รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มมูลค่าผลผลิต

โครงการวิจัย : การประเมินคุณภาพผลผลิตและผลิตภัณฑ์โดยใช้เทคนิคการไม่ทำลายตัวอย่าง

กิจกรรมที่ 2 : การประเมินคุณภาพผลผลิตเกษตรโดยเทคนิค NIR Spectroscopy

ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การวัดปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟโดยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Evaluation of Ochratoxin A in Green Coffee by Near Infrared Spectroscopy

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : จารุรัตน์ พุ่มประเสริฐ

หน่วยงานต้นสังกัด : กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน : จารุวรรณ บางแวก

หน่วยงานต้นสังกัด : กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Abstract

Method of Ochratoxin A (OTA) determination in green coffee bean was modified by near infrared spectroscopy (NIR) technique. The wave length region 400-2500 nm was used. One hundred samples of green coffee bean were used to create the effective model of OTA evaluation. Equation of OTA determination in green coffee bean had high regression correlation (R); 0.94 and low standard error of prediction (SEP); 3.43 which standard deviation (SD) was lower than the HPLC method; 8.27 and also low standard error of calibration (SEC); 2.88. After that, 20 samples of green coffee bean were analyzed OTA by NIR technique compared with the laboratory HPLC method and the results of two methods were quite similar in OTA content. When the results of two methods were plotted, it had high regression correlation (R); 0.97 and showed that both methods were related on the same trend of OTA content. The efficiency of the OTA-NIR technique model was tested by spiking method and it showed that the model could detect 99.39% of OTA at concentration 4 ppb, 75.79% at concentration 10 ppb, 85.15% at concentration of OTA 20 ppb and 79.92% at concentration of OTA 30 ppb. When the results of both methods were compared by T-TEST, it was not significantly OTA content.

Keywords : Green coffee Ochratoxin A Near Infrared Spectroscopy

บทคัดย่อ

การตรวจสอบปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟดิบ โดยใช้สมการที่สร้างขึ้นด้วยวิธี Near Infrared Spectroscopy(NIR) พบว่า สมการจากเมล็ดกาแฟดิบที่ไม่ต้องผ่านการบดที่ช่วงคลื่น 400-2500 nm จำนวน 100 ตัวอย่าง มีค่าความสัมพันธ์(R) 0.94 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) 3.43 ซึ่งต่ำกว่าค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 8.27 และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard Error of Calibration, SEC) 2.88 เมื่อนำสมการที่ได้ปรับปรุงแล้วไปทำนายปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบจำนวน 20 ตัวอย่าง เทียบกับผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ทั้ง 2 วิธีมีปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ใกล้เคียงกันเมื่อนำผลการประเมินด้วย NIR ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm และผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ของปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ระหว่าง 2 วิธี ได้ค่าความสัมพันธ์(R) 0.97 ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันสามารถใช้แทนกันได้ค่อนข้างดี และสามารถนำไปใช้ในการประเมินปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีประเมินปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี NIR โดยการเติมสารพิษมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไป (spike sample) และนำไปตรวจสอบด้วย NIR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสมการ พบว่าวิธี NIR สามารถตรวจสารพิษได้ 99.39% ที่ระดับความเข้มข้น 4 ppb 75.79% ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb 85.15% ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppb และ 79.92% ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppb เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลโดย T-TEST ระหว่างวิธี NIR และผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

