บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

ข้าวโพดพันธุ์ DK 888 จากเกษตรกรอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่จำนวน 100 กิโลกรัม เพื่อใช้ในการทดลองการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ที่พบในเมล็ดข้าวโพด และสเปกตรัมที่วัดได้จากเชื้อรา *A. flavus* ต่อช่วงคลื่น VIS/NIR spectroscopy การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ที่พบในเมล็ดข้าวโพด และ การตรวจการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ข้าวโพดระหว่างการเก็บรักษา

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์การเตรียมตัวอย่าง</u>

1. ตู้อบลดความชื้น (hot air oven, UM 500 Memmert, Germany)
2. เครื่องแยกเมล็ดโดยใช้ specific gravity (specific gravity separator, Damas)
3. เครื่องแยกเมล็ดโดยใช้ลมเป่า (aspirated sieve separator, van opstal)
4. ถุงพลาสติก
5. ถังพลาสติก

<u>สารเคมี</u>

1. สารรมฟอสฟีน (phosphine)

<u>ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง</u>

นำข้าวโพดมาลดความชื้นในตู้อบลดความชื้น (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 35 °C เพื่อให้มีความชื้นประมาณ 14 % จากนั้นคัดแยกสิ่งแปลกปลอมปนออกจากเมล็ดด้วยเครื่องแยกเมล็ดโดยใช้ลมเป่าและนำไปคัดขนาดเมล็ดด้วยเครื่องแยกเมล็ดโดยใช้ specific gravity นำเมล็ดข้าวโพดที่มีขนาดเมล็ดสม่ำเสมอกันมาบรรจุลงในถุงพลาสติกและใส่ในถังดำใช้สารรมฟอสฟีนรมภายในถังเก็บเมล็ดเป็นเวลา 7 วันแล้วจึงนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อราด้วยเทคนิคทาง Microbiology

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาการเจริญของเชื้อรา</u>

1. กล้อง stereomicroscope and accessories ยี่ห้อ Olympus รุ่น S2X-12
2. กระดาษเพาะ
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX 31-12L02-SET
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. ปากคีบ (forcep)
8. หลอดทดลอง
9. ถุงมือ
10. เข็มเขี่ยเชื้อ
11. แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์
12. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
13. มีดผ่าตัด
14. couting chamber, brightline (haemacytometer)

<u>สารเคมี</u>

1. PDA (potato dextrose agar)
2. 3% sodium hypochlorite

3.3.1 การตรวจสอบหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ด

โดยการเพาะเมล็ดบนวุ้น (agar method) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) และกระดาษชื้น (blotter method) (ISTA, 2006) ดังนี้

3.3.1.1 agar method โดยนำเมล็ดไปฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วย 3 % sodium hypochlorite เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแล้ว จากนั้นนำเมล็ดไปวางบนผิว อาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

PDA โดยแต่ละเมล็ดวางห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วนำจานเพาะเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่ประมาณ 25 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.3.1.2 blotter method โดยนำกระดาษซับที่ค่อนข้างหนาซ้อนกัน 2-3 ชั้น จุ่มลงในน้ำกลั่นให้เปียกทั้งหมด ยกขึ้นให้น้ำส่วนเกินไหลออกไป จากนั้นนำ กระดาษบรรจุลงในถุงพลาสติก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น แล้วจึงนำกระดาษซับดังกล่าวมาวางลงในจานเพาะเชื้อ ซึ่งทุกขั้นตอนต้องเตรียมภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ต้องการแยกเชื้อวางลงไปบนกระดาษชื้น โดยวางเมล็ดห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร และนำจานเพาะเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่ประมาณ 25 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งเมื่อครบกำหนด 7 วันจะสามารถสังเกตเห็นเชื้อราที่เจริญบริเวณผิวของเมล็ดได้ชัดเจนขึ้น

3.3.2 การจำแนกเชื้อราที่เจริญบริเวณผิวของเมล็ด

โดยนำเมล็ดที่มีเชื้อราเจริญอยู่มาตรวจหาเชื้อ *A. flavus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนผิวเมล็ด การตรวจดูสี การเจริญของเส้นใย การสร้างโคนิเดีย รวมถึงนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ทั้งสังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนี การชูโคนิเดีย เวสสิเคิล และสีของโคนิเดียเปรียบเทียบกับหนังสือโรคหลังเก็บเกี่ยวของเมล็ดพืช (สมบัติ, 2535) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา

3.3.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ตัดบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ (petri dish) บ่มเชื้อที่ 25 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราทั้งสองมาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่บรรจุในหลอดทดลองมีลักษณะเอียง เมื่อเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหารจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 5 °C เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger*

