การพัฒนาวิธีตรวจขนไก่ปั่นในปลาปั่นด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy

ธญานี ปาณพิมลวัฒน์ ธงไชย ดิษฐประชา เกรียงไกร เกื้อกูล วารินทร์ อนมนวล ศิริวรรณ จันมี

บทคัดย่อ

การปลอมปนขนไก่ปั่นในปลาปั่นเป็นปัญหาที่ส่งผลต่อคุณภาพของวัตถุดิบอาหารสัตว์ การพัฒนาวิธีนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) ร่วมกับวิธีทางเคโมเมทริกซ์สำหรับจำแนกและตรวจสอบการปลอมปนขนไก่ปั่นในปลาปั่น โดยเตรียมตัวอย่างปลาปั่นที่ผสมขนไก่ปั่นในระดับสัดส่วน 0.5-10% (w/w) จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง FT-IR ที่ติดตั้ง Universal Attenuated Total Reflectance (UATR) และนำข้อมูลสเปกตรัมในรูป %transmittance มาวิเคราะห์ด้วยวิธี multivariate partial least squares regression โดยเปรียบเทียบการใช้ข้อมูลสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับข้อมูล การปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน และการปรับอนุพันธ์ลำดับที่หนึ่งและสอง ภายใต้การเลือกช่วงเลขคลื่น ได้แก่ whole region (4,000 – 550 cm^{-1}), fingerprint region (1,800 – 550 cm^{-1}) และ selected spectral region (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1}) ทั้งนี้ข้อมูลสเปกตรัมของทุกตัวอย่างถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle component; PCA) เพื่อศึกษาการกระจายตัวและการจำแนกกลุ่มตัวอย่าง และประเมินสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแบบจำลองจำแนกกลุ่ม ผลการศึกษาพบว่าการปรับข้อมูลสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์ลำดับที่สองร่วมกับการใช้ selected spectral region ให้การกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างใน PCA score plot และค่า R-square สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.99961 จึงเลือกสภาวะดังกล่าวสำหรับการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) และประเมินประสิทธิภาพแบบจำลองด้วยวิธี soft independent modeling of class analogy (SIMCA) ผลการประเมินแบบจำลองด้วย confusion matrix พบค่า total sensitivity, total specificity และ total efficiency เท่ากับ 94%, 100% และ 97% ตามลำดับ เมื่อนำสเปกตรัมตัวอย่างเข้าสู่แบบจำลองเพื่อทำนายการจำแนกกลุ่ม พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างปลาปั่นและปลาปั่นที่ผสมขนไก่ปั่นได้ โดยมีค่า total sensitivity, total specificity และ total efficiency เท่ากับ 95%, 100% และ 97% ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค FT-IT ร่วมกับเคโมเมตริกซ์ โดยเฉพาะการปรับสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์ลำดับที่สองและการเลือกช่วงคลื่นที่เหมาะสม มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแนวทางสำหรับการจำแนกปลาปั่นที่มีการปลอมปนขนไก่ปั่น และสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการปลอมปนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ต่อไป

คำสำคัญ: ปลาปั่น, ขนไก่ปั่น, การปลอมปน, FT-IR

Development of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Detection of Feather Meal Adulteration in Fishmeal

Tayanee Panapimonlawat Thongchai Ditpracha Kriangkrai Kuakoon Warin Anomnual Siriwan Chanmee

Abstract

Adulteration of fishmeal with feather meal is potential concern for the quality and authenticity of animal feed ingredients. This study investigates the feasibility of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) coupled with chemometric techniques for the discriminating feather meal adulteration in fishmeal. Fishmeal samples were adulterated with feather meal at level ranging from 0.5 to 10% (w/w). The samples were analyzed using an FT-IR spectrometer equipped with a Universal Attenuated Total Reflectance (UATR) accessory. Spectral data expressed as %transmittance at individual wavenumber were evaluated using multivariate partial least squares regression. Spectral pretreatment method, including unprocessed spectra, Standard normalization variance (SNV), 1st and 2nd derivative pretreatment, were compared across three spectral regions: whole region (4,000-550 cm^{-1}), fingerprint region (1,800-550 cm^{-1}), and selected spectral region (1,600-1,500, 1,350-1,300, and 680-600 cm^{-1}). Principle Component Analysis (PCA) was performed to investigate sample distribution and group discrimination, and the pretreatment and spectral region were compared for model development. The results showed that 2nd derivative pretreatment combined with the selected spectral region provided the highest R-square value (0.999961) and a relatively distinct distribution of fishmeal and feather meal adulterated fishmeal samples in the PCA score plot. This condition was selected for development of a Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) model, with performance evaluated using Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA). Based on the confusion matrix the model achieved total sensitivity, specificity, and efficiency of 94%, 100%, and 97% respectively. Prediction of sample spectrum using the developed model resulted in total sensitivity, specificity, and efficiency of 95%, 100%, and 97% respectively. These findings demonstrate the potential of FT-IR spectroscopy coupled with chemometric analysis, particularly 2nd derivative pretreatment and selected spectra region, as a rapid approach for discriminating feather meal adulteration in fishmeal. The developed approach may provide a basis for further development and validation of screening method for adulteration control in animal feed ingredients.

Keywords: fishmeal, feather meal, adulteration, FT-IR

บทนำ

ปลาป่น (Fish Meal) จัดเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์แหล่งโปรตีนจากสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะไลซีน (Lysine) เมไทโอนีน (Methionine) และทริปโตเฟน (Tryptophan) อีกทั้งยังเป็นแหล่งของวิตามินบี 12 วิตามินบี 2 แคลเซียม และฟอสฟอรัส จากคุณสมบัติทางโภชนาการที่โดดเด่น ส่งผลให้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบหลักที่มีราคาสูงในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ปลาป่นเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดหนึ่งที่ควบคุมตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ชั้นคุณภาพของปลาป่นแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ปลาป่นชั้นคุณภาพที่ 1 (โปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 60) ชั้นคุณภาพที่ 2 (โปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 55) และชั้นคุณภาพที่ 3 (โปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 50) นอกจากนี้ยังมีปลาป่นและกระดูกปลาป่นที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 ซึ่งคุณภาพที่แตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับชนิดวัตถุดิบปลาป่น (แพรวพรรณ และ ดรุณี., 2542)

ภาวะการเติบโตอย่างต่อเนื่องของอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ทั่วโลก ส่งผลให้ความต้องการใช้ปลาป่นขยายตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ปริมาณปลาที่จับได้จากธรรมชาติกลับมีแนวโน้มลดลงจนเกิดการขาดแคลนและดันให้ราคาปลาป่นในท้องตลาดปรับตัวสูงขึ้นอย่างมาก (FAO., 2022) ปัจจัยทางเศรษฐกิจดังกล่าวกลายเป็นแรงจูงใจให้เกิดเจตนาในการเจือปนหรือปลอมปนวัตถุดิบอื่นที่มีราคาต่ำกว่าเพื่อลดต้นทุนกระบวนการผลิต ไม่ว่าจะเป็นการเติมสารเคมีเพื่อปรับค่าไนโตรเจน เช่น ยูเรีย การผสมวัตถุดิบอินทรีย์ที่มีโปรตีนย่อยยากหรือคุณภาพต่ำ เช่น ขนไก่ป่น ขนแห้งบดละเอียด เศษหนัง เลือดป่น เนื้อและกระดูกป่น กากน้ำมันหมู กากวุ้นเส้น รวมถึงเศษหัวและไส้ปลาจากโรงงานแปรรูป นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนแกลบบดละเอียด ตลอดจนสารอนินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ เช่น แกลบกุ้ง ทรายละเอียด เปลือกหอยป่น หรือเศษเปลือกหอยผุ (กาซ้า) ซึ่งมีรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกับกระดูกปลาและอาจส่งผลให้สัตว์เกิดภาวะขาดฟอสฟอรัสหากปนมาในสัดส่วนที่สูง รวมถึงอาจพบเศษผงเหล็กปะปนอยู่ด้วย (กนกรัตน์ และคณะ., 2559) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำขนไก่ป่น (Feather Meal) ซึ่งเป็นผลพลอยได้มาใช้ปลอมปน เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนหยาบ (Crude Protein) ให้สูงถึงร้อยละ 80–85 แต่โปรตีนหลักในขนไก่ป่นคือ เคอราติน (Keratin) ซึ่งยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่แข็งแรง ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยและนำไปใช้ประโยชน์ของสัตว์ต่ำ อีกทั้งยังมีรูปแบบกรดอะมิโนที่ไม่สมดุล (Bureau et al., 1999) การนำสิ่งปลอมปนเหล่านี้มาผสมจึงทำให้คุณภาพมาตรฐานของปลาป่นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลเสียต่อการเติบโตและสุขภาพของสัตว์ สร้างความเสียหายเชิงเศรษฐกิจแก่เกษตรกรและผู้ผลิตอาหารสัตว์