คำสำคัญ: เมล็ดกาแฟดิบ สารพิษโอคราทอกซิน เอ เนียร์อินฟลาเรดสเปกโตรสโคปี

คำนำ

กาแฟเป็นพืชที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจและปลูกเป็นการค้าอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันมีอยู่ 2 ชนิด คือ กาแฟอาราบิกา(*Coffea arabica*. L) มีผลผลิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกาแฟที่ผลิตทั่วโลก ให้คุณภาพเมล็ดกาแฟที่ดี รสชาติดี มีกลิ่นหอม และกาแฟโรบัสต้า(*Coffea canepora* Pierre ex Froehnr) พบปลูกมากในแถบเอเชีย มีคุณภาพต่ำกว่ากาแฟอาราบิกาทั้งกลิ่นและรสชาติ แต่มีเนื้อกาแฟและอัตราส่วนคาเฟอีนสูงกว่า สำหรับการปลูกกาแฟในประเทศไทย พบว่ากาแฟพันธุ์อาราบิกาจะปลูกมากทางภาคเหนือและแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และอุตรดิตถ์ มีปริมาณผลผลิตไม่มากนักคิดเป็นร้อยละ 5 ของปริมาณผลผลิตกาแฟทั้งประเทศ และผลผลิตส่วนมากใช้บริโภคภายในประเทศ ส่วนกาแฟโรบัสต้าปลูกมากทางภาคใต้และแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญ ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และนครศรีธรรมราช ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 95 ของปริมาณผลผลิตกาแฟทั้งประเทศ(สถาบันวิจัยพืชสวน ,2553) ปัจจุบันกาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมอย่างมาก และในกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าเมล็ดกาแฟมีการปนเปื้อนของเชื้อราและมีการสร้างสารพิษโอคราทอกซิน เอ ขึ้น การนำเมล็ดกาแฟไปคั่วไม่สามารถทำลายสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟได้และสารพิษจะปนออกมาในน้ำกาแฟที่ดื่ม สารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟเป็นสารทุติยภูมิที่ถูกสร้างขึ้นมาจากเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* และ *Penicillium verucosum* ราชนิดนี้สามารถเจริญและสร้างสารพิษได้บนเมล็ดกาแฟ เมล็ดธัญพืช ผลไม้อบแห้งและในผลิตภัณฑ์อาหาร สารพิษโอคราทอกซิน เอ เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง เมื่อคนและสัตว์ได้รับอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีสารพิษนี้เข้าไปจะก่อให้เกิดความเป็นพิษและอันตรายอย่างมากต่อไต และระบบประสาท (Palma.*at al*, 2007)

กาแฟจัดเป็นเมล็ดพืชชนิดหนึ่งที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารพิษสารโอคราทอกซิน เอ ซึ่งเป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* มีความเป็นพิษทำอันตรายต่อระบบประสาท ตับ และไต หน่วยงานต่างๆ เช่น FAO , WTO , CODEX ได้ให้ความสำคัญอย่างมาก ซึ่งองค์การการค้าโลก (WTO) ได้กำหนดค่าปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่ยอมให้มีได้ในเมล็ดกาแฟและผลิตภัณฑ์ไว้ที่ 5 และ 3 μg/kg สารโอคราทอกซิน เอ เกิดขึ้นได้ในระหว่างการผลิต โดยเฉพาะในสภาพอากาศที่มีความชื้น ตั้งแต่ระยะเก็บเกี่ยวผลกาแฟ ระยะการตากแห้งผลกาแฟ และระยะเก็บรักษาเมล็ดกาแฟ เมื่อนำเมล็ดกาแฟไปผ่านการแปรรูปแล้ว สารพิษเหล่านี้ก็อาจยังปนเปื้อนอยู่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2553)

ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่ยอมรับให้บริโภคได้ไม่ควรเกิน 0.005 μg/kg ของน้ำหนักตัวต่อวัน (Zimmerli and Dick, 1995) เมื่อทำการตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ ในกาแฟคั่วที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานครจำนวน 17 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนจำนวน 1 ตัวอย่าง มีค่าปริมาณ 3.2 μg/kg(สิทธิพร, 2549) และเมื่อทำการรวบรวมและเก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟอาราบิกาจำนวน 32 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ และ เมล็ดกาแฟโรบัสต้า จำนวน 32 ตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร มาวัดปริมาณการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ พบว่าในกาแฟอาราบิกาและกาแฟโรบัสต้ามีการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในระดับ 0.6 – 5.5 μg/kg และ 1 – 27 μg/kg ตามลำดับ(Noonim, 2008) โดย Hierro *et al*.(2008) พบว่าสามารถใช้ Near Infrared Spectroscopy ในการวัดปริมาณสาร Aflatoxin B_1, Ochratoxin A และ Total Aflatoxins ในผงพริกสีแดงเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงทางเคมีได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ ทั้งยังใช้ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าด้วย