นำจานเพาะเชื้อ แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์ โดยนำมาทำให้ปราศจากเชื้อ และนำจานอาหาร PDA มา 1 จาน ตัด PDA เป็นชิ้นเล็ก ๆ สี่เหลี่ยม ขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร ย้ายชิ้นส่วน PDA วางตรงกลางแผ่นสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ย้ายเชื้อราที่เตรียมไว้ไปแตะขอบอาหาร PDA ทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4 ด้าน แล้วปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ โดยทุกขั้นตอนต้องเตรียมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ รวมทั้งศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ตลอดระยะเวลา 7 วัน

3.3.5 ศึกษาสเปกตรัมที่วัดได้จากเชื้อรา *A. flavus* ต่อช่วงคลื่น VIS/NIR spectroscopy

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์การวัดสเปกตรัม</u>

1. เครื่อง NIRSystem6500 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA)
2. อุปกรณ์เสริมชุดวัดตัวอย่าง spinning module with standard cup
3. กระดาษกรองชนิด Whatman Glass Microfibre filters (Whatman,GF/C) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 37 มิลลิเมตร
4. โปรแกรม The unscrambler ® version 7.6 (Camo, Oslo, Norway)

<u>วิธีการ</u>

นำส่วนของเส้นใยและสปอร์เชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ไปลดความชื้นใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววางบนกระดาษกรองชนิด whatman glass microfibre filters ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 37 มิลลิเมตร นำมาบรรจุใน standard cup โดยให้มีความหนาของเส้นใยและสปอร์เชื้อราประมาณ 1 มิลลิเมตร ใช้จำนวนตัวอย่างของเชื้อราจำนวน 30 ตัวอย่างต่อชนิดของเชื้อ วัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสงด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup จากนั้นนำข้อมูลสเปกตรัม (spectrum) ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The unscrambler ® version 7.6

3.4 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ที่พบในเมล็ดข้าวโพด

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา</u>

1. เครื่อง NIRSystem6500
2. อุปกรณ์เสริมชุดวัดตัวอย่าง transportation module with coarse sample cell, transportation module with pasting cell และ spinning module with standard cup
3. โปรแกรม The unscrambler ® version 7.6
4. ถาดอลูมิเนียม
5. ขวดพ่นน้ำขนาดเล็ก
6. plastic wrap ชนิด polyvinyl chloride
7. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
8. เครื่องบดเมล็ด (sample mill, Cemotect Foss Testor, Sweden)
9. ถุงมือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี

1. สารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 0.1 %

3.4.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy

วิธีการ

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ DK 888 จำนวน 70 กิโลกรัม แบ่งตัวอย่างเมล็ดออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกนำเมล็ดมาแกลี่ยในถาดอลูมิเนียม และปลูกเชื้อด้วยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ความเข้มข้น 0.4×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 มิลลิลิตร ให้กระจายอย่างทั่วถึงทุกเมล็ด ปิดถาดด้วย plastic wrap ชนิด polyvinyl chloride บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน เมื่อสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อรา จึงนำเมล็ดที่ได้มาทดลอง ใน 4 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยผสมเมล็ดข้าวโพดที่มีเชื้อเข้าทำลายมาผสมกับเมล็ดข้าวโพดปกติ ในอัตราส่วน 5, 10, 15 และ 20 % โดยน้ำหนักตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมจะใช้เมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ปลูกเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 0.1 % นาน 1 นาที ทุกกรรมวิธีใช้เมล็ดข้าวโพดน้ำหนัก 200 กรัมต่อตัวอย่าง และใช้ 30 ตัวอย่างต่อกรรมวิธี จากนั้นนำเมล็ดในแต่กรรมวิธีไปวัดสเปกตรัม ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตรด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell และ transportation module with pasting cell โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง แล้วนำข้อมูลสเปกตรัมที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนด้วยโปรแกรม The unscrambler ® version 7.6

3.4.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพดบด

วิธีการ

นำเมล็ดข้าวโพดมาทดลองดังการทดลองที่ 3.4.1 ก่อนทำการวัดสเปกตรัม นำเมล็ดมาบดในเครื่องบดเมล็ด แบ่งตัวอย่างเมล็ดออกเป็นสองส่วน และทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 3.4.1 แล้วนำเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีไปวัดสเปกตรัม ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตรด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell และ spinning module with standard cup โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง แล้วนำข้อมูลสเปกตรัมที่ได้มา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนด้วยโปรแกรม The unscrambler ® version 7.6

3.5 การตรวจการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ข้าวโพดระหว่างการเก็บรักษา