วิธีเคมีมาตรฐานแบบเดิม เช่น วิธีเคจดาห์ล (Kjeldahl method) วัดได้เพียงปริมาณไนโตรเจนรวมแล้วคำนวณเป็นโปรตีนหยาบ จึงไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างโปรตีนจากปลาป่นและขนไก่ป่นได้ ขณะที่วิธีวิเคราะห์ทางกล้องจุลทรรศน์ (Feed Microscopy) แม้ว่าลักษณะทางกายภาพ เช่น เส้นใยกล้ามเนื้อปลา (Muscle fibers) ก้างปลา และเกล็ดปลา จะมีลักษณะเฉพาะตัว แต่กระบวนการผลิตปลาป่นและขนไก่ป่นที่ผ่านการย่อย สุก หรือบดละเอียด จะทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อสูญเสียสภาพไป ส่งผลให้การตรวจจำแนกด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ทำได้ยากและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญสูง (แพรวพรรณ และ ดรุณี., 2542) ส่วนวิธีทางชีวเคมีระดับสูง เช่น โครมาโทกราฟี (Chromatography) หรือ ELISA มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเบื้องต้นในปริมาณมาก (Čapla, J. *et al.,* 2020)

เทคนิค Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ร่วมกับการวิเคราะห์เคโมเมตริกซ์ (Chemometrics) จึงเข้ามามีบทบาทเป็นทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง และไม่ต้องใช้สารเคมี อาศัยการดูดกลืนพลังงานแสงอินฟราเรดช่วงกลาง (middle-IR) 4,000 - 400 cm^{-1} ซึ่งทำให้พันธะเคมีภายในโมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือน (Vibrational transition) ส่งผลให้เกิดสเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว (Gong, Y. *et al.,* 2024) โดย FTIR สามารถตรวจวัดความแตกต่างของโครงสร้างรองของโปรตีน (Protein secondary structures) ได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากโปรตีนเคอราตินในขนไก่ป่นมีโครงสร้างแบบ beta-sheet (β-sheet) เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่โปรตีนกล้ามเนื้อปลาป่นประกอบด้วยโครงสร้างแบบ alpha-helix ($\propto$-helix) เป็นส่วนใหญ่ ความแตกต่างเชิงโครงสร้างนี้สะท้อนผ่านรูปแบบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในย่าน Amide I (1600–1700 cm^{-1}) และ Amide II (1500–1600 cm^{-1}) (Mahdabi, M. และ Hosseini Shekarabi, S.P., 2018 และ Tesfaye, T. et al., 2017) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จาก FTIR มีความซับซ้อนและมีปริมาณชุดข้อมูลขนาดใหญ่ การวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับเทคนิคเคโมเมทริกซ์ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติและคณิตศาสตร์จึงสามารถประมวลผลข้อมูลที่มีความซับซ้อน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร (Multivariate data analysis) เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis: PCA) เพื่อการจำแนกกลุ่ม และการสร้างแบบจำลองด้วยวิธี Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) เพื่อการประเมินปริมาณสิ่งปลอมปน (Hibbert, DB., 2016) การใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับการวิเคราะห์เคโมเมทริกซ์จึงสามารถนำมาใช้ในการแยกแยะและประเมินการปลอมปนได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ (Irnawati, I. *et al.,* 2023)

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาขนไก่ป่นในตัวอย่างปลาป่น ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รวมกับวิธีทางเคโมเมตริกซ์

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีตรวจหาขนไก่ป่นที่ผสมอยู่ในตัวอย่างปลาป่น ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีตรวจวิเคราะห์ขนไก่ป่นในวัตถุดิบปลาป่น ด้วยเทคนิค FTIR สำหรับนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองและเฝ้าระวังสิ่งปลอมปนในปลาป่น เพื่อช่วยควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ให้เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.1.1 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereo microscope)

4.1.2 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope)

4.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electronic balance)

4.1.4 เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (3D mixer)

4.1.5 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)

4.1.6 ตู้ดูดควัน (Fume hood)

4.1.7 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25 มิลลิลิตร

4.1.8 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 25 มิลลิลิตร

4.1.9 จานแก้ว (Petri dish)

4.1.10 ตะแกรงร่อน (Sieve)

4.1.11 ช้อนตักสาร (Spatula)

4.1.12 แท่งแก้ว (Stirring rod)

4.1.13 ถุงมือ (Gloves)

4.1.14 แผ่นสไลด์ (Slide)

4.1.15 แผ่นปิดสไลด์ (Cover glass)

4.1.16 ปากคีบปลายแหลม (Forceps)

4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

4.2.1 คลอโรฟอร์ม (Chloroform)

4.2.2 สารละลายตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (Mounting media)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 การเตรียมตัวอย่างปลาป่นโดยวิธีการลอยตัว (Floatation)

5.1.1 ชั่งตัวอย่างปลาป่นตัวอย่างละ 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่ระบุ sample code

5.1.2 ตวงตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ที่มีตัวอย่าง ใช้แท่งแก้วคนจำนวน 5 รอบ และปล่อยทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นในตู้ดูดควัน

5.1.3 ใช้ช้อนตักตัวอย่าง ตักส่วนลอยใส่จานแก้วที่ระบุ sample code เทสารละลายคลอโรฟอร์มออกให้เหลือส่วนจมในบีกเกอร์ และตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันให้แห้งสนิท

5.1.4 นำตัวอย่างที่แห้งแล้วแต่ละส่วน มาร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 250 และ 500 ไมโครเมตร เก็บใส่จานแก้วที่ระบุ sample code จะได้ตัวอย่างที่มีความละเอียดต่างกัน 3 ส่วน สำหรับนำไปทดสอบสิ่งปลอมปนโดยกล้องจุลทรรศน์

5.2 ตรวจวิเคราะห์สิ่งปลอมปนในตัวอย่างปลาป่นทุกตัวอย่าง

เพื่อใช้เป็นตัวอย่างแบลงค์ (sample blank) ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ให้มั่นใจว่าไม่มีสิ่งปลอมปนก่อนนำตัวอย่างปลาป่นดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

5.3 การเตรียมตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่น

การเตรียมตัวอย่างปลาป่นที่ผสมขนไก่ป่นใช้ตัวอย่างปลาป่นที่ผ่านการบดและร่อนแต่ละตัวอย่าง ให้มีขนาดน้อยกว่า 250 ไมโครเมตร ทดสอบด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงแล้วไม่พบการปลอมปน นำตัวอย่างปลาป่นแต่ละตัวอย่างมาผสมกับขนไก่ป่นให้มีสัดส่วน 10%, 5%, 1% และ 0.5% w/w ด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ดังตารางที่ 1

ตาราง 1 ปริมาณขนไก่ป่นที่ใช้ผสมในตัวอย่างปลาป่นแต่ละตัวอย่างให้มีสัดส่วน 10%, 5%, 1% และ 0.5% w/w ด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์

สัดส่วน (%w/w)	ปริมาณ (กรัม)		รวม (กรัม)	ผสมตัวอย่างด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ (นาที)
	ขนไก่ป่น	ปลาป่น		
0.0	-	2.0000	2.0000	-
0.5	0.0100	1.9900	2.0000	150
1.0	0.0200	1.9800	2.0000	150
5.0	0.1000	1.9000	2.0000	150
10	0.2000	1.8000	2.0000	150

5.4 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity)

ทดสอบ Homogeneity ของตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่นแต่ละสัดส่วนที่เตรียมไว้ในข้อ 5.5 โดยเจ้าหน้าที่ทดสอบงานกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงด้วยวิธี In house method: BQCLP_ FQCL_PH_T09_01 based on AOAC Official Methods of Analysis, 22nd ed., 2023, method 970.09

5.5 การวัดค่า %Transmittance (%T) ด้วยเครื่อง FTIR

นำตัวอย่างปลาป่น ขนไก่ป่น และปลาป่นผสมขนไก่ป่นที่สัดส่วน 10%, 5%, 1% และ 0.5% w/w จากข้อ 5.5 วัดค่า %T ทุกตัวอย่าง ด้วยเครื่อง FTIR โดยโรยตัวอย่างลงบนคริสตัลของ UATR เกลี่ยตัวอย่างให้กระจาย กดตัวอย่างด้วย pressure clamp ทำการสแกนตัวอย่างในช่วงเลขคลื่น 4,000–550 cm^{-1} ความละเอียด 4 cm^{-1}

จำนวนสแกน 32 รอบต่อครั้ง ระยะห่างระหว่างเลขคลื่น 1 cm^{-1} และความเร็วในการสแกน 0.2 cm^{-1}/s ทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง โดยบันทึกสเปกตรัมที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยแสดงในรูปของ %T ที่เลขคลื่นต่างๆ

5.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและการวิเคราะห์การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (PLS)

เมื่อได้สเปกตรัมทุกเลขคลื่นตั้งแต่ 4,000 – 550 cm^{-1} ในรูปของ %transmittance จากทุกตัวอย่างแล้ว สเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง FT-IR นี้เป็นข้อมูลสเปกตรัมเริ่มต้นหรือ original spectrum กำหนดให้เป็น pretreatment a จากนั้นนำสเปกตรัมเริ่มต้นทั้งหมดมาปรับให้อยู่ในแต่ละ pretreatment สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก และการสร้างสมการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) การปรับข้อมูลสเปกตรัมหรือ pretreatment มีขั้นตอนคือ นำค่า %transmittance ของสเปกตรัมที่ไม่ปรับหรือ original spectrum ที่ได้จากขั้นตอนที่ 5.5 ทุกตัวอย่าง มาปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานหรือ standard normalization variate (SNV) กำหนดให้เป็น pretreatment b ปรับอนุพันธ์ลำดับที่ 1 และ 2 กำหนดให้เป็น pretreatment c และ d ตามลำดับ ด้วยโปรแกรม PerkinElmer spectrum (version 10.5.3)

2) การกำหนดสภาวะสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก นำข้อมูลสเปกตรัมที่ผ่านการปรับทั้ง 4 pretreatment และสเปกตรัมเริ่มต้นอีก 1 pretreatment ร่วมกับการใช้เลขคลื่น 3 แบบ ได้แก่ การใช้เลขคลื่นทั้งหมด whole region (4,000 – 550 cm^{-1}) การใช้ข้อมูลเลขคลื่นช่วง fingerprint region (1,800-550 cm^{-1}) และการใช้เลขคลื่นช่วง selected spectral regions (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1}) จะได้สภาวะดังตารางที่ 2

ตาราง 2 การกำหนดสภาวะการปรับข้อมูลสเปกตรัม (pretreatment) ร่วมกับการใช้เลขคลื่นในการพัฒนาวิธีดังกล่าวนี้

Pretreatment	Wavenumber selection	Condition
(a) Original spectrum	Whole region	a1
	Fingerprint region	a2
	Selected spectral regions	a3
(b) Standard normalization variate (SNV)	Whole region	b1
	Fingerprint region	b2
	Selected spectral regions	b3
(c) 1st derivative	Whole region	c1
	Fingerprint region	c2
	Selected spectral regions	c3
(d) 2nd derivative	Whole region	d1
	Fingerprint region	d2
	Selected spectral regions	d3

3) การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและการสร้างสมการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด

จากตารางที่ 2 นำข้อมูลสเปกตรัมที่ได้ทุกตัวอย่างในแต่ละ condition สร้างสมการตรวจสอบการกระจายตัวของข้อมูลสเปกตรัมโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle component analysis: PCA) โดยโปรแกรม MATLAB R2020b จากนั้นการวิเคราะห์การสร้างสมการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square regression : PLS) ด้วยโปรแกรม Unscramble X (10.1) โดยกำหนดให้สเปกตรัมปลาป่นผสมขนไก่ป่นเป็น Class 1 และสเปกตรัมปลาป่นเป็น Class 0 โดยเลือก Predict Using Regression Model ใช้ NIPALS Algorithm ดังตารางที่ 3

ตาราง 3 จำนวนสเปกตรัมที่ใช้สร้างสมการ PLS

สเปกตรัม	Class	Calibration set
ปลาป่น	0	57
ปลาป่นผสมขนไก่ป่น	1	51

ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อใช้พิจารณาสภาวะที่เหมาะสมในการแบ่งกลุ่มระหว่างปลาป่น และปลาป่นผสมขนไก่ป่น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณาโดยสมการที่ดีต้องมีค่า R-square สูงใกล้เคียง 1 และมีค่า RMSEC ต่ำ

5.7 การสร้างรูปแบบการทำนายด้วยวิธี Partial least square discrimination (PLS-DA)

นำข้อมูลสเปกตรัมที่ผ่านการปรับข้อมูลและให้ค่า R-square สูงสุดจากขั้นตอนที่ 3.1.3 มาสร้างรูปแบบการทำนายสำหรับแยกกลุ่มปลาป่นที่มีการผสมขนไก่ป่นออกจากปลาป่น โดยใช้โปรแกรม MATLAB R202a (PLS-DA GUI) (Zontov *et al*., 2020) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (Type I error เท่ากับ 0.05) ค่า outlier level ระดับ 0.01

6. ผลการทดลอง

6.1 ตรวจวิเคราะห์สิ่งปลอมปนในตัวอย่างปลาป่นสำหรับใช้เป็นตัวอย่างทดสอบ

จากการตรวจวิเคราะห์สิ่งปลอมปนในตัวอย่างปลาป่นด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยบุคลากรงานกายภาพด้วยวิธี In house method: BQCLP_ FQCL_PH_T09_01 based on AOAC Official Methods of Analysis, 22nd ed., 2023, method 970.09 ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างปลาป่น (a) เส้นใยกล้ามเนื้อปลา และส่วนประกอบของปลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (45 เท่า) (b) เส้นใยกล้ามเนื้อปลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (200 เท่า) และ (c) เกล็ดปลา และหนังปลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (200 เท่า)

จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เนื่องจากเป็นตัวอย่างปลาป่นที่ผ่านการบดและร่อนให้มีขนาดน้อยกว่า 250 ไมโครเมตร จึงพบลักษณะเฉพาะโครงสร้างภายนอกของปลาป่นเพียงบางส่วน คือ เส้นใยกล้ามเนื้อปลา มีลักษณะเป็นเส้น ขนาดไม่สม่ำเสมอ สีเหลืองอ่อนและใส ดังภาพที่ 1(a) และจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบเส้นใยกล้ามเนื้อปลา ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ ขนาดเล็ก สีขาวออกเหลืองใส ภายในมีลายกล้ามเนื้อเป็นเส้นบางๆ หยักเป็นคลื่น ขนานกัน ดังภาพที่ 1(b) พบเกล็ดปลา มีรูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะเป็นลายเส้นบนเกล็ด และพบหนังปลา มีสีเข้ม มีจุดสีคล้ำ ลักษณะเป็นก้อนกลม ดังภาพที่ 1(c)

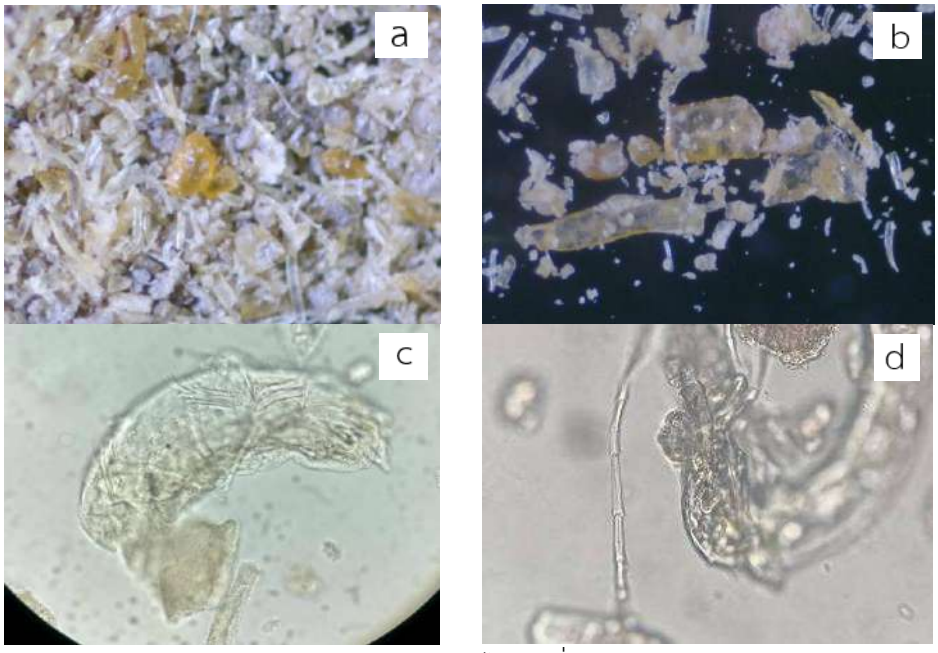
จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ไม่พบสิ่งปลอมปนในปลาป่น สามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างแบลงค์สำหรับทดสอบในขั้นตอนต่อไปได้

6.2 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เตรียมจากตัวอย่างปลาป่นที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสิ่งปลอมปนในปลาป่น และผ่านการร่อนให้มีขนาดน้อยกว่า 250 ไมโครเมตร นำมาผสมขนไก่ป่น ให้มีสัดส่วน 10%, 5%, 1% และ 0.5% w/w เพื่อทำการทดสอบ homogeneity ของตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่นแต่ละสัดส่วนที่เตรียมไว้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง จำนวน 51 ตัวอย่าง ทำการตรวจหาขนไก่ป่นในตัวอย่างที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มตัวอย่างชุดละ 3 ตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 4 และลักษณะขนไก่ป่นที่ตรวจพบดังภาพที่ 2

ตาราง 4 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์ของขนไก่ป่นในตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่นที่เตรียมสัดส่วน 10%, 5%, 1% และ 0.5% w/w

ตัวอย่าง	สัดส่วน (%w/w)	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างทดสอบ	ผลการทดสอบ
ปลาป่นผสม	10%	13	3	พบ
ขนไก่ป่น	5%	13	3	พบ
	1%	13	3	พบ
	0.5%	12	3	พบ



ภาพที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่นที่เตรียมสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR (a) ขนไก่หลอม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (40 เท่า) (b) ก้านขนไก่หลอม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (32 เท่า) (c) ขนไก่หลอม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (200 เท่า) และ (d) ขนไก่ส่วนขนอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (200 เท่า)

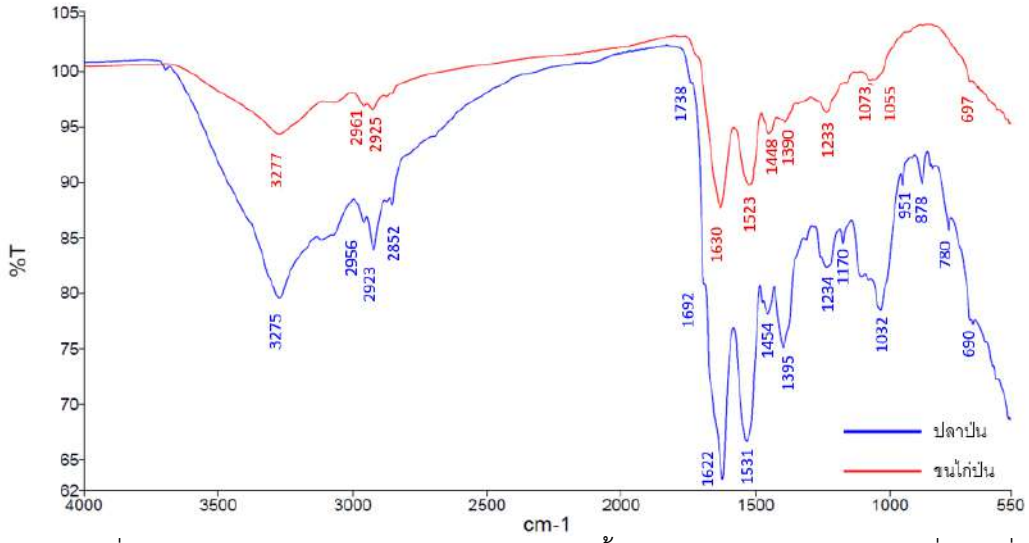
การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการพบขนไก่ป่นในตัวอย่างปลาป่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำพบส่วนประกอบอื่นนอกเหนือจากลักษณะเฉพาะโครงสร้างภายนอกของปลาป่น คือ ส่วนประกอบที่เป็นลักษณะเฉพาะของขนไก่ ได้แก่ ขนไก่หลอม มีลักษณะเป็นก้อน ขนาดและรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเหลืองเข้มและใส ดังภาพที่ 2(a) และส่วนของก้านขนไก่หลอม มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ สีเหลืองใส และมีแกนตรงกลาง ดังภาพที่ 2(b) สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบว่ามีส่วนประกอบที่เป็นลักษณะเฉพาะของขนไก่ป่น ได้แก่ ขนไก่หลอม มีลักษณะเป็นเส้นขนขดกันภายในดังภาพที่ 2(c) และพบขนไก่ส่วนขนอ่อน มีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ มีข้อปล้องดังภาพที่ 2(d)

จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงของตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่นสัดส่วน 10%, 5%, 1% และ 0.5% w/w แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่เตรียมได้มีความเป็นเนื้อเดียวกันจึงใช้ตัวอย่างดังกล่าวในการศึกษาในขั้นตอนถัดไป

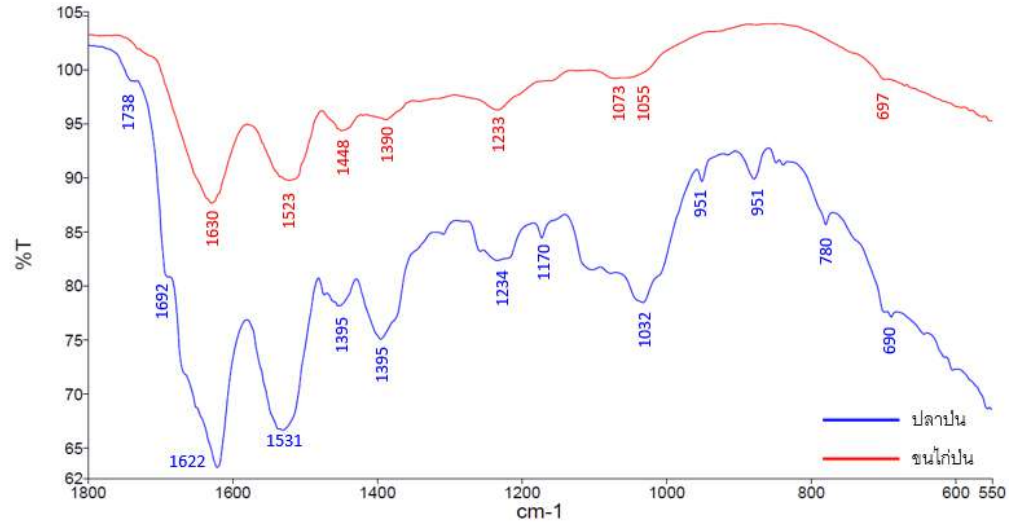
6.3 การวัดค่า %Transmittance (%T) ด้วยเครื่อง FTIR

นำตัวอย่างปลาป่นและขนไก่ป่น ที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสิ่งปลอมปน มาร่อนให้มีขนาดน้อยกว่า 250 ไมโครเมตร วัดค่า %T ด้วยเครื่อง FTIR ได้สเปกตรัมเริ่มต้น (original spectrum) ของปลาป่น (สีน้ำเงิน) และขนไก่ป่น (สีแดง) ที่ได้จากการสั่นของพันธะเคมีในย่านความยาวคลื่น 4,000–550 cm^{-1} ดังภาพที่ 3 รูปแบบของสเปกตรัมที่ได้ประกอบด้วยสเปกตรัมจากหมู่ฟังก์ชัน (functional group region) ในช่วงเลขคลื่น 4,000–1,500

cm^{-1} ใช้ระบุหมู่ฟังก์ชันต่างๆ และเลขคลื่นในช่วงประมาณ 1,500-550 cm^{-1} เป็นบริเวณที่ให้ลักษณะเฉพาะของโมเลกุล (fingerprint region) ดังรูปที่ 4



ภาพที่ 3 สเปกตรัมเริ่มต้น (original spectrum) ของปลาป่น (สีน้ำเงิน) และขนไก่ป่น (สีแดง) ที่เลขคลื่น whole region (4000-550 cm^{-1})



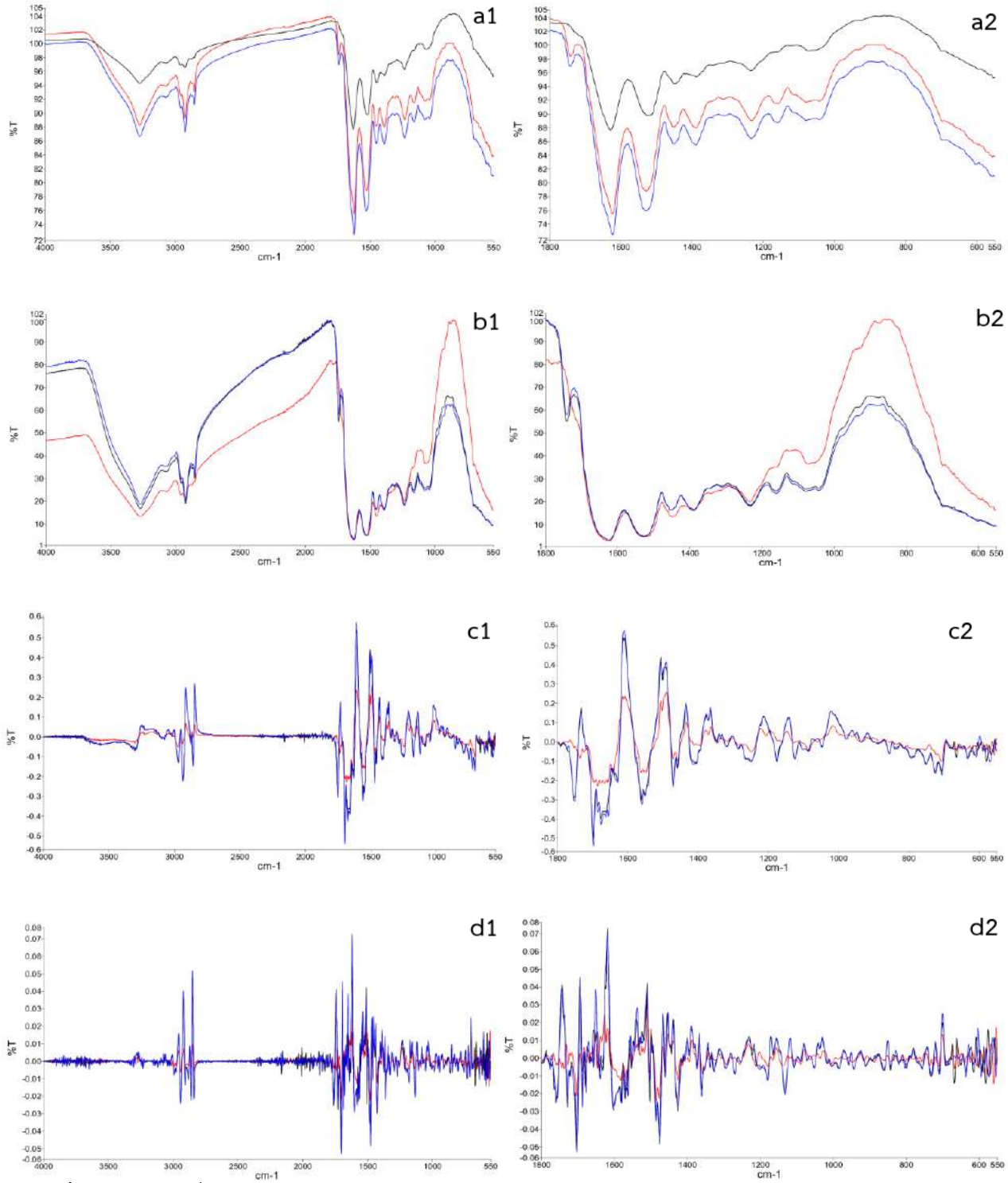
ภาพที่ 4 สเปกตรัมเริ่มต้น (original spectrum) ของปลาป่น (สีน้ำเงิน) และขนไก่ป่น (สีแดง) ที่เลขคลื่น finger print region (1800-550 cm^{-1})

จากการศึกษาสเปกตรัมของปลาป่นภาพที่ 3 และ 4 มีสัญญาณที่เกิดจากการสั่นของหมู่เอไมด์ (Amide bands) ดังนี้ การสั่นแบบยืดระหว่างพันธะ N-H (N-H stretching) ของ amide A ร่วมกับการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H (O-H stretching) ของหมู่ไฮดรอกซิล เกิดขึ้นที่ช่วง 3000-3600 cm^{-1} ที่เลขคลื่นช่วง 1738 cm^{-1} สอดคล้องกับการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O (C=O stretching) ของหมู่เอสเทอร์คาร์บอนิลในโครงสร้างไตรกลี

เซอไรด์ นอกจากนี้เลขคลื่นช่วง 1600-1700 cm^{-1} แสดงถึง amide I ซึ่งเป็นโครงสร้างโปรตีนแบบ $\propto$-helix เลขคลื่นช่วง 1500-1550 cm^{-1} แสดงถึงลักษณะเฉพาะของ amide II ซึ่งเป็นผลมาจากการสั่นแบบยืดของ C-N (C-N stretching) ที่เลขคลื่น 1395 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดแบบสมมาตรของหมู่คาร์บอกซิเลต (COO^- symmetric stretching) เลขคลื่นช่วง 1230-1240 cm^{-1} แสดงถึงการสั่นแบบยืดแบบไม่สมมาตรของหมู่ฟอสเฟต (PO_2^-) ในโมเลกุลฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) ร่วมกับสัญญาณของ amide III ซึ่งเป็นสัญญาณผสมที่เกิดจากการสั่นของพันธะ C-H และ N-H ในโครงสร้างของโปรตีน เลขคลื่นที่ 1170 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดแบบไม่สมมาตรของพันธะ C-O-C (C-O-C asymmetric stretching) ในหมู่เอสเทอร์ของไขมัน และเลขคลื่นที่ประมาณ 1080 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดแบบสมมาตรของหมู่ PO_2^- ร่วมกับการสั่นของพันธะ C–C และ C–O ที่พบในโมเลกุลของไขมันและโปรตีน

จากการศึกษาสเปกตรัมของขนไก่ป่น พบว่าเลขคลื่นช่วง 3000-3600 cm^{-1} สอดคล้องกับ O-H stretching และ N-H stretching ของ amide A นอกจากนี้เลขคลื่นช่วง 1600-1700 cm^{-1} แสดงถึงการสั่นแบบยืดของ C=O amide I ของหมู่คาร์บอนิลในพันธะเพปไทด์ซึ่งเป็นโครงสร้างโปรตีนแบบ $\propto$-helix เช่นเดียวกับปลาป่น เลขคลื่นช่วง 1500-1550 cm^{-1} แสดงถึงลักษณะเฉพาะของ amide II ซึ่งเป็นผลมาจากการสั่นแบบยืดของ C-N จากเคราติน และการสั่นแบบงอในระนาบของ N-H (N-H in-plane bending) จากโครงสร้างโปรตีนแบบ β-sheet ช่วง 1200-1330 cm^{-1} เป็นการสั่นแบบรวมระหว่างการสั่นแบบยืดของ C-N (C-N stretching) และการสั่นแบบงอในระนาบของ N-H (N-H in-plane bending) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ amide III ในโครงสร้างโปรตีนแบบ β-sheet ซึ่งมีมากในโปรตีนจากส่วนของก้านขนไก่ นอกจากนี้เลขคลื่นช่วง 1050-1150 cm^{-1} สอดคล้องกับ C-C links และช่วง 500-730 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ C-S

จากข้อมูล original spectrum ของปลาป่น ขนไก่ป่น และปลาป่นผสมขนไก่ป่น ในภาพที่ 5(a1) และ 5(a2) ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะและแสดงผลออกมาในรูปของสเปกตรัมสามารถบ่งชี้หมู่ฟังก์ชันหลายหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นองค์ประกอบหลักภายในตัวอย่าง เนื่องจากสเปกตรัมของปลาป่นและขนไก่ป่นมีองค์ประกอบหลักเป็นโปรตีนเหมือนกันอาจมีเลขคลื่นอยู่ในช่วงเดียวกันได้ สเปกตรัมของปลาป่นผสมขนไก่ป่นอาจมีการสั่นของหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นองค์ประกอบในปลาป่นซ้อนทับกับหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นองค์ประกอบในขนไก่ป่น ดังนั้นจึงใช้การปรับข้อมูลสเปกตรัมสำหรับแยกกลุ่มระหว่างปลาป่นและขนไก่ป่นในรูปแบบต่างๆ โดยนำข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมดของปลาป่น ขนไก่ป่น และปลาป่นผสมขนไก่ป่น ที่ได้จาก original spectrum ในช่วงเลขคลื่น whole region (4000-550 cm^{-1}) และ fingerprint region (1,800-550 cm^{-1}) ดังภาพที่ 5(a1) และ 5(a2) ตามลำดับ มาทำการปรับข้อมูลโดยปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานหรือ standard normalization variate (SNV) แสดงผลสเปกตรัมดังภาพที่ 5(b1) และ 5(b2) แปลงอนุพันธ์ลำดับที่ 1 แสดงผลสเปกตรัมดังภาพที่ 5(c1) และ 5(c2) และแปลงอนุพันธ์ลำดับที่ 2 แสดงผลสเปกตรัมดังภาพที่ 5(d1) และ 5(d2) ตามลำดับ เพื่อให้ผลการทำนายมีประสิทธิภาพสูงสุด



ภาพที่ 5 สเปกตรัมเริ่มต้น (original spectrum) (a1, a2) สเปกตรัมหลังจากปรับด้วยวิธี SNV (b1, b2) สเปกตรัมหลังจากปรับด้วยวิธีแปลงอนุพันธ์ลำดับที่หนึ่ง (c1, c2) และสเปกตรัมหลังจากปรับด้วยวิธีแปลงอนุพันธ์ลำดับที่สอง (d1, d2) ที่เลขคลื่น whole region (4000-550 cm^{-1}) และ fingerprint region (1,800-550 cm^{-1}) ของปลาป่น (สีน้ำเงิน) ขนไก่ป่น (สีแดง) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีดำ)

6.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและการวิเคราะห์การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (PLS)

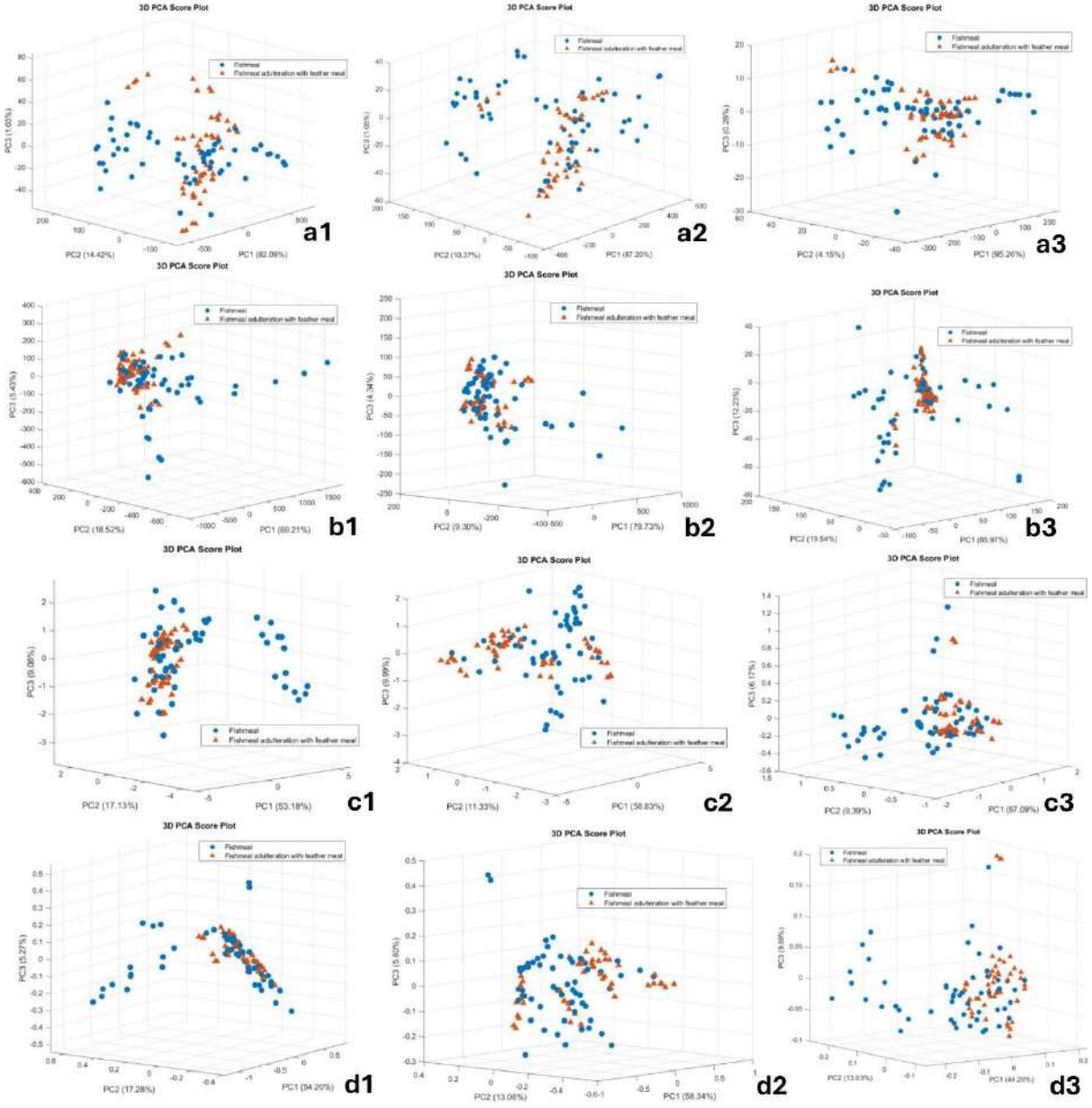
การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักด้วยโปรแกรม MATLAB R2020a เพื่อประเมินข้อมูลและตรวจสอบการกระจายตัวของข้อมูลสเปกตรัมในแต่ละสภาวะของการปรับสเปกตรัมร่วมกับการเลือกช่วงเลขคลื่นของปลาป่น (สีน้ำเงิน) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) ผลที่ได้ดังภาพที่ 6 และตารางที่ 5 ผลที่ได้มีดังนี้

ตารางที่ 5 Principle component จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MATLAB R2020a แต่ละ condition

Pretreatment	Spectrum region	condition	Principle component (%)			
			PC1	PC2	PC3	Total PC
a) Original spectrum	Whole	a1	82.09	14.42	1.03	97.54
	Fingerprint	a2	87.20	10.37	1.35	98.92
	Marker	a3	95.26	4.15	0.28	99.69
b) Standard normalization variate	Whole	b1	69.21	18.52	5.43	93.16
	Fingerprint	b2	79.73	9.30	3.43	92.46
	Marker	b3	65.97	19.54	12.23	97.74
c) 1^{st} derivative	Whole	c1	53.18	17.13	9.86	80.17
	Fingerprint	c2	58.83	11.33	9.99	80.15
	Marker	c3	67.09	9.39	6.17	82.65
d) 2^{nd} derivative	Whole	d1	54.20	17.28	5.27	76.75
	Fingerprint	d2	58.34	13.08	5.80	77.22
	Marker	d3	44.28	13.63	8.69	66.60

ผลของ original spectrum (a) พบว่าสเปกตรัมให้ค่า explained variance ของ PC1-PC3 ในระดับสูงทั้ง 3 ช่วงคลื่นที่ทำการวิเคราะห์เท่ากับ 97.54%, 98.92 และ 99.69% ตามลำดับ ซึ่งช่วงคลื่น selected spectral regions ให้ค่า PC1 สูงถึง 95.26% แสดงว่าความแปรปรวนส่วนใหญ่ของสเปกตรัมใน selected spectral regions สามารถอธิบายได้ด้วย PC1 เพียงองค์ประกอบเดียว เมื่อพิจารณา score plot ดังภาพที่ 6 (a1-a3) พบว่ายังไม่สามารถแยกกลุ่มระหว่างสเปกตรัมของปลาป่น (สีน้ำเงิน) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ขณะที่การปรับสเปกตรัมแบบ SNV (b1-b3) พบว่าค่า explained variance มีการเปลี่ยนแปลงจากสเปกตรัมเดิมอย่างชัดเจน ซึ่งการปรับแบบ SNV นี้ทำให้ความแปรปรวนของข้อมูลกระจายไปยัง PC2 และ PC3 มากขึ้นโดยเฉพาะใน selected spectral regions การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับหลักการของ spectral preprocessing ที่มีผลต่อโครงสร้างข้อมูล multivariate ซึ่งอาจเปลี่ยนตำแหน่งของข้อมูลที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มได้ (Loong Chuen Lee et al, 2017) จากภาพที่ 6 (b1-b3) สเปกตรัมของปลาป่น (สีน้ำเงิน) มี

การกระจายตัวค่อนข้างกว้าง ขณะที่ปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) มีแนวโน้มรวมตัว แต่ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน

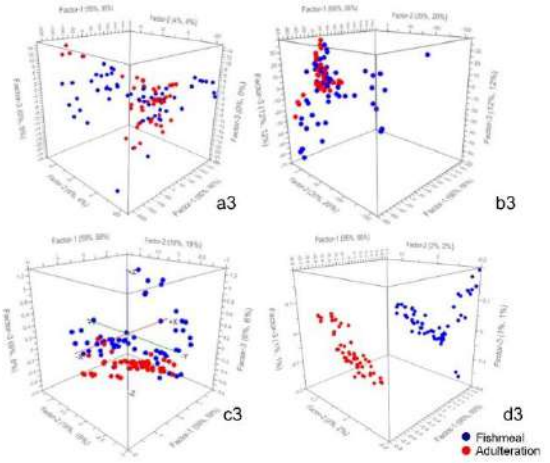


ภาพที่ 6 Score plot ของแต่ละ condition จากโปรแกรม MATLAB R2020a ระหว่างปลาป่น (สีน้ำเงิน) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง)

หมายเหตุ Pretreatment spectrum condition ได้แก่ a. คือ original spectrum, b. ปรับแบบ standard normalization variate , c. อนุพันธ์อันดับที่ 1 และ d. อนุพันธ์อันดับที่ 2 ร่วมกับช่วงเลขคลื่นที่ใช้คือ 1 คือ whole region (4,000-550 cm-1), 2 คือ fingerprint region (1,800-550 cm-1) และ 3 คือ selected spectral regions (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1})

การปรับแบบอนุพันธ์ลำดับที่ 1 (c1-c3) ทำให้โครงสร้างการกระจายตัวของข้อมูลสเปกตรัมเปลี่ยนแปลงจาก original spectrum และ SNV อย่างชัดเจนซึ่งการปรับแบบอนุพันธ์สามารถเปลี่ยนรูปแบบการกระจายของข้อมูลสเปกตรัมและช่วยลดผลกระทบจาก baseline variation พร้อมทั้งเพิ่มความเด่นชัดของการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมให้ละเอียดมากยิ่งขึ้น (P. Oliveri et, al, 2018) จากภาพที่ 6 (c3) ซึ่งเป็นการปรับแบบอนุพันธ์ลำดับที่ 1 ร่วมกับการใช้เลขคลื่น selected spectral regions พบว่ามีแนวโน้มการกระจายตัวของสองกลุ่มแตกต่างค่อนข้างชัดเจน โดยกลุ่มของปลาป่น (สีน้ำเงิน) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) มีแนวโน้มกระจายตัวแยกออกจากกัน แม้ว่ายังคงพบการซ้อนทับกันของข้อมูลบางส่วน ซึ่งอาจเกิดจากการเลือก selected spectral regions อาจยังไม่มีความจำเพาะที่เพียงพอ จึงยังมีข้อมูลสเปกตรัมที่ยังมีความเกี่ยวข้องกัน ขณะที่การปรับแบบอนุพันธ์ลำดับที่ 2 (d1-d3) พบว่ามีค่า explained variance เท่ากับ 76.75%, 77.22% และ 66.60% ตามลำดับ โดยเฉพาะ d3 ซึ่งมีค่าต่ำสุดที่สุด แสดงว่าความแปรปรวนของข้อมูลไม่ได้ถูกรวมอยู่ใน PC1-PC3 มากเท่ากับข้อมูลของ original spectrum อย่างไรก็ตาม score plot ดังภาพที่ 6 (d1-d3) การกระจายตัวของปลาป่น (สีน้ำเงิน)ที่กระจายตัวกว้างกว่ากลุ่มของปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) และมีแนวโน้มที่แยกออกจากกันแต่ก็ยังไม่ชัดเจนเช่นเดียวกับการปรับแบบอนุพันธ์ลำดับที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบช่วงเลขคลื่นพบว่า selected spectral regions ให้ผลที่แตกต่างจาก whole region และ fingerprint region อย่างชัดเจน โดยเฉพาะ original spectrum (a3) ที่มี explained variance ของ PC1-PC3 สูงถึง 99.69% แสดงว่าช่วงเลขคลื่นดังกล่าวสามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลสเปกตรัมได้เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่การปรับแบบอนุพันธ์ลำดับที่ 1 รวมกับการเลือกช่วง selected spectral regions (c3) สามารถแยกกลุ่มระหว่างปลาป่น (สีน้ำเงิน) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) ออกจากกัน แม้ว่าจะมีบางข้อมูลที่ยังไม่สามารถแยกกออกจากกันได้ ถึงแม้ว่าค่า explained variance จะลดลงเหลือประมาณ 82.65% ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปรับแบบอนุพันธ์ช่วยให้สเปกตรัมที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างระหว่างปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นมีความชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้ PCA เป็น unsupervised exploratory analysis ดังนั้นการเห็นกลุ่มแยกกันใน PCA ไม่ได้หมายความว่ามี classification accuracy สูงโดยอัตโนมัติ จึงเลือกเลขคลื่นในช่วง selected spectral regions ของสเปกตรัมทั้ง 4 condition คือ a3, b3, c3 และ d3 มาวิเคราะห์ PLS ด้วยโปรแกรม Unscramble X ผลที่ได้ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 Score plot ของ principal component ในการแยกกลุ่มระหว่างปลาป่น (สีน้ำเงิน) และปลาป่นผสมขนไก่ป่น (สีแดง) หมายเหตุ Pretreatment spectrum condition ได้แก่ a. คือ original spectrum, b. ปรับแบบ standard normalization variate , c. อนุพันธ์อันดับที่ 1 และ d. อนุพันธ์อันดับที่ 2 ร่วมกับช่วงเลขคลื่นที่ใช้ช่วงเดียวคือ 3 = selected spectral regions (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1})

เมื่อสร้างสมการในการทำนายการแยกกลุ่มปลาป่นที่มีการผสมขนไก่ป่นออกจากปลาป่น จากข้อมูลสเปกตรัมที่มีการปรับร่วมกับการเลือกเลขคลื่นในการสร้างสมการด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component) ผลที่ได้ดังภาพที่ 7 พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีการผสมปลาป่น (สีแดง) มีการแยกกลุ่มออกจากกลุ่มของปลาป่นในสภาวะที่มีการปรับข้อมูลแบบอนุพันธ์ดังภาพที่ 6 (d3) ในขณะที่ข้อมูลสเปกตรัมเริ่มต้นที่ไม่มีการปรับปลาป่นผสมขนไก่ป่นและปลาป่นกระจายรวมกลุ่มกันไม่สามารถแยกกลุ่มได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 6 ค่าสถิติของการสร้างสมการ PLS จากการปรับสเปกตรัมและเลขคลื่น selected spectral regions (MR) เลขคลื่นระหว่าง 1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1}

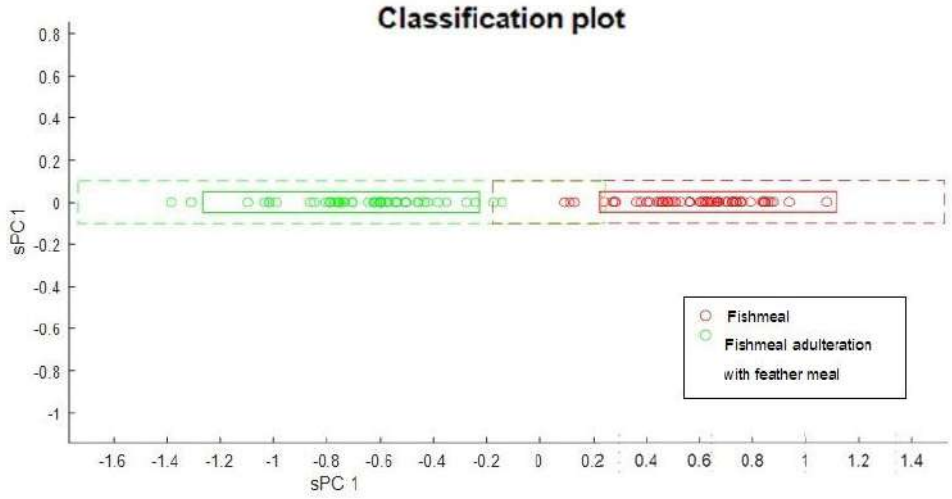
Pretreatment	Spectrum region	condition	Statistical result of PLS model (n=108)	
			RMSE	R-square
Original spectrum	MR	a3	0.4371635	0.2331866
Standard normalization variate	MR	b3	0.4428698	0.2130372
1^{st} derivative	MR	c3	0.0032741	0.999957
2^{nd} derivative	MR	d3	0.0009871	**0.999961**

เช่นเดียวกับค่าสถิติที่ได้จากการคำนวณสมการดังตารางที่ 6 ค่า R-square จากข้อมูลการปรับสเปกตรัมแบบอนุพันธ์ร่วมกับการเลือกช่วงเลขคลื่น selected spectral regions (c3, d3) ให้ค่าที่สูงกว่าสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับ และสภาวะการปรับสเปกตรัมแบบอนุพันธ์ลำดับที่สองให้ค่า R-square สูงที่สุดเท่ากับ 0.999961 จึงสรุปได้ว่าสภาวะที่ให้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและการสร้างสมการสำหรับทำนายการแยกกลุ่มระหว่างสเปกตรัม

จากปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นที่ดีที่สุดคือ การปรับข้อมูลสเปกตรัมแบบอนุพันธ์ลำดับที่สองร่วมกับการเลือกเลขคลื่นที่ selected spectral regions (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1})

6.5 การสร้างรูปแบบการทำนายด้วยวิธี Partial least square discrimination (PLS-DA)

นำข้อมูลสเปกตรัมที่ให้ข้อมูลการแยกกลุ่มที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 6.4 มาสร้างรูปแบบการจำแนกและทดสอบรูปแบบการจำแนกโดยวิธี PLS-DA ด้วยโปรแกรม MATLAB R2020a (PLS-DA GUI) ผลจากการคำนวณแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากข้อมูลสเปกตรัมที่มีการปรับแบบอนุพันธ์ลำดับที่สองร่วมกับการเลือกข้อมูลเลขคลื่น selected spectral regions (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1}) ด้วยวิธี PLS-DA ได้ผลดังภาพที่ 8 ตารางที่ 7 และตารางที่ 8



ภาพที่ 8 Classification plot ระหว่างปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นจากการวิเคราะห์ด้วย PLS-DA

จากภาพที่ 8 องค์ประกอบหลัก (principle component) ที่ใช้ในการจำแนกกลุ่ม ใช้องค์ประกอบหลักเพียงองค์ประกอบเดียวที่ให้ค่าสัมพันธ์ในการแยกกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มออกจากกันมากที่สุด พบว่าข้อมูลสเปกตรัมที่ใช้สร้างแบบจำลอง แยกกลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจน (สีเขียวและสีแดง) แต่ยังมีสเปกตรัมบางข้อมูลที่อยู่ในช่วงระดับความเชื่อมั่น 95% (เส้นประ) ที่อยู่คาบเกี่ยวระหว่างกลุ่ม

ตารางที่ 7 Confusion matrix ของ calibration model ระหว่างปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นจากการวิเคราะห์ด้วย PLS-DA

Class	Confusion matrix	
	ปลาป่น (n=57)	ปลาป่นผสมขนไก่ป่น (n=51)
ปลาป่น	**54**[a]	0
ปลาป่นผสมขนไก่ป่น	0	**47**[a]

[a] **ตัวหนา** หมายถึง จำนวนข้อมูลสเปกตรัมที่ทำนายกลุ่มของตัวอย่างได้ถูกต้อง

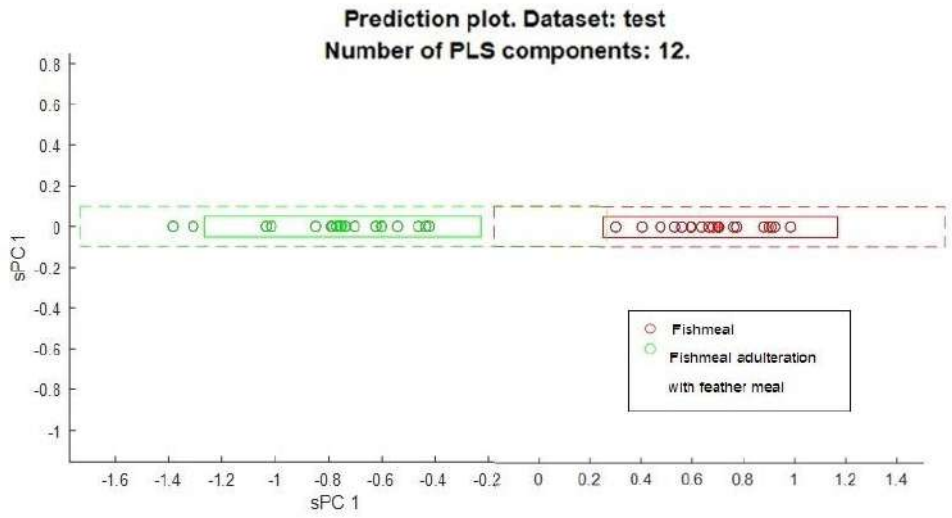
จากตารางที่ 7 แบบจำลองดังกล่าวสามารถทำนายกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างแบบจำลองได้อย่างถูกต้องโดยมี class specificity อยู่ที่ 100% ทั้งสองกลุ่ม แต่พบว่ามีข้อมูลสเปกตรัมที่เป็น outlier ถูกตัดออกไม่นำมาใช้ในการคำนวณจำนวน 7 สเปกตรัม (ปลาป่น 3 สเปกตรัมจากทั้งหมด 57 สเปกตรัม ปลาป่นผสมขนไก่ป่นจำนวน 4 สเปกตรัมจากทั้งหมด 51 สเปกตรัม) ส่งผลต่อค่า class sensitivity ของทั้งกลุ่มปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นอยู่ที่ 95 และ 92 ตามลำดับดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าทางสถิติของ calibration model ระหว่างปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นจากการวิเคราะห์ด้วย PLS-DA

Classes	Figures of metrit of	
	ปลาป่น (n=57)	ปลาป่นผสมขนไก่ป่น(n=51)
True positive	54	47
False positive	0	0
Class sensitivity (%)	95	92
Class specificity (%)	100	100
Class efficiency (%)	97	96
Total sensitivity (%)	94	
Total specificity (%)	100	
Total efficiency (%)	97	

จากตารางที่ 8 แบบจำลองดังกล่าวให้ผลการทำนายในขั้นตอนการสร้างสมการหรือ calibration model มีความจำเพาะต่อกลุ่มของตัวอย่างโดยรวม (total specific) อยู่ที่ 100% ในขณะที่ค่า total sensitivity อยู่ที่ 94%

เมื่อใช้แบบจำลองดังกล่าวทำนายสเปกตรัมของปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นอย่างละ จำนวน 20 ข้อมูลสเปกตรัม ผลการทำนายดังภาพที่ 9 และตารางที่ 9



ภาพที่ 9 Prediction plot จากการทำนายด้วยแบบจำลองที่ได้

ตารางที่ 9 ค่าทางสถิติของ prediction model ระหว่างปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นจากแบบจำลองที่ได้

Classes	Figures of metrit of	
	ปลาป่น (n=20)	ปลาป่นผสมขนไก่ป่น(n=20)
True positive	20	18
False positive	0	0
Class sensitivity (%)	100	90
Class specificity (%)	100	100
Class efficiency (%)	100	95
Total sensitivity (%)	95	
Total specificity (%)	100	
Total efficiency (%)	97	

จากตารางที่ 9 แบบจำลองดังกล่าวสามารถทำนายกลุ่มทดสอบได้อย่างถูกต้อง โดยสามารถทำนายสเปกตรัมของปลาป่นได้ถูกต้องทั้ง 20 ข้อมูลสเปกตรัม มี class efficiency อยู่ที่ 100% ขณะที่ข้อมูลสเปกตรัมปลาป่นผสมขนไก่ป่นทำนายถูกต้อง 18 ข้อมูลสเปกตรัม มี class efficiency อยู่ที่ 95% โดยภาพรวมแบบจำลองดังกล่าวสามารถใช้ทำนายข้อมูลสเปกตรัมของปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นได้ โดยมีค่า Total specification, Total sensitivity และ Total efficiency เท่ากับ 100%, 95% และ 97% ตามลำดับ

7. สรุปผลการทดลอง

จากการเตรียมตัวอย่างปลาป่นผสมขนไก่ป่นที่ระดับการปลอมปนสัดส่วนระหว่าง 0.5 – 10% (w/w) ด้วยวิธี gradual mixing 2-fold dilution และนำตัวอย่างที่เตรียมได้วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FT-IR ที่มี UATR (Universal-Attenuated total reflectance) เปรียบเทียบกับปลาป่นที่ไม่มีการผสมด้วยวิธีการทางเคโมเมตริกซ์ โดยการวิเคราะห์ multiple variance partial least squares regression โดยเปรียบเทียบการไม่ปรับข้อมูลสเปกตรัมและปรับข้อมูลแบบปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน ปรับอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง ร่วมกับการเลือกเลขคลื่นแบบ whole region (4,000-550 cm^{-1}) fingerprint region (1,800-550 cm^{-1}) และ selected spectral regions (1,600-1,500, 1,350-1,300 และ 680-600 cm^{-1}) นำค่า %transmittance แต่ละเลขคลื่นของทุกตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบหลักเพื่อจำแนกกลุ่มและสร้างสมการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดเพื่อเปรียบเทียบสภาวะการแยกกลุ่มที่ดีที่สุด

พบว่าการปรับข้อมูลสเปกตรัมแบบอนุพันธ์อันดับสองร่วมกับการใช้เลขคลื่น selected spectral region ให้ผล score plot และค่า R-square สูงสุดเท่ากับ 0.999961 จึงเลือกสภาวะดังกล่าวสร้างแบบจำลองด้วยวิธี Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) และประเมินโดยวิธี soft independent modeling by class analogy (SIMCA) แสดงผลในรูปของตาราง confusion matric และ figures of metrit โดยมีค่า total sensitivity, total specificity และ total efficiency พบว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากสภาวะดังกล่าวให้ผลการประเมินเท่ากับ 94%, 100% และ 97% ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างสเปกตรัมเข้าทำนายด้วยแบบจำลองดังกล่าว พบว่าแบบจำลองดังกล่าวสามารถทำนายสเปกตรัมปลาป่นและปลาป่นผสมขนไก่ป่นถูกต้องโดยมีค่า total sensitivity, total specificity และ total efficiency เท่ากับ 95%, 100% และ 97% ตามลำดับ

8. ข้อเสนอแนะ

วิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้สามารถเตรียมตัวอย่างสิ่งปลอมปนในปลาป่นให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมตัวอย่างสิ่งปลอมปนในอาหารสัตว์ในการทดสอบบุคลากรห้องปฏิบัติการต่อไป

จำนวนตัวอย่างของวัตถุดิบที่ใช้ในการสร้างฐานข้อมูลควรมีการจำแนกแหล่งที่มา และคุณสมบัติเบื้องต้นของวัตถุดิบ เนื่องจากส่งผลต่อคุณภาพของสเปกตรัมหลังจากการวัด ซึ่งข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวจะช่วยในการจัดจำแนกคุณสมบัติเบื้องต้นของวัตถุดิบชนิดนั้นๆ เนื่องจากข้อมูลสเปกตรัมของวัตถุดิบปลาป่นที่ได้จากการทำ principle component analysis มีการกระจายตัวค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณภาพของตัวอย่างเองหรือสภาวะของเครื่องมือในช่วงเวลาดังกล่าวได้ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งถัดไปควรใช้จำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้นเพื่อให้ครอบคลุมปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของสเปกตรัมที่ได้

ในการศึกษาครั้งถัดไปในขั้นตอนการเลือก selected spectral region ควรพิจารณาในขั้นตอนการทำ PCA ประกอบด้วยเนื่องจากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับ pretreatment สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ด้วยองค์ประกอบ PC1-PC3 ได้สูง แต่ในขณะเดียวกัน เมื่อมีการปรับด้วย pretreatment พบว่าองค์ประกอบหลัก

สามารถอธิบายความแปรปรวนของสเปกตรัมได้ต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากการเลือกช่วงเลขคลื่นที่เป็น selected spectral region ที่ยังไม่สามารถอธิบายความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มที่ศึกษาได้ดีเท่าที่ต้องการ

9. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณนายจิรภัทร อินทร์สุข ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และนางสาวรวยรินทร์ นาคประดิษฐ์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวก และดำเนินการเตรียมตัวอย่างสำหรับนำมาทดสอบ ขอขอบคุณงานพิษวิทยาและชีวเคมี (งานสารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์การเตรียมตัวอย่าง และขอขอบคุณบุคลากรงานกายภาพ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในครั้งนี้ ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเสมอมา

10. เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ และคณะ. (2559). *การประเมินคุณภาพและการตรวจการปลอมปนในปลาป่นที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์.* สัตวแพทย์มหานครสาร, 11(*2*), 91–100.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2558). *ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558*. ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 132, ตอนพิเศษ 322ง, หน้า 5–12.

แพรวพรรณ ห้องทองแดง และดรุณี กอเซาะ. (2542). *คู่มือการตรวจวิเคราะห์อาหารสัตว์ทางกล้องจุลทรรศน์ เล่ม 1 : วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีน*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. (2560). *คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ด้วยกล้องจุลทรรศน์* (พิมพ์ครั้งที่ 3). โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

AOAC International. 2023. *Official Methods of Analysis*, 22nd ed. Method 970.09.

Bureau, D. P., Harris, A. M., & Cho, C. Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 180(*1-2*), 183-193.

Čapla, J. *et al.* (2020). Procedures for the identification and detection of adulteration of fish and meat products. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 978–994.

FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

Gao, F., Zhou, S., Yang, Z., Han, L., & Liu, X. (2017). Study on the characteristic spectral properties for species identification of animal-derived feedstuff using Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy,* 71(*11*), 2446–2456.

Gong, Y., Chen, X. and Wu, W. (2024). Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in sample preparation: Material Characterization and mechanism investigation. *Advances in Sample Preparation*, 11, 100122.

Hernández-Martínez, M., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Almaraz-Abarca, N., & Castañeda-Pérez, E. (2014). Application of MIR-FTIR spectroscopy and chemometrics to the rapid prediction of fish fillet quality. *CyTA - Journal of Food*, 12(*4*), 369–377.

Hibbert, DB. (2016). Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendation 2016). *Pure and Applied Chemistry.* 88(*4*), 407–443.

Irnawati, I. *et al.* (2023). Rapid detection of tuna fish oil adulteration using FTIR-ATR spectroscopy and chemometrics for Halal Authentication. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 13(*4*), 231–239.

Mahdabi, M. and Hosseini Shekarabi, S.P. (2018). A comparative study on some functional and antioxidant properties of Kilka meat, fishmeal, and Stickwater protein hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(*7*), 844–858.

Tesfaye, T., Sithole, B., Ramjugernath, D., & Chunilall, V. (2017). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of physical properties and morphological structure. *Journal of Cleaner Production*, 149, 349–365.

Tesfaye, T., Sithole, B., Ramjugernath, D., & Chunilall, V. (2017). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. *Waste Management*, 68, 626–635.