เนื่องจากสารพิษโอคราทอกซิน เอ เป็นสารพิษที่มีความรุนแรงมากแม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดอันตรายได้ การกำหนดค่าของปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ จึงกำหนดให้มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (µg/kg) และตามข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรที่เกี่ยวกับสารปนเปื้อน ให้ตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟ และพบได้ไม่เกิน 20 µg/kg (กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร, 2551)

การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืชและผลิตภัณฑ์สามารถทำได้ด้วยวิธีการทางเคมีโดยใช้ High-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD) แม้ว่า HPLC ซึ่งจะให้ limit of detection (LOD) ต่ำ แต่ต้นทุนการวิเคราะห์สูง และต้องใช้เวลาในการสกัดสารพิษค่อนข้างนานใช้เครื่องมือและอุปกรณ์มาก การใช้หลักการของ รังสี Near Infrared Spectroscopy ที่มีช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 800 – 2500 นาโนเมตร ที่มีต้นทุนที่น้อยกว่า วิธีการสะดวก และใช้ระยะเวลาสั้น (ศุมาพร,2552) การทำงานของเครื่อง NIR spectrometer อาศัยการดูดกลืนพลังงานแสงในแต่ละช่วงความยาวคลื่นของสารแต่ละชนิดมีไม่เท่ากัน และนำค่าความเข้มแสงที่ได้ในแต่ละความยาวคลื่นมาเขียนกราฟโดยใช้แกนนอนเป็นค่าความยาวคลื่น แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง จะได้กราฟการดูดกลืนแสงของตัวอย่างนั้นๆ (ศิวลักษณ์, 2552) และนำข้อมูลไปวิเคราะห์กับค่าที่ได้ในห้องปฏิบัติการ สามารถสร้างสมการทำนายและนำสมการที่ได้มาทำนายค่าของวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์ เป็นวิธีการที่สะดวกและมีความแม่นยำสูง ไม่มีการทำลายตัวอย่าง และค่าใช้จ่ายต่ำ

ดังนั้นการศึกษาวิธีการวัดปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy จึงเป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้เปรียบเทียบกับวิธีในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นวิธีการเดิม อีกทั้งจะทำให้ได้เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปที่เหมาะสม รวมทั้งลดการปนเปื้อนสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดกาแฟดิบ
2. สารพิษโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน
3. เครื่อง Near Infrared Spectroscopy
4. เครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series
5. Immunoaffinity Column

วิธีการ

ปีงบประมาณ 2556

1. เตรียมตัวอย่างเมล็ดกาแฟที่สะอาดไม่มีการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ
2. นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟมาทำให้มีการปนเปื้อนปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในระดับความเข้มข้นที่ต่างๆ กัน (spiked sample) โดยการเติมสารพิษโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm และนำตัวอย่างนั้นไปบดละเอียดและวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง
4. นำตัวอย่างดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีของ AOAC 2004.10 และ AOAC 976.38

   4.1 ชั่งตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบน้ำหนัก 25 กรัม นำไปบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น

   4.2 เติมสารละลาย Acetonitrile-water (6:4) 100 ml เขย่าที่ 300 รอบต่อนาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว

   4.3 ปิเปตส่วนใสที่กรองได้ปริมาตร 4 ml ใส่ใน Volumetric flask เติมสารละลาย Phosephate buffer saline ปริมาตร 44 ml เพื่อปรับ pH และเขย่าให้เข้ากัน

   4.4 นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน Immunoaffinity Column อัตราการไหล 1 – 2 หยดต่อวินาที ล้าง Column ด้วยน้ำปราศจากอิออน 10 ml อัตราการไหล 1 – 2 หยดต่อวินาที ปล่อยอากาศผ่าน 30 วินาที

   4.5 ชะ Ochratoxin A ออกจาก Column ด้วย Methanol ปริมาตร 1 ml จำนวน 4 ครั้ง

   4.6 ระเหยสารละลายที่ได้จนแห้งด้วยไนโตรเจน

   4.7 ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase 1 ml (Methanol – Acetonitrile – Water – Acitic / 35 : 35 : 29 : 1)

   4.8 ฉีดสารละลายที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series

   - Column : Symmetry C 18
   - Mobile phase : Methanol – Acetonitrile – Water – Acitic (35 : 35 : 29 : 1)
   - Flow rate : 1 ml/min
   - Run time : 8 min
   - Detector : Fluorescence
   - Injection : 20 µl
   - Standard curve of Ochratoxin A : 2, 5, 10, 20, 30 และ 40 ng/ml

5. นำ spectra ต้นแบบ (original spectra) ที่ได้หรืออาจทำการแปลงผลข้อมูลเพื่อลดผลกระทบ จากปัจจัยต่างๆ noise หรือ errors จากการวัดที่ปรากฏใน spectrum ไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) จากโปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler ของบริษัท Camo Oslo ของประเทศนอร์เวย์
6. ทำการคัดเลือกสมการโดยพิจารณาค่า Standard Error of Calibration (SEC) และค่า Correlation Coefficient (R)
7. นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาสร้างสมการและวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาสมการที่ดีที่สุด ตรวจสอบความแม่นยำของสมการที่สร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบค่า Standard Error of Prediction (SEP) และ Bias

ปีงบประมาณ 2557

1. ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมการที่ได้จาก Near Infrared Spectroscopy กับวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟจากแหล่งปลูกกาแฟที่สำคัญๆ ทั้งทางภาคเหนือและภาคใต้ที่มีการปนเปื้อนของสารพิษโอคราทอกซิน เอ ตามธรรมชาติ มาเป็นตัวอย่างในการทดสอบประสิทธิภาพของสมการ และทำการปรับปรุงสมการ
2. ทดสอบความแม่นยำของสมการโดยใช้สมการทำนายปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ เทียบกับผลวิเคราะห์ที่ได้โดยวิธีทางเคมี
3. นำสมการที่ได้ไปเผยแพร่เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการวัดปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟต่อไป

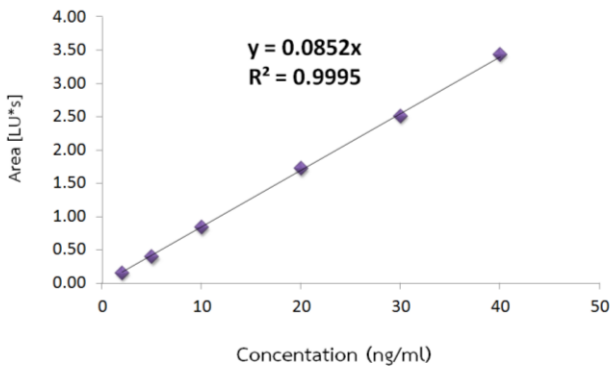
เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง : เริ่มต้น ตุลาคม 2555 – กันยายน 2557

สถานที่ทำการทดลอง : กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ปี 2556 ทำการทดสอบวิธีการมาตรฐานในห้องปฏิบัติการสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series ตามวิธีของ AOAC 2004.10 และ AOAC 976.38 โดยใช้สารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น คือ 2 5 10 20 30 และ 40 ng/ml เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ (Area) ได้ค่า R^2 = 0.999 แสดงว่าค่าความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ(Area) มีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้น อยู่ในช่วง 2 – 40 ng/ml(ภาพที่1)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ(Area) ของสารมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ

เปรียบเทียบวิธีการมาตรฐานในห้องปฏิบัติการสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series ตามวิธีของ AOAC 2004.10 และ AOAC 976.38 กับวิธีของบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง(ประเทศไทย)จำกัด เพื่อยืนยันผลการทดสอบดังกล่าวพบว่ามีค่าผลการทดสอบใกล้เคียงกัน(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ

ตัวอย่างที่	ผลการทดสอบโอคราทอกซิน เอ (ppb)	
	วิธีของ AOAC 2004.10 และ AOAC 976.38	วิธีของบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง(ประเทศไทย)จำกัด
1	Not Detected	Not Detected
2	2.02	<2.00
3	8.50	9.10

ทดสอบนำเมล็ดกาแฟดิบและเมล็ดกาแฟที่ทำให้มีการปนเปื้อนปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ (spiked sample) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm มาเปรียบเทียบกัน พบว่าเส้นสเปกตรัมมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน(ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 กราฟแสดงสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟดิบและเมล็ดกาแฟที่ทำให้มีการปนเปื้อนปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ (spiked sample) ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series ตามวิธีของ AOAC 2004.10 และ AOAC 976.38 และเส้นสเปกตรัมของเมล็ดกาแฟดิบและเมล็ดกาแฟที่ทำให้มีการปนเปื้อนปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ (spiked sample) ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm ที่ได้แสดงให้เห็นว่าเครื่อง Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm มีแนวโน้มว่าสามารถประเมินปริมาณการปนเปื้อนปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ได้ จึงทำการนำตัวอย่างเมล็ดกาแฟมาทำให้มีการปนเปื้อนปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในระดับความเข้มข้นที่ต่างๆกัน(spiked sample) โดยการเติมสารพิษโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm และนำตัวอย่างนั้นไปบดละเอียดและวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง นำตัวอย่างดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีของ AOAC 2004.10 และ AOAC 976.38 นำ spectra ต้นแบบ (original spectra) ที่ได้ไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) จากโปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler ของบริษัท Camo Oslo ของประเทศนอร์เวย์ ได้สมการของเมล็ดกาแฟดิบจำนวน 53 ตัวอย่าง ทดสอบสร้างสมการที่ความยาวคลื่นต่างๆ กันเพื่อคัดเลือกช่วงคลื่นที่ดีที่สุดในการสร้างสมการ พบว่าที่ช่วงคลื่น 400-2500 nm มีค่าสมการดีที่สุด (ตารางที่ 2) โดยมีค่าความสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.91 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) คือ 5.68 ซึ่งต่ำกว่าค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) คือ 8.82 และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard Error of Calibration, SEC) คือ 3.74

และ สมการของเมล็ดกาแฟที่ผ่านการบดมีค่าความสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.91 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) คือ 4.72 ซึ่งต่ำกว่าค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) คือ 8.63 และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard Error of Calibration, SEC) คือ 3.65 ทดสอบทำนายตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบโดยสมการที่ได้และนำผลไปเปรียบเทียบกับวิธีในห้องปฏิบัติการ พบว่า วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy ค่าที่ได้ยังมีความแม่นยำไม่มากพอที่จะนำมาใช้ประเมินได้ ต้องทำการปรับปรุงสมการ โดยสมการ ของเมล็ดกาแฟดิบและสมการของเมล็ดกาแฟที่ผ่านการบดพบว่ามีค่าความสัมพันธ์ (R) ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard Error of Calibration, SEC) ใกล้เคียงกัน จึงเลือกปรับปรุงสมการจากเมล็ดกาแฟดิบที่ไม่ต้องผ่านการบด

ตารางที่ 2 สมการของเมล็ดกาแฟดิบจำนวน 53 ตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่นต่างๆ

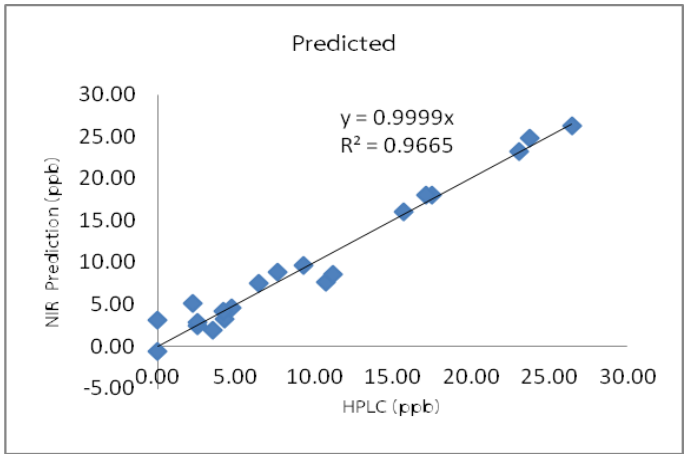
Item	Wavelength (nm)	R	SEP	SD
Ochratoxin A	400-2500	0.91	5.681	8.817
Ochratoxin A	400-2000	0.90	5.738	8.817
Ochratoxin A	800-2500	0.90	5.516	8.817
Ochratoxin A	800-1500	0.87	5.023	8.817
Ochratoxin A	500-2500	0.77	6.072	8.817

ปี 2557 ปรับปรุงสมการจากเมล็ดกาแฟดิบที่ไม่ต้องผ่านการบดที่ช่วงคลื่น 400-2500 nm จากเดิม 53 ตัวอย่างเป็น 100 ตัวอย่าง พบว่า สมการมีค่าความสัมพันธ์(R) ดีขึ้นจาก 0.91 เป็น 0.94 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of Prediction, SEP) 3.43 ซึ่งต่ำกว่าค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series 8.27 และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard Error of Calibration, SEC) 2.88 เมื่อนำสมการที่ได้ปรับปรุงแล้วไปทำนายปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบจำนวน 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) พบว่าเมื่อนำผลการประเมินด้วย Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 nm และผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC Agilent 1260 Infinity Series มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ของปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ระหว่าง 2 วิธี ได้ค่าความสัมพันธ์ (R) 0.97 ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันสามารถใช้แทนกันได้ค่อนข้าง

ดี สามารถนำไปใช้ในการประเมินปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3) สอดคล้องกับ Hierro *et al*.(2008) พบว่าสามารถใช้ Near Infrared Spectroscopy ในการวัดปริมาณสาร Aflatoxin B_1, Ochratoxin A และ Total Aflatoxins ในผงพริกสีแดงเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงทางเคมีได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ ทั้งยังใช้ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าด้วย

ตารางที่ 3 การทำวาลิเดชั่น (Validation) ของข้อมูลปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NIR (predictive values: Y) และวิธีการทางเคมี HPLC (actual Values: X)

ลำดับที่	วิธีหาค่าปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ		d	d^2
	Reference Method	NIR Prediction	ผลต่าง (x-y)	ผลต่าง $(x-y)^2$
	X	Y		
1	4.70	4.65	0.04	0.00
2	4.26	3.30	0.96	0.93
3	6.43	7.53	-1.10	1.21
4	10.75	7.63	3.12	9.75
5	11.23	8.54	2.69	7.23
6	0.00	3.11	-3.11	9.65
7	2.23	5.13	-2.90	8.39
8	2.57	2.49	0.09	0.01
9	2.56	2.81	-0.24	0.06
10	7.68	8.79	-1.11	1.24
11	9.35	9.63	-0.28	0.08
12	17.52	18.05	-0.53	0.28
13	15.73	16.01	-0.28	0.08
14	17.14	18.01	-0.87	0.77
15	23.79	24.78	-0.99	0.98
16	23.09	23.17	-0.08	0.01
17	26.46	26.24	0.22	0.05
18	0.00	-0.60	0.60	0.35
19	4.17	4.13	0.04	0.00
20	3.52	1.96	1.56	2.43
ผลรวม	193.19	195.35	-2.16	43.48
ค่าเฉลี่ย	9.66	9.77	-0.11	2.17



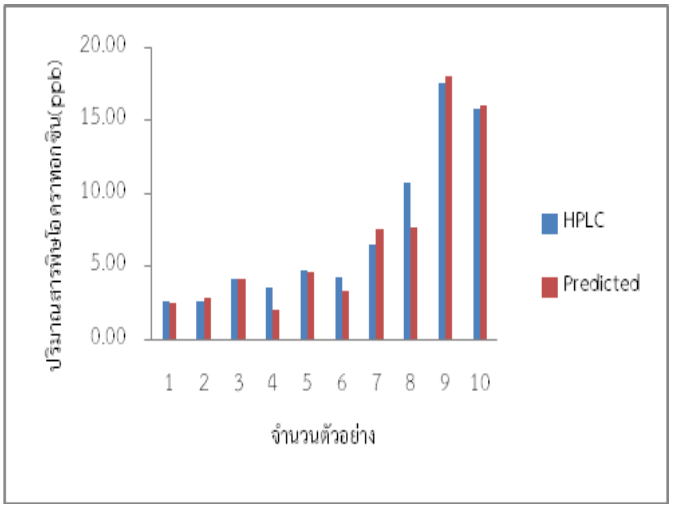
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของค่าปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NIR (predictive values: Y) และวิธีการทางเคมี HPLC (actual Values: X)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีประเมินปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี NIR โดยการเติมสารพิษมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไป (spike sample) และนำไปตรวจสอบด้วย NIR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสมการว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจสอบสารพิษได้จริงกี่เปอร์เซ็นต์ พบว่าวิธี NIR สามารถตรวจสารพิษได้ 99.39% ที่ระดับความเข้มข้น 4 ppb 75.79% ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb 85.15% ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppb และ 79.92% ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppb (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลโดย T-TEST ระหว่างวิธี NIR และผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของวิธี NIR ในการตรวจหาสารโอคราทอกซิน เอ ที่เติมลงในเมล็ดกาแฟดิบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารโอคราทอกซิน เอ (ppb)	ปริมาณสารโอคราทอกซินที่ตรวจได้ (ppb)			%การตรวจหาพบ (%recovery)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	
4	4.65	3.30	3.98	99.39
10	7.53	7.63	7.58	75.79
20	18.05	16.01	17.03	85.15
30	24.78	23.17	23.98	68.50

$$\%recovery = \frac{\text{ปริมาณสารพิษที่ตรวจได้}}{\text{ปริมาณสารพิษที่เติมลงไป}} \times 100$$



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ด้วยวิธี NIR และวิธีการทางเคมี HPLC ในการวิเคราะห์ค่าปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบ

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสมการที่ได้โดยวิธี NIR สามารถนำไปใช้ในการประเมินสารพิษโอคราทอกซิน เอ ในเมล็ดกาแฟดิบได้ โดยใช้ในการทำนายปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดกาแฟดิบได้ไม่ต่างจากวิธี HPLC วิธี NIR เป็นวิธีที่ใช้ง่าย สะดวก มีความแม่นยำและใช้เวลาน้อย จึงเหมาะจะเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจตัวอย่างวิเคราะห์จำนวนมากๆ ก่อน (screening) ถ้ามีตัวอย่างใดที่น่าสงสัยหรือสนใจเป็นพิเศษจึงค่อยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีซ้ำ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สมการที่ได้โดยวิธี NIR สามารถนำไปใช้ในการตรวจตัวอย่างวิเคราะห์จำนวนมากๆ ก่อน (screening) ถ้ามีตัวอย่างใดที่น่าสงสัยหรือสนใจเป็นพิเศษจึงค่อยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีซ้ำ
2. สมการที่ได้โดยวิธี NIR สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสำหรับใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบปริมาณสารพิษโอคราทอกซิน เอ

เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟอาราบิกา ตามพระราชบัญญัติสินค้าเกษตร. หน้า 6 เล่ม 126.

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2553. การจัดการความรู้เทคโนโลยีการผลิตกาแฟครบวงจร. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

สิทธิพร ชมพูรัตน์. 2549. การตรวจสอบโอคราทอกซินเอในกาแฟคั่วที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุมาพร เกษมสำราญ. 2552. หลักพื้นฐานของเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี. การอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบสินค้าเกษตรโดยไม่ทำลายด้วยวิธี Near Infrared Spectroscopy (NIR Workshop). สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวลักษณ์ ปฐวีรัตน์. 2552. เครื่อง NIR spectrometer Instrumentation for NIR spectroscopy. การอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบสินค้าเกษตรโดยไม่ทำลายด้วยวิธี Near Infrared Spectroscopy (NIR Workshop).สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

J.M.Hernandez-Hierro, R.J.Garcia-Villanova and I.Gonzalez-Martin. 2008.Potential of near infrared spectroscopy for the analysis ofmycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. www.sciencedirect.com/

Palma N, Cinelli S, Sapora O, Wilson SH, Dogliotti E. 2007. Ochratoxin A-Induced Mutagenesis in Mammalian Cells Is Consistent with the Production of Oxidative Stress. Chemical Research in Toxicology 20(7): 1031-1037. doi:10.1021/tx700027j

Zimmerli, B. and R. Dick. 1995. Determination of Ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum,milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. J.Chromatography B. 666: 85-99.