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. ชุดตรวจสอบ DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit ประกอบด้วย
   - microELISA plate แบบต่างๆ ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อสารอะฟลาทอกซิน B_1 บรรจุในถุงฟอยด์
   - สาร AFB_1 มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 5 ng/ml (ppb)
   - substrate (TMB) 12 มิลลิลิตร
   - stopping solution (0.3 M Ohosphoric acid) 12 มิลลิลิตร
   - conjugate buffer ปริมาณ 8 มิลลิลิตร
   - washing buffer 100 มิลลิลิตร (10 เท่า 0.01 M PBS + 0.05% tween 20)
2. เครื่อง NIRSystem6500 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA)
3. อุปกรณ์เสริมชุดวัดตัวอย่าง transportation module with pasting cell
4. โปรแกรม The unscrambler ® version 7.6 (Camo, Oslo, Norway)
5. เครื่องบดเมล็ด (sample mill, Cemotec)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
7. เครื่องเขย่า
8. เครื่องแก้วสำหรับกรอง และเจือจางสารสกัด
9. กระดาษกรองเบอร์ 4
10. ไมโครปิเปตขนาด 50-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตรพร้อมปิเปตทิป
11. เครื่อง microELISA reader อ่านที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
13. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
14. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

16. จานเพาะเชื้อ (petri dish)

สารเคมี

1. เมทานอล 70 %

วิธีการ

นำเมล็ดข้าวโพด นำมาผ่านกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *A. flavus* (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *A. flavus*

จากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านกรรมวิธีทั้ง 2 กรรมวิธี มาเก็บรักษาในสภาพปกติ (อุณหภูมิห้อง) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 เดือน นำเมล็ดข้าวโพดที่ ผ่านการเก็บรักษามาวัดสเปกตรัมด้วย NIRSystem6500 ด้วยชุดอุปกรณ์เสริมที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 2 แล้วนำมาตรวจการเข้าทำลายของเชื้อราด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit) จากสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3.5.1 วิธีวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป

1. การเตรียมตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดอย่างน้อย 1 กิโลกรัม ตัวอย่างที่สุ่มมาต้องเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่างนั้นๆ ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
2. วิธีการสกัดสารพิษจากตัวอย่าง
   - ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 20 กรัมใส่ใน flask
   - เติม 100 มิลลิลิตร ของ 70% เมทานอล ลงใน flask (อัตราส่วนของตัวอย่างต่อ 70% เมทานอล เท่ากับ 1:5)
   - ปิดปาก flask ด้วยจุกยางหรือแผ่นพาราฟิล์ม แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที
3. การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์
   - นำตัวอย่างที่เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที
   - นำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในหลอดแก้วที่สะอาดปิดสนิท สารสกัดที่กรองได้นี้จะมีความเข้มข้นเป็น 1:5 เท่า
- ให้ทำการเจือจางสารสกัดเป็น 1:20 เท่า โดยใช้สารละลาย 0.01 M PBS-T ก่อนนำไปวิเคราะห์โดยเจือจางในอัตราส่วน 1:3 (สารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร + สารละลาย 0.01 M PBS-T 3 มิลลิลิตร)

4. ขั้นตอนการวิเคราะห์
   - หยดสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นต่างๆ (4-5 ความเข้มข้น) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุมทดสอบ/ความเข้มข้น และหยดสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางเป็น 1:20 แล้ว ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบที่เหลือ
   - หยดเอ็นไซม์คอนจูเกต (AFB_1 – HRP conjugate) ที่เจือจางใน conjugate buffer แล้ว ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุมทดสอบตามลงไปทุกหลุม เขย่าเล็กน้อย แล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 20-30 นาที
   - หลังจากครบเวลาการบ่มแล้ว เทสารในหลุมทดสอบสอบทิ้งโดยการคว่ำหลุม
   - ล้างหลุมทดสอบ โดยเติม washing buffer (PBS-T) ลงในหลุมให้เต็มทุกหลุม แล้วคว่ำทิ้ง ควรทำการล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง
   - คว่ำหลุมทดสอบบนกระดาษซับแล้วเคาะให้แห้ง
   - หยด substrate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบจากทุกหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5-10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้า ตามลำดับความเข้มข้นของสารพิษตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีสารพิษหรือมีน้อย และตัวอย่างที่มีสีฟ้าจางหรือขาวแสดงว่ามีสารพิษมาก
   - หยุดปฏิกิริยาโดยเติม stopping solution (0.5 M phosphoric acid) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง และอ่านค่าความเข้มข้นของสีด้วย microELISA reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ควรอ่านปฏิกิริยาภายใน 60 นาทีหลังจากหยุดปฏิกิริยา

รวมทั้งทดสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* ที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 ตรวจสอบการเกิดเชื้อรา (fungi infect)

สุ่มเมล็ดมาจำนวน 400 เมล็ด จานละ10 เมล็ด ที่อุณหภูมิ 25 °C ในตู้ incubator นาน 7 วัน บันทึกภาพ ตรวจวัดผลการทดลอง

$$\% \text{ การปนเปื้อนเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้างสมการ

สร้างสมการเทียบมาตรฐานโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมและปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้จากวิธีเคมี โดยการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค partial least squares regression (PLSR) โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าทางเคมีด้วยโปรแกรม The unscrambler ® และสร้างสมการโดยใช้วิธี test set โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสร้างสมการ (calibration set) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นระหว่างข้อมูลทางเคมีที่วัดได้ด้วยวิธีมาตรฐานกับข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของข้าวโพดในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร และกลุ่มทดสอบสมการ (validation set) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของสมการทำนายค่าทางเคมีที่ได้ ซึ่งมีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างและทดสอบสมการทำนายปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน แปลงข้อมูลสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum หรือ Log (1/R)) ด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ คือ smooting, first derivative, second derivative และ multiplicative scatter correction (MSC) และทำการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้ โดยพิจารณาค่าสถิติที่วิเคราะห์ได้จากการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นของตัวอย่างในกลุ่ม calibration set และกลุ่ม validation set ได้แก่ ค่า R ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (standard error of calibration, SEC), ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (standard error of prediction, SEP) และค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIR (bias) ของแต่ละสมการ เพื่อจะได้เลือกสมการที่เหมาะสมที่สุด โดยมีขั้นตอนดังแผนภาพ 3.1

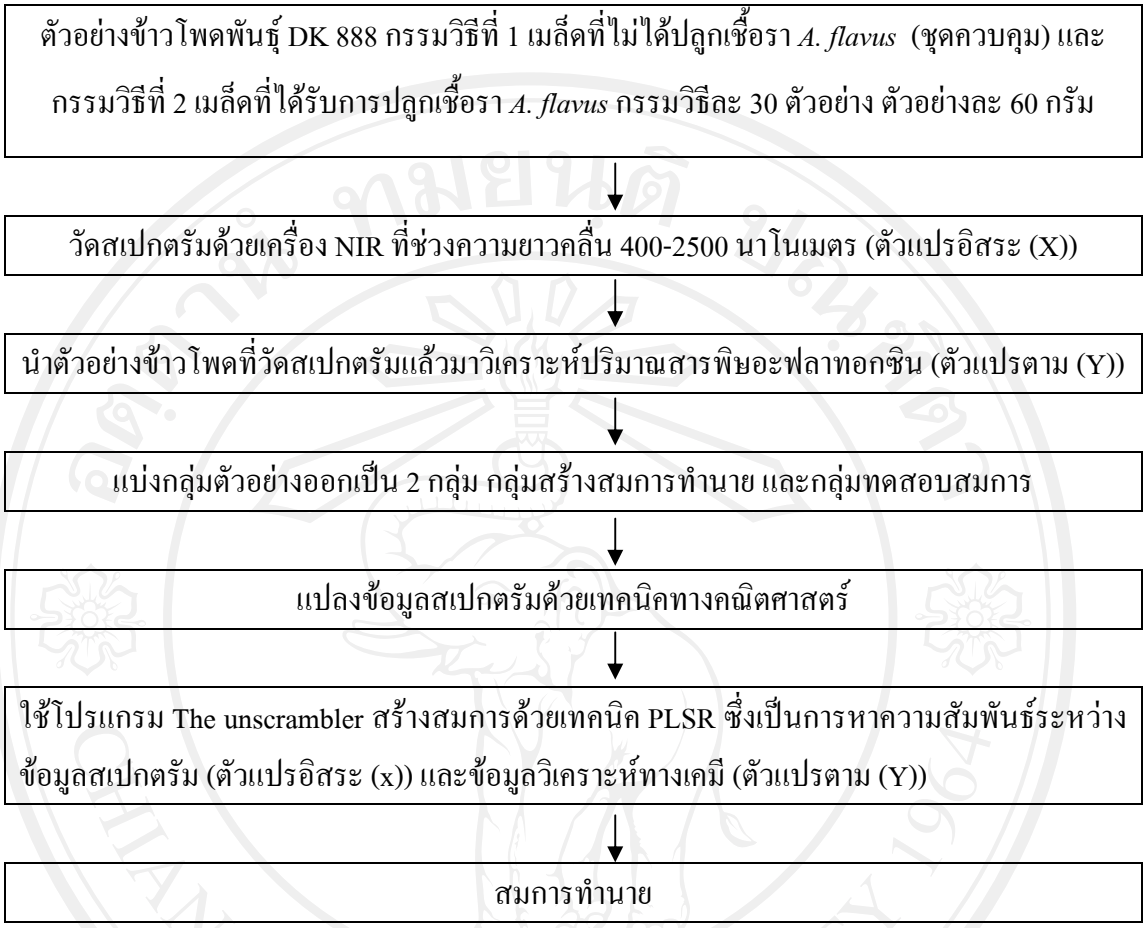
3.8 สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.9 ระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2552- ตุลาคม 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1 ขั้นตอนการใช้โปรแกรม The unscrambler ® สร้างสมการด้วยเทคนิค PLSR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved