

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

- เครื่อง Near infrared spectroscopy (Foss NIR system) Model 6500
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) ATAGO Model PR101
- เครื่องติดเทรา (Burette digital DB) Model SLAMED
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (PB-20 Sartorius)
- เครื่องซั่งไฟฟ้าจุดเทคนิค 4 ตำแหน่ง PB150
- ชุดเครื่องแก้ว
- กล้องถ่ายรูป

#### 3.2 สารเคมี

Sodium hydroxide (NaOH) 0.1 N

#### 3.3 การเตรียมตัวอย่างสัมทิ้งทดสอบ

ผลสัมภាមานที่นำมาทำการทดลองเป็นพันธุ์สายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งได้มาจากแหล่งปลูกใน  
อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

#### 3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### 3.5 วิธีวิจัยและการบันทึกผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบคุณภาพผลส้มพันธุ์ล้ายน้ำผึ้ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

#### 3.5.1 การตรวจสอบคุณภาพด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy (NIRS)

##### 1. ตัวอย่างผลส้มส้มเขียวหวานที่ใช้ทดสอบ

ส้มเขียวหวานพันธุ์ล้ายน้ำผึ้งเกรด A ไม่มีตำหนิ สีผิวมีสีเหลืองทั้งผล ไม่มีรอยด่าง ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.1 ส้มเกรด B ลักษณะผิวมีรอยตำหนิ สีผิวสีเขียวปนเหลือง มีรอยด่างเล็กน้อย ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.2 ผลส้มที่นำมาทดลองผ่านการเคลือบผิว เพื่อป้องกันการคายน้ำ และขนาดที่นำมาทดลองมีอยู่ 5 ขนาด (ตามโครงคัดบริษัทเรียงใหม่มากร) ดังนี้ เบอร์ 3 เส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร เบอร์ 4 เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร เบอร์ 5 เส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร เบอร์ 6 เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร และ เบอร์ 7 เส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร



ภาพที่ 3.1 ส้มเขียวหวานพันธุ์ล้ายน้ำผึ้ง เกรด A



ภาพที่ 3.2 ต้มเขียวหวานพันธุ์สายนำ้ผึ้ง เกรด B

ต้มเขียวหวานพันธุ์สายนำ้ผึ้งต้องนำมาไว้ในห้องที่มีการควบคุมให้ได้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษา Kawano,1993 พบว่า อุณหภูมิของตัวอย่างความมีการปรับอุณหภูมิของผลิตผลที่ 25 องศาเซลเซียส เพื่อจะมีผลต่อลักษณะสีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ตัวอย่างที่วัดได้ถ้าวัดในขณะที่มีอุณหภูมิต่างกัน ก็จะได้สีเปลี่ยนที่ต่างกัน หากนำตัวอย่างไปหาปริมาณ โดยคำนวณหาความต้มพันธุ์จากสมการประmenิคทางเคมีที่มีถูกว่าอุณหภูมิต่างกัน ผลการวิเคราะห์ที่ได้ก็จะเกิดการเบี่ยงเบน

#### 1. การวัดสเปกตรัม

การวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy (NIRS) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 เครื่อง Near Infrared Spectroscopy (NIRS) Model NIRS FOSS 6500

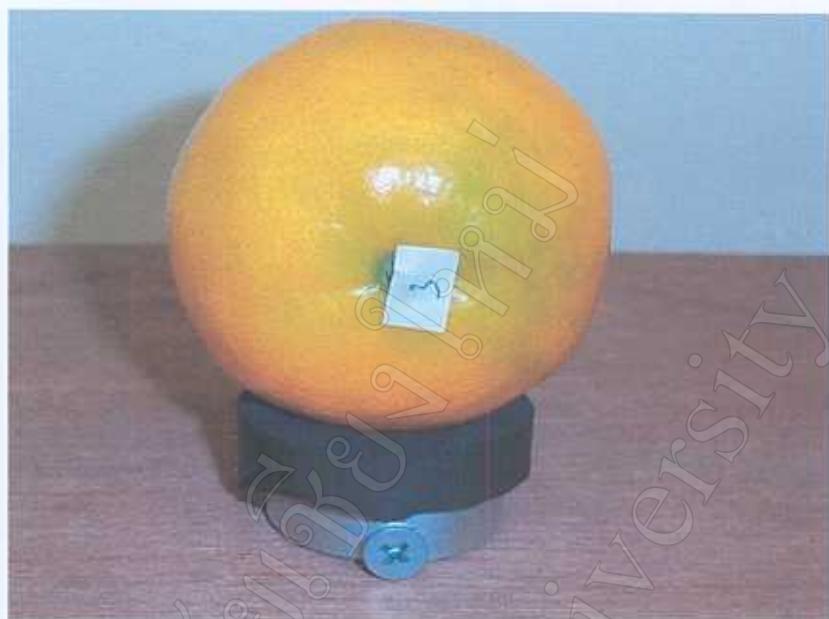
การวัดจะใช้ช่วงแสงที่มีช่วงความยาวคลื่น ตั้งแต่ 700-1100 nm ซึ่งเป็นช่วงคลื่นสั้นโดยมีค่าความยาวคลื่นห่างกันค่าละ 2 nm ช่วงคลื่นสั้นนี้สามารถเข้าไปในผลลัมได้ลึกกว่าช่วงคลื่นยาว และการวัดในช่วงคลื่นนี้ไม่มีผลต่อสิ่งของผลลัม เนื่องจากช่วงที่มีผลต่อสิ่งอยู่ในช่วงวิสิบิล (visible) ที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-600 nm (นิพนธ์, 2545) การวัดใช้ fiber-optic probe ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.4 ซึ่งวัดแบบ interaction การวัดจะทำการวัดผลลัมทั้งผลนี้เปลือก และวัดผลลัมทั้งผลที่ปอกเปลือก ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.5 โดยวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง ต่อผล ดังตัวอย่างสเปกตรัมแสดงไว้ในภาพที่ 3.6 จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางเคมีทันที



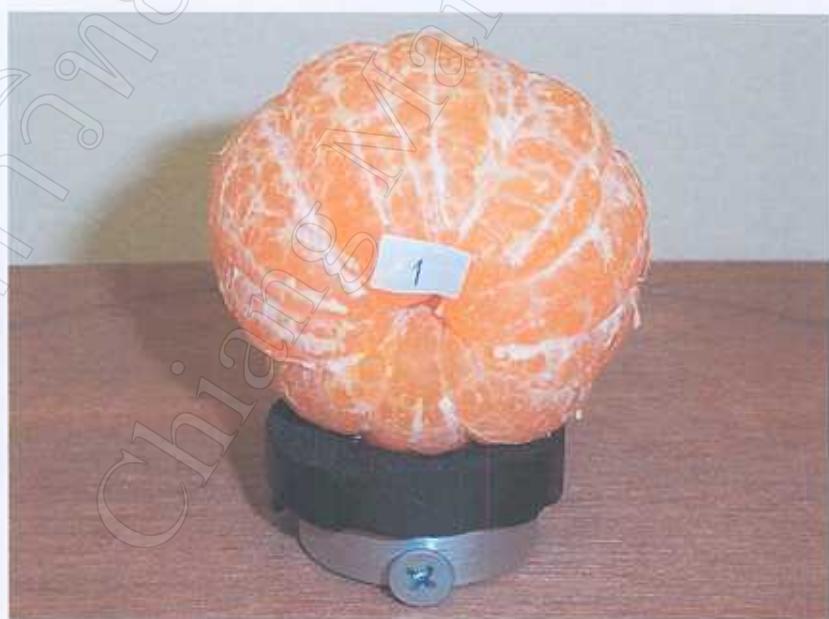
(ก)



ภาพที่ 3.4 (ก) เครื่อง NIRS และสาย fiber-optic (ก) fiber-optic probe

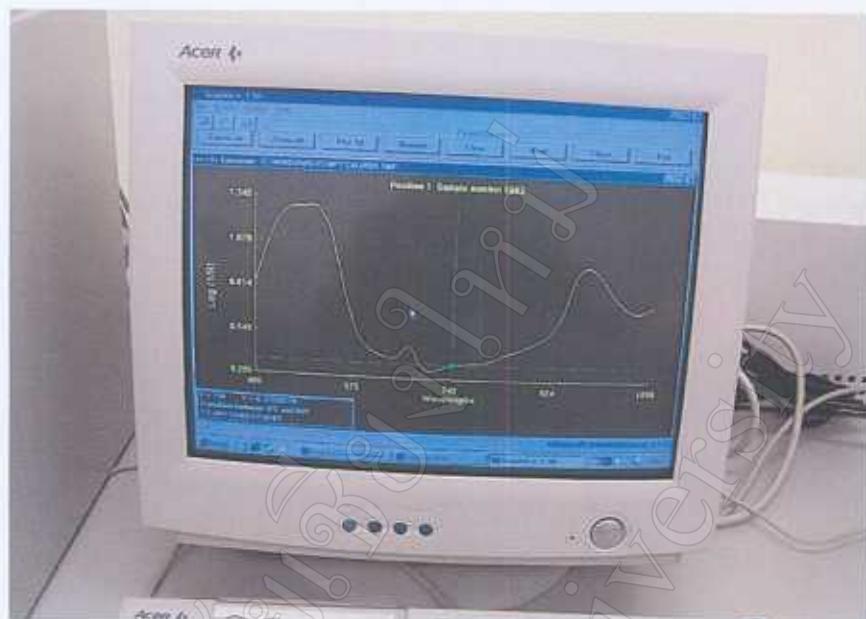


(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.5 การวางแผนเพื่อวัดผลเบเกตซิม (ก) วัดผลส้มมีเปลือก(ข) วัดผลส้มปอกเปลือก



ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างของสเปกตรัมในขณะที่วัด

### 3. การวัดคุณภาพทางเคมี

3.1 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid, TSS) ด้วย Digital refractometer ก่อนวัดให้น้ำกลั่นปรับค่าสเกลให้เป็นศูนย์ก่อน จากนั้นนำน้ำคั้นของผลส้มเขียวหวานอ่อนค่าที่ได้เป็นค่า % Brix ซึ่งการวัดและอ่านค่าทำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.2 การวัดปริมาณกรดที่ได้เทราได้ (titratable acidity, TA) ในรูปของกรดซิตริก (citric acