบางความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (selected wavelength) หรือมาจากทุกๆ ค่าของความยาวคลื่นที่ศึกษา (full spectrum) ซึ่งอาจเป็นค่าสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (raw spectral data) หรือผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectral data) ก่อนเพื่อทำให้ข้อมูลของตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามมากขึ้น (ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ, 2552)

สิ่งสำคัญในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน คือ การหาตัวแปรอิสระ (ตัวแปร X) ที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (ตัวแปร Y) ที่ต้องการทำนาย โดยการคัดเลือกตัวแปรอิสระแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลัก คือ วิธีการเลือกความยาวคลื่น (wavelength selection methods) และวิธีใช้สเปกตรัมทั้งหมด (full spectrum methods) ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการเลือกใช้สเปกตรัมทั้งหมดในการวิเคราะห์เนื่องจากสามารถลดปัญหาข้อผิดพลาด และความไม่ถูกต้องของข้อมูลที่เกิดจากการเลือกความยาวคลื่น วิธีทางสถิติที่นิยมใช้สร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ได้แก่ การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principal components regression; PCR) และการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression; PLSR) (ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ, 2552)

การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principal components regression; PCR) เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) ของข้อมูลที่เป็นตัวแปรอิสระ เพื่อลดจำนวนตัวแปรเดิมลงโดยการสร้างองค์ประกอบหรือตัวแปรใหม่ (new factors) แล้วนำค่าของตัวแปรใหม่ที่สร้างขึ้นมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่ได้จากการวิธีมาตรฐาน เพื่อสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ซึ่งการทำ PCA เป็นวิธีการหนึ่งทางสถิติในการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัว (multivariate analysis) โดยใช้เทคนิคการลดจำนวนตัวแปรอิสระด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรใหม่เรียกว่า ปัจจัย หรือ องค์ประกอบ (factors หรือ principal components; PC) (ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ, 2552)

การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression; PLSR) เป็นวิธีที่ใช้การวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) และนิยมใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด PLSR เป็นเทคนิคในการลดจำนวนตัวแปรเช่นเดียวกับวิธี PCR แต่แตกต่างจาก PCR ในช่วงการจัดกลุ่มลดจำนวนตัวแปร โดยการสร้างตัวแปรใหม่นั้น PLSR มีการนำข้อมูลตัวแปรตามเข้าร่วมในการสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า ค่าคะแนนปัจจัย (factor loading) เห็นได้ว่า PLSR เป็นกระบวนการขั้นตอนเดียวไม่จำเป็นต้องทำขั้นตอน regression อีก ในการประยุกต์ PLSR เพื่อสร้างแบบจำลองแคลิเบรชัน ทำได้ 2 วิธี คือ PLS1 และ PLS2 โดยวิธี PLS1 คือ การสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายค่าตัวแปรตามเพียง 1 ตัว โดยใช้แบบจำลอง 1 แบบจำลอง ในขณะที่ PLS2 เป็นการสร้างแบบจำลองสำหรับทำนายค่าตัวแปรตามหลายตัวโดยใช้แบบจำลองเดียวกัน ซึ่งวิธี PLS1 จะให้ค่าความถูกต้องของการทำนายดีกว่า PLS2 (ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ, 2552)

การวิเคราะห์จำแนกประเภท (discriminant analysis) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยมีตัวแปรตาม 1 ตัว ซึ่งเป็นตัวแปรเชิงคุณภาพ และมีตัวแปรอิสระหลายตัว การวิเคราะห์จำแนกประเภทมีหลักการคล้ายกับการวิเคราะห์แบบถดถอย คือ มีตัวแปรตาม 1 ตัว ตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว แต่ต่างที่ลักษณะหรือชนิดของตัวแปรตาม โดยการวิเคราะห์แบบถดถอย ตัวแปรตามเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ ในขณะที่การวิเคราะห์จำแนกประเภท ตัวแปรตามคือตัวแปรเชิงคุณภาพหรือตัวแปรเชิงกลุ่ม (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) เช่น การใช้วิธี partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) และ soft independent modeling of class analogy (SIMCA) ในการจัดจำแนกลำไยผลช้ำและลำไยผลปกติ (Pholpho และคณะ, 2011)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.13.4 ขั้นตอนการทำแวลิเดชัน

เมื่อได้แบบจำลองแคลิเบรชันที่เหมาะสมแล้ว จำเป็นต้องทดสอบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากชุดข้อมูลที่สุ่มมานั้นสามารถนำมาใช้ทำนายข้อมูลชุดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้หรือไม่ ซึ่งการทดสอบที่นิยมใช้ คือ การทำ full cross validation และการทดสอบแบบประเมิน (prediction testing)

full cross validation เป็นการทดสอบแบบจำลองภายใน (internal validation) ตัวอย่างที่นำมาทดสอบแบบจำลองเป็นตัวอย่างชุดมาตรฐานทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชันของตัวอย่าง โดยเริ่มจากตัดตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้สร้างแบบจำลอง แล้วนำตัวอย่างที่เหลือมาสร้างแบบจำลอง นำแบบจำลองที่ได้มาประเมินค่าทางองค์ประกอบของตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 ที่ตัดออก จากนั้น ใส่ตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 กลับคืน

แล้วตัดตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 2 ออกจากชุดตัวอย่าง ทำขั้นตอนซ้ำจนครบทุกตัวอย่าง วิธีนี้เหมาะกับการใช้ทดสอบกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย เช่น น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง แล้วพิจารณาค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean square error of cross validation; *RMSECV*) (Williams, 2007)

การทดสอบแบบประเมิน (prediction testing) เป็นการทดสอบแบบจำลองภายนอก (external validation) ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่างชุดใหม่ (testing set) ที่มีวิธีการเตรียมตัวอย่าง การวัดสเปกตรัม สภาวะในการศึกษา รวมถึงการปรับแต่งสเปกตรัมเหมือนกับกลุ่มการทำแคลิเบรชั่น ตัวอย่างที่นำมาทดสอบจะผ่านการสแกนเพื่อให้ได้ค่าสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด แล้วนำไปแทนค่าในแบบจำลองแคลิเบรชันที่สร้างขึ้นเพื่อทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการทราบ (predicted value) แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบที่ต้องการทราบด้วยวิธีมาตรฐานได้ค่าวัดจริง (actual value) จากนั้น เปรียบเทียบค่าที่วัดได้จริงกับค่าทำนาย ว่ามีความถูกต้องมากเพียงใด และมีค่าเฉลี่ยของการทำนายและค่าเฉลี่ยของการวัดจริงมีความแตกต่างกันหรือไม่ (Burns และคณะ, 2007)

2.13.5 ค่าทางสถิติที่ใช้พิจารณาความแม่นยำของแบบจำลอง

1) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; r) เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลตัวแปร X และ Y ถ้าข้อมูลสองชุดมีความสอดคล้องกันมาก ค่า r ที่ได้จะเข้าใกล้ 1 ซึ่งในกรณีค่า r ที่ได้มีค่าเท่ากับ 1 หมายความว่าข้อมูลสองชุดมีความสอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ ในกรณีที่ค่า r เข้าใกล้ 0 หมายความว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน ทั้งนี้ ตัวแปร X และ Y อาจมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกหรือลบก็ได้ (Williams, 2007) การแปลความหมายของค่า r แสดงดังตารางที่ 2.12

2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; r^2) เป็นค่าที่แสดงถึงสัดส่วนความแปรปรวนของข้อมูล X ที่สามารถอธิบายโดยความแปรปรวนในข้อมูล Y ซึ่งมีค่าเป็นบวกเสมอ เช่น ถ้า r = 0.97 แล้ว r^2 = 0.941 หมายความว่า 94.1 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนของค่าที่วัดได้จริง (ตัวแปร X) อธิบายจากความแปรปรวนของค่าที่ทำนายได้ (ตัวแปร Y) และ 5.9 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือของความแปรปรวนของค่าที่วัดได้จริง มาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น วิธีการเตรียมตัวอย่างหรือวิธีการวิเคราะห์มาตรฐาน โดยค่า r^2 จะมีค่าเป็นบวกเสมอ (Williams, 2007) (ตารางที่ 2.12)

ตารางที่ 2.12 แนวทางในการอธิบายความสามารถและการนำแบบจำลองไปใช้ด้วยค่า *r* และ r^2

ค่า *r*	r^2	ความหมาย
±0.50	0-0.25	ไม่ควรใช้ใน NIRS calibration
±0.51-0.70	0.26-0.49	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ ควรหาเหตุผล
±0.71-0.80	0.50-0.64	สามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบ
±0.81-0.90	0.66-0.81	สามารถนำไปใช้ได้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบและประมาณค่าเบื้องต้น
±0.91-0.95	0.83-0.90	ควรใช้งานอย่างระมัดระวังในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัย
±0.96-0.98	0.92-0.96	ใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ
±0.99 ขึ้นไป	0.98 ขึ้นไป	ดีเยี่ยม สามารถนำไปใช้ได้กับทุกงาน

ที่มา: Williams (2007)

3) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เป็นค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างค่าที่วัดได้จริง (actual value) และค่าทำนาย (predicted value) ซึ่งเป็นการวัดความแม่นยำโดยรวมของแบบจำลอง ค่าที่ได้ควรมีค่าน้อย (Williams, 2007)

4) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบแบบจำลอง (standard error of prediction; *SEP*) เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; *SD*) ของความแตกต่างระหว่างค่าที่วัดได้จริงและค่าทำนายในกลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบแบบจำลอง ค่า *SEP* จะเป็นอิสระจากค่า bias ซึ่งต่างจากค่า *RMSEP* ที่มีการนำค่า bias มาใช้ในการคำนวณ ดังนั้น เมื่อรายงานผลโดยใช้ค่า *SEP* จำเป็นต้องรายงานผลคู่กับค่า bias เสมอ ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่าน้อยเช่นเดียวกันกับค่า bias (Williams, 2007)

5) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างแบบจำลอง (standard error of calibration; *SEC*) เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่วัดได้จริงและค่าทำนายในกลุ่มตัวอย่างสำหรับสร้างแบบจำลอง ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่าต่ำที่สุดเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามค่า *SEC* ที่ต่ำที่สุดอาจดีสำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชั่นเท่านั้น อาจไม่ดีสำหรับตัวอย่างอื่น (Williams, 2007)

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

ทดสอบแบบ cross validation ที่ใช้กลุ่มตัวอย่างในการทดสอบชุดเดียวกันกับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลอง ค่า *RMSECV* ที่ได้เกิดจากการนำค่า bias มาใช้คำนวณร่วมด้วย ดังนั้น เมื่อรายงานผลจึงไม่จำเป็นต้องรายงานค่า bias และค่าที่ได้ควรมีค่าน้อยเช่นเดียวกัน (Williams, 2007)

7) อัตราส่วนระหว่างค่า *SEP* ต่อ *SD* (ratio of standard error of prediction validation to standard deviation; RPD) เป็นอัตราส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้จริงของข้อมูลกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบแบบจำลองกับค่า *SEP* ซึ่งค่า RPD เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของแบบจำลองที่ได้ และค่าที่ได้ควรมีค่ามาก (Williams, 2007) (ตารางที่ 2.13)

8) อัตราส่วนระหว่างค่า *SEP* ต่อช่วงกว้างของข้อมูล (ratio of standard error of prediction validation to range; RER) เป็นอัตราส่วนระหว่างช่วงกว้างของค่าที่วัดได้จริงของข้อมูลในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบแบบจำลองกับค่า *SEP* ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่ามาก (Williams, 2007) (ตารางที่ 2.13)

ตารางที่ 2.13 แนวทางในการอธิบายประสิทธิภาพและการนำแบบจำลองไปใช้ด้วยค่า RPD และ RER

ค่า RPD	ค่า RER	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: Williams (2007)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.14 ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แบ่งได้เป็น 3 ปัจจัยหลัก ได้แก่ (วารุณี ธนะแพสย์ และคณะ, 2552)

1) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือ

- มาตราส่วนความยาวคลื่น ปัจจัยที่ส่งผลต่อความคงที่ของการกำหนดค่าความยาวคลื่น คือ ประสิทธิภาพของเครื่องมือ อะไหล่ หรืออุปกรณ์ที่ใส่เข้าไป การสั่นสะเทือนที่เกี่ยวกับเครื่องมือ การขยายตัวและการหดตัวจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป การเสื่อมของส่วนประกอบของการให้แสง รวมถึงอุณหภูมิรอบเครื่องมือ โดยปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับความคงที่ของมาตราส่วนความยาวคลื่น คือ อุณหภูมิ ดังนั้น การควบคุมอุณหภูมิจึงถูกใช้ในเครื่องมือมากที่สุดเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องมือ

- การควบคุมอุณหภูมิของเครื่องมือ พัดลมที่อยู่ในเครื่องมือมีหน้าที่ทำให้เครื่องเย็น ดังนั้น ถ้าพัดลมหยุดทำงาน จะทำให้อุณหภูมิในเครื่องมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจส่งผลต่อองค์ประกอบบางชนิดในตัวอย่าง ทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้

- ความชื้นสัมพัทธ์ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศเปลี่ยนไป อาจทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องมือเปลี่ยนไปด้วย

- ความไม่คงที่ของเครื่องมือต่อเครื่องมือ เครื่องที่เป็นโมเดลเดียวกัน อาจให้ประสิทธิภาพต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นแบบจำลองเดียวกัน

2) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่าง

- ความหนาแน่นของตัวอย่าง มีผลต่อการเกิดสัญญาณแบบแพร่สะท้อนแสง โดยความหนาแน่นมีอิทธิพลต่อจำนวนและการบรรจุตัวอย่างลงในอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่าง ซึ่งถ้าบรรจุตัวอย่างหนาแน่นไม่เท่ากัน จะส่งผลทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดสอบ

- ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบ และโครงสร้างของตัวอย่าง ซึ่งจะส่งผลต่อการสะท้อนแสงแบบแพร่

- อุณหภูมิของตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างที่มีอุณหภูมิต่างกัน อาจทำให้อุณหภูมิภายในเครื่องมือมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเครื่องมือที่ใช้ตรวจคลื่นความถี่มีความไวต่ออุณหภูมิ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ดังนั้น ในการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดที่มีอุณหภูมิเดียวกัน ควรทำพร้อมกันอย่างต่อเนื่อง แล้วจึงวิเคราะห์ชุดตัวอย่างต่อไปที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

- อุณหภูมิห้อง ส่งผลต่อการแสดงประสิทธิภาพของเครื่องมือ เครื่องมือตรวจคลื่นความถี่และส่วนประกอบอื่นๆ มีความไวต่ออุณหภูมิ โดยเฉพาะการใช้การต่อเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่ใช้คำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ ซึ่งอาจมีอุปกรณ์ไม่พร้อมในการควบคุมอุณหภูมิในเครื่อง

3) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่

- แนวทางปฏิบัติในการสร้างแบบจำลองแคลิเบรชั่น เช่น การเลือกตัวอย่าง โดยต้องมีการระบุถึงแหล่งกำเนิดของความแปรเปลี่ยนที่น่าจะเป็นไปได้ในผลิตภัณฑ์ที่จะตรวจสอบ และต้องมีการรวมกลุ่มของชุดตัวอย่างที่จะเป็นตัวแทนของทั้งหมดของความแปรเปลี่ยนหรือแตกต่างกันรวมทั้งแหล่งกำเนิด ส่วนประกอบทางเคมีและกายภาพ

- การเตรียมตัวอย่าง เช่น กระบวนการสุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตัวอย่างควรเป็นตัวแทนที่แท้จริงของประชากรตัวอย่างทั้งหมด ชนิดของเครื่องบดที่เลือกใช้ สภาพของเครื่องบด และการผสมหลังจากการบด

- การบรรจุตัวอย่างในอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่าง เช่น การผสม การบรรจุ การทำความสะอาด และความไม่ละเอียดถี่ถ้วนของผู้ปฏิบัติการ

2.15 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในอุตสาหกรรม

การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในอุตสาหกรรมไทย ส่วนใหญ่มักใช้ในงานวิเคราะห์ด้านปริมาณ (qualitative analysis) ในลักษณะของวิธีประจำในการวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid analytical routine method) ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหารเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมีความแพร่หลายมากขึ้นในหลายอุตสาหกรรม เนื่องจากประหยัดเวลา ลดการใช้สารเคมี และลดต้นทุนในระยะยาวในการควบคุมคุณภาพการผลิตตั้งแต่วัตถุดิบจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีการใช้เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์เพิ่มขึ้นในภาคอุตสาหกรรม (วารุณี ธนะแพสย์, 2552)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหาร

โรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการวิธีในการตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบ (raw material) ผลิตภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป (semi=finished products) และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (finished products) (ตารางที่ 2.14) ที่มีความรวดเร็วและถูกต้องเป็นอย่างมาก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการที่สามารถตรวจติดตามกระบวนการผลิตเพื่อการตัดสินใจที่รวดเร็วในกรณีที่เกิดความผิดพลาดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต อีกทั้ง ยังมุ่งหวังให้ได้วิธีการที่ประหยัดทั้งค่าใช้จ่ายและเวลา และยังสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามมาตรฐาน ซึ่งเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทร สโกปีเป็นวิธีที่สามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพได้อย่างรวดเร็ว และสามารถใช้ควบคุมการผลิตตั้งแต่วัตถุดิบไปจนกระทั่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ปิติพร ฤทธิเรืองเดช, 2552)

การประยุกต์ด้านอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเนียร์อินฟราเรดมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่ไม่ใช่อาหารกันอย่างแพร่หลายเพิ่มมากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมกลุ่มเภสัชกรรม กลุ่มปิโตรเคมีและพลังงาน กลุ่มยางและโพลิเมอร์ กลุ่มเยื่อกระดาษและไม้ และกลุ่มอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2.14 อย่างไรก็ตาม ก่อนการนำเทคโนโลยีเนียร์อินฟราเรดมาประยุกต์จำเป็นต้องมีการศึกษาเบื้องต้นก่อน เพื่อลดผลกระทบต่างๆ รวมถึงการออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องการมากที่สุด (ณัฐภรณ์ สุทธิวิจิตรภักดี, 2552)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.14 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดในด้านต่างๆ

การประยุกต์ใช้	องค์ประกอบที่วัด	อ้างอิง
อุตสาหกรรมอาหาร		
ธัญพืชและผลิตภัณฑ์	ปริมาณโปรตีน และอะไมโลสในข้าวกล้อง	Bagchi และคณะ (2015)
นมและผลิตภัณฑ์	ปริมาณโปรตีน ไขมัน และแลคโตส ในน้ำนมดิบ	Sasic และคณะ (2001)
	ปริมาณความชื้นในนมผง	Reh และคณะ (2004)
	ปริมาณ และขนาดของอนุภาคเม็ดไขมันในนม	Aernouts และคณะ (2015)
ผักและผลไม้สด	ค่าบริกซ์ ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตสในมะม่วง	Delwiche และคณะ (2008)
	ความแน่นเนื้อ สีผิว และไลโคพีนในมะเขือเทศ	Clement และคณะ (2008)
	ระยะเวลาเก็บรักษาแอปเปิล	Paz และคณะ (2009)
	การจำแนกสายพันธุ์ของแอพพริคอท	Camps และคณะ (2009)
เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์	ปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันในหมูยอ	Ritthiruangdej และคณะ (2011)
	การเจือปนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว	Schmutzler และคณะ (2015)
ผลิตภัณฑ์ประมง	ความสดของเนื้อปลา	Nilsen และคณะ (2005)
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม	ปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักไวน์	Zeaiter และคณะ (2006)
	ค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในเบียร์สด	Giovenzana และคณะ (2014)
	ปริมาณของสารประกอบฟีนอลในไวน์แดง	Martelo-Vidal และคณะ (2014)
อุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร		
เภสัชกรรม	การเปลี่ยนรูปของผลึกของสาร	Blanco และคณะ (2006)
	ปริมาณ ranitidine ในกระบวนการผลิตยา	Rosa และคณะ (2008)
	ประเมินคุณภาพของยาพาราเซตามอล	Pestieau และคณะ (2014)
ปิโตรเคมีและพลังงาน	สมบัติและคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซล	Meher และคณะ (2006)
	ปริมาณลิกโนเซลลูโลสในซังข้าวโพด	Xue และคณะ (2015)
ยางและโพลิเมอร์	ปริมาณการเกิดพอลิเมอร์ และจลศาสตร์ของปฏิกิริยา polymerization ของ caprolactone	Blanco และคณะ (2010)
ไม้และเยื่อกระดาษ	ค่าความหนืด ค่าการเกิดเป็นพอลิเมอร์ ค่าแคปปาปริมาณกลูแคนของเยื่อยูคาลิปตัสที่ผ่านการฟอก	Fardim และคณะ (2002)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.16 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสปกโทรสโกปีในการตรวจหาราและสารพิษจาราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

ตัวอย่างการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

Berardo และคณะ (2005) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในข้าวโพด ซึ่งพบว่า แบบจำลองที่สร้างขึ้นสามารถใช้ทำนายการปนเปื้อนของรา *Fusarium verticillioides* ปริมาณของเออร์โกสเทอรอล และฟูโมไนซินบี 1 ได้อย่างแม่นยำด้วยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.78, 0.81 และ 0.78 ตามลำดับ

Liu และคณะ (2010) ได้ศึกษาการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 350-2500 นาโนเมตร ในการแยกความแตกต่างของต้นข้าวที่มีการปนเปื้อนด้วยรา *Ustilaginoidea virens* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรค rice false smut disease (RFSD) ในข้าว ที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ ได้แก่ ต้นข้าวที่ไม่มีการปนเปื้อนด้วยรา ต้นข้าวที่มีการปนเปื้อนด้วยราเล็กน้อย ต้นข้าวที่มีการปนเปื้อนด้วยราปานกลาง และต้นข้าวที่มีการปนเปื้อนด้วยรามาก

Shahin และคณะ (2011) ได้ใช้เนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 400-1000 นาโนเมตร หรือช่วง visible-NIR วิเคราะห์แบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) เพื่อแยกกลุ่มข้าวสาลีที่มีการติดเชื้อของรา *Fusarium* ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ได้เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุดสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเมล็ดที่มีและไม่มีการติดเชื้อของรา และ 86 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเมล็ดที่มีการติดเชื้อปานกลางและติดเชื้ออย่างรุนแรง

Williams และคณะ (2012) ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 1000-2498 นาโนเมตร ในเทคนิค hyperspectral imaging ในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของรา *Fusarium verticillioides* ที่เจริญบนผิวของเมล็ดข้าวโพดที่เวลาต่างๆ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของการเจริญได้เป็นสองช่วง คือ ช่วง 17 ชั่วโมงหลังการทำให้ติดเชื้อ และช่วง 20-90 ชั่วโมงหลังการทำให้ติดเชื้อ และยังสามารถใช้ทำนายระดับการปนเปื้อนของราได้อีกด้วย

Dachoupakan Sirisomboon และคณะ (2013) ได้รายงานความเป็นไปได้ในการใช้ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ในการตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) เท่ากับ 0.668 และ 0.437 ตามลำดับ

ตัวอย่างการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร

Hernández-Hierro และคณะ (2008) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษจากรา 3 ชนิดในพริก ได้แก่ อะฟลาทอกซินรวม อะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ โดยจากงานวิจัยสามารถสร้างแบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.938, 0.955 และ 0.853 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายอยู่ในเกณฑ์ที่แม่นยำ

Tripathi และคณะ (2009) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาทำนายระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่น โดยจากงานวิจัยสามารถสร้างแบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.98 ซึ่งสามารถใช้ทำนายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในพริกป่นในช่วง 15-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้อย่างแม่นยำ

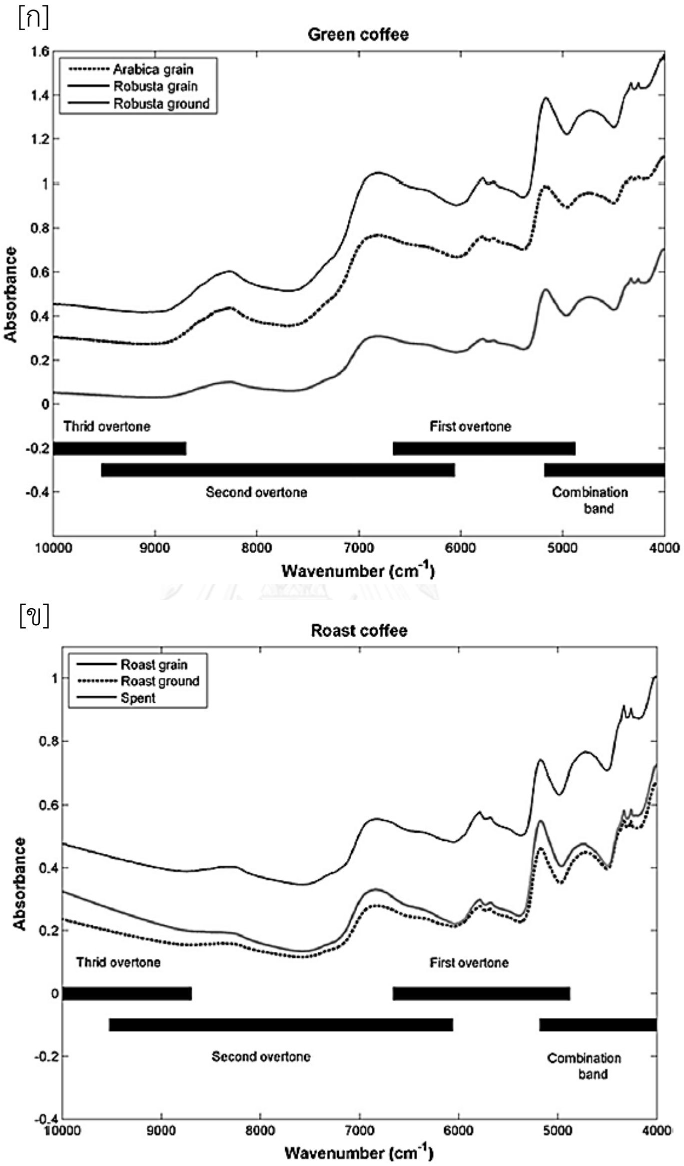
Gaspardo และคณะ (2012) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-NIR) ในการตรวจหาปริมาณของฟูโมนิซินบี 1 และบี 2 ในข้าวโพด ได้แบบจำลองที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดยกกำลังสองเฉลี่ยของแบบจำลองแคลิเบรชั่น (*RMSEC*) และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างแบบจำลอง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

Giacomo และคณะ (2013) ได้ใช้เนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 650 ถึง 2500 นาโนเมตร ในการตรวจหาปริมาณฟูโมนิซินในข้าวโพด โดยได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.995 ซึ่งสามารถใช้ทำนายปริมาณการปนเปื้อนของฟูโมนิซินในข้าวโพดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.17 การประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในกาแฟ

ปัจจุบันได้มีการการประยุกต์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีกันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมกาแฟ โดยมีการใช้ในแทบทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตกาแฟ ตั้งแต่เมล็ดกาแฟสารจนได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยเฉพาะการใช้เนียร์อินฟราเรดในการแยก (discrimination) รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) เมล็ดกาแฟคั่ว (roasted coffee bean) และกากกาแฟ (spent coffee) ระหว่างกาแฟอะราบิกาและกาแฟโรบัสตา

(Esteban-Díez และคณะ, 2007; Pizarro และคณะ, 2007) ภาพที่ 2.12 แสดงสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดของเมล็ดกาแฟสารและเมล็ดกาแฟคั่วของกาแฟอะราบิกาและโรบัสตา



ภาพที่ 2.12 สเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเมล็ดกาแฟสาร [ก] และเมล็ดกาแฟคั่ว [ข] (Páscoa และคณะ, 2015)

นอกจากนี้ ยังมีการใช้เนียร์อินฟราเรดในการจัดกลุ่ม (classification) ตัวอย่างเมล็ดกาแฟที่มาจากรอบการผลิตและผู้ผลิตที่แตกต่างกัน รวมถึงใช้บอกปริมาณและใช้แยกเมล็ดกาแฟที่มีความเสียหายออกจากเมล็ดกาแฟที่สมบูรณ์ (Santos และคณะ, 2012) จากความสามารถของเนียร์อินฟราเรดที่สามารถใช้ในการแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างเมล็ดกาแฟคั่วแต่ละระดับได้ (roasting levels) ทำให้มีการพัฒนาการใช้เนียร์อินฟราเรดในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มกาแฟ (sensory test หรือ cup quality test) เช่น ความเป็นกรด รสขม เนื้อกาแฟ กลิ่น และคุณภาพโดยรวม (Ribeiro และคณะ, 2011) อีกทั้ง การใช้เนียร์อินฟราเรดสามารถบอกถึงแหล่งเพาะปลูกกาแฟทางภูมิศาสตร์ เนื่องจากกาแฟที่มาจากแหล่งเพาะปลูกต่างพื้นที่ ก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน (Alonso-Salces และคณะ, 2009) และใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก (chlorogenic acid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในกาแฟได้อีกด้วย (Zuorro และคณะ, 2012)

Zhang และคณะ (2013) ได้ศึกษาการใช้เนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 10000-4000 ต่อเซนติเมตร ในการหาปริมาณคาเฟอีนในเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อะราบิกา โดยนำเมล็ดกาแฟที่ระดับการคั่วต่างๆ ไปบด แล้ววิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนด้วยวิธี HPLC-UV หลังจากนั้นสร้างแบบจำลองแคลิเบรชั่นด้วยวิธีด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) โดยเลือกใช้สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการทำอนุพันธ์อันดับที่สอง และการทำ stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเลือกตัวแปร (variable selection) ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแบบจำลอง โดยแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; *r*) สูงถึง 0.918 และมีค่า root mean square error of cross validation (*RMSECV*) เท่ากับ 0.375 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการทำนายปริมาณคาเฟอีนในเมล็ดกาแฟคั่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยแก้วขนาด 50 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
2. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 22 x 28 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Menzel-Glaser, Germany
3. กระดาษกรอง ขนาด 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman No.1, England
4. กระทงฟอยล์บรรจุอาหาร บริษัท ยูเนียน อินตา จำกัด, Thailand
5. กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Nipro, Thailand
6. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอร์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
7. ขวดดูแรน ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
8. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
9. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
10. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
11. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ รุ่น Maxima บริษัท Elga, England
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น SS-325 และ ES-315 ยี่ห้อ Tomy, Japan
13. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform - Near infrared spectrometer; FT-NIR) รุ่น MPA บริษัท Bruker, Germany
14. เครื่องปั่นผสม รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
15. เครื่องปั่นอเนกประสงค์ รุ่น HR 2102 และรุ่น HR 2115 บริษัท Philips, Indonesia
16. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak
17. จานเพาะเชื้อแก้ว บริษัท Pyrex, England
18. จานเพาะเชื้อพลาสติก บริษัท Greiner bio – one, Thailand

19. ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ
    - aluminium clamp บริษัท Pyrex, England
    - fritted glass support base ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
    - กรวยแก้ว ขนาด 300 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
    - กระดาษกรอง ชนิด regenerated cellulose ขนาด 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Sartorius Biolab Products, Germany
    - ขวดลดความดัน (suction flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England
    - ปั๊มลดความดัน บริษัท Sibata Scientific Technology, Japan
20. ชุดเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromotography, HPLC)
    - คอลัมน์ C18 5 ไมโครเมตร ขนาด 250 × 4.60 มิลลิเมตร รุ่น Luna ยี่ห้อ Phenomenax, USA
    - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
    - เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟสมรรถนะสูง รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
    - ปั๊ม autosampler รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
21. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service
22. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Lab Micro, Thailand
23. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
24. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
25. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
26. ตู้อบลมร้อน รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
27. ตู้อบแห้ง บริษัท Conthem Scientific, New Zealand
28. ถุงมือยาง ยี่ห้อ SemperGuard บริษัท สยามเซมเพอร์เมจ จำกัด, Thailand
29. โถดูดความชื้น บริษัท เบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด, Thailand
30. บีกเกอร์ ขนาด 200, 600 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, England

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

31. ปิเปตต์แก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร บริษัท Qualicolor
32. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
33. พาสเจอร์ปิเปตต์แก้ว ขนาด 230 มิลลิเมตร รุ่น D812 บริษัท Volac
34. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2.5, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
35. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler, Thailand
36. สไลด์ ขนาด 25.6 x 76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sail Brand, China
37. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 x 150 และ 13 x 100 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
38. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 0.6 และ 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, USA
39. หัวกรองสำเร็จรูป ชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Fortune Scientific, Thailand
40. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert, Germany
41. อ่างอัลตร้าโซนิก รุ่น SORONEX RX 100 ยี่ห้อ Bandelin, Germany
42. ฮีมาไซโตมีเตอร์ ยี่ห้อ Boeco, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เคมีภัณฑ์

1. กรดฟอร์มิก (CH_2O_2) บริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซิติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. กลีเซอรอล 85% (glycerol 85%) บริษัท Merck, Germany
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
5. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท Merck, Germany
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Ajax, Australia
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
9. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
10. สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บริษัท Sigma, USA
11. อะซีโตไนไตรล์ (CH_3CN) บริษัท Labscan, Thailand
12. อิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (immunoaffinity column) รุ่น Ochratest บริษัท VICAM, USA
13. เอทานอล (C_2H_5OH) บริษัท J.T. Baker, USA
14. Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) บริษัท Merck, Germany
15. Potato Dextrose Agar (PDA Agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
16. Tween 20 บริษัท Merck, Germany
17. Tween 80 บริษัท Merck, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (green coffee beans) ซึ่งหมายถึง เมล็ดกาแฟแห้งที่ได้จากผลกาแฟสุกที่เอาส่วนเปลือกและผนังผลชั้นในหรือเปลือกชั้นในออกแล้ว แต่ยังไม่ผ่านการคั่ว (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552b) โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกาที่เก็บเกี่ยวในช่วงปี พ.ศ. 2555-2556 จากไร่กาแฟและศูนย์รวบรวมเมล็ดกาแฟในจังหวัดเชียงใหม่ รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิท และเก็บรักษาไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.2 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราทั้งหมดและราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

ขั้นตอนการตรวจหาการปนเปื้อนราทั้งหมดและราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่ามีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแสดงในภาพที่ 3.1 โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่าง แล้วสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform-Near infrared spectrometer; FT-NIR) (MPA, Bruker, Germany) จากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปตรวจหาการปนเปื้อนราโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างแบบจำลอง

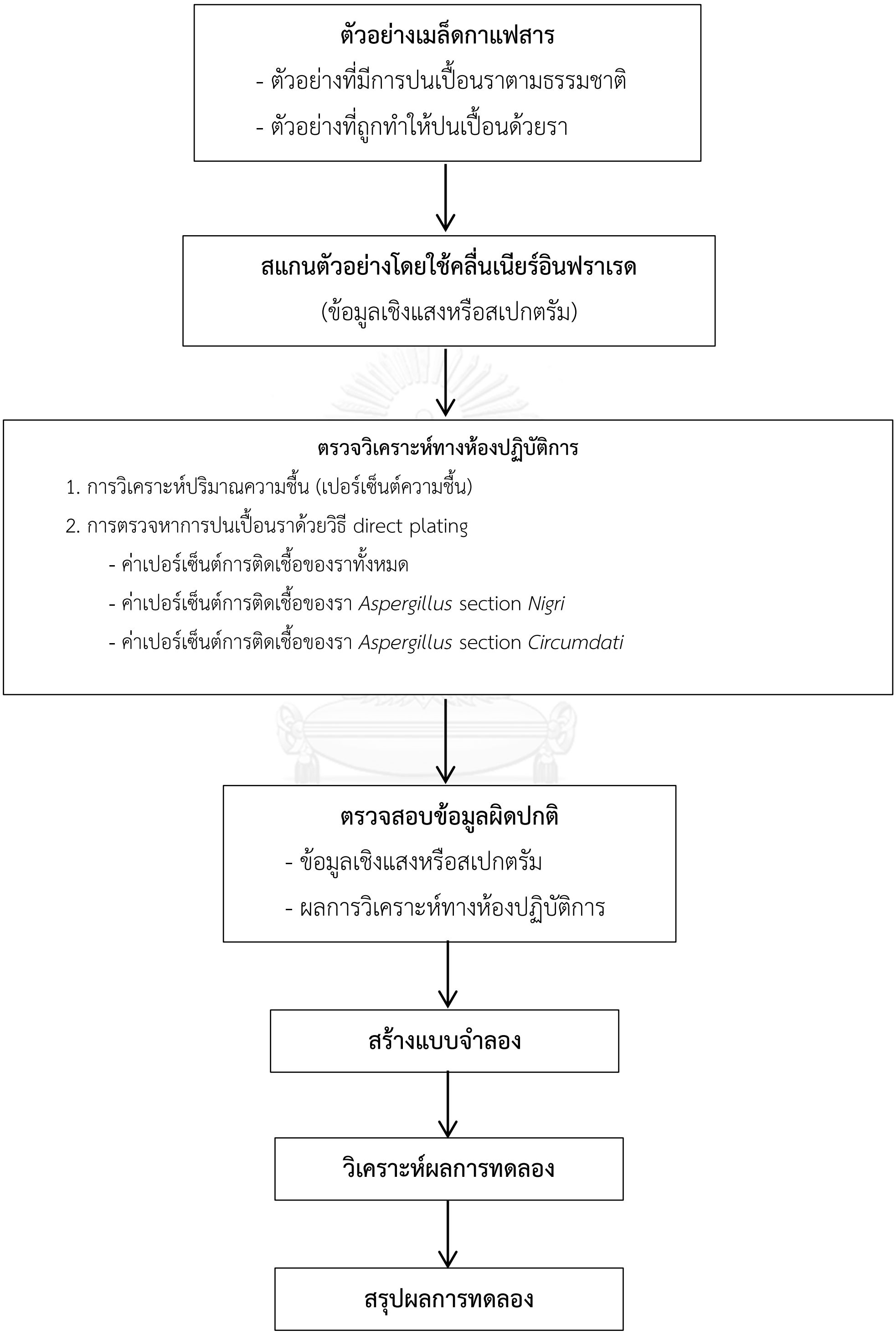
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

1) ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ (naturally contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 3.1 จำนวน 100 ตัวอย่าง

2) ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (artificially contaminated sample) เป็นตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการเติมสารแขวนลอยสปอร์ของราดำในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ที่แยกได้จากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารและมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ โดยเติมสารแขวนลอยสปอร์ของราที่ความเข้มข้น 10^2, 10^4, 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ไม่พบการปนเปื้อนของรา แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ตัวอย่างที่มีการเติมสารแขวนลอยสปอร์ของรามีความชื้น

ใกล้เคียงกับตัวอย่างจากธรรมชาติ จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน รวมทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาการปนเปื้อนราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

3.2.2 การสแกนตัวอย่างโดยใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรด

นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบรรจุในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างซึ่งก้นของภาชนะทำด้วยควอทซ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร ลึก 8.9 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2 [ก]) โดยบรรจุให้ได้ปริมาตรเท่ากับหนึ่งส่วนสี่ของภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่าง แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (ภาพที่ 3.2 [ข]) ในแบบแพร่สะท้อนแสง (diffuse reflectance) โดยวางบนตำแหน่งรับคลื่นเนียร์อินฟราเรดที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) (ความยาวคลื่นประมาณ 800-2500 นาโนเมตร) ซึ่งตรวจวัดจำนวนคลื่นทุกๆ 16 จำนวนคลื่นต่อเซนติเมตร ตัวอย่างกาแฟสาร 1 ตัวอย่าง ทำการสแกน 2 ครั้ง ในการสแกนแต่ละครั้งตัวอย่างจะหมุน 3 รอบ การหมุน 1 รอบได้เส้นสเปกตรัม 1 เส้น เก็บข้อมูลเชิงแสง (สเปกตรัม) ที่ได้จากการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดจากเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ด้วยโปรแกรม OPUS 7.0.122 (Bruker, Germany) ได้ทั้งหมด 696 เส้น ซึ่งเป็นสเปกตรัมจากตัวอย่างธรรมชาติ 600 เส้น และจากตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา 96 เส้น แล้วแปลงข้อมูลเชิงแสงทั้งหมดที่ได้ให้เป็นรูปแบบ JCAMP-DX เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางเคโมเมทริกซ์ (chemometrics) จากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปตรวจหาปริมาณความชื้น การปนเปื้อนราทั้งหมดและราในสกุล *Aspergillus* ตามวิธีทางห้องปฏิบัติการทันที

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

3.2.3 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) กำหนดให้คุณภาพของเมล็ดกาแฟสารทั่วไปมีความชื้นได้ไม่เกิน 12.5 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้ง ถ้าปริมาณความชื้นที่สูงเกินไป จะส่งเสริมการเจริญของราบนเมล็ดกาแฟ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด โดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามวิธีมาตรฐานจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (มกษ. 5701-2552)

เปิดฝากล่องอลูมิเนียมที่มีฝาปิด โดยเอาฝาซ้อนไว้ใต้กล่องหรือวางข้างๆ แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักของกล่องและฝาปิดด้วยเครื่องชั่งที่มีความละเอียดสองตำแหน่ง จากนั้น ตักตัวอย่างเมล็ดกาแฟประมาณ 10 กรัม ใส่ในกล่องอลูมิเนียมที่ผ่านการอบ แล้วชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นอบกล่องอลูมิเนียมที่มีตัวอย่างเมล็ดกาแฟในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาและเอาฝาซ้อนไว้ใต้กล่องหรือวางข้างๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ± 0.5 ชั่วโมง แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละสองซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาคผนวก ค.1)

3.2.3.2 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่าง

นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ผ่านการสแกนแล้วจากข้อ 3.2.2 มาตรวจหาการปนเปื้อนของราด้วยวิธี direct plating จากนั้นคัดแยกและจัดจำแนกราที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอ และทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของราที่คัดแยกได้

(1) วิธี direct plating

Direct plating เป็นวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการตรวจหา นับจำนวน และคัดแยกราที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีลักษณะเป็นชิ้น (particulate foods) เช่น เมล็ดถั่ว และเมล็ดธัญพืช เป็นต้น (Samson และคณะ, 2004) ทำได้โดยสุ่มหยิบเมล็ดกาแฟสารที่ผ่านการสแกนแล้วจากบริเวณก้นภาชนะสำหรับการสแกนตัวอย่างจากข้อ 3.2.2 ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ตัวอย่างละ 25 เมล็ด วางบนอาหารแข็ง DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar) (ภาคผนวก ก.1) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการคัดแยกและนับจำนวนราในอาหารหรือผลผลิตทางการเกษตรที่มีค่า water activity (a_w) ต่ำกว่า 0.90 เช่น อาหารแห้ง เป็นต้น

(Samson และคณะ, 2004) โดยวาง 5 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนเมล็ดกาแฟสารที่พบการเจริญของราทุกชนิด ราดำและราเหลือง แล้วรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (ภาคผนวก ค.2) จากนั้น แยกราที่มีลักษณะโคโลนีสีดำและสีเหลืองลงในอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก.2) เพื่อทำการจัดจำแนกต่อไป

(2) การจัดจำแนกรา

นำราที่มีโคโลนีสีดำและสีเหลืองที่แยกได้จากวิธี direct plating ที่คาดว่ามีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอมาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characterization) ทั้งลักษณะที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี และลักษณะของโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic characters) เช่น ลักษณะของ conidia conidiophores และ conidial heads ตามวิธีของ Samson และคณะ (2004) และ Pitt และคณะ (2009) คัดเลือกราดำที่จำแนกในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และราเหลืองที่จำแนกในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอในการทดลองขั้นต่อไป

(3) การทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของราที่คัดเลือก

การผลิตโอคราทอกซินเอของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำราที่มีโคโลนีสีดำและสีเหลืองที่คัดเลือกได้จากวิธี direct plating มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บสปอร์เพื่อเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.1) เจือจางให้มีจำนวนสปอร์อยู่ที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ในการนับสปอร์ จากนั้น หยดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงกลางอาหารแข็ง PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เมื่อบ่มครบ 7 วัน เจาะวุ้น 3 ชิ้น บริเวณกลางโคโลนีใส่ลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ชั่งน้ำหนักวุ้นทั้ง 3 ชิ้น แล้วเติมเมทานอลและกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 25 : 1 (ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพื่อสกัดโอคราทอกซินเอโดยอาศัยอ่างอัลตร้าโซนิก (ultrasonic bath) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วระเหยเมทา

นอลด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทแล้วเติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตไนไตรล์ : น้ำปลอดประจุ : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 49.5 : 49.5 : 1) (ภาคผนวก ข.3) และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยหัวกรองสำเร็จรูป (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอทันทีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ผ่านคอลัมน์ C18 (250 × 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence detector) excitation wavelength (λ_{exc}) เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 460 นาโนเมตร) ควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส retention time (RT) ของโอคราทอกซินเอเท่ากับ 10 นาที (ภาคผนวก ง.3)

3.2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

(1) การตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (outliers)

ตรวจสอบค่าผิดปกติของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* โดยใช้เงื่อนไข

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

เมื่อ x คือ ค่าที่ได้จากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ทั้งหมด

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมด

เมื่อตรวจสอบผลข้อมูลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตามเงื่อนไขแล้วจะต้องมีค่าอยู่ในช่วง ±3 หากมีค่าอยู่นอกช่วงดังกล่าว จะถูกกำหนดเป็นค่าผิดปกติ ซึ่งจะถูกตัดออกจากกลุ่มตัวอย่างที่จะใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

สำหรับการตรวจสอบค่าผิดปกติของข้อมูลเชิงแสง (optical data) ซึ่งเป็นข้อมูลเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ จะใช้วิธีการสังเกตเส้นสเปกตรัมที่ได้ด้วยตาเปล่า และใช้วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) จากโปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.8 (Camo, Norway)

(2) การสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนาย

สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด และแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร แบ่งกลุ่มข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและข้อมูลเชิงแสงที่ตัดค่าผิดปกติออกแล้วเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทำนาย (prediction set) ในอัตราส่วนกลุ่มสร้างแบบจำลอง : กลุ่มทำนาย เท่ากับ 7 : 3 จากนั้น นำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองมาหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกับข้อมูลเชิงแสง โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) จากโปรแกรม Unscrambler 9.8 ทั้งนี้ ข้อมูลเชิงแสงที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองเป็นข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น (raw spectra) และที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ก่อน (pretreated spectra) เช่น

- การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction; MSC)
- การปรับเป็นค่ามาตรฐาน (normalization; mean, maximum, range)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด (first derivative by Savitzky – Golay method, 11 points)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด (first derivative by Savitzky – Golay method, 21 points)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด (second derivative by Savitzky – Golay method, 11 points)
- การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด (second derivative by Savitzky – Golay method, 21 points)
- การเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม (baseline offset)
- การปรับแก้ความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (standard normal variation; SNV)

หลังจากได้แบบจำลองแล้ว นำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำแบบจำลอง และคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าทางสถิติ ได้แก่ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

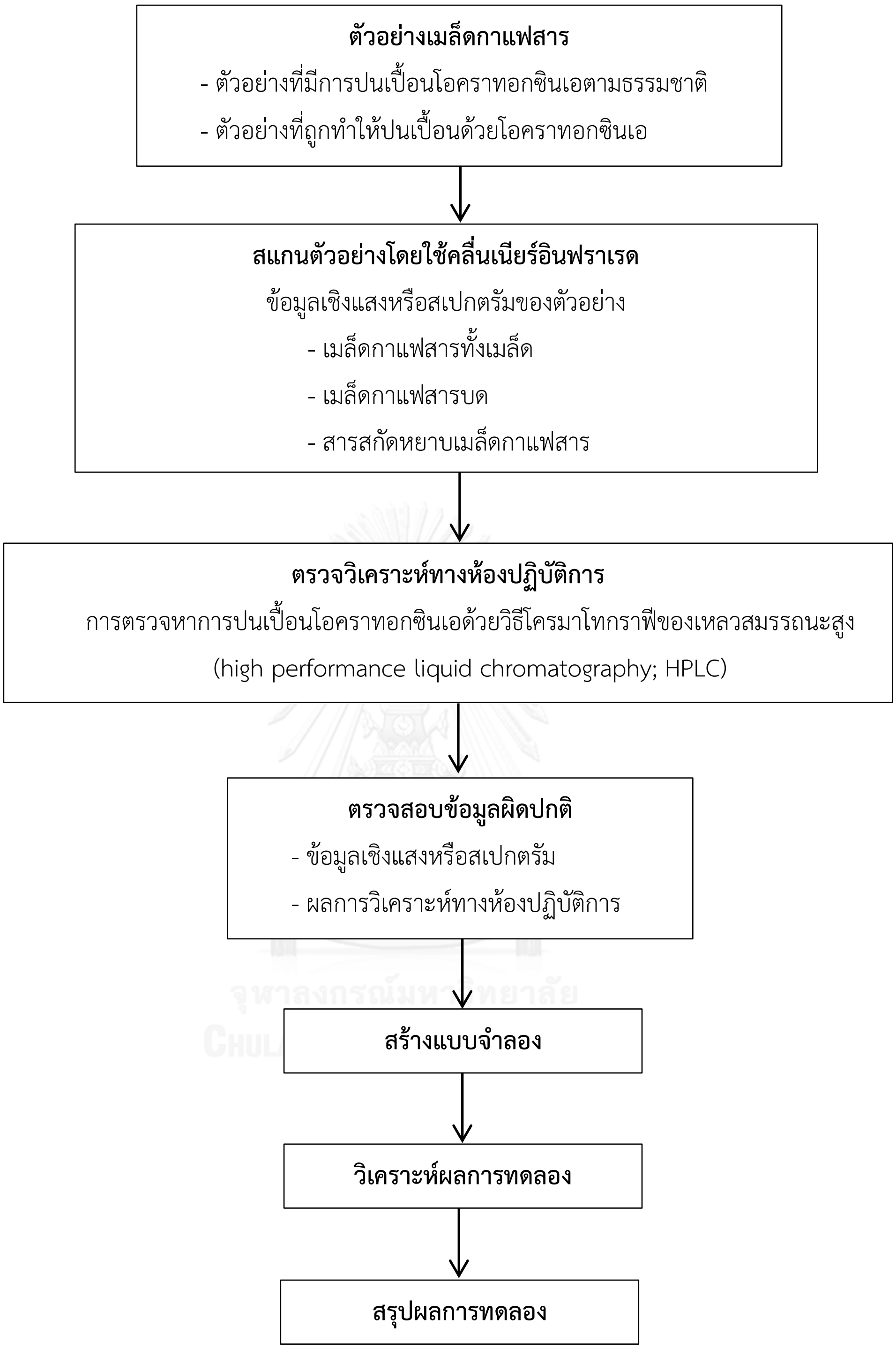
(correlation coefficient; *r*) สูงที่สุด ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบแบบจำลอง (standard error of prediction; *SEP*) และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) ต่ำที่สุด

3.2.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

นำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของรามาแบ่งกลุ่ม 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนรา และกลุ่มที่ 2 มีการปนเปื้อนรา แล้วสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่ม (classification model) โดยวิธี SIMCA (soft independent modeling of class analogy) และ PLS-DA (partial least square-discriminant analysis) เมื่อได้แบบจำลองแล้วนำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง จากนั้น คัดเลือกแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.8 (Camo, Norway)

3.3 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

ขั้นตอนการตรวจหาโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแสดงในภาพที่ 3.3 โดยเริ่มจากเตรียมตัวอย่างแล้วสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ จากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการสแกนแล้วไปวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแบบจำลอง



ภาพที่ 3.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

1) ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอตามธรรมชาติ (naturally contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 3.1 จำนวน 100 ตัวอย่าง

2) ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอ (artificially contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ (ภาคผนวก ข.5) ลงในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 5, 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง หลังเติมแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

3.3.2 การสแกนตัวอย่างโดยใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรด

การสแกนตัวอย่างแบ่งเป็น 3 แบบ ได้แก่

การสแกนตัวอย่างแบบที่ 1 เป็นการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด
การสแกนตัวอย่างแบบที่ 2 เป็นการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด
การสแกนตัวอย่างแบบที่ 3 เป็นการสแกนสารตัวอย่างสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร

การสแกนตัวอย่างแบบที่ 1 ทำเช่นเดียวกับการสแกนตัวอย่างในข้อ 3.2.2

การสแกนตัวอย่างแบบที่ 2 ทำได้โดยนำตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ผ่านการสแกนแบบที่ 1 แล้วจากบริเวณก้นภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 2-3 นาที นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่บดละเอียดแล้วบรรจุในภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างเดิม โดยบรรจุให้ได้ปริมาตรเพียงพอที่คลื่นเนียร์อินฟราเรดไม่สามารถส่องผ่านออกมาจากตัวอย่างได้ แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์โดยใช้ภาวะในการสแกนเดียวกันกับการสแกนตัวอย่างในข้อ 3.2.2

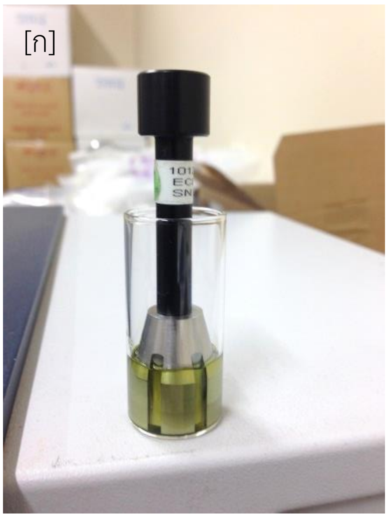
การสแกนตัวอย่างแบบที่ 3 ทำได้โดยนำตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ถูกบดละเอียดที่ผ่านการสแกนแบบที่ 2 แล้วปริมาณ 25 กรัม ใส่ลงในโถสำหรับปั่นตัวอย่าง นำไปสกัดโอคราทอกซินเอตามวิธีของ VICAM (2004) โดยเติมสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มเข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ในอัตราส่วน 70 : 30 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แบ่งส่วนน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะสำหรับสแกนของเหลวขนาด

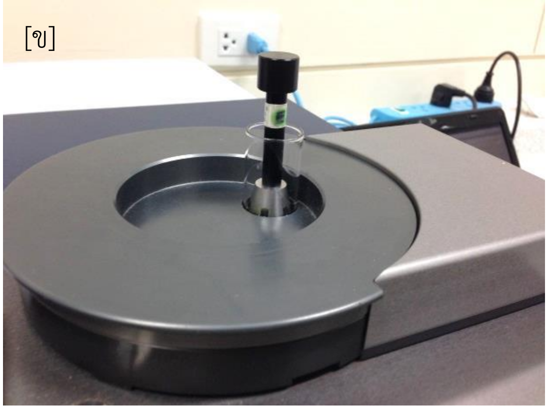
เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร ลึก 4.8 เซนติเมตร แล้ววางเครื่องมือที่ทำให้เกิดการสะท้อน (transflection device) ที่มีทางเดินของแสง (pathlength) ขนาด 2 มิลลิเมตร กดทับสารสกัดหยาบภายในภาชนะสำหรับสแกนของเหลว แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์โดยใช้ภาวะในการสแกนเดียวกันกับการสแกนตัวอย่างในข้อ 3.2.2 (ภาพที่ 3.4)

หลังจากนั้น นำสารสกัดหยาบที่เหลือไปตรวจหาโอคราทอกซินเอในขั้นตอนต่อไปทันที

สำหรับการสแกนตัวอย่างในแต่ละแบบ ตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ทำการสแกน 2 ครั้ง ในการสแกนแต่ละครั้ง ตัวอย่างจะหมุน 3 รอบ 1 รอบการหมุนได้เส้นสเปกตรัม 1 เส้น เก็บข้อมูลเชิงแสง (สเปกตรัม) ที่ได้จากการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดจากเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ด้วยโปรแกรม OPUS 7.0.122 (Bruker, Germany) ได้ทั้งหมด 672 เส้น ซึ่งเป็นสเปกตรัมจากตัวอย่างธรรมชาติ 600 เส้น และจากตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอ 72 เส้น จากการสแกนตัวอย่างทั้งหมด 3 แบบดังกล่าวข้างต้น ทำให้ได้ข้อมูลเชิงแสงทั้งหมด 3 ชุด คือ ข้อมูลเชิงแสงจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ข้อมูลเชิงแสงจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่บดแล้ว และข้อมูลเชิงแสงจากสารสกัดหยาบจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร จากนั้น แปลงข้อมูลเชิงแสงทั้งหมดที่ได้ให้เป็นรูปแบบ JCAMP-DX เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางเคโมเมทริกซ์ (chemometrics) ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University





ภาพที่ 3.4 ภาชนะสำหรับสแกนตัวอย่างที่มีการวางเครื่องมือที่ทำให้เกิดการสะท้อน (transflection device) [ก], การสแกนสารสกัดหยาบด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ [ข]

3.3.3 การตรวจหาโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

นำสารสกัดหยาบ (crude extract) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่ผสมกับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ของ Tween 20 (ภาคผนวก ข.10) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองอีกครั้งผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นดูดสารสกัดที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกฉีดยาที่ต่ออยู่กับอิมมูโนแอฟฟินีตีคอลัมน์ (Ochratest, VICAM, USA) โดยปรับให้มีอัตราการไหลที่ 1 หยดต่อวินาที ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย PBS ที่ผสมกับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ของ Tween 20 (ภาคผนวก ข.10) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับให้มีอัตราการไหลที่ 1-2 หยดต่อวินาที แล้วล้างคอลัมน์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อีกสองครั้ง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เพื่อชะโอคราทอกซินเอออกจากคอลัมน์ ตามวิธีของ VICAM (2004) จากนั้น นำไปประเหยเมทานอลด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทแล้วเติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตไนไตรล์ : น้ำปลอดประจุ : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 49.5 : 49.5 : 1) (ภาคผนวก ข.3) กรองสารละลายที่ได้ด้วยหัวกรองสำเร็จรูป (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอทันทีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ผ่านคอลัมน์ C18 (250 × 4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence detector) excitation wavelength (λ_{exc}) เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 477 นาโนเมตร) ควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส retention time (RT) ของโอคราทอกซินเอเท่ากับ 10 นาที (ภาคผนวก ง.3)

3.3.4 การทดสอบสมรรถนะการวัดปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารของผู้วิจัย (laboratory performance)

การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของผู้วิจัย ในห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารแทรกเข้ามาเป็นระยะในระหว่างการทดลองปกติ โดยผู้วิจัยไม่ทราบถึงปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ซึ่งตัวอย่างที่นำมาทดสอบมี 2 ชุด คือ กลุ่มตัวอย่าง duplication เป็นตัวอย่างที่ซ้ำกับตัวอย่างในการทดลองปกติ และกลุ่มตัวอย่าง blind เป็นตัวอย่างที่ผู้วิจัยไม่ทราบเลยว่าเป็นตัวอย่างใด โดยในการทดลองนี้มีตัวอย่าง duplication 6 คู่ ตัวอย่าง blind 5 ตัวอย่าง แล้วนำมาคำนวณหาค่า repeatability และ reproducibility โดยค่า repeatability คือค่า SD ของค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ในชุดตัวอย่าง duplicate และ reproducibility คือค่า SD ของค่าความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ในชุดตัวอย่าง blind กับตัวอย่างจริง

3.3.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอเชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายระดับการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอตามการทดลองข้อ 3.2.4 โดยใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือ ปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และข้อมูลเชิงแสงจากการสแกนตัวอย่าง 3 แบบ จากการสแกนในข้อ 3.3.2

3.3.6 การสร้างแบบจำลองเพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

นำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอมาแบ่งกลุ่ม 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ และกลุ่มที่ 2 มีการปนเปื้อน แล้วสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่ม (classification model) โดยใช้วิธีการตามการทดลองข้อ 3.2.5

บทที่ 4
ผลการทดลอง

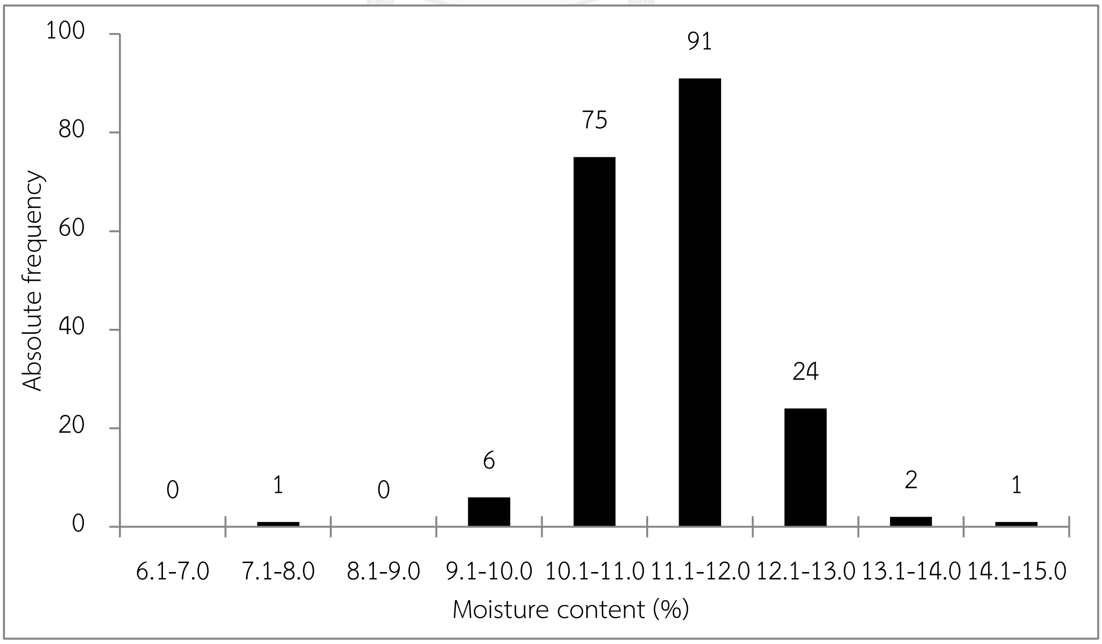
4.1 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราทั้งหมด และราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

4.1.1.1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ตามวิธีมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) พบว่าตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมดมีปริมาณความชื้นเฉลี่ยเท่ากับ 11.34±0.81 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความชื้นสูงสุดเท่ากับ 14.17 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นต่ำสุดเท่ากับ 7.51 เปอร์เซ็นต์

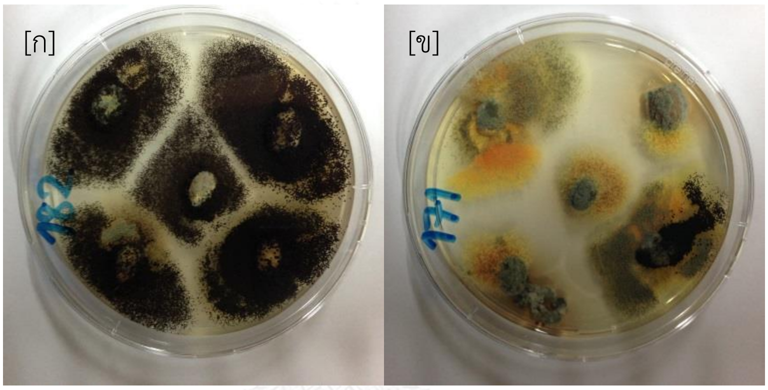
ภาพที่ 4.1 แสดงการแจกแจงความถี่ของปริมาณความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร จำนวน 100 ตัวอย่าง (200 ตัวอย่างย่อย) ซึ่งมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 7.51-14.17 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.1 การแจกแจงความถี่ของปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด 200 ตัวอย่างย่อย

4.1.1.2 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกาทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ที่เก็บเกี่ยวในช่วงปี พ.ศ. 2555-2556 จากไร่กาแฟและศูนย์รวบรวมเมล็ดกาแฟในจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธี direct plating (ภาพที่ 4.2) พบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 83.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่ามีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอซึ่งได้แก่ ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และ ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง มีค่าเฉลี่ยต่ำ เท่ากับ 7.36 และ 0.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ด้วยวิธี direct plating บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DG18 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยภาพ [ก] แสดงการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และภาพ [ข] แสดงการติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง

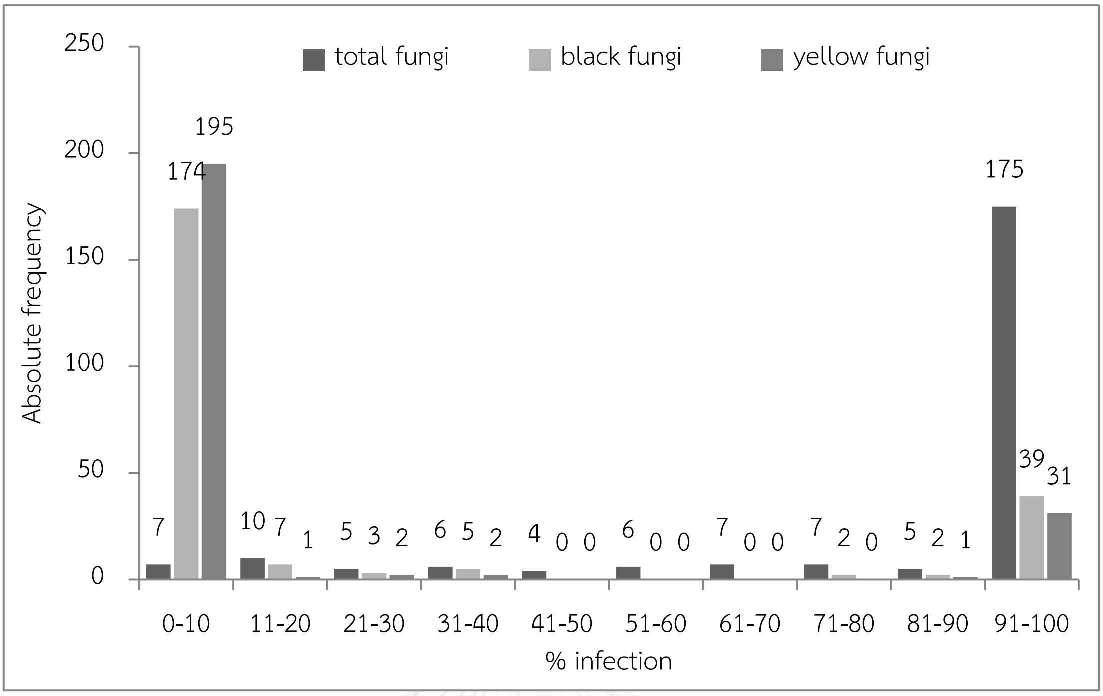
สำหรับตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา โดยการเติมสารแขวนลอยสปอร์ของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ที่ความเข้มข้น 10^2, 10^4, 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ไม่พบการปนเปื้อนของราจำนวน 16 ตัวอย่าง มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 100, 100 และ 97.63 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) และเมื่อรวมตัวอย่างข้อมูลของตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติและตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 85.35, 20.14 และ 14.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ภาพที่ 4.3 แสดงการแจกแจงความถี่ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ จำนวน 100 ตัวอย่าง (200 ตัวอย่างย่อย) และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยราจำนวน 16 ตัวอย่าง (32 ตัวอย่างย่อย) รวมทั้งสิ้น 116 ตัวอย่าง (232 ตัวอย่างย่อย) พบว่า ตัวอย่างส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดสูงสุด (91-100 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองต่ำ (0-10 เปอร์เซ็นต์) พบมากในตัวอย่างส่วนใหญ่

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

ตัวอย่าง	ชนิดของรา	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา		
		ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ	ราทั้งหมด	0	100	83.56±28.97
	ราดำ	0	100	7.36±21.59
	ราเหลือง	0	32	0.94 ± 4.31
ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา	ราทั้งหมด	100	100	100±0.00
	ราดำ	100	100	100±0.00
	ราเหลือง	88	100	97.63±3.30
รวม	ราทั้งหมด	0	100	85.35±27.49
	ราดำ	0	100	20.14±37.71
	ราเหลือง	0	100	14.28±33.60

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4.3 การแจกแจงความถี่ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด (total fungi) ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ (black fungi) และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง (yellow fungi) จากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนราตามธรรมชาติ และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา รวมทั้งหมด 232 ตัวอย่างย่อย

4.1.1.3 ความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารโดยวิธี direct plating สามารถคัดแยกราสกุล *Aspergillus* ที่มีลักษณะโคโลนีสีดำได้ 130 ไอโซเลต และสีเหลือง 28 ไอโซเลต รวมทั้งสิ้น 158 ไอโซเลต จากนั้น จัดกลุ่มราที่แยกได้โดยใช้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกราที่มีโคโลนีสีดำในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* และราที่มีโคโลนีสีเหลืองในกลุ่ม *Aspergillus* section *Circumdati* แล้วคัดเลือกราในแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ โดยใช้หลักเกณฑ์ 5 ไอโซเลต เลือกมา 1 ไอโซเลต ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ 33 ไอโซเลต และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง 6 ไอโซเลต นำราทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เพื่อให้ผลิตโอคราทอกซินเอ ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 3.2.3.2 (3) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะ ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 3.2.3.2 (4) พบว่า ราทุกไอโซเลตที่นำไปทดสอบมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ ราสกุล *Aspergillus* โคโลนี สี

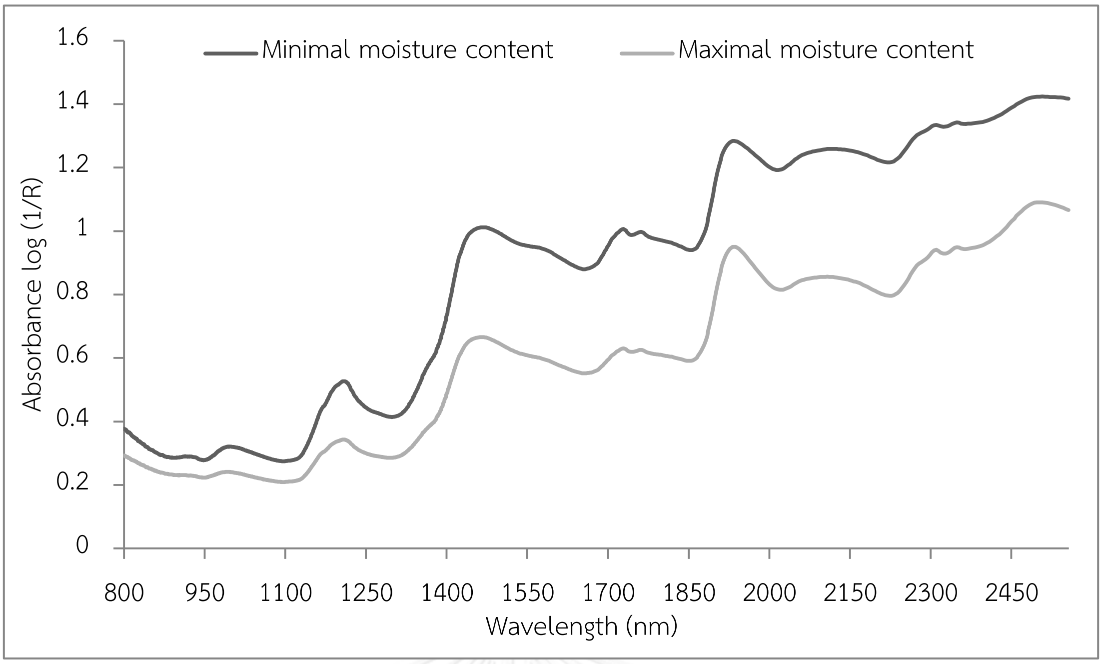
เหลืองมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอสูงสุด โดยมีปริมาณการผลิตสูงสุดเท่ากับ 6,918.50±674.50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารเลี้ยง (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 การผลิตโอคราทอกซินเอของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

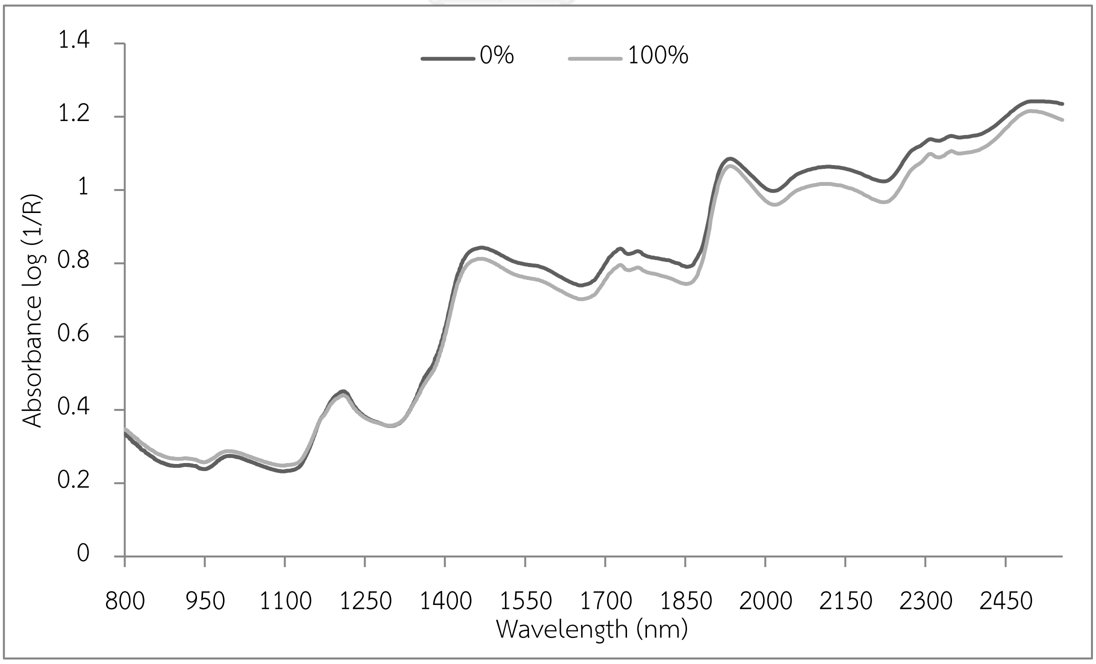
ชนิดของรา	จำนวนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตที่ผลิต OTA (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA)	
			ช่วง	ค่าเฉลี่ย
ราดำ	33	33 (100)	10.55-2,079.68	680.06±591.60
ราเหลือง	6	6 (100)	1.09-6,918.50	1,164.03±2,573.50
รวม	39	39 (100)	1.09-6,918.50	922.05±241.99

4.1.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

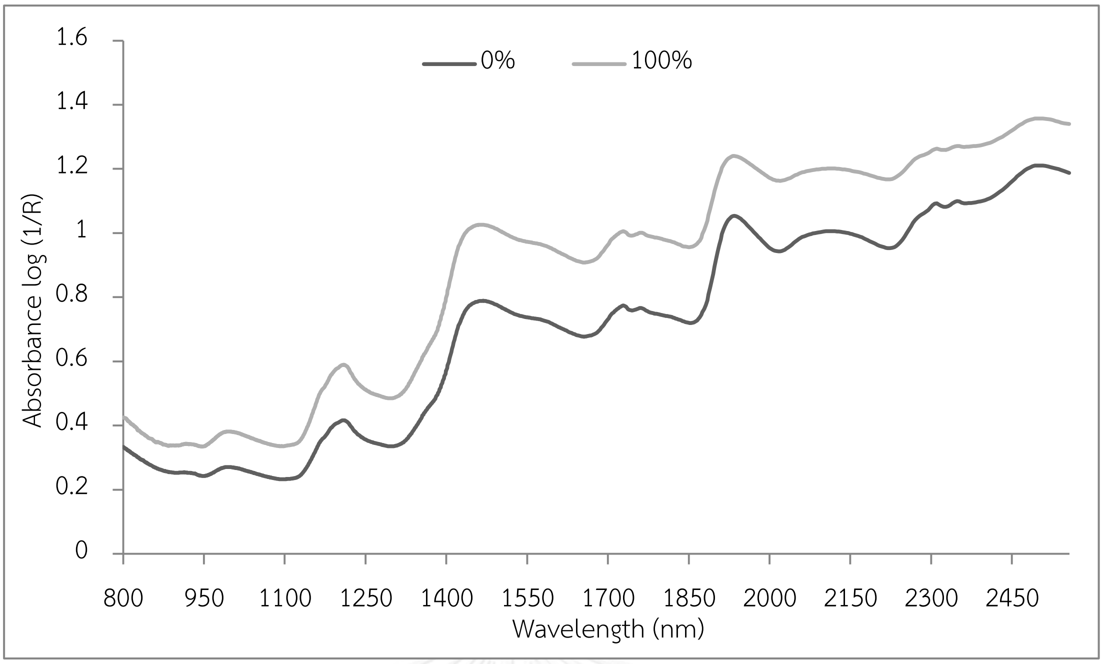
จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้น และตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร หรือที่ความยาวคลื่นประมาณ 800-2500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR) (MPA, Bruker, Germany) ในแบบแพร่สะท้อนแสง (diffuse reflectance) ที่ผ่านการแปลงข้อมูลเป็น JCAMP-DX format แล้ว ได้สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย (raw spectra) ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) ในแนวแกน X กับค่าการดูดกลืนแสง (log (1/R)) ในแนวแกน Y ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.4, 4.5, 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ พบว่าสเปกตรัมดั้งเดิม (raw spectra) ของทั้ง 4 ภาพ มีรูปแบบ (spectrum pattern) เหมือนกัน log (1/R) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงชัดเจนเมื่อค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาพที่ 4.4) เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำ (ภาพที่ 4.6) และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเหลือง (ภาพที่ 4.7) เปลี่ยนแปลงไป ในขณะที่ log (1/R) ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดต่างกันมีความต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 4.5)



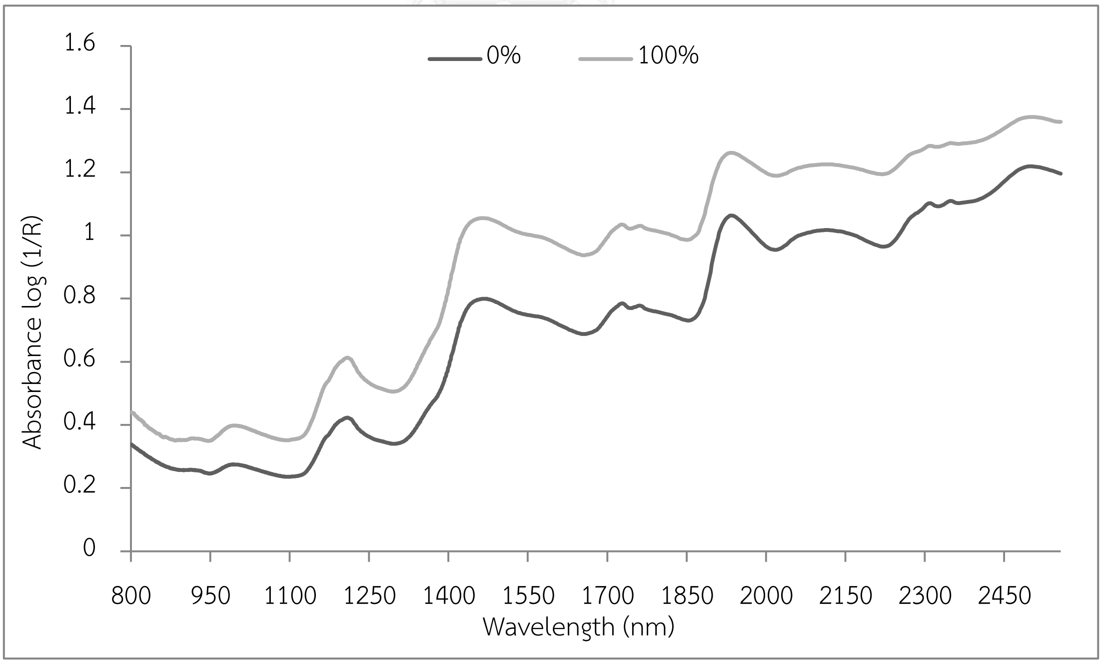
ภาพที่ 4.4 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำสุด (7.51 เปอร์เซ็นต์) และสูงสุด (14.17 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4.5 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์

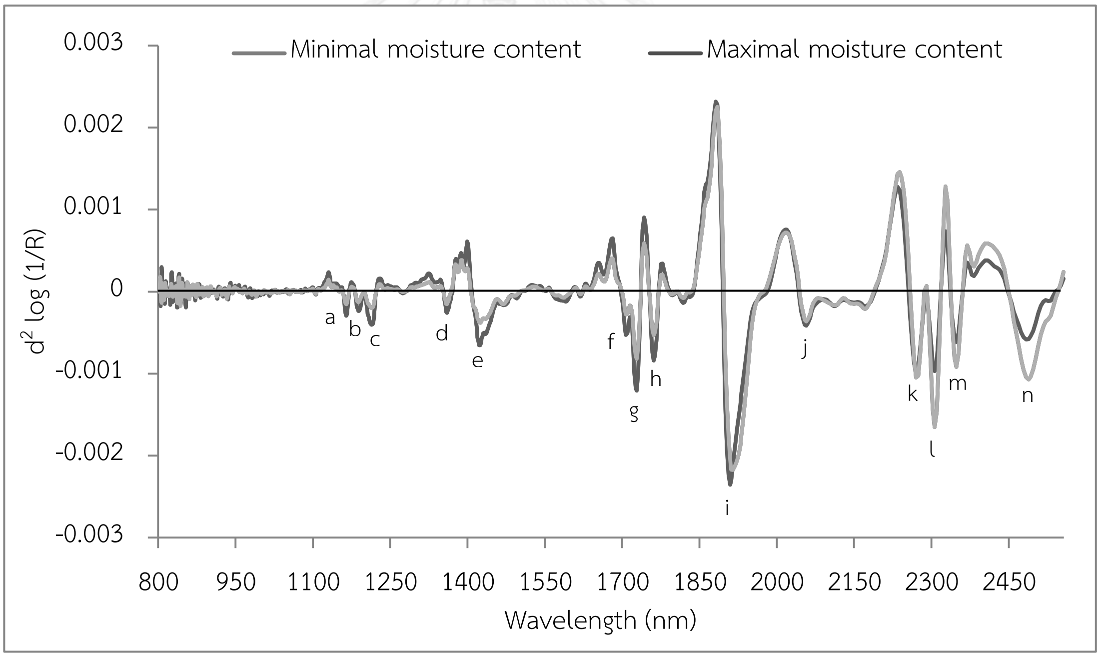


ภาพที่ 4.6 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์

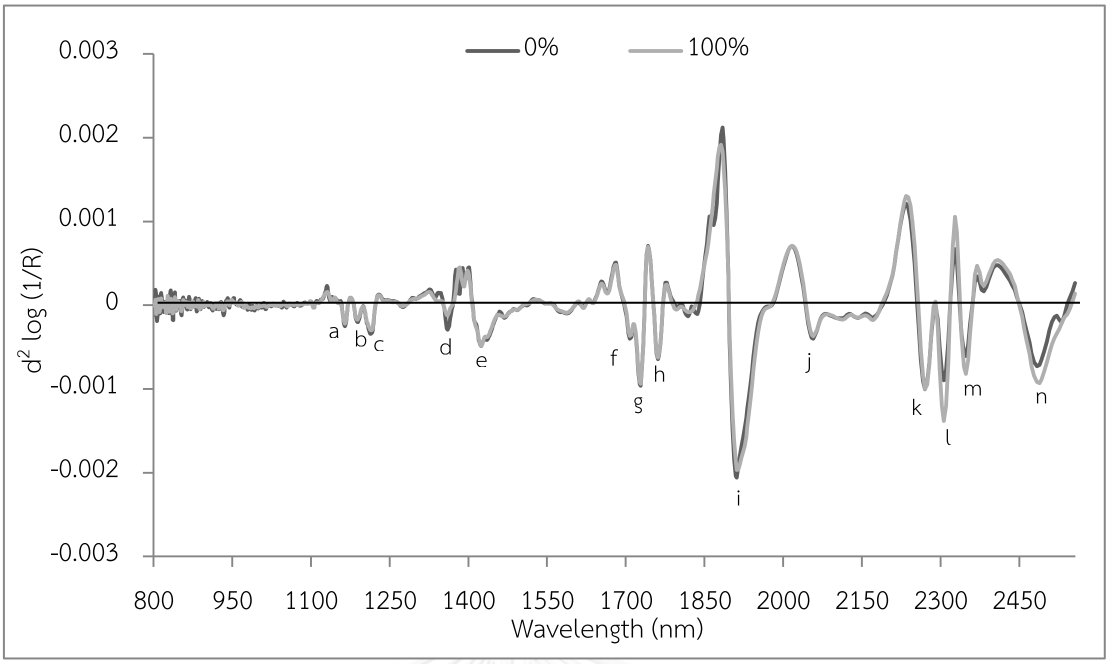


ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์

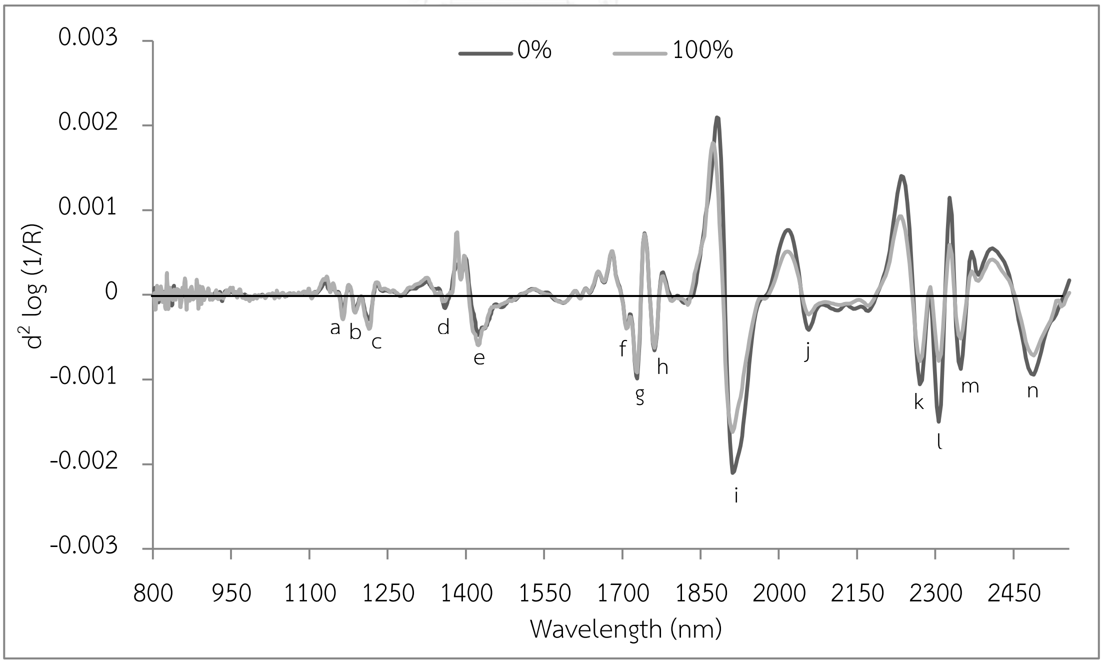
การปรับแต่งเส้นสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ เช่น การทำอนุพันธ์อันดับที่สอง เป็นวิธีที่ทำให้สังเกตพีคและลักษณะของเส้นสเปกตรัมที่ดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่นได้ง่ายและชัดเจนขึ้น ผลการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด (second derivative by Savitzky-Golay method, 11 points) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ที่แสดงระดับปริมาณความชื้น ระดับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารแสดงดังภาพที่ 4.8, 4.9, 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ พบว่า log (1/R) ที่ความยาวคลื่นต่างๆ หรือพีคมีความชัดมากกว่าสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยและมีลักษณะที่คล้ายกันทั้ง 4 กราฟ โดยมีพีคที่เด่นชัดทั้งหมด 14 พีค ที่อยู่ในตำแหน่งความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกันที่ประมาณ 1162, 1186, 1207, 1359, 1423, 1706, 1728, 1761, 1915, 2051, 2274, 2307, 2344 และ 2479 นาโนเมตร ซึ่งแต่ละพีคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3



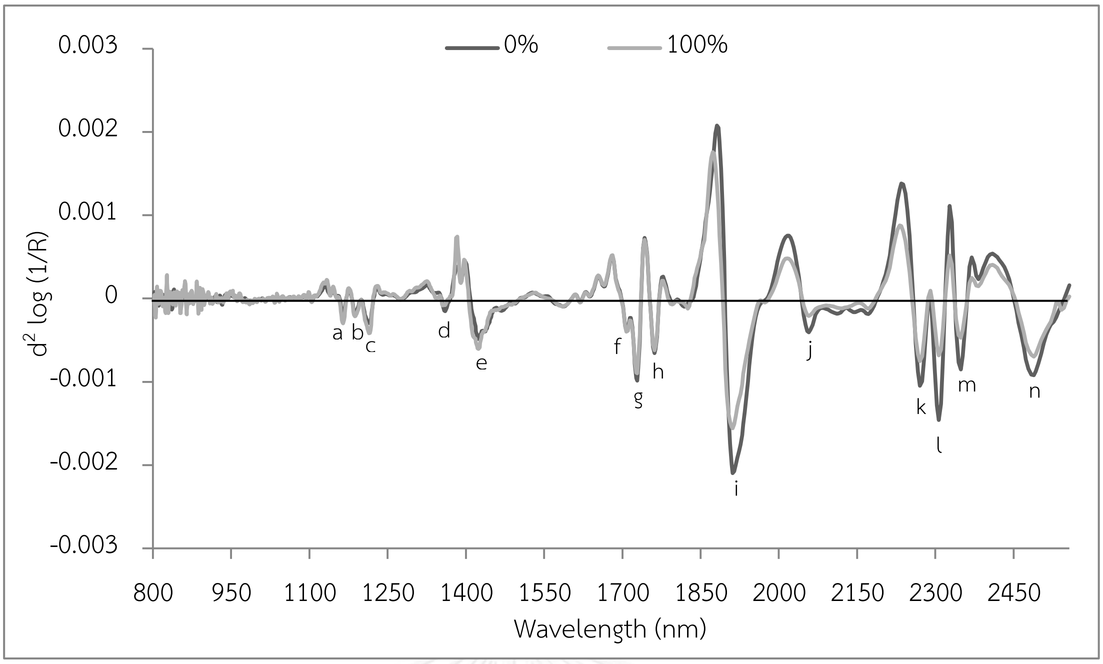
ภาพที่ 4.8 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำสุด (7.51 เปอร์เซ็นต์) และสูงสุด (14.17 เปอร์เซ็นต์) (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.9 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.10 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.3 การสั่นสะเทือนของพันธะของององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (ภาพที่ 4.8-4.11) (Osborne และคณะ, 1993)

	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
a	1162 (ขยับจาก 1152)	C-H str. second overtone	CH_3
b	1186 (ขยับจาก 1195)	C-H str. second overtone	CH_3
c	1207 (ขยับจาก 1215)	C-H str. second overtone	CH_2
d	1359 (ขยับจาก 1360)	2 x C-H str. + C-H def.	CH_3
e	1423 (ขยับจาก 1420)	O-H str. first overtone	$ArOH_2$
f	1706 (ขยับจาก 1705)	C-H str. first overtone	CH_3
g	1728 (ขยับจาก 1725)	C-H str. first overtone	CH_2
h	1761 (ขยับจาก 1765)	C-H str. first overtone	CH_2
i	1915 (ขยับจาก 1940)	O-H str. + O-H def.	น้ำ
j	2051 (ขยับจาก 2050)	N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
		N-H asym. str. + amide III	$CONH_2$
k	2274 (ขยับจาก 2276)	O-H str. + C-C str.	แป้ง
l	2307 (ขยับจาก 2310)	C-H str. + C-H def.	CH_2
m	2344 (ขยับจาก 2336)	C-H str. + C-H def.	เซลลูโลส
n	2479 (ขยับจาก 2488)	C-H str. + C-C str.	แป้ง

str. = stretching def. = deformation

sym. = symmetrical asym. = asymmetrical

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองในการทำนายปริมาณความชื้น และการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร จากเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) จากโปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) ทั้งหมด 4 แบบจำลอง ได้แก่

- แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง

ผลการตรวจสอบค่าผิดปกติของข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และข้อมูลเชิงแสงทั้งหมด 600 เส้น สำหรับข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความชื้น และ 696 เส้น สำหรับข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา ซึ่งเป็นสเปกตรัมจากตัวอย่างธรรมชาติ 600 เส้น และจากตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา 96 เส้น ไม่พบค่าผิดปกติจากข้อมูลทั้งหมด จึงแบ่งข้อมูลทั้งหมดออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) 70 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มทำนาย (prediction set) 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการสร้างแบบจำลองใช้ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการเบื้องต้น (raw spectra) และข้อมูลเชิงแสงที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectra) ทั้งหมด 10 วิธี ตามการทดลองในข้อที่ 3.2.4 (2) สำหรับข้อมูลทางสถิติของผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทำนาย แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลอง และกลุ่มทำนาย

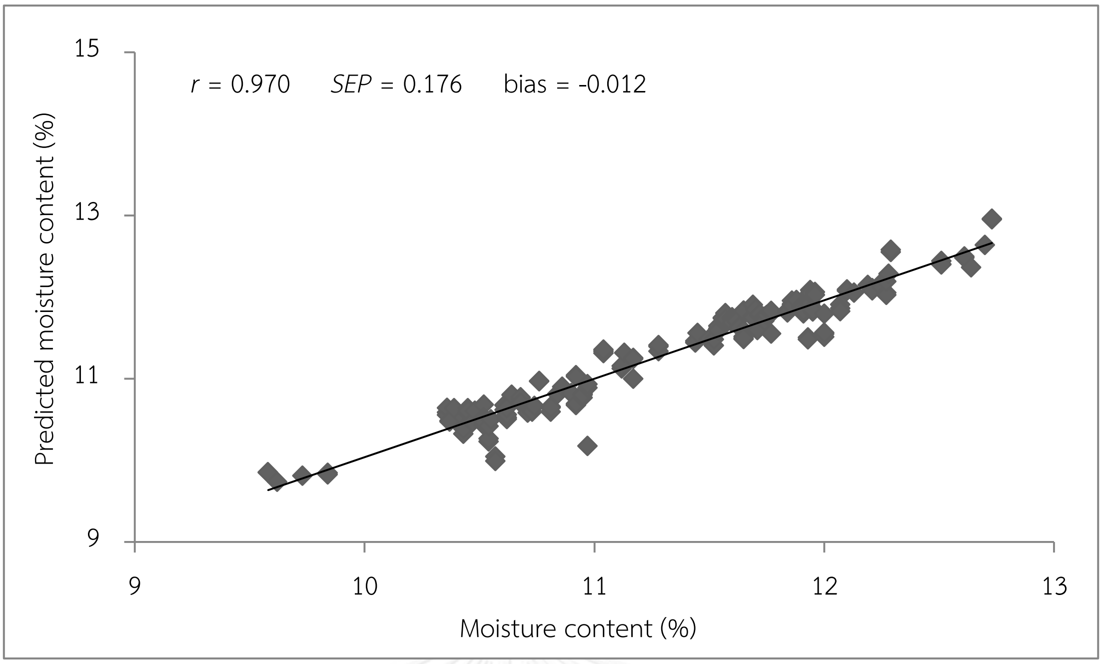
ข้อมูล	กลุ่มสร้างแบบจำลอง					กลุ่มทำนาย				
	จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD	จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD
เปอร์เซ็นต์ความชื้น	423	7.510	14.170	11.349	0.840	177	9.580	12.730	11.335	0.716
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา										
ราทั้งหมด	489	0	100	85.677	27.744	207	4	100	86.184	26.993
ราดำ	489	0	100	20.082	37.764	207	0	100	20.155	37.828
ราเหลือง	489	0	100	14.470	33.919	207	0	100	13.759	33.019

4.1.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี partial least square regression (PLSR) แสดงในตารางที่ 4.5 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (mean normalization) โดยมีค่า PCs, ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; *r*), ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างแบบจำลองแคลิเบรชั่น (standard error of calibration; *SEC*) และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เท่ากับ 6, 0.938, 0.290 เปอร์เซ็นต์ และ 9.402E-08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r* เท่ากับ 0.970 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบแบบจำลอง (standard error of prediction; *SEP*) เท่ากับ 0.176 เปอร์เซ็นต์ และค่า bias เท่ากับ -0.012 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอัตราส่วนค่า *SEP* ต่อ *SD* (ratio of standard error of prediction validation to standard deviation; RPD) และอัตราส่วนระหว่างค่า *SEP* ต่อ range (ratio of standard error of prediction validation to range; RER) มีค่าเท่ากับ 4.075 และ 37.931 ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการปรับค่าเป็นมาตรฐาน (mean normalization) และค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการแสดงดังภาพที่ 4.12

ตารางที่ 4.5 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	5	0.934	0.299	-3.448E-07	0.954	0.217	0.011	3.296	30.679
Multiplicative scatter correction	5	0.935	0.297	4.925E-07	0.964	0.192	-0.004	3.735	34.762
Mean normalization	**6**	**0.938**	**0.290**	**9.402E-08**	**0.970**	**0.176**	**-0.012**	**4.075**	**37.931**
Max normalization	6	0.941	0.285	-3.671E-07	0.963	0.195	0.003	3.678	34.235
Range normalization	6	0.940	0.287	1.119E-08	0.961	0.198	0.006	3.605	33.558
First derivative (11 points)	5	0.941	0.285	-4.253E-08	0.964	0.194	0.006	3.692	34.364
First derivative (21 points)	4	0.938	0.291	-6.268E-08	0.965	0.189	0.012	3.791	35.283
Second derivative (11 points)	9	0.942	0.282	-1.567E-08	0.935	0.264	0.007	2.710	25.224
Second derivative (21 points)	5	0.926	0.318	2.015E-08	0.941	0.247	0.008	2.892	26.921
Baseline	5	0.934	0.300	-1.634E-07	0.957	0.211	0.013	3.384	31.501
Standard normal variate	5	0.937	0.293	2.104E-07	0.963	0.195	-0.007	3.676	34.217



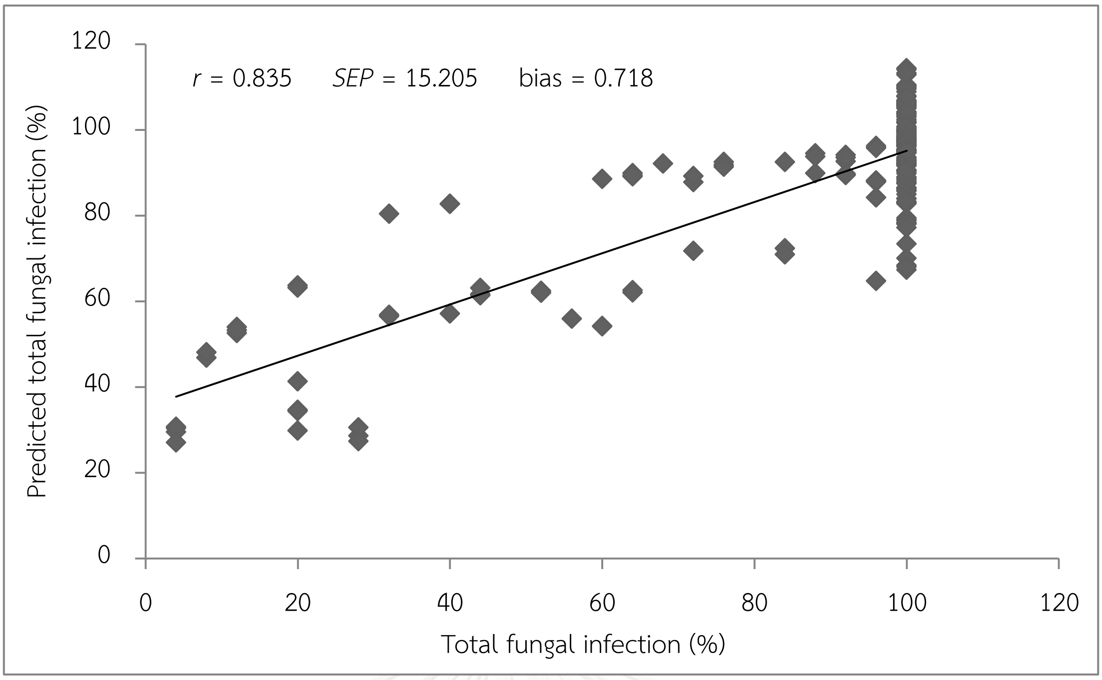
ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (mean normalization)

4.1.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.6 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (range normalization) โดยมีค่า PCs, *r*, *SEC* และ bias เท่ากับ 6, 0.773, 17.609 เปอร์เซ็นต์ และ 9.402E-08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias เท่ากับ 0.835, 15.205 เปอร์เซ็นต์ และ 0.718 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 1.775 และ 6.577 ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการปรับค่าเป็นมาตรฐาน (range normalization) และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการแสดงดังภาพที่ 4.13

ตารางที่ 4.6 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	5	0.759	18.077	-2.262E-07	0.805	16.193	0.513	1.667	6.176
Multiplicative scatter correction	5	0.757	18.116	4.462E-06	0.810	16.063	0.617	1.680	6.225
Mean normalization	6	0.764	17.913	1.032E-05	0.816	15.813	0.510	1.707	6.324
Max normalization	6	0.771	17.666	8.129E-06	0.829	15.440	0.891	1.748	6.477
Range normalization	**6**	**0.773**	**17.609**	**4.673E-06**	**0.835**	**15.205**	**0.718**	**1.775**	**6.577**
First derivative (11 points)	6	0.756	18.166	2.114E-06	0.773	17.172	0.219	1.572	5.823
First derivative (21 points)	6	0.769	17.743	1.147E-06	0.829	15.351	0.455	1.758	6.514
Second derivative (11 points)	2	0.686	20.190	4.220E-06	0.682	19.753	0.690	1.366	5.063
Second derivative (21 points)	6	0.755	18.195	5.391E-06	0.760	17.587	-0.214	1.535	5.686
Baseline	6	0.773	17.596	8.870E-06	0.834	15.220	0.678	1.773	6.570
Standard normal variate	5	0.763	17.918	1.482E-07	0.806	16.153	0.946	1.671	6.191



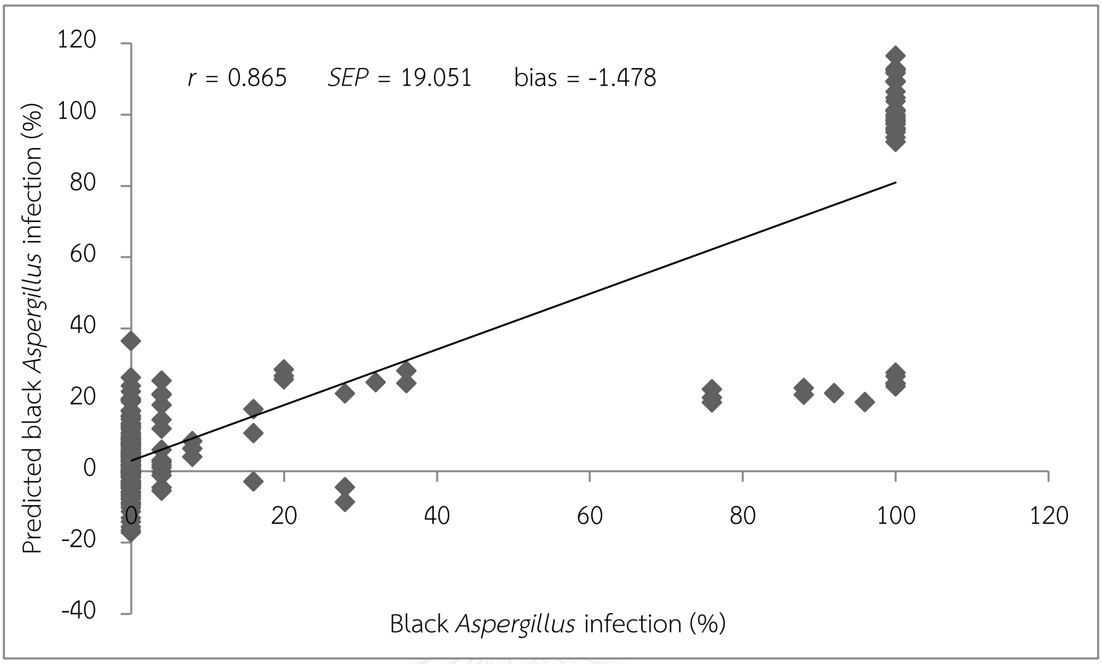
ภาพที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (range normalization)

4.1.3.3 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล Aspergillus โคโลนีสีดำ

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.7 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ โดยมีค่า PCs, *r*, *SEC* และ bias เท่ากับ 6, 0.882, 17.820 เปอร์เซ็นต์ และ 1.697E-07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias เท่ากับ 0.865, 19.051 เปอร์เซ็นต์ และ -1.478 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 1.986 และ 5.249 ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการกระเจิงแบบผลคูณ และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการแสดงดังภาพที่ 4.14

ตารางที่ 4.7 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	5	0.866	18.901	-2.633E-07	0.828	21.223	-0.960	1.782	4.712
Multiplicative scatter correction	**6**	**0.882**	**17.820**	**1.697E-07**	**0.865**	**19.051**	**-1.478**	**1.986**	**5.249**
Mean normalization	4	0.848	20.015	1.706E-06	0.823	21.522	-1.407	1.758	4.646
Max normalization	5	0.858	19.409	2.465E-06	0.834	20.891	-0.846	1.811	4.787
Range normalization	5	0.859	19.334	7.547E-07	0.836	20.790	-0.753	1.820	4.810
First derivative (11 points)	3	0.869	18.691	3.304E-06	0.854	19.655	-0.513	1.925	5.088
First derivative (21 points)	3	0.867	18.816	-4.739E-07	0.837	20.682	-0.513	1.829	4.835
Second derivative (11 points)	5	0.868	18.751	5.110E-07	0.853	19.757	0.153	1.915	5.061
Second derivative (21 points)	4	0.870	18.629	1.318E-06	0.846	20.164	-0.407	1.876	4.959
Baseline	5	0.867	18.794	3.778E-06	0.835	20.815	-0.626	1.817	4.804
Standard normal variate	6	0.874	18.43	1.493E-05	0.853	19.808	-1.084	1.910	5.048



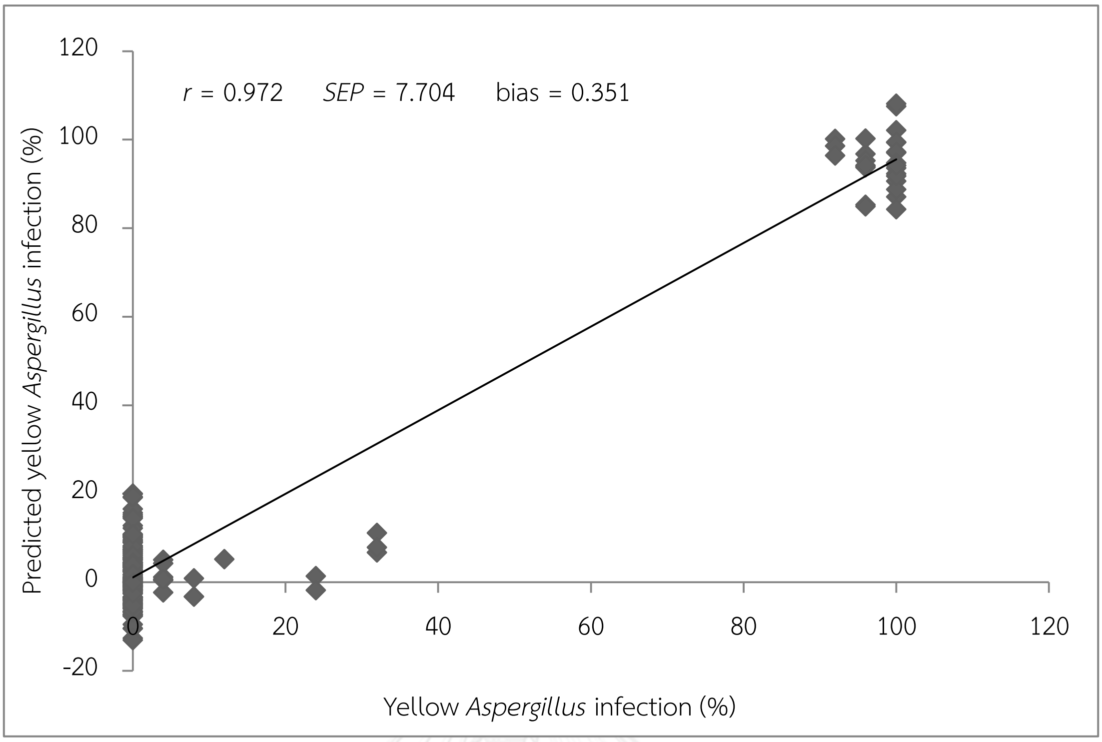
ภาพที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ

4.1.3.4 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล Aspergillus โคโลนีสีเหลือง

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.8 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด โดยมีค่า PCs, *r*, *SEC* และ bias เท่ากับ 6, 0.979, 6.845 เปอร์เซ็นต์ และ -1.615E-06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias เท่ากับ 0.972, 7.704 เปอร์เซ็นต์ และ 0.351 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 4.286 และ 12.980 ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด และค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการแสดงดังภาพที่ 4.15

ตารางที่ 4.8 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: เปอร์เซ็นต์)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	5	0.963	9.153	-1.141E-07	0.951	10.215	0.340	3.233	9.790
Multiplicative scatter correction	5	0.961	9.340	6.321E-06	0.945	10.762	0.104	3.068	9.292
Mean normalization	6	0.958	9.709	1.731E-05	0.942	11.070	0.165	2.983	9.033
Max normalization	6	0.962	9.250	-3.899E-06	0.948	10.483	0.081	3.150	9.539
Range normalization	6	0.964	8.993	-1.933E-05	0.951	10.258	0.073	3.219	9.748
First derivative (11 points)	5	0.975	7.514	-6.397E-07	0.967	8.470	0.255	3.898	11.806
First derivative (21 points)	4	0.966	8.742	5.626E-07	0.955	9.758	0.403	3.384	10.248
Second derivative (11 points)	6	0.977	7.281	1.580E-07	0.971	7.965	-0.086	4.146	12.555
Second derivative (21 points)	**6**	**0.979**	**6.845**	**-1.615E-06**	**0.972**	**7.704**	**0.351**	**4.286**	**12.980**
Baseline	6	0.969	8.429	-1.295E-06	0.957	9.618	0.361	3.433	10.397
Standard normal variate	5	0.963	9.190	4.437E-06	0.948	10.510	0.117	3.142	9.515



ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด

4.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

แบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามปริมาณความชื้น โดยอ้างอิงจากมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) ที่กำหนดให้เมล็ดกาแฟสารทั่วไปมีความชื้นได้ไม่เกิน 12.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงแบ่งกลุ่มข้อมูลสำหรับการสร้างแบบจำลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นมากกว่า 12.5 เปอร์เซ็นต์

แบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามการปนเปื้อนของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด พบว่า ตัวอย่างส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์

การติดเชื้อของราอยู่ในเกณฑ์ต่ำ (0-10 เปอร์เซ็นต์) หรือสูง (90-100 เปอร์เซ็นต์) จึงแบ่งกลุ่มข้อมูลสำหรับการสร้างแบบจำลองแต่ละแบบจำลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามปริมาณความชื้นด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงไว้ในตารางที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แบบจำลองทั้งหมดที่สร้างขึ้นนั้นยังมีเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ไม่แม่นยำ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องต่ำ เท่ากับ 46.13-88.89 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี SIMCA และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี PLS-DA

ตารางที่ 4.9 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (≤ 12.5%)	กลุ่มที่ 2 (>12.5%)
กลุ่มที่ 1 (≤ 12.5%)	168	92.26	77.98
กลุ่มที่ 2 (> 12.5%)	9	0.00	100.00
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		46.13	88.89

ตารางที่ 4.10 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (≤ 12.5%)	168	100.00
กลุ่มที่ 2 (> 12.5%)	9	33.33
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		66.67

ตารางที่ 4.11 และ 4.12 แสดงผลการสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามระดับการปนเปื้อนของราทั้งหมด ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองที่สร้างขึ้นมีเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ไม่แม่นยำ (48.18-74.39 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ที่มีเปอร์เซ็นต์การทำนายโดยรวมถูกต้อง 83.49 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.11 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (≤ 50%)	กลุ่มที่ 2 (> 50%)
กลุ่มที่ 1 (≤ 50%)	168	88.89	3.70
กลุ่มที่ 2 (> 50%)	36	59.89	92.66
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		74.39	48.18

ตารางที่ 4.12 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (≤ 50%)	168	70.37
กลุ่มที่ 2 (> 50%)	36	96.61
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		83.49

ตารางที่ 4.13 และ 4.14 แสดงผลการสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามระดับการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองที่สร้างขึ้นมีเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ไม่แม่นยำ (68.15-84.52 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ที่มีเปอร์เซ็นต์การทำนายโดยรวมถูกต้อง 87.50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.13 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (≤ 50%)	กลุ่มที่ 2 (> 50%)
กลุ่มที่ 1 (≤ 50%)	168	94.05	44.64
กลุ่มที่ 2 (> 50%)	36	75.00	91.67
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		84.52	68.15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.14 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (≤ 50%)	168	100.00
กลุ่มที่ 2 (> 50%)	36	75.00
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		87.50

ตารางที่ 4.15 และ 4.16 แสดงผลการสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารตามระดับการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แบบจำลองที่สร้างขึ้นทั้งหมดให้ผลการทำนายที่แม่นยำสูง โดยเฉพาะวิธี PLS-DA ที่มีเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวม 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.15 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี SIMCA

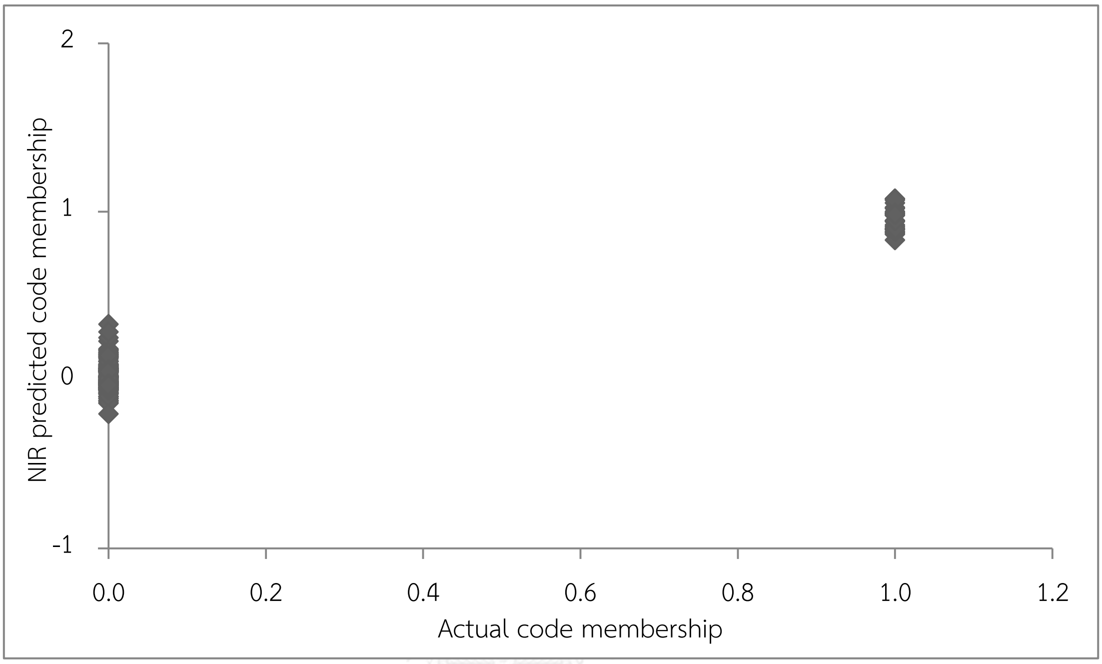
กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (< 50%)	กลุ่มที่ 2 (≥ 50%)
กลุ่มที่ 1 (< 50%)	177	92.66	100
กลุ่มที่ 2 (≥ 50%)	27	100	100
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		96.33	100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.16 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (< 50%)	177	100
กลุ่มที่ 2 (≥ 50%)	27	100
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		100

ภาพที่ 4.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองที่ได้จากวิธี direct plating กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA ที่ความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.5



ภาพที่ 4.16 การกระจายตัวของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีระดับการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลืองที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

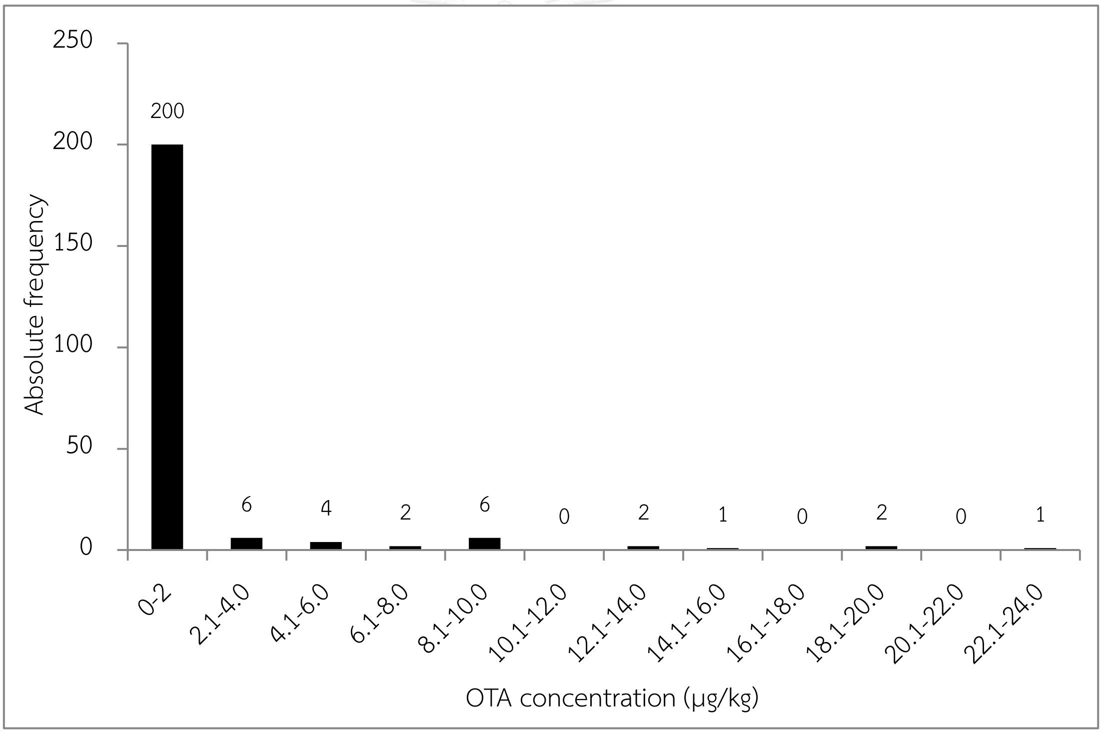
4.2.1.1 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ตรวจสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 200 ตัวอย่างย่อย ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 3.3.2 และ 3.3.3 พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณโอคราทอกซินเอ อยู่ในช่วง 0.69-1.91 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.89 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.17) สำหรับปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อน อยู่ในช่วง 3.10-22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.77 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ภาพที่ 4.17 แสดงการแจกแจงความถี่ของปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอตามธรรมชาติ จำนวน 100 ตัวอย่าง (200 ตัวอย่างย่อย) และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอ จำนวน 12 ตัวอย่าง (24 ตัวอย่าง) รวมทั้งสิ้น 112 ตัวอย่าง (224 ตัวอย่างย่อย) ซึ่งเมื่อรวมข้อมูลปริมาณโอคราทอกซินเอที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ทำให้ได้ช่วงของข้อมูลที่กว้างขึ้น เป็น 0.69-22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.52±4.81 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.17) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้มีการกระจายตัวที่เป็นแบบไม่สม่ำเสมอ โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอต่ำ คือ อยู่ในช่วง 0-2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.17 ปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ช่วง	ค่าเฉลี่ย
ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอตามธรรมชาติ	200	48 (24)	0.69-1.91	0.89±0.26
ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอ	24	24 (100)	3.10-22.84	8.77±5.28
รวม	224	72 (32.14)	0.69-22.84	3.52±4.81



ภาพที่ 4.17 การแจกแจงความถี่ของปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอตามธรรมชาติ และตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอ รวมทั้งหมด 224 ตัวอย่างย่อย

4.2.1.2 การทดสอบสมรรถนะการวัดปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารของผู้วิจัย (laboratory performance)

ค่า repeatability และ reproducibility ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอของผู้วิจัยแสดงดังตารางที่ 4.18 โดยค่า repeatability ของผู้วิจัย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำ) และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.11 และ 0.08 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับค่า reproducibility ของผู้วิจัย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำตัวอย่างที่ไม่รู้ (blind duplicate)) และค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.54 และ 0.14 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารของผู้วิจัย (laboratory performance)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำ (Repeatability)			
ตัวอย่างที่	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ความแตกต่างระหว่างซ้ำ
1,2	0.77	0.83	-0.06
13,14	0	0	0
51,52	0	0	0
71,72	1.40	1.72	-0.32
101,102	0.69	0.72	-0.03
175,176	0.74	0.82	-0.08
		SD	0.11
		ค่าเฉลี่ย	-0.08

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างของการทำซ้ำตัวอย่างที่ไม่รู้ (Reproducibility)			
ตัวอย่างที่	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ความแตกต่างระหว่างซ้ำ
R1,44	0.73	0	0.73
R2,57	0	0	0
R3,107	0	0	0
R4,136	0	0.72	-0.72
R5,164	0	0.70	-0.70
		SD	0.54
		ค่าเฉลี่ย	-0.14

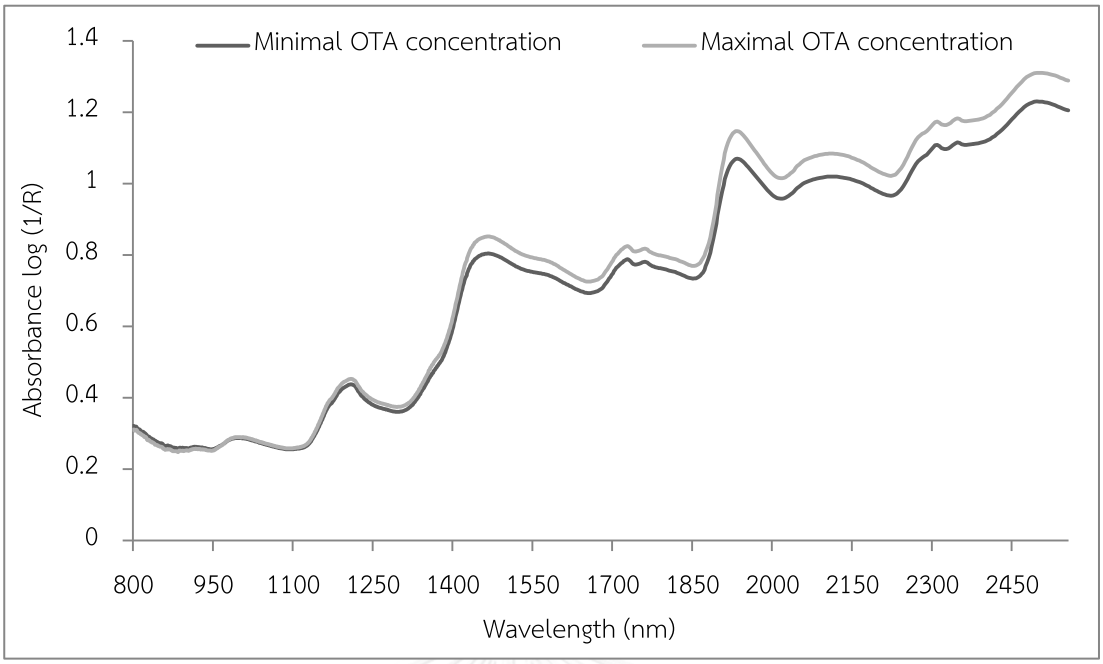
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

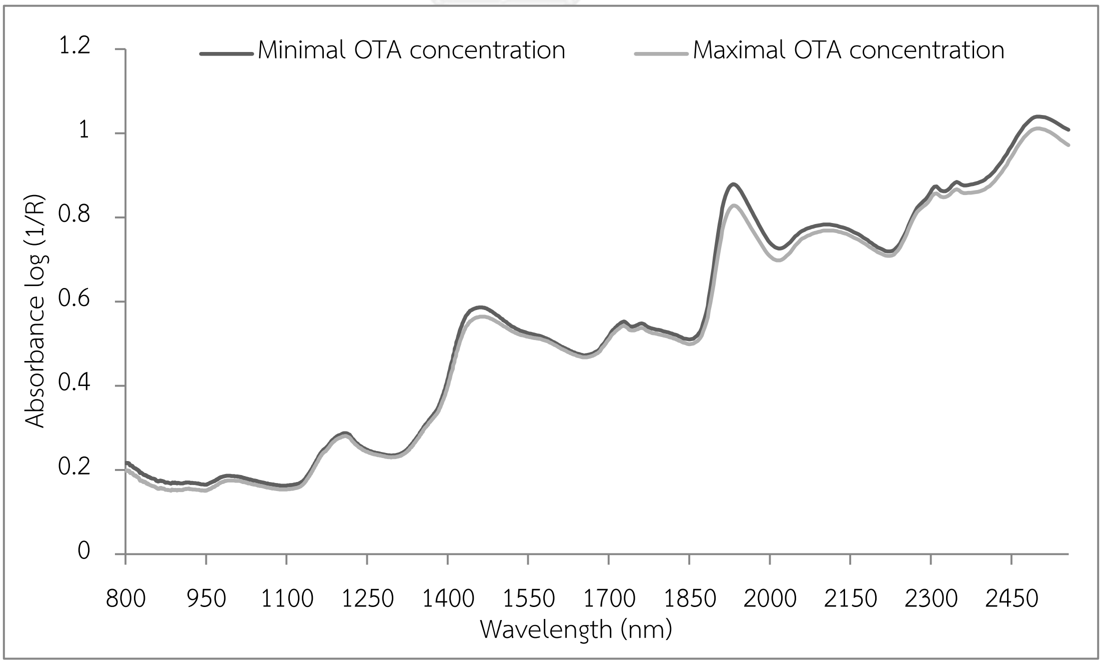
จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในการตรวจวัดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งสามชนิด ได้แก่ เมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด เมล็ดกาแฟสารบด และสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร ที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร หรือที่ความยาวคลื่นประมาณ 800-2500 นาโนเมตร จากเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (MPA, Bruker, Germany) ที่ผ่านการแปลงข้อมูลเป็นรูปแบบ JCAMP-DX แล้วได้สเปกตรัมเฉลี่ยดั้งเดิม ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) ในแนวแกน X กับ log (1/R) ในแนวแกน Y ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด เมล็ดกาแฟสารบด และสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ดังแสดงในภาพที่ 4.18, 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ พบว่า สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด (ภาพที่ 4.18) และเมล็ดกาแฟสารบด (ภาพที่ 4.19) มีรูปแบบเหมือนกัน ในขณะที่สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยที่ของสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร (ภาพที่ 4.20) มีรูปแบบที่ไม่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามค่าการดูดกลืนเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างทั้งสามชนิดไม่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงชัดเจนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโอคราทอกซินเอ

ผลการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด (second derivative by Savitzky-Golay method, 11 points) ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด และเมล็ดกาแฟสารบดที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ แสดงดังภาพที่ 4.21 และ 4.22 ตามลำดับ ซึ่งปรากฏรูปแบบและตำแหน่งของพีคคล้ายกับผลการทดลองในข้อ 4.1.2 (ภาพที่ 4.8-4.11) สำหรับสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสารที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ (ภาพที่ 4.23) มีรูปแบบและตำแหน่งของพีคแตกต่างกับตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด และตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด โดยมีพีคที่เด่นชัด 7 พีค ได้แก่ พีคที่ 1690, 1895, 2051, 2239, 2258, 2340 และ 2414 นาโนเมตร ซึ่งแต่ละพีคสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.19

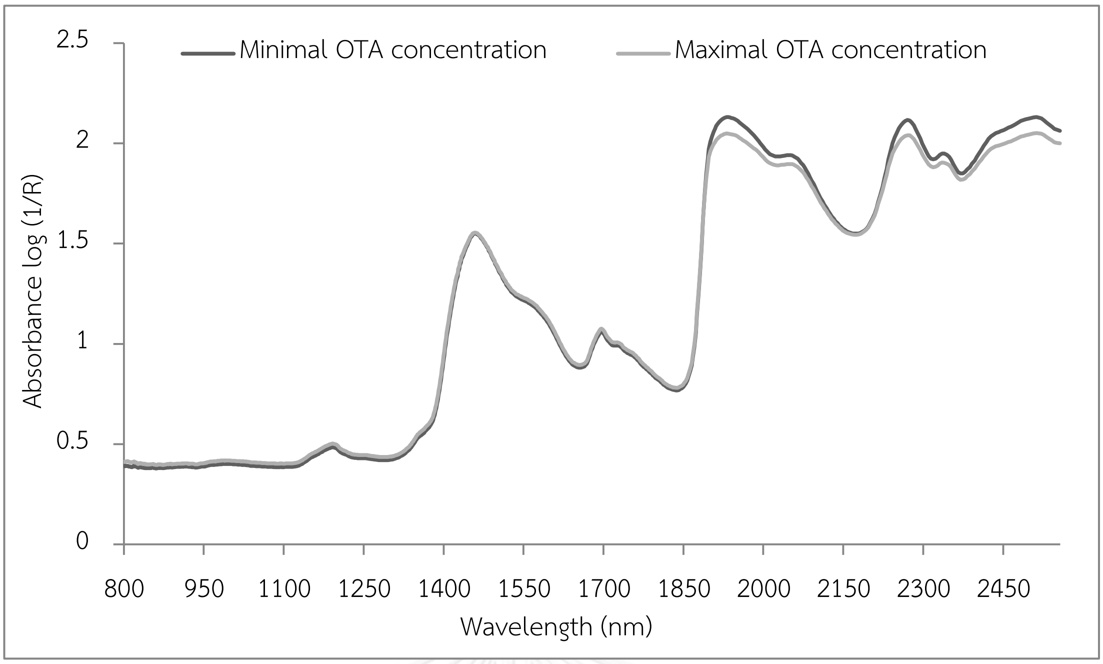
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



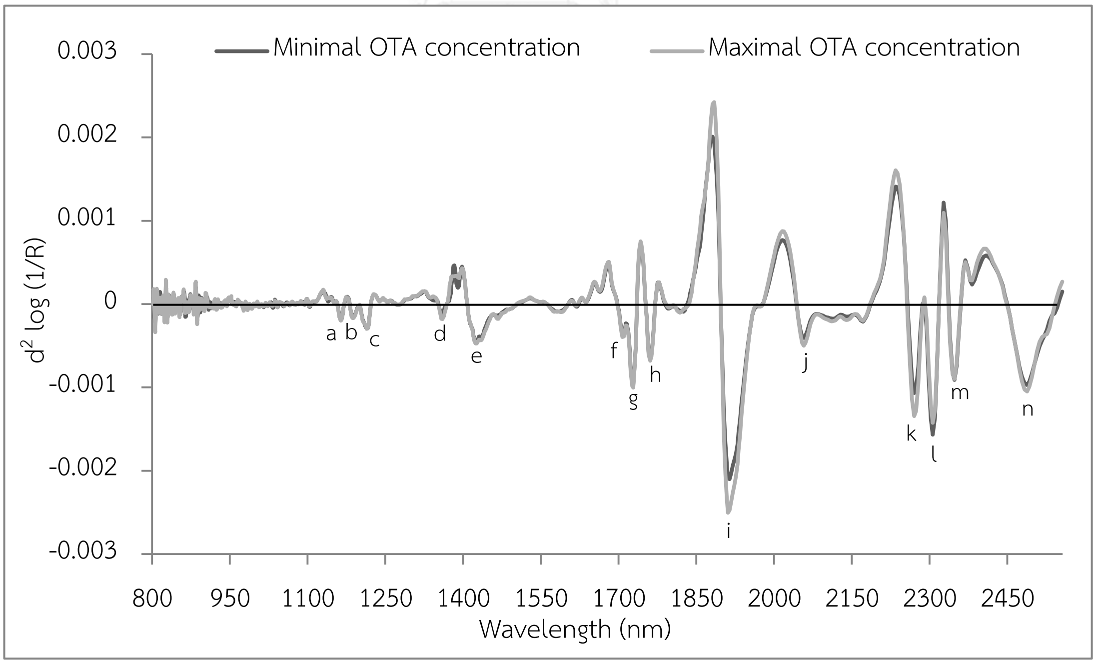
ภาพที่ 4.18 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร



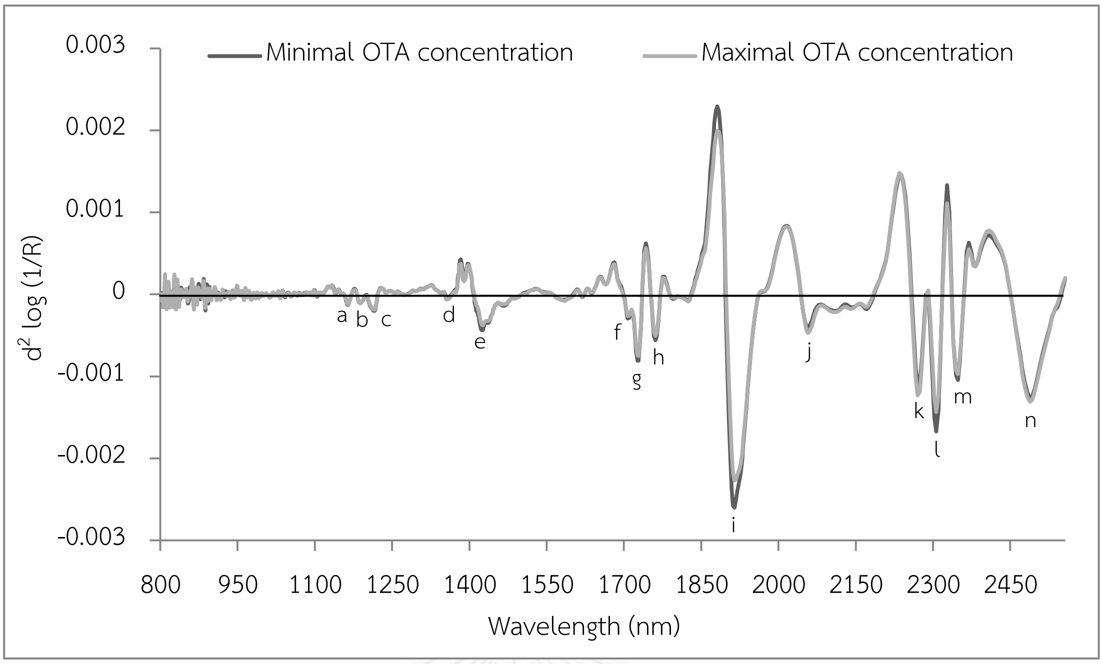
ภาพที่ 4.19 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร



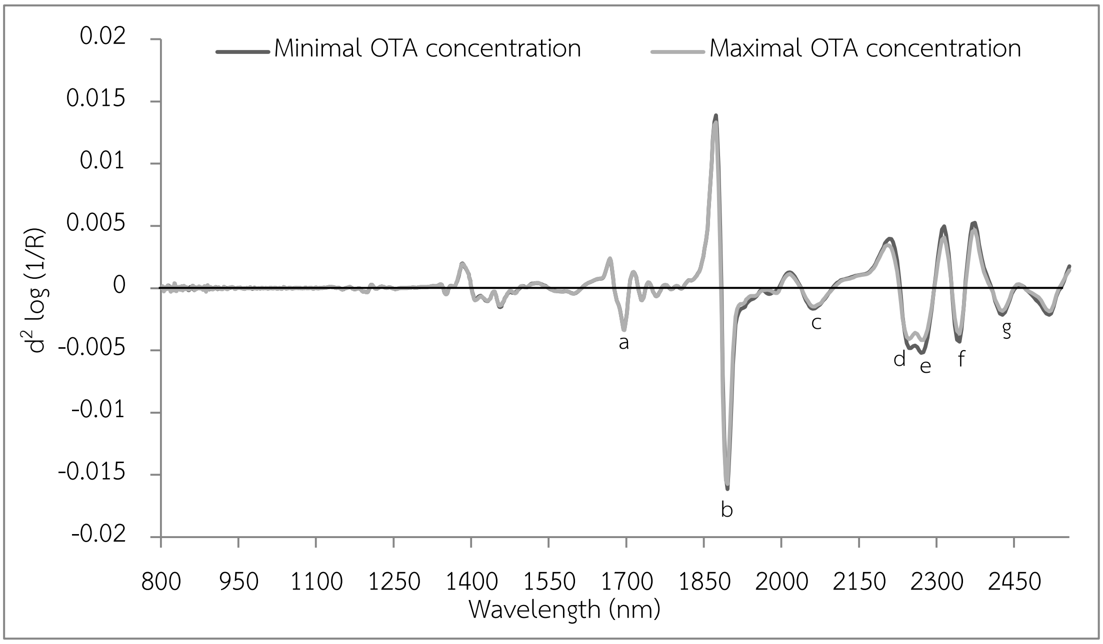
ภาพที่ 4.20 สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเมล็ดกาแฟที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.21 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.22 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบดที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ค่า a ถึง n แสดงในตารางที่ 4.3)



ภาพที่ 4.23 สเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำสุด (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และสูงสุด (22.84 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร (ค่า a ถึง g แสดงในตารางที่ 4.19)

ตารางที่ 4.19 การสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่แต่ละความยาวคลื่นที่พบจากเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร (ภาพที่ 4.23) (Osborne และคณะ, 1993)

	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	การสั่นสะเทือนของพันธะ	โครงสร้าง
a	1690 (ขยับจาก 1685)	C-H str. first overtone	อะโรมาติก
	1690 (ขยับจาก 1695)	C-H str. first overtone	CH_3
b	1895 (ขยับจาก 1940)	O-H str. + O-H def.	น้ำ
c	2051 (ขยับจาก 2050)	N-H sym. str. + amide II	โปรตีน
		N-H asym. str. + amide III	$CONH_2$
d	2239 (ขยับจาก 2242)	N-H str. + NH_3^+ def.	กรดอะมิโน
e	2258 (ขยับจาก 2252)	O-H str. + O-H def.	แป้ง
f	2340 (ขยับจาก 2336)	C-H str. + C-H def.	เซลลูโลส
g	2414 (ขยับจาก 2380)	O-H def. second overtone	ROH

str. = stretching　　def. = deformation

sym. = symmetrical　　asym. = asymmetrical

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือ ปริมาณโอคราทอกซินเอ และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้ง 3 แบบ (เมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด เมล็ดกาแฟสารบด และสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร จากเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) จากโปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.7 (Camo, Norway) ทั้งหมด 3 แบบจำลอง ได้แก่

- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด
- แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร

ผลการตรวจสอบค่าผิดปกติของข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้ง 3 แบบ แบบละ 672 เส้น ซึ่งเป็นสเปกตรัมจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอตามธรรมชาติ 600 เส้น และจากตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยโอคราทอกซินเอ 72 เส้น ไม่พบค่าผิดปกติจากข้อมูลก่อนการสร้างแบบจำลอง จึงแบ่งข้อมูลทั้งหมดออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) 70 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มทำนาย (prediction set) 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการสร้างแบบจำลองใช้ข้อมูลเชิงแสงที่ไม่มีการจัดการเบื้องต้น (raw spectra) และข้อมูลเชิงแสงที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ (pretreated spectra) ทั้งหมด 10 วิธี ตามการทดลองในข้อที่ 3.2.4 (2) สำหรับข้อมูลทางสถิติของผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปริมาณโอคราทอกซินเอของกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทำนาย แสดงดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองและกลุ่มทำนาย

กลุ่ม	จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD
กลุ่มสร้างแบบจำลอง	471	0	22.842	1.111	3.137
กลุ่มทำนาย	201	0	22.842	1.177	3.308

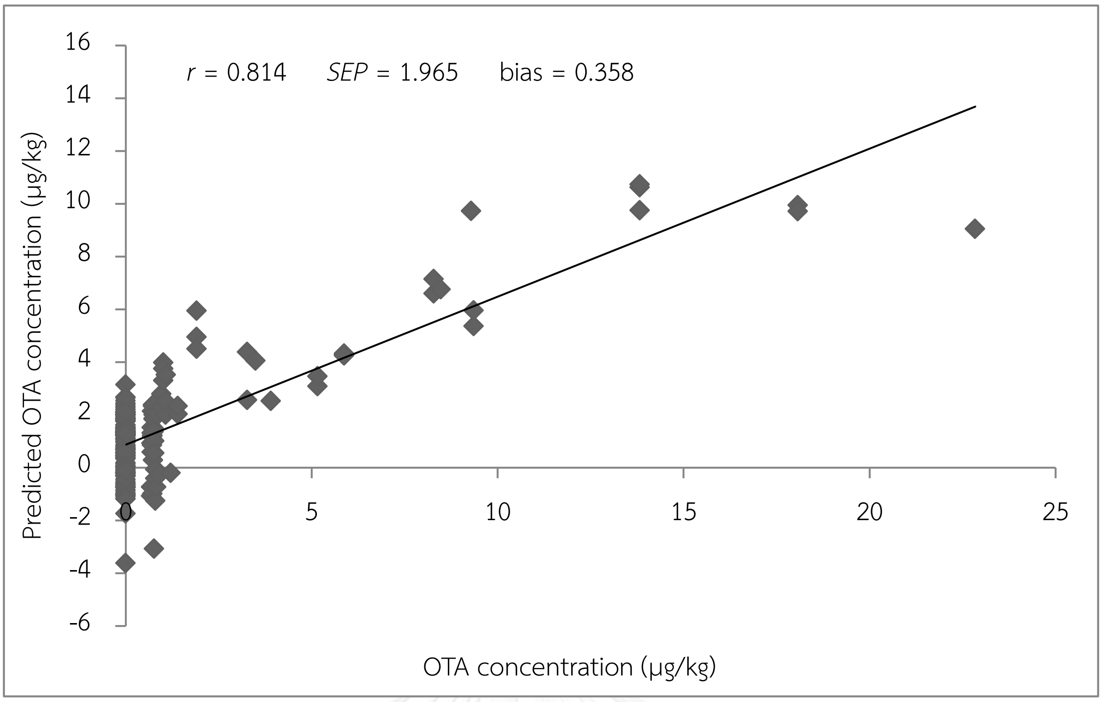
4.2.3.1 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.21 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด โดยมีค่า PCs, *r*, *SEC* และ bias เท่ากับ 6, 0.794, 1.907 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -1.484E-07 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias อยู่ที่ 0.814, 1.965 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.358 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 1.683 และ 11.624 ตามลำดับ ภาพที่ 4.24 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด และปริมาณโอคราทอกซินเอที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.21 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	6	0.653	2.376	4.579E-07	0.628	2.577	0.207	1.283	8.864
Multiplicative scatter correction	6	0.660	2.357	2.111E-06	0.618	2.599	0.288	1.273	8.789
Mean normalization	6	0.667	2.338	-6.470E-07	0.578	2.703	0.316	1.224	8.451
Max normalization	6	0.589	2.534	-7.036E-08	0.498	2.871	0.198	1.152	7.956
Range normalization	6	0.584	2.545	-7.935E-08	0.499	2.870	0.207	1.152	7.959
First derivative (11 points)	6	0.789	1.927	1.114E-08	0.788	2.041	0.416	1.621	11.192
First derivative (21 points)	**6**	**0.794**	**1.907**	**-1.484E-07**	**0.814**	**1.965**	**0.358**	**1.683**	**11.624**
Second derivative (11 points)	6	0.780	1.964	3.445E-07	0.713	2.324	0.322	1.423	9.829
Second derivative (21 points)	6	0.806	1.857	-1.596E-07	0.773	2.099	0.384	1.576	10.882
Baseline	6	0.693	2.262	-3.071E-07	0.667	2.468	0.261	1.340	9.255
Standard normal variate	6	0.658	2.363	-6.770E-08	0.614	2.611	0.291	1.267	8.748



ภาพที่ 4.24 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด

เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนายมีจำนวนน้อย (112 ตัวอย่าง; 224 ตัวอย่างย่อย) อีกทั้งค่า bias ที่มีค่าเท่ากับ 0.358 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด มีค่ามากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของค่าเฉลี่ยปริมาณโอคราทอกซินเอ (1.177 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ของข้อมูลกลุ่มทำนายแบบจำลอง จึงใช้ข้อมูลของตัวอย่างทั้งหมดสำหรับสร้างแบบจำลองและทดสอบแบบจำลอง (full cross validation) ตารางที่ 4.22 แสดงค่าทางสถิติของปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดของตัวอย่างทั้งหมด

ตารางที่ 4.22 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ใช้สำหรับการสร้างแบบจำลอง

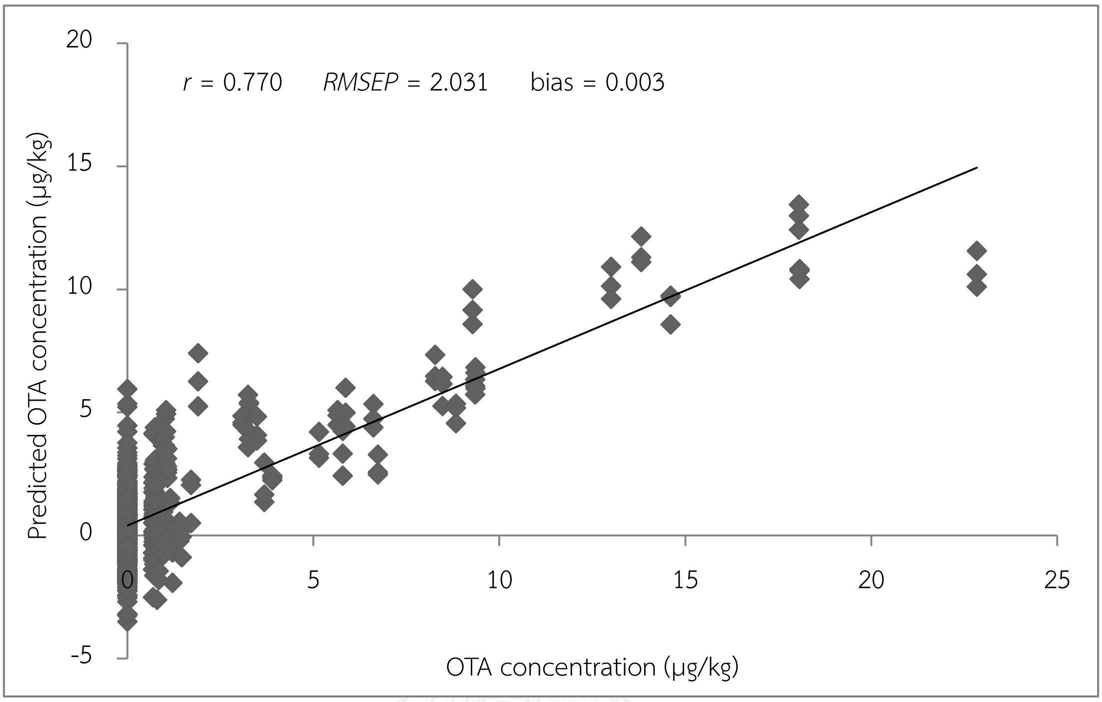
จำนวน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD
672	0	22.842	1.131	3.186

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.23 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด โดยมีค่า PCs, *r*, ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างแบบจำลอง (root mean square error of calibration; *RMSEC*) และ bias เท่ากับ 6, 0.797, 1.921 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -2.070E-07 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างทดสอบแบบจำลอง (root mean square error of prediction; *RMSEP*) และ bias อยู่ที่ 0.770, 2.031 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.003 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 1.569 และ 11.247 ตามลำดับ ภาพที่ 4.25 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด และปริมาณโอคราทอกซินเอที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.23 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่มีการทดสอบแบบจำลองด้วยวิธี full cross validation (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*RMSEC*	Bias	*r*	*RMSEP*	Bias		
Raw spectra	6	0.676	2.346	5.810E-08	0.659	2.394	-0.007	1.331	9.541
Multiplicative scatter correction	6	0.656	2.403	6.336E-07	0.630	2.474	-0.003	1.288	9.233
Mean normalization	6	0.665	2.379	2.739E-06	0.642	2.441	-0.006	1.305	9.358
Max normalization	6	0.592	2.567	1.695E-06	0.566	2.625	-0.001	1.214	8.702
Range normalization	6	0.589	2.572	1.270E-06	0.565	2.628	0.002	1.212	8.692
First derivative (11 points)	6	0.788	1.960	-6.472E-07	0.768	2.042	0.000	1.560	11.186
First derivative (21 points)	6	0.783	1.979	2.145E-07	0.767	2.044	-0.006	1.559	11.175
Second derivative (11 points)	6	0.763	2.057	-3.415E-08	0.731	2.175	-0.003	1.465	10.502
Second derivative (21 points)	**6**	**0.797**	**1.921**	**-2.070E-07**	**0.770**	**2.031**	**0.003**	**1.569**	**11.247**
Baseline	6	0.708	2.248	-2.079E-06	0.682	2.329	-0.005	1.368	9.808
Standard normal variate	6	0.655	2.405	-7.003E-07	0.628	2.478	-0.006	1.286	9.218



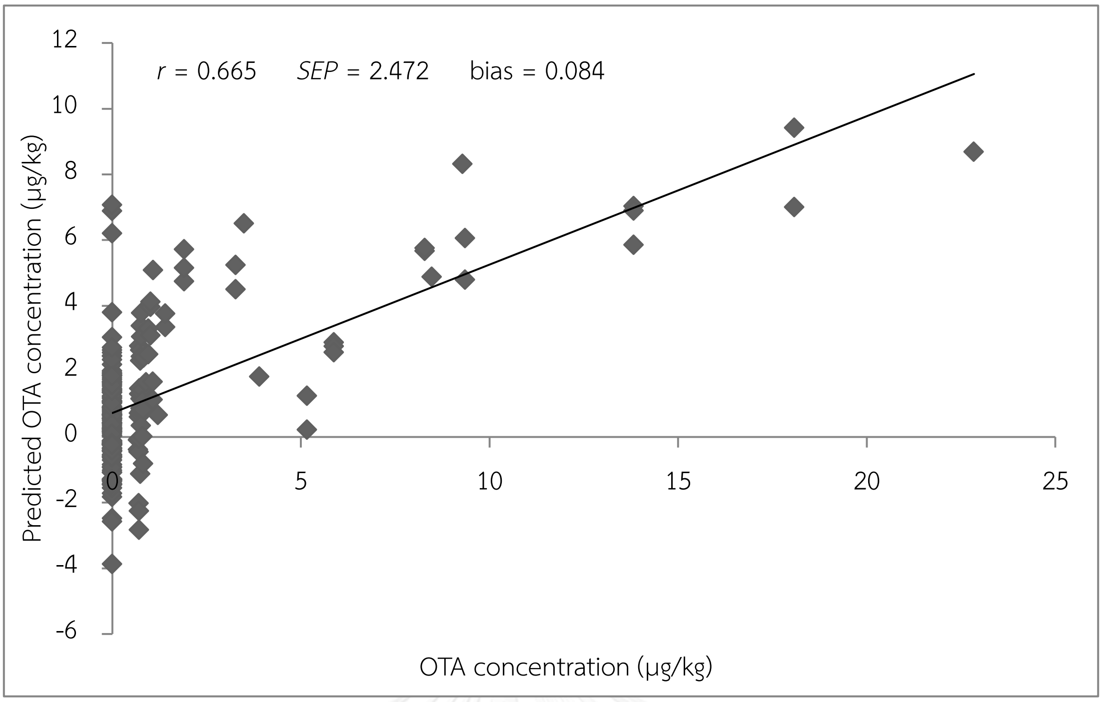
ภาพที่ 4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด

4.2.3.2 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบดด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.24 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด โดยมีค่า PCs, *r*, *SEC* และ bias เท่ากับ 6, 0.742, 2.103 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -6.059E-07 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias อยู่ที่ 0.665, 2.472 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.084 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 1.338 และ 9.240 ตามลำดับ ภาพที่ 4.26 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นด้วยการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด และปริมาณโอคราทอกซินเอที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4.24 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	6	0.386	2.893	3.062E-07	0.259	3.211	-0.041	1.030	7.114
Multiplicative scatter correction	6	0.623	2.452	-1.076E-06	0.519	2.829	0.165	1.169	8.074
Mean normalization	6	0.558	2.602	-1.979E-07	0.525	2.820	0.030	1.173	8.100
Max normalization	6	0.494	2.728	1.999E-06	0.400	3.033	0.081	1.091	7.531
Range normalization	6	0.501	2.714	-1.584E-06	0.422	2.999	0.082	1.103	7.617
First derivative (11 points)	6	0.649	2.386	3.118E-07	0.575	2.707	0.021	1.222	8.438
First derivative (21 points)	6	0.705	2.224	2.322E-07	0.605	2.633	0.142	1.256	8.675
Second derivative (11 points)	5	0.644	2.399	-1.134E-07	0.603	2.640	0.073	1.253	8.652
Second derivative (21 points)	**6**	**0.742**	**2.103**	**-6.059E-07**	**0.665**	**2.472**	**0.084**	**1.338**	**9.240**
Baseline	6	0.541	2.638	-1.598E-06	0.526	2.814	0.001	1.175	8.117
Standard normal variate	6	0.605	2.498	-5.653E-07	0.520	2.825	0.158	1.171	8.086



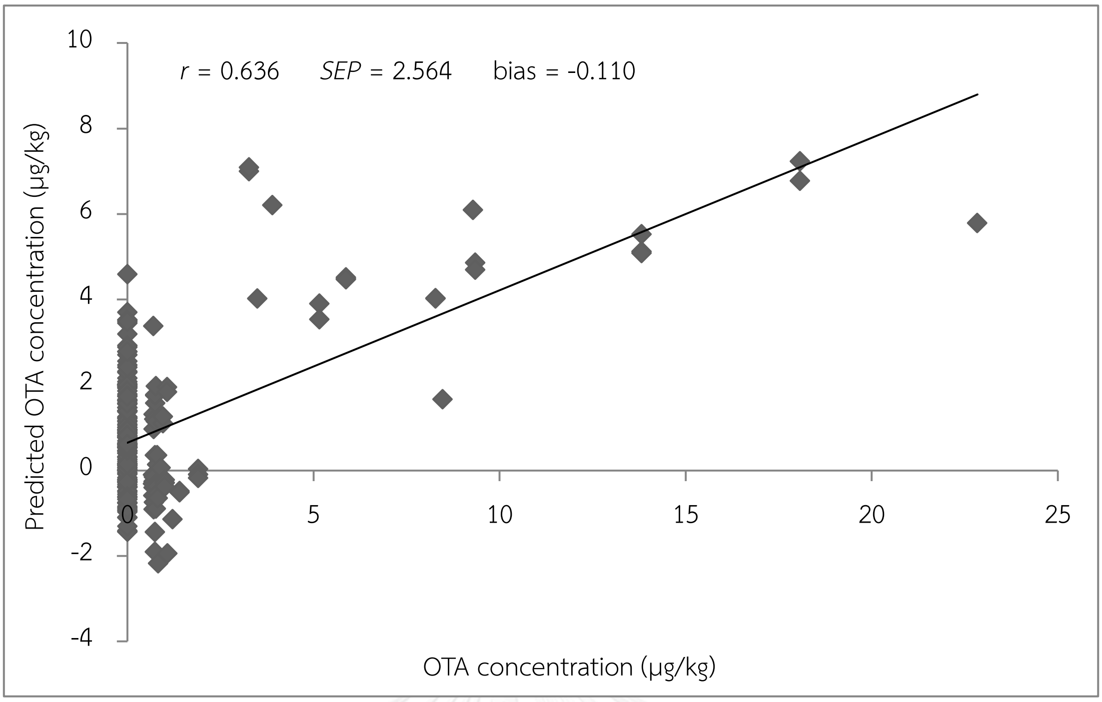
ภาพที่ 4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟสารบดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นโดยวิธีวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด

4.2.3.3 แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร

ผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLSR แสดงดังตารางที่ 4.25 แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมดั้งเดิม โดยมีค่า PCs, *r*, *SEC* และ bias เท่ากับ 4, 0.632, 2.430 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -6.049E-08 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทำนายได้ดีที่สุด โดยมีค่า *r*, *SEP* และ bias อยู่ที่ 0.636, 2.564 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -0.110 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า RPD และ RER มีค่าเท่ากับ 1.290 และ 8.909 ตามลำดับ ภาพที่ 4.27 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองที่ถูกพัฒนามาจากสเปกตรัมดั้งเดิม และปริมาณโอคราทอกซินเอที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4.25 แบบจำลอง PLSR ที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร (หน่วย: ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

การปรับแต่งเส้นสเปกตรัม	PCs	กลุ่มสร้างแบบจำลอง			กลุ่มทำนาย			RPD	RER
		r	*SEC*	Bias	*r*	*SEP*	Bias		
Raw spectra	**4**	**0.632**	**2.430**	**-6.049E-08**	**0.636**	**2.564**	**-0.110**	**1.290**	**8.909**
Multiplicative scatter correction	6	0.553	2.614	1.141E-06	0.350	2.280	-0.103	1.451	10.018
Mean normalization	5	0.585	2.544	-7.168E-07	0.426	3.043	0.172	1.087	7.506
Max normalization	6	0.594	2.524	-1.749E-07	0.366	3.247	0.223	1.019	7.035
Range normalization	6	0.595	2.521	-1.140E-06	0.361	3.269	0.229	1.012	6.987
First derivative (11 points)	6	0.513	2.692	1.492E-07	0.400	3.051	0.050	1.084	7.487
First derivative (21 points)	6	0.533	2.653	3.362E-07	0.445	2.967	-0.009	1.115	7.699
Second derivative (11 points)	5	0.443	2.812	-3.986E-08	0.355	3.115	-0.006	1.062	7.333
Second derivative (21 points)	6	0.501	2.714	-4.038E-07	0.409	3.028	0.061	1.092	7.544
Baseline	6	0.553	2.613	-4.571E-07	0.385	3.112	-0.067	1.063	7.340
Standard normal variate	6	0.554	2.611	5.720E-07	0.349	3.282	-0.109	1.008	6.960



ภาพที่ 4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC กับค่าทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมดั้งเดิมของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งสามชนิด พบว่าแบบจำลองที่ให้ผลการทำนายดีที่สุด ได้แก่ แบบจำลองที่ใช้ทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีโอคราทอกซินเอปนเปื้อนอยู่ในปริมาณต่ำ (0-2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) อีกทั้งเมื่อพิจารณาถึงข้อกำหนดของคณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ที่กำหนดให้มีโอคราทอกซินเอปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟคั่ว ได้ไม่เกิน 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2006) จึงสร้างแบบจำลองเพื่อแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ทั้งหมด 2 แบบจำลอง ได้แก่

แบบจำลองที่ 1

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ

แบบจำลองที่ 2

- กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
- กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอที่มากกว่า 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงไว้ในตารางที่ 4.26 และ 4.27 ตามลำดับ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองที่สร้างขึ้นมีเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ไม่แม่นยำ (43.92-61.69 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ที่มีเปอร์เซ็นต์การทำนายโดยรวม เท่ากับ 77.94 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.26 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีและไม่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี SIMCA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	135	94.81	3.70
กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)	63	28.57	84.13
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		61.69	43.92

ตารางที่ 4.27 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีและไม่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (ไม่มีการปนเปื้อน)	135	95.56
กลุ่มที่ 2 (มีการปนเปื้อน)	63	60.32
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		77.94

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.28 และ 4.29 แสดงผลการสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA ตามลำดับ พบว่า แบบจำลองที่สร้างจากการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA ให้ผลการทำนายที่ไม่แม่นยำ (59.78-81.15 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ที่มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มโดยรวมถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.28 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี SIMCA

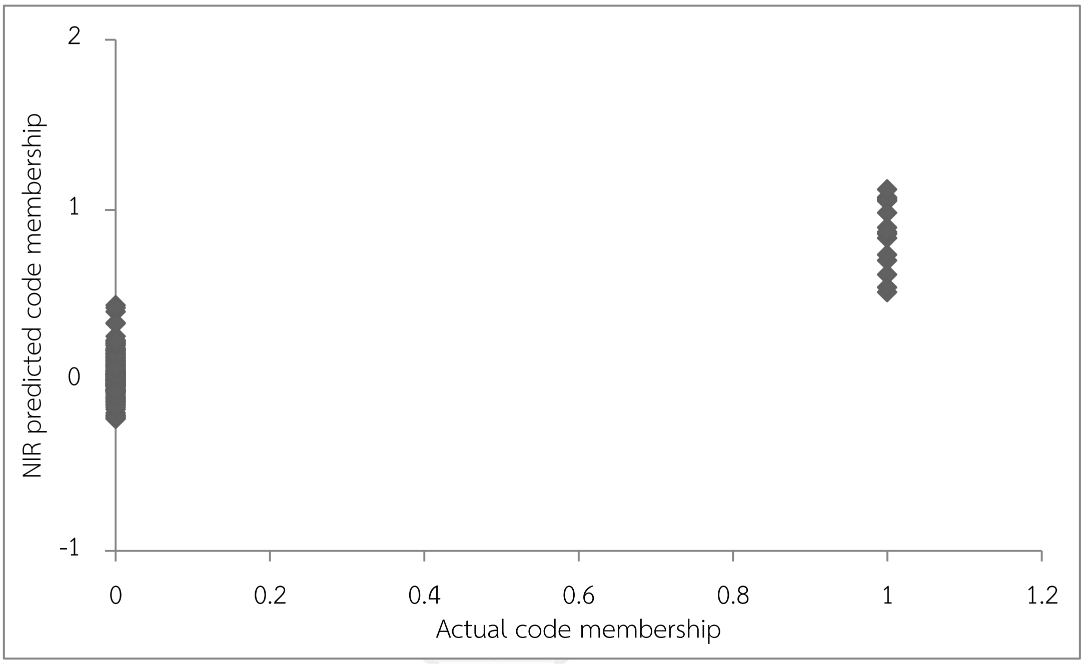
กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง	
		กลุ่มที่ 1 (≤5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	กลุ่มที่ 2 (>5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
กลุ่มที่ 1 (≤5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	183	92.90	62.30
กลุ่มที่ 2 (>5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	15	26.67	100.00
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		59.78	81.15

ตารางที่ 4.29 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับและมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดด้วยวิธี PLS-DA

กลุ่ม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้อง
กลุ่มที่ 1 (≤5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	183	100.00
กลุ่มที่ 2 (>5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	15	100.00
เปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องโดยรวม		100.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโอคราทอกซินเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC กับค่าที่ทำนายได้จากแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารด้วยวิธี PLS-DA ที่ความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.5



ภาพที่ 4.28 การกระจายตัวของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3 การพิจารณาระดับโมเลกุลจากกราฟ regression coefficient

กราฟ regression coefficient เป็นกราฟที่สร้างขึ้นระหว่างค่า regression coefficient กับความยาวคลื่น ค่า regression coefficient ที่มีค่าสูงที่ความยาวคลื่นใดๆ หมายความว่า ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นนั้นมีอิทธิพลต่อการทำนายค่าที่ต้องการ ผู้วิจัยขอแสดงกราฟ regression coefficient ของแบบจำลองที่ให้ผลการทำนายที่ดี ได้แก่ แบบจำลองที่ใช้ในการทำนายปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของราทั้งหมด และการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด

เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดบนพื้นฐานของโมเลกุลจากกราฟ regression coefficient ที่สร้างขึ้น พบว่า แบบจำลองที่ใช้ในการทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร มีค่า regression coefficient สูงที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 1410, 1820, 1900 และ 2190 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.29) ซึ่งแต่ละความยาวคลื่นสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น

ความยาวคลื่นที่ 1410 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของแอลกอฮอล์ (ROH)

ความยาวคลื่นที่ 1900 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C=O stretching second overtone ของ $-CO_2H$

แบบจำลองที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร มีค่า regression coefficient สูงที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 910, 1020, 1360, 1410, 1685, 1820, 1920, 2200, 2310 และ 2461 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.30) ซึ่งแต่ละความยาวคลื่นสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น

ความยาวคลื่นที่ 1360 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-H deformation ของ CH_3

ความยาวคลื่นที่ 1410 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของแอลกอฮอล์ (ROH)

ความยาวคลื่นที่ 1820 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ C-O stretching ของเซลลูโลส

ความยาวคลื่นที่ 2200 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C=O stretching ของ -CHO

ความยาวคลื่นที่ 2461 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-C stretching ของ แป้ง

แบบจำลองที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด มีค่า regression coefficient สูงที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 1360, 1395, 1705, 1900, 1940, 2030, 2080, 2132, 2200, 2280 และ 2352 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.31) ซึ่งแต่ละความยาวคลื่นสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น

ความยาวคลื่นที่ 1705 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching first overtone ของ CH_3

ความยาวคลื่นที่ 1940 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching และ O-H deformation ของน้ำ

ความยาวคลื่นที่ 2030 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C=O stretching second overtone ของ $CONH_2$

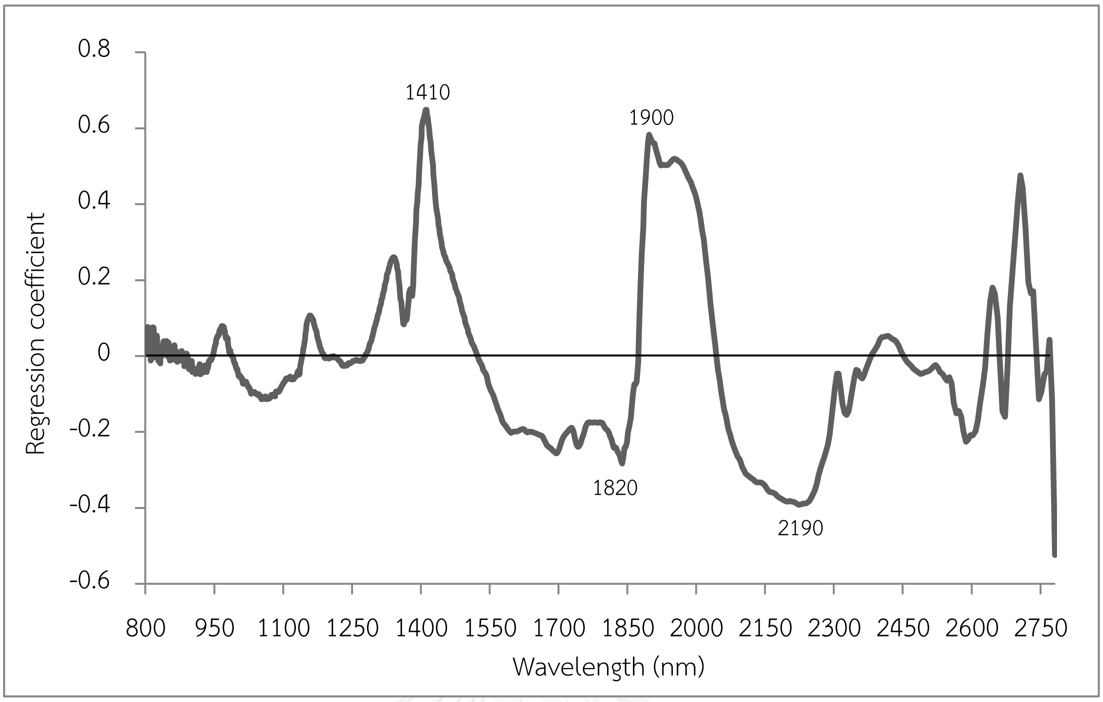
ความยาวคลื่นที่ 2200 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C=O stretching ของ –CHO

ความยาวคลื่นที่ 2280 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-H deformation ของ CH_3

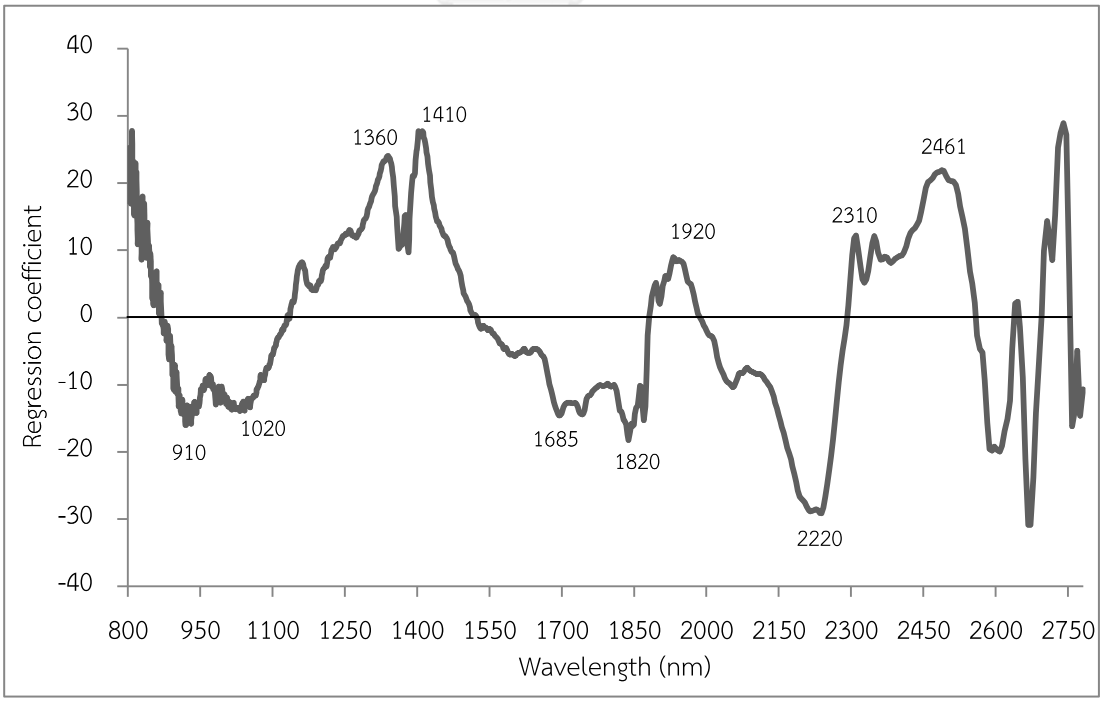
แบบจำลองที่ใช้ในการทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ที่มีการทดสอบแบบจำลองโดยวิธี full cross validation มีค่า regression coefficient สูงที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 2050, 2180, 2280 และ 2310 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.32) ซึ่งแต่ละความยาวคลื่นสัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น

ความยาวคลื่นที่ 2280 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-H deformation ของ CH_3

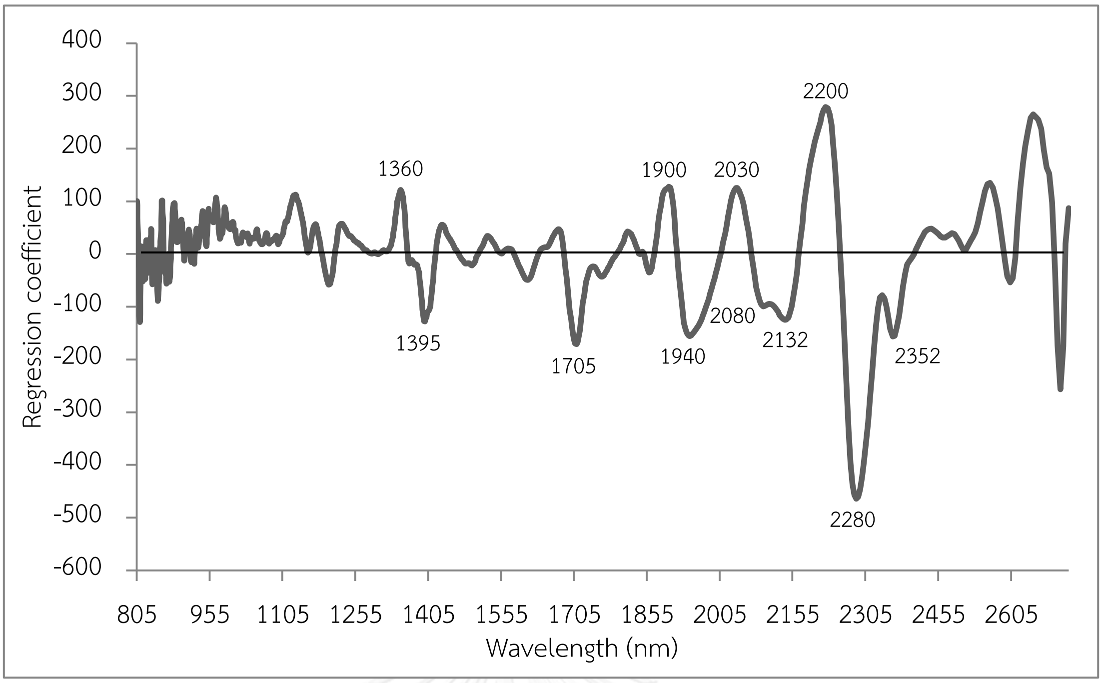
ความยาวคลื่นที่ 2310 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching และ C-H deformation ของ CH_2



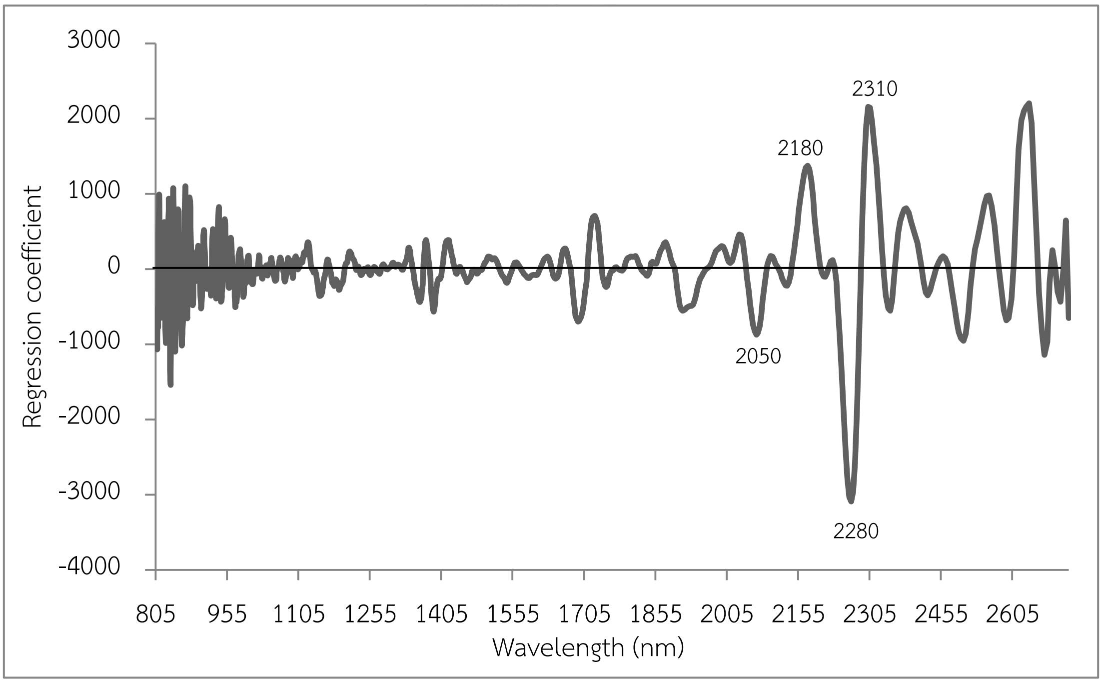
ภาพที่ 4.29 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการปรับค่าเป็นมาตรฐาน (mean normalization) เพื่อทำนายปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ที่ PCs = 6



ภาพที่ 4.30 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการปรับค่าเป็นมาตรฐาน (range normalization) เพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมดในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ที่ PCs = 6



ภาพที่ 4.31 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด เพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ที่ PCs = 6



ภาพที่ 4.32 ค่า Regression coefficient ของแบบจำลองที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด เพื่อทำนายการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด ที่มีการทดสอบแบบจำลองโดยวิธี full cross validation ที่ PCs = 6

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาราทั้งหมด และราในสกุล *Aspergillus* ที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

5.1.1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นฐานเปียกของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างกาแฟสารมีความชื้นใกล้เคียงกันเฉลี่ยเท่ากับ 11.34±0.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) ที่กำหนดให้มีปริมาณความชื้นไม่เกิน 12.5 เปอร์เซ็นต์

5.1.2 การปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร ด้วยวิธี direct plating พบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมดมีการปนเปื้อนของราสูง มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 83.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การปนเปื้อนของราที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *Aspergillus* section *Nigri* ซึ่งมีโคโลนีสีดำ และ *Aspergillus* section *Circumdati* ซึ่งมีโคโลนีสีเหลืองต่ำ ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเท่ากับ 7.36 และ 0.94 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่าตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกามีการปนเปื้อนของราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอต่ำ โดยพบการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* section *Nigri* สูงกว่า *Aspergillus* section *Circumdati* ในขณะที่การผลิตโอคราทอกซินเอสูงสุด 6,918.50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบในตัวอย่างไอโซเลตจาก *Aspergillus* section *Circumdati*

จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Joosten และคณะ (2001); Batista และคณะ (2003); Taniwaki และคณะ (2003); Morello และคณะ (2007) ที่พบว่า *Aspergillus* section *Nigri* และ *Aspergillus* section *Circumdati* เป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในกาแฟ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Noonim และคณะ (2008) ที่ศึกษาการปนเปื้อนของราในกาแฟสายพันธุ์อะราบิกาที่ปลูกในประเทศไทย พบราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอในกาแฟสายพันธุ์อะราบิกา ซึ่งส่วนใหญ่เป็นราสกุล *Aspergillus* ทั้ง section *Circumdati* โดยเฉพาะ *A. westerdijkiae* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอสูงสุด และ section *Nigri*

โดยเฉพาะ *A. niger* Taniwaki และคณะ (2014) ศึกษาการปนเปื้อนของราในเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกาที่มีความบกพร่องในประเทศบราซิล พบราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรา *Aspergillus* section *Circumdati* โดยเฉพาะ *A. westerdijkiae* ในขณะที่พบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* section *Nigri* โดยเฉพาะ *A. carbonarius* ซึ่งเป็นราที่พบต่ำ มักพบการปนเปื้อนในองุ่น กาแฟสายพันธุ์โรบัสตาและอะราบิกาในหลายพื้นที่ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย (Taniwaki และคณะ, 2003; Leong และคณะ, 2006; Noonim และคณะ, 2008; Techarat และคณะ, 2012)

การปนเปื้อนของราเหล่านี้พบได้ตั้งแต่กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ กระบวนการแปรรูปกาแฟ การขนส่ง และการเก็บรักษา (Paterson และคณะ, 2014) โดยทั่วไปกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก (wet process) ให้เมล็ดกาแฟที่มีคุณภาพดี จึงนิยมใช้ในการผลิตเมล็ดกาแฟอะราบิกา แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากกระบวนการแบบเปียกมีหลายขั้นตอน ซึ่งในแต่ละขั้นตอนอาจมีสาเหตุที่ทำให้มีการปนเปื้อนของราเพิ่มขึ้นได้ เช่น คุณภาพน้ำและอุปกรณ์ที่ใช้ระหว่างขั้นตอนการหมัก ระยะเวลาในการตากแดด ความสะอาดของอุปกรณ์ที่ใช้ และสิ่งแวดล้อมบริเวณที่ใช้ในการตากเมล็ดกาแฟ (Noonim และคณะ, 2008)

5.1.3 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้น และตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่ช่วงจำนวนคลื่น 12500-4000 ต่อเซนติเมตร (ความยาวคลื่นประมาณ 800-2500 นาโนเมตร) ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (FT-NIR) (MPA, Bruker, Germany) ในแบบแพร่สะท้อนแสง (diffuse reflectance) พบว่า สเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง มีรูปแบบ (spectrum pattern) เหมือนกันถึงแม้จะมีค่าองค์ประกอบที่ต้องการวัดแตกต่างกัน log (1/R) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงชัดเจนเมื่อค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาพที่ 4.4) เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำ (ภาพที่ 4.6) และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเหลือง (ภาพที่ 4.7) เปลี่ยนแปลงไป ในขณะที่ log (1/R) ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดต่างกันมีความต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 4.5) เมื่อปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด พบว่า log (1/R) ที่ความยาวคลื่นต่างๆ หรือพีคมีความชัดมากกว่าสเปกตรัมดั้งเดิมเฉลี่ย และมีลักษณะที่คล้ายกันทั้ง 4 กราฟ ซึ่งมีพีคที่เด่นชัดทั้งหมด 14 พีค พีคที่สำคัญ เช่น 1915, 2344 และ 2479 นาโน

เมตร ซึ่งอาจเป็นพีคที่ขยับมาจากความยาวคลื่นที่ 1940, 2336 และ 2488 นาโนเมตร ตามลำดับ พีคที่ 1940 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของน้ำ พีคที่ 2336 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของเซลลูโลส และพีคที่ 2488 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะของแป้ง (Osborne และคณะ, 1993) ซึ่งองค์ประกอบทั้งสามชนิดนี้ เป็นองค์ประกอบหลักในเมล็ดกาแฟ

5.1.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น และการปนเปื้อนของราในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารจากเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) จากโปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) สรุปได้ดังนี้

แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น

แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (mean normalization) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation; *r*) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้อธิบายความสามารถของแบบจำลอง เท่ากับ 0.970 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง ±0.96-0.98 ซึ่งหมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ (Williams, 2007) สำหรับค่า RPD หรือ อัตราส่วนค่า *SEP* ต่อ *SD* (ratio of standard error of prediction validation to standard deviation; RPD) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้อธิบายถึงประสิทธิภาพของแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 4.075 ซึ่งอยู่ในช่วง 3.1-4.9 หมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้แบบพอใช้ (Williams, 2007)

แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราทั้งหมด

แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการปรับเป็นค่ามาตรฐาน (range normalization) โดยมีค่า *r* เท่ากับ 0.835 ค่าที่ได้อยู่ในช่วง ±0.81-0.90 ซึ่งหมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปใช้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบและประมาณค่าเบื้องต้น ค่า RPD ที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.775 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.0-2.3 หมายความว่าไม่ควรนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการทำนาย (Williams, 2007)

แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ

แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีวิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ โดยมีค่า *r* เท่ากับ 0.882 ค่าที่ได้อยู่ในช่วง ±0.81-0.90 ซึ่งหมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปใช้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบและประมาณค่าเบื้องต้น ค่า RPD ที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.986 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.0-2.3 หมายความว่าไม่ควรนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการทำนาย (Williams, 2007)

แบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง

แบบจำลองที่ดีที่สุดได้จากแบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 โดยมีค่า *r* เท่ากับ 0.972 ค่าที่ได้อยู่ในช่วง ±0.96-0.98 ซึ่งหมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปใช้ได้ในงานประยุกต์ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ ค่า RPD ที่ได้มีค่าเท่ากับ 4.286 ซึ่งอยู่ในช่วง 3.1-4.9 หมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้แบบพอใช้ (Williams, 2007)

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณทั้งหมด พบว่า แบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้นเป็นแบบจำลองที่ใช้ทำนายได้แม่นยำที่สุดและสามารถนำไปใช้ได้จริง เนื่องจากข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาสร้างแบบจำลองมีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำให้ได้แบบจำลองที่มีค่า *r* และ RPD สูง ในขณะที่ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราของตัวอย่างบางส่วนมีค่าต่ำมาก บางส่วนสูงมาก และไม่มีข้อมูลระหว่างกลาง ทำให้การกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบไม่ปกติ ดังนั้น เมื่อสร้างแบบจำลองจากเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา แบบจำลองที่ได้ถึงแม้จะมีค่า *r* สูง แต่มีค่า RPD ต่ำ ไม่เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ การเลือกตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อสร้างแบบจำลองจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ และความแม่นยำของแบบจำลอง ตัวอย่างที่ดีต้องเป็นตัวแทนที่มีค่าองค์ประกอบที่ต้องการวัดครอบคลุมตัวอย่างที่แท้จริงในธรรมชาติ และมีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบสม่ำเสมอ (uniform distribution) (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2545)

5.1.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

จากผลการสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA (soft independent modeling of class analogy) และ PLS-DA (partial least square-discriminant analysis)

พบว่า ส่วนใหญ่แบบจำลองที่สร้างจากวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด สูงกว่าวิธี SIMCA โดยแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของราทั้งหมด การปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีดำ และการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* โคโลนีสีเหลือง มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด เท่ากับ 66.67, 83.49, 87.50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบว่า แบบจำลองที่ใช้ทำนายปริมาณความชื้นเป็นแบบจำลองที่ทำนายได้แม่นยำที่สุด ด้วยค่า *r* และค่า RPD ที่สูงถึง 0.970 และ 4.075 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาสร้างแบบจำลองมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ข้อมูลค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราของตัวอย่างที่นำมาสร้างแบบจำลองบางส่วนมีค่าต่ำมาก บางส่วนมีค่าสูงมาก และไม่มีข้อมูลระหว่างกลาง ทำให้การกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบไม่ปกติ ในขณะที่การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือการแบ่งกลุ่ม พบว่า แบบจำลองที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มปริมาณความชื้นให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องต่ำ เนื่องจากข้อมูลมีค่าใกล้เคียงกันทำให้การแบ่งกลุ่มเป็นไปได้ยาก ในขณะที่ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรามีค่าต่างกันอย่างชัดเจนทำให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ในการแบ่งกลุ่มที่ถูกต้องแม่นยำถึง 100 เปอร์เซ็นต์

ทั้งนี้เนื่องจากความชื้นหรือปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบที่เป็นเนื้อเดียว (homogeneous) กับกาแฟ ดังนั้นเมื่อสแกนเมล็ดกาแฟด้วยเนียร์อินฟราเรดจึงได้สเปกตรัมที่สอดคล้องกับค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ ในขณะที่ราเป็นสิ่งปนเปื้อนซึ่งไม่เป็นเนื้อเดียว (heterogeneous) กับกาแฟ เมื่อสแกนเมล็ดกาแฟด้วยเนียร์อินฟราเรด อาจไม่ได้สแกนเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของรา จึงได้สเปกตรัมที่ไม่สอดคล้องกับค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์

5.2 การใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

5.2.1 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

จากการตรวจสอบโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งหมด 200 ตัวอย่าง ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) พบว่า มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารเพียง 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณโอคราทอกซินเอต่ำ (0.69-1.91 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งต่ำกว่าข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรเมล็ดกาแฟอะราบิกา (มกษ. 5701-2552) ที่กำหนดให้มีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และข้อกำหนดของ

คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ที่กำหนดให้มีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟคั่ว ได้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (European Commission, 2006) ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานจาก Noonim และคณะ (2008) ที่ได้ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในกาแฟสายพันธุ์อะราบิกาที่ปลูกในประเทศไทย พบว่าร้อยละ 89 ของเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกามีโอคราทอกซินเอปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.6-5.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Gopinandhan และคณะ (2008) ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสารสายพันธุ์อะราบิกาในประเทศอินเดีย พบว่า 25 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 64 ของตัวอย่างมีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในช่วง 0.2-4.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Vanesa และคณะ (2013) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร กาแฟคั่วบด และกาแฟสำเร็จรูป ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนเท่ากับ 5.77, 1.00 และ 1.99 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

5.2.2 ลักษณะสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรด

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดในการตรวจวัดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งสามชนิด ได้แก่ เมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด เมล็ดกาแฟสารบด และสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร พบว่า สเปกตรัมดั้งเดิมและสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่สองโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 11 จุด ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดและเมล็ดกาแฟสารบดที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ มีรูปแบบเหมือนกันและปรากฏพีคที่สำคัญเช่นเดียวกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ในขณะที่สเปกตรัมดั้งเดิมและสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งของสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร มีรูปแบบต่างออกไป แต่ยังคงมีบางพีคที่เหมือนกับตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดและตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารบด เช่น พีคที่ 1895, 2258 และ 2340 นาโนเมตร ซึ่งอาจเป็นพีคที่ขยับมาจากความยาวคลื่นที่ 1940, 2252 และ 2336 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งพีคเหล่านี้สัมพันธ์กับองค์ประกอบหลักในเมล็ดกาแฟ ได้แก่ น้ำ (1940 นาโนเมตร) แป้ง (2252 นาโนเมตร) และเซลลูโลส (2336 นาโนเมตร) (Osborne และคณะ, 1993)

5.2.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือ ปริมาณโอคราทอกซินเอ และข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้ง 3 แบบ ได้แก่ เมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ด เมล็ดกาแฟสารบด และสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟสาร ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) ซึ่งแบบจำลองที่ให้ผลการทำนายระดับการ

ปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุดสร้างจากข้อมูลเชิงแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ผ่านการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งโดยวิธีซาวิตซ์กีโกเลย์ทำอนุพันธ์ทุกๆ 21 จุด โดยมีค่า *r* เท่ากับ 0.814 ค่าที่ได้อยู่ในช่วง ±0.81-0.90 ซึ่งหมายความว่าสามารถนำแบบจำลองไปใช้ในการแบ่งกลุ่มแบบหยาบและประมาณค่าเบื้องต้น ค่า RPD ที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.683 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.0-2.3 หมายความว่าไม่ควรนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการทำนาย (Williams, 2007)

เนื่องจากข้อมูลปริมาณโอคราทอกซินเอของตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาสร้างแบบจำลองมีค่าต่ำมาก อีกทั้งการเติมสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอลงในตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในความเข้มข้นต่างๆ ไม่ได้ตามที่ต้องการ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากวิธีที่ใช้ในการสกัดโอคราทอกซินเอออกจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟสารยังไม่เหมาะสม หรือมีการเสื่อมสภาพของสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ ทำให้ปริมาณโอคราทอกซินเอที่ได้น้อยกว่าความเป็นจริง ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ทำให้ไม่มีข้อมูลที่หลากหลายสำหรับการสร้างแบบจำลอง

มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร เช่น Gaspardo และคณะ (2012) ใช้ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-NIR) ในการตรวจหาปริมาณของฟูโมนิซินบี 1 และบี 2 ในข้าวโพด โดยตัวอย่างข้าวโพดที่นำมาศึกษามีฟูโมนิซินบี 1 และบี 2 ปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.417-11.845 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แบบจำลองที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) ค่ารากที่สองของความผิดพลาดยกกำลังสองเฉลี่ยของแบบจำลองแคลิเบรชั่น (*RMSEC*) และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างแบบจำลอง (*SEC*) เท่ากับ 0.964, 0.630 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.632 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ Giacomo และคณะ (2013) ใช้เนียร์อินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่น 650 ถึง 2500 นาโนเมตร ในการตรวจหาปริมาณฟูโมนิซินในข้าวโพด ตัวอย่างข้าวโพดที่นำมาศึกษามีฟูโมนิซินบี 1 และบี 2 ปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.357-11.845 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แบบจำลองที่มีค่า *r* เท่ากับ 0.995 ซึ่งสามารถใช้ทำนายปริมาณการปนเปื้อนของฟูโมนิซินในข้าวโพดได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าว พบว่า แบบจำลองที่ได้มีค่า *r* สูงถึง 0.964 และ 0.995 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้จริงได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ปริมาณฟูโมนิซินที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองมีความเข้มข้นสูงในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ปริมาณโอคราทอกซินเอที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองในงานวิจัยนี้มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่าพันเท่า (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ทำให้ได้แบบจำลองที่มีค่า *r* ต่ำ (0.814) ซึ่งไม่เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้

แสดงให้เห็นว่าเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีไม่เหมาะกับการนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบที่มีความเข้มข้นต่ำในระดับไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความไวของการวิเคราะห์ต่ำ (low sensitivity) ซึ่งเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ (Hossain และคณะ, 2014)

5.2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

จากผลการสร้างแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA (soft independent modeling of class analogy) และ PLS-DA (partial least square-discriminant analysis) พบว่า ส่วนใหญ่แบบจำลองที่สร้างจากวิธี PLS-DA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด สูงกว่าวิธี SIMCA โดยแบบจำลองในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีและไม่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องที่สุด เท่ากับ 77.94 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการสร้างแบบจำลองทั้งการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาแบบจำลองให้สามารถทำนายได้แม่นยำขึ้น รวมถึงการนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้จริง โดยเพิ่มความหลากหลายของตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ อาจเปลี่ยนวิธีที่ใช้ในการสแกนตัวอย่างเมล็ดกาแฟจากการสแกนตัวอย่างทั้งหมด (whole kernel) เป็นการสแกนตัวอย่างแบบเมล็ดเดี่ยว (single kernel) เพื่อให้สอดคล้องกับค่าองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ และเมื่อคำนึงถึงการนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้จริง การตรวจสอบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอโดยใช้เมล็ดกาแฟสารทั้งเมล็ดที่ไม่ต้องผ่านการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งทำได้สะดวกรวดเร็ว และมีความปลอดภัยสูง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากผลการทดลองทั้งหมดแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณทั้งหมดที่สร้างขึ้น ทั้งแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณความชื้น การปนเปื้อนของรา และการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ มีค่า RPD ที่ต่ำในช่วง 0.0-4.9 ซึ่งหมายความว่าไม่ควรนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการทำนาย หรือสามารถนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้แบบพอใช้ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเนียร์อินฟราเรดเป็นตัวอย่างจำพวกธัญพืช หรือแป้ง การสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนายให้มีค่า RPD มากกว่า 3.0 เป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เนื่องจากความยุ่งยากซับซ้อนของการเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) รวมถึงตำแหน่งในการจัดวางตัวอย่าง (sample presentation) บนเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Williams, 2012)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน เนื่องจากเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถวิเคราะห์องค์ประกอบได้หลายค่าพร้อมกัน ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคนี้ไปใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาราและสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่างๆ ซึ่งการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจวิเคราะห์นั้น ไม่ได้เป็นการตรวจหาราหรือปริมาณสารพิษจากราโดยตรง แต่เป็นการตรวจวิเคราะห์จากลักษณะของเส้นสเปกตรัมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของการสร้างแบบจำลองเพื่อการทำนาย (calibration model) ที่จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น อีกทั้งความจำเพาะของแบบจำลองต่อชนิดของอาหารและผลผลิตทางการเกษตร ความไวของการวิเคราะห์ต่ำ และต้องใช้ความรู้ความเชี่ยวชาญในการวิเคราะห์และจัดการข้อมูลเพื่อนำไปสร้างแบบจำลอง (Hossain และคณะ, 2014)

ถึงแม้ว่าเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจะนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณสารพิษจากราได้จริง แต่ความไวที่ต่ำที่สุดของเทคนิคนี้ก็ยังมีค่าสูงกว่าข้อกำหนดของสหภาพยุโรป (EU) ในเรื่องปริมาณสารพิษจากราที่ยอมรับได้ในอาหารแต่ละชนิด ดังนั้นการนำเทคนิคนี้ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาความไวในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากรา อีกทั้งต้องมีการลดความแปรปรวนระหว่างตัวอย่าง ลดความผิดพลาดที่อาจเกิดจากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และมีการพัฒนาโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลซึ่งนำไปสู่การสร้างแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูง สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรได้จริง (Hossain และคณะ, 2014)

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนราและโอคราทอกซินเอในกาแฟ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีให้ใช้ตรวจได้จริง ข้อดีของการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี คือ สามารถวัดค่าคุณภาพและปริมาณขององค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ได้ภายในเวลารวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบไม่ถูกทำลาย อีกทั้งสามารถลดต้นทุนในการใช้สารเคมี ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตาม ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบให้มีการกระจายตัวของข้อมูลครอบคลุมตัวอย่างจริงในธรรมชาติและมีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบสม่ำเสมอ (uniform distribution) ซึ่งจะส่งผลต่อสมรรถนะในการทำนายของแบบจำลองที่สร้างขึ้น

รายการอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. (2557). สินค้ากาแฟ. ธันวาคม 2557. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dft.go.th/Portals/0/ContentManagement/Document_Mod689/%E0%B8%AA%E0%B8%96%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%93%E0%B9%8C%E0%B8%AA%E0%B8%B4%E0%B8%99%E0%B8%84%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%9F%20%20%E0%B8%98.%E0%B8%84.57@25580116-1617363623.pdf. [6 เมษายน 2558].

กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. (2558). สินค้ากาแฟ. กุมภาพันธ์ 2558. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dft.go.th/Portals/0/ContentManagement/Document_Mod689/COFFEE%20-%20%E0%B8%81.%E0%B8%9E.%2058@25580318-0925108004.pdf. [6 เมษายน 2558].

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2552a). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟโรบัสตาตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 (มกษ. 5700-2552). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/robusta_coffee_bean.pdf. [23 พฤศจิกายน 2556].

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2552b). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟอะราบิกาตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 (มกษ. 5701-2552). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/robusta_coffee_bean.pdf. [23 พฤศจิกายน 2556].

กัลยา วานิชย์บัญชา. (2552). การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร. บริษัทธรรมสาร จำกัด: ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กาญจน์มุนี ศรีวิศาลภพ. (2546). คุณรู้เรื่องกาแฟดีแค่ไหน? กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ดอกหญ้ากรุ๊ป.

ชวลิต กอสัมพันธ์. (2555). การปลูกและผลิตกาแฟอราบิก้า ชุด จากกล้าสู่แก้ว. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่: วนิดาการพิมพ์.

ณัฐภรณ์ สุทธิวิจิตรภักดี. (2552). การประยุกต์ใช้สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในด้านอุตสาหกรรมที่มิใช่อาหาร. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธงชัย สุวรรณสิชณน์, & ปิติพร ฤทธิเรืองเดช. (2552). การวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี.

นิดดา หงษ์วิวัฒน์. (2550). ผลไม้ 111 ชนิด คุณค่าอาหารและการกิน. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แสงแดด.

นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์. (2545). หลักการพื้นฐานของเทคนิคอินฟราเรดย่านใกล้สเปกโทรสโกปี การอบรมเชิงปฏิบัติการ การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิติพร ฤทธิเรืองเดช. (2552). การประยุกต์ใช้ NIRS ในด้านอุตสาหกรรมเกษตร. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. .

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์. (2531). จากฝิ่น สู่กาแฟ.

พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. (2547). NIR Spectrometer เครื่องมือสาหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์. *LAB. TODAY, 4*, 28-32.

วารุณี ธนะแพสย์. (2552). สถานการณ์การใช้ประโยชน์เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในประเทศไทย. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วารุณี ธนะแพสย์, & ศุมาพร เกษมสำราญ. (2552). ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ NIRS. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร.

ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์, & อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. (2552). เครื่องมือและอุปกรณ์สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุมาพร เกษมสำราญ. (2545). ขั้นตอนการสร้างสมการประเมินค่าทางเคมีและการทดสอบสมการในเทคนิคสเปคโตรสโกปีย่านใกล้อินฟราเรด. การอบรมเชิงปฏิบัติการ การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุมาพร เกษมสำราญ. (2552). หลักการพื้นฐานของสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2558). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สาคัญและแนวโน้ม ปี 2558. [ออนไลน์], แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/download/document_tendency/journalofecon2558.pdf. [7 มิถุนายน 2558].

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). (2558). กาแฟในประเทศไทย. คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/coffee/history/01-02.php. [7 มิถุนายน 2558].

อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. (2552). การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมการเกษตร: ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., & Cabanes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection, 66*(3), 504-506.

Aernouts, B., Van Beers, R., Watté, R., Huybrechts, T., Jordens, J., Vermeulen, D., Van Gerven, T., Lammertyn, J., & Saeys, W. (2015). Effect of ultrasonic homogenization on the Vis/NIR bulk optical properties of milk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 126*(0), 510-519.

Alborch, L., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabanes, F. J. (2011). Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. *International Journal of Food Microbiology, 147*(1), 53-57.

Ali, W. H., Derrien, D., Alix, F., Pérollier, C., Lépine, O., Bayoudh, S., Chapuis-Hugon, F., & Pichon, V. (2010). Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *Journal of Chromatography A, 1217*(43), 6668-6673.

Almeida, A. P. d., Alaburda, J., Shundo, L., Ruvieri, V., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., & Sabino, M. (2007). Ochratoxin A in brazilian instant coffee. *Brazilian Journal of Microbiology, 38*, 300-303.

Alonso-Salces, R. M., Serra, F., Reniero, F., & HÉberger, K. (2009). Botanical and Geographical Characterization of Green Coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric Evaluation of Phenolic and Methylxanthine Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(10), 4224-4235.

Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., & Kumagai, S. (2010). Four-year surveillance for ochratoxin a and fumonisins in retail foods in Japan. *Journal of Food Protection, 73*(2), 344-352.

Araguás, C., González-Peñas, E., & López de Cerain, A. (2005). Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chemistry, 92*(3), 459-464.

Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics, 45*(1), 3-15.

Bagchi, T. B., Sharma, S., & Chattopadhyay, K. (2015). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. *Food Chemistry*(0).

Baker, P. S. (2001). *Coffee Futures: A Source Book of Some Critical Issues Confronting the Coffee Industry*: CABI Commodities.

Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology, 85*(3), 293-300.

Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M. L., Ramos, A. J., & Bragulat, M. R. (2006). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology, 111, Supplement 1*(0), S40-S45.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2002). Review: Ochratoxin A (OTA) in Wines, Musts and Grape Juices: Occurrence, Regulations and Methods of Analysis. *Food Science and Technology International, 8*(6), 325-335.

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.

Blanco, M., Alcalá, M., González, J. M., & Torras, E. (2006). Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations. *Analytica Chimica Acta, 567*(2), 262-268.

Blanco, M., Sanchez, M. J., & Alcala, M. (2010). Study of epsilon-caprolactone polymerization by NIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397*(8), 3575-3579.

Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J., & Johnson, E. M. (2008). Molecular identification of pathogenic fungi. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61 Suppl 1*, i7-12.

Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabanes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology, 71*(2-3), 139-144.

Bragulat, M. R., Martinez, E., Castella, G., & Cabanes, F. J. (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology, 126*(1-2), 43-48.

Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology, 173*(1–2), 134-158.

Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2007). *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*: CRC Press.

Cabanes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castella, G., Minguez, S., & Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology, 79*(3), 213-215.

Camps, C., & Christen, D. (2009). Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology, 42*(6), 1125-1131.

Chiotta, M. L., Ponsone, M. L., Sosa, D. M., Combina, M., & Chulze, S. N. (2013). Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiology, 36*(2), 182-190.

Chulze, S. N., Magnoli, C. E., & Dalcero, A. M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology, 111, Supplement 1*(0), S5-S9.

Clement, A., Dorais, M., & Vernon, M. (2008). Nondestructive measurement of fresh tomato lycopene content and other physicochemical characteristics using visible-NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(21), 9813-9818.

Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology, 143*(1–2), 67-70.

Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J. P., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology, 132*(1), 14-23.

Dachoupakan Sirisomboon, C., Putthang, R., & Sirisomboon, P. (2013). Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control, 33*(1), 207-214.

De Castro, R. D., & Marraccini, P. (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology, 18*, 175-199.

De Marchi, M. (2013). On-line prediction of beef quality traits using near infrared spectroscopy. *Meat Science, 94*(4), 455-460.

Delwiche, S. R., Mekwatanakarn, W., & Wang, C. Y. (2008). Soluble Solids and Simple Sugars Measurement in Intact Mango Using Near Infrared Spectroscopy. *HortTechnology, 18*(3), 410-416.

Díaz, G. A., Torres, R., Vega, M., & Latorre, B. A. (2009). Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology, 133*(1–2), 195-199.

Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology, 27*(2), 187-198.

Esteban-Díez, I., González-Sáiz, J. M., Sáenz-González, C., & Pizarro, C. (2007). Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta, 71*(1), 221-229.

Esteve Agelet, L., Ellis, D. D., Duvick, S., Goggi, A. S., Hurburgh, C. R., & Gardner, C. A. (2012). Feasibility of near infrared spectroscopy for analyzing corn kernel damage and viability of soybean and corn kernels. *Journal of Cereal Science, 55*(2), 160-165.

European Commission. (2006). Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L, 364*, 1-25.

FAOSTAT. (2009). Crops Primary Equivalent. [Online]. Source: http://faostat.fao.org/site/609/DesktopDefault.aspx?PageID=609#ancor. [2 January 2014].

FAOSTAT. (2014). Crops Primary Equivalent. [Online]. Source: http://faostat.fao.org/site/609/DesktopDefault.aspx?PageID=609#ancor. [6 April 2015].

Farah, A. (2012). *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention* (1 ed.): Wiley-Blackwell.

Farah, A., & Ferreira dos Santos, T. (2015). Chapter 1 - The Coffee Plant and Beans: An Introduction. In V. R. Preedy (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention*, (pp. 5-10). San Diego: Academic Press.

Fardim, P., Ferreira, M. M. C., & Durán, N. (2002). MULTIVARIATE CALIBRATION FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF EUCALYPT KRAFT PULP BY NIR SPECTROMETRY. *Journal of Wood Chemistry and Technology, 22*(1), 67-81.

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.

Flajs, D., Domijan, A. M., Ivić, D., Cvjetković, B., & Peraica, M. (2009). ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control, 20*(6), 590-592.

Galarce-Bustos, O., Alvarado, M., Vega, M., & Aranda, M. (2014). Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. *Food Control, 46*(0), 102-107.

Gaspardo, B., Del Zotto, S., Torelli, E., Cividino, S. R., Firrao, G., Della Riccia, G., & Stefanon, B. (2012). A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chemistry, 135*(3), 1608-1612.

Ghali, R., Hmaissia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., & Hedili, A. (2009). HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. *Food Control, 20*(8), 716-720.

Giacomo, D. R., & Stefania, D. Z. (2013). A multivariate regression model for detection of fumonisins content in maize from near infrared spectra. *Food Chemistry, 141*(4), 4289-4294.

Giovenzana, V., Beghi, R., & Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering, 142*(0), 80-86.

Gopinandhan, T. N., Kannan, G. S., Panneerselvam, P., Velmourougane, K., Raghuramulu, Y., & Jayarama, J. (2008). Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export. *Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance, 1*(1), 51-57.

Gupta, R. C. (2011). Chapter 55 - Aflatoxins, ochratoxins and citrinin. In R. C. Gupta (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology*, (pp. 753-763). San Diego: Academic Press.

Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J.-L., & Barthelmebs, L. (2012). Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control, 26*(2), 401-415.

Hernández-Hierro, J. M., García-Villanova, R. J., & González-Martín, I. (2008). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta, 622*(1–2), 189-194.

Hossain, M. Z., & Goto, T. (2014). Near- and mid-infrared spectroscopy as efficient tools for detection of fungal and mycotoxin contamination in agricultural commodities. *World Mycotoxin Journal, 7*(4), 507-515.

Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., & Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters, 122*(2), 179-188.

IARC. (1993). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer, 56*, 489.

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.

Joosten, H. M., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., & Bucheli, P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology, 65*(1-2), 39-44.

Jorgensen, K., & Jacobsen, J. S. (2002). Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. *Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance, 19*(12), 1184-1189.

Josephs, R. D., Krska, R., Grasserbauer, M., & Broekaert, J. A. (1998). Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas

chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A, 795*(2), 297-304.

Juan, C., Pena, A., Lino, C., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2008). Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. *International Journal of Food Microbiology, 127*(3), 284-289.

Juan, C., Zinedine, A., Idrissi, L., & Mañes, J. (2008). Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *International Journal of Food Microbiology, 126*(1–2), 83-85.

Lasram, S., Bellí, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., & Ghorbel, A. (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology, 114*(3), 376-379.

Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2007). Ochratoxin A-producing Aspergilli in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology, 45*(3), 301-306.

Leong, S. L., Hocking, A. D., Pitt, J. I., Kazi, B. A., Emmett, R. W., & Scott, E. S. (2006). Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology, 111, Supplement 1*(0), S10-S17.

Leoni, L. A., Soares, L. M., & Oliveira, P. L. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Additives and Contaminants, 17*(10), 867-870.

Levi, C. P., Trenk, H. L., & Mohr, H. K. (1974). Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal - Association of Official Analytical Chemists, 57*(4), 866-870.

Liu, Z.-Y., Wu, H.-F., & Huang, J.-F. (2010). Application of neural networks to discriminate fungal infection levels in rice panicles using hyperspectral reflectance and principal components analysis. *Computers and Electronics in Agriculture, 72*(2), 99-106.

Lock, E. A., & Hard, G. C. (2004). Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse: review of the NCI/NTP database and categorization of renal carcinogens based on mechanistic information. *Critical Reviews in Toxicology, 34*(3), 211-299.

Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., & Perrone, G. (2003). Epidemiology of Toxigenic Fungi and their Associated Mycotoxins for Some Mediterranean Crops. *European Journal of Plant Pathology, 109*(7), 645-667.

Lombaert, G. A., Pellaers, P., Chettiar, M., Lavalee, D., Scott, P. M., & Lau, B. P. (2002). Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants, 19*(9), 869-877.

Lund, F., & Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology, 95*(5), 1117-1123.

Mally, A., Hard, G. C., & Dekant, W. (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology, 45*(11), 2254-2260.

Martelo-Vidal, M. J., & Vázquez, M. (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry, 158*(0), 28-34.

Mat Nawi, N., Chen, G., Jensen, T., & Mehdizadeh, S. A. (2013). Prediction and classification of sugar content of sugarcane based on skin scanning using visible and shortwave near infrared. *Biosystems Engineering, 115*(2), 154-161.

Mazivila, S. J., de Santana, F. B., Mitsutake, H., Gontijo, L. C., Santos, D. Q., & Neto, W. B. (2015). Discrimination of the type of biodiesel/diesel blend (B5) using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Fuel, 142*(0), 222-226.

Meca, G., Blaiotta, G., & Ritieni, A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control, 21*(4), 579-583.

Meher, L. C., Vidya Sagar, D., & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 10*(3), 248-268.

Morello, L. G., Sartori, D., de Oliveira Martinez, A. L., Vieira, M. L. C., Taniwaki, M. H., & Fungaro, M. H. P. (2007). Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β-tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology, 119*(3), 270-276.

Moser, A. C., & Hage, D. S. (2010). Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis, 2*(4), 769-790.

Nawaz, S., Coker, R. D., & Haswell, S. J. (1992). Development and evaluation of analytical methodology for the determination of aflatoxins in palm kernels. *The Analyst, 117*(1), 67-74.

Nguyen, M. T., Tozlovanu, M., Tran, T. L., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry, 105*(1), 42-47.

Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology, 119*(1-2), 38-46.

Nilsen, H., & Esaiassen, M. (2005). Predicting sensory score of cod (Gadus morhua) from visible spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology, 38*(1), 95-99.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology, 128*(2), 197-202.

Odhav, B., Adam, J. K., & Bhoola, K. D. (2008). Modulating effects of fumonisin B1 and ochratoxin A on leukocytes and messenger cytokines of the human immune system. *International Immunopharmacology, 8*(6), 799-809.

Odhav, B., & Naicker, V. (2002). Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Additives and Contaminants, 19*(1), 55-61.

Olsson, J., Borjesson, T., Lundstedt, T., & Schnurer, J. (2002). Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology, 72*(3), 203-214.

Onji, Y., Aoki, Y., Tani, N., Umebayashi, K., Kitada, Y., & Dohi, Y. (1998). Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A, 815*(1), 59-65.

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

Otteneder, H., & Majerus, P. (2001). Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Additives and Contaminants, 18*(5), 431-435.

Ozbey, F., & Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control, 28*(2), 354-361.

Páscoa, R. N. M. J., Sarraguça, M. C., Magalhães, L. M., Santos, J. R., Rangel, A. O. S. S., & Lopes, J. A. (2015). Chapter 103 - Use of Near-Infrared Spectroscopy for Coffee Beans Quality Assessment. In V. R. Preedy (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention*, (pp. 933-942). San Diego: Academic Press.

Pasquini, C. (2003). Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society, 14*, 198-219.

Paterson, R., & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International, 43*(7), 1902-1914.

Paterson, R., & Lima, N. (2011). Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International, 44*(9), 2555-2566.

Paterson, R. R. M., Lima, N., & Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International, 61*(0), 1-15.

Paz, P., Sánchez, M.-T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.-E., & Garrido-Varo, A. (2009). Evaluating NIR instruments for quantitative and qualitative assessment of intact apple quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 89*(5), 781-790.

Pestieau, A., Krier, F., Thoorens, G., Dupont, A., Chavez, P.-F., Ziemons, E., Hubert, P., & Evrard, B. (2014). Towards a real time release approach for manufacturing tablets using NIR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 98*(0), 60-67.

Pholpho, T., Pathaveerat, S., & Sirisomboon, P. (2011). Classification of longan fruit bruising using visible spectroscopy. *Journal of Food Engineering, 104*(1), 169-172.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3 ed.): Springer US.

Pizarro, C., Esteban-Díez, I., & González-Sáiz, J. M. (2007). Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta, 585*(2), 266-276.

Pohland, A. E., Nesheim, S., & Friedman, L. (1992). Ochratoxin A : A Review. *International Union of Pure and Applied Chemistry, 64*, 1029-1046.

Prado, G., OLIVEIRA, M. S. d., ABRANTES, F. M., SANTOS, L. G. d., VELOSO, T., & BARROSO, R. E. d. S. (2000). Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. *Food Science and Technology (Campinas), 20*, 192-196.

Reh, C., Bhat, S. N., & Berrut, S. (2004). Determination of water content in powdered milk. *Food Chemistry, 86*(3), 457-464.

Ribeiro, J. S., Ferreira, M. M. C., & Salva, T. J. G. (2011). Chemometric models for the quantitative descriptive sensory analysis of Arabica coffee beverages using near infrared spectroscopy. *Talanta, 83*(5), 1352-1358.

Ritthiruangdej, P., Ritthiron, R., Shinzawa, H., & Ozaki, Y. (2011). Non-destructive and rapid analysis of chemical compositions in Thai steamed pork sausages by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry, 129*(2), 684-692.

Rosa, C. A., Magnoli, C. E., Fraga, M. E., Dalcero, A. M., & Santana, D. M. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants, 21*(4), 358-364.

Rosa, S. S., Barata, P. A., Martins, J. M., & Menezes, J. C. (2008). Development and validation of a method for active drug identification and content determination of ranitidine in pharmaceutical products using near-infrared reflectance spectroscopy: A parametric release approach. *Talanta, 75*(3), 725-733.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., de Boer, E., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*: ASM Press.

Santos, A., Cremades, R., Rodriguez, J. C., Garcia-Pachon, E., Ruiz, M., & Royo, G. (2010). Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 118*(1), 60-65.

Santos, J. R., Sarraguça, M. C., Rangel, A. O. S. S., & Lopes, J. A. (2012). Evaluation of green coffee beans quality using near infrared spectroscopy: A quantitative approach. *Food Chemistry, 135*(3), 1828-1835.

Sasic, S., & Ozaki, Y. (2001). Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. *Analytical Chemistry, 73*(1), 64-71.

Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sanchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology, 27*(1), 82-92.

Schmutzler, M., Beganovic, A., Böhler, G., & Huck, C. W. (2015). Methods for detection of pork adulteration in veal product based on FT-NIR spectroscopy for laboratory, industrial and on-site analysis. *Food Control, 57*(0), 258-267.

SCOOP. (2002). Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states.

Shahin, M. A., & Symons, S. J. (2011). Detection of *Fusarium* damaged kernels in Canada Western Red Spring wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging and principal component analysis. *Computers and Electronics in Agriculture, 75*(1), 107-112.

Siegel, D., & Babuscio, T. (2011). Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control, 22*(8), 1145-1153.

Spadaro, D., Ciavorella, A., Frati, S., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2007). Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. *Food Control, 18*(9), 1098-1102.

Stefanovic, V., Toncheva, D., Atanasova, S., & Polenakovic, M. (2006). Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *American Journal of Nephrology, 26*(1), 1-11.

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology, 82*(2), 173-179.

Taniwaki, M. H., Teixeira, A. A., Teixeira, A. R. R., Copetti, M. V., & Iamanaka, B. T. (2014). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International, 61*(0), 161-166.

Techarat, S., & Cheewanun, D. (2012). Growth and Ochratoxin A production of black aspergilli isolated from Thai wine grapes. *Asian Journal of Food and Agro-Industry, 5*(03), 172-182.

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.

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta, 632*(2), 168-180.

Van Der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature, 205*(4976), 1112-1113.

Vanesa, D., & Ana, P. (2013). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control, 30*(2), 675-678.

Varga, J., Frisvad, J. C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., & Samson, R. A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology, 69*(0), 1-17.

Varga, J., & Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology, 17*(2), 72-81.

Vecchio, A., Mineo, V., & Planeta, D. (2012). Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control, 28*(2), 220-223.

VICAM. (2004). OchraTest HPLC procedure for green coffee (0-50 ppb). *OchraTest and OchraTest WB Instruction Manual*.

Visagie, C. M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology, 78*(0), 1-61.

Visconti, A., Pascale, M., & Centonze, G. (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A, 864*(1), 89-101.

Wang, Y., Chai, T., Lu, G., Quan, C., Duan, H., Yao, M., Zucker, B. A., & Schlenker, G. (2008). Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environmental Research, 107*(2), 139-144.

Wei, F., & Tanokura, M. (2015). Chapter 10 - Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting. In V. R. Preedy (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention*, (pp. 83-91). San Diego: Academic Press.

Williams, P. (2007). *Near-infrared Technology-Getting the Best Out of Light*: Nanaimo B.C., Canada PDK project Inc.

Williams, P. (2012). Bias correction. In P. Sirisomboon (Ed.)).

Williams, P. J., Geladi, P., Britz, T. J., & Manley, M. (2012). Investigation of fungal development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Journal of Cereal Science, 55*(3), 272-278.

Woo, C. S., Partanen, H., Myllynen, P., Vahakangas, K., & El-Nezami, H. (2012). Fate of the teratogenic and carcinogenic ochratoxin A in human perfused placenta. *Toxicology Letters, 208*(1), 92-99.

Xue, J., Yang, Z., Han, L., Liu, Y., Liu, Y., & Zhou, C. (2015). On-line measurement of proximates and lignocellulose components of corn stover using NIRS. *Applied Energy, 137*(0), 18-25.

Zeaiter, M., Roger, J. M., & Bellon-Maurel, V. (2006). Dynamic orthogonal projection. A new method to maintain the on-line robustness of multivariate calibrations. Application to NIR-based monitoring of wine fermentations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 80*(2), 227-235.

Zhang, X., Li, W., Yin, B., Chen, W., Kelly, D. P., Wang, X., Zheng, K., & Du, Y. (2013). Improvement of near infrared spectroscopic (NIRS) analysis of caffeine in roasted Arabica coffee by variable selection method of stability competitive

adaptive reweighted sampling (SCARS). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 114*(0), 350-356.

Zuorro, A., & Lavecchia, R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production, 34*(0), 49-56.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar)

อาหารสำเร็จรูป DG18	31.6	กรัม
กลีเซอรอล	175	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสาเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เตรียมกลีเซอรอล 175 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกลีเซอรอล 85 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน

2. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารสำเร็จรูป PDA	39	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายที่ใช้เตรียมสารแขวนลอยสปอร์

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

2. สารละลายสำหรับการสกัดโอคราทอกซินเอจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับกรดฟอร์มิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. เฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ

เตรียมอะซีโตไนไตรล์ปริมาตร 495 มิลลิลิตร น้ำปลอดประจุปริมาตร 495 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมรวมกันแล้วนำไปกรองด้วยชุดเครื่องกรองผ่านกระดาษกรอง ไล่แก๊สในอ่างอัลตร้าโซนิก เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาทีก่อนการนำไปวิเคราะห์หาโอคราทอกซินเอด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4. สารละลายสำหรับเตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

เตรียมน้ำปลอดประจุปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอลปริมาตร 90 มิลลิลิตร

5. สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุที่ผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 1 : 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารมาตรฐาน โอคราทอกซินเอตั้งต้น 1 มิลลิกรัม (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน โอคราทอกซินเอความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยดูดสารมาตรฐาน โอคราทอกซินเอที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุที่ผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 1 : 3 จนครบปริมาตร

6. สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ 8 ความเข้มข้น สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

เตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 และ 2500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่มีน้ำปลอดประจุผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 3 : 7 จนครบปริมาตร

7. สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมไบคาร์บอเนต 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

8. สารละลายสำหรับการสกัดโอคราทอกซินเอจากเมล็ดกาแฟสาร

เตรียมเมทานอลปริมาตร 700 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

9. สารละลาย phosphate buffered saline (PBS)

โซเดียมคลอไรด์	8.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดแล้วละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสให้ได้ 7.0

10. สารละลายสำหรับการเจือจางสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเมล็ดกาแฟสาร และล้างอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์

เตรียมสารละลาย PBS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมกับ Tween 20 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดกาแฟสาร

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

โดย	A	คือ	น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา
	B	คือ	น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดกาแฟก่อนอบ
	C	คือ	น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดกาแฟหลังอบ

2. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา

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

3. การคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอที่ราผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

$$\text{ปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{A}{B \times 2.5 \times C \times (1/D)}$$

โดย	A	คือ	พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ
	B	คือ	สัมประสิทธิ์หน้า x ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ
	C	คือ	การเติมเฟสเคลื่อนที่ลงในโอคราทอกซินเอที่สกัดได้ (เท่า)
	D	คือ	น้ำหนักวุ้น (กรัม)

4. การคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ

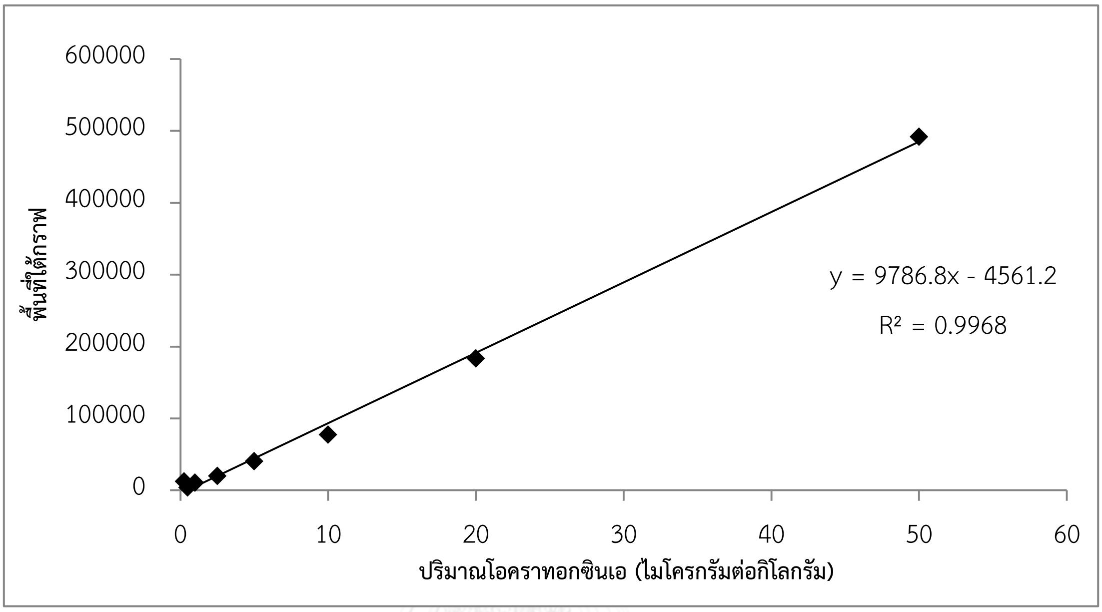
$$\text{ปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{A + B}{C}$$

โดย	A	คือ	พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ
	B	คือ	จุดตัดแกน y ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ
	C	คือ	สัมประสิทธิ์หน้า x ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

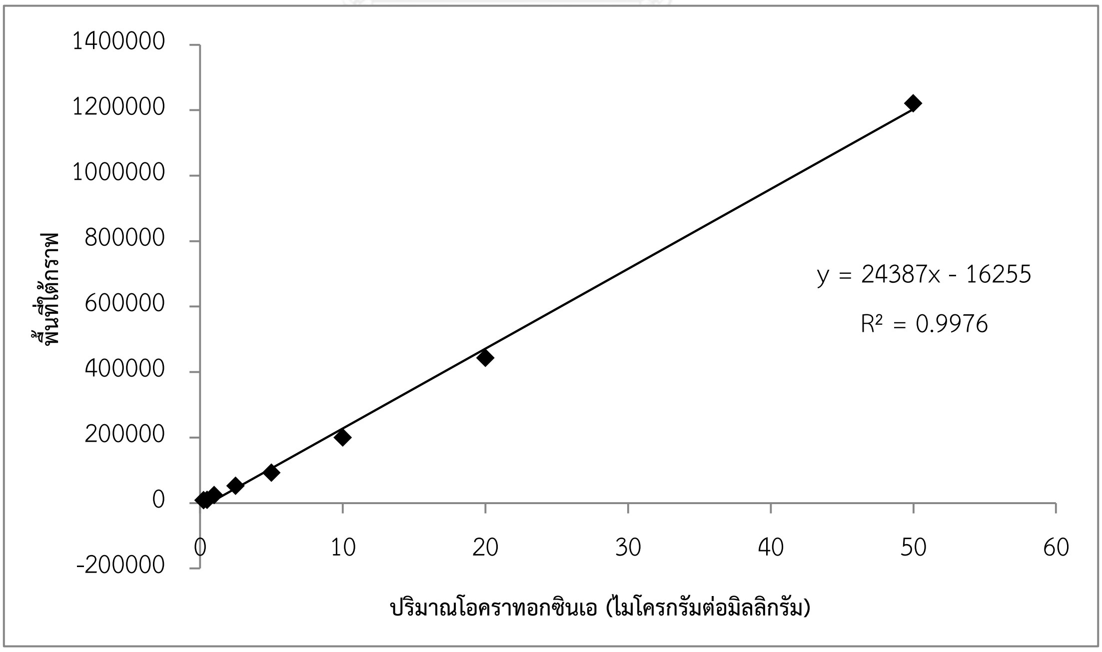
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอและโครมาโทแกรม



ภาพที่ ง.1 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอสำหรับการคำนวณหาปริมาณโอคราทอกซินเอที่ราผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ ง.2 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอสำหรับการคำนวณหาปริมาณโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล: นางสาวพัณณ์ชิตา ธราดลศิริฐิติกุล

วัน เดือน ปีเกิด: 5 มิถุนายน พ.ศ. 2533

ประวัติการศึกษา:

ปีการศึกษา 2554 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555 เข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนการศึกษา:

ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ที่อยู่ปัจจุบัน: 222 ม.วรารมย์81 ซ.48 ถ.บางบอน4 ซ.7 บางบอน กทม. 10150

ผลงานเผยแพร่:

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ “TSB 2014: The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference” ระหว่างวันที่ 26-29 พฤศจิกายน 2557 ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย ในหัวข้อเรื่อง "Application of Near Infrared Spectroscopy to detect fungal contamination in green coffee beans" (Oral presentation)

ผลงานตีพิมพ์:

Taradolsirithitikul, P., Sirisomboon, P. and Dachoupakan Sirisomboon, C. (2015). Qualitative and Quantitative Analysis of Ochratoxin A Contamination in Green Coffee Beans using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy. Food Chemistry. (Impact Factor (2014) = 3.391) (Submitted on 24th June 2015, Ref. No. FOODCHEM-D-15-02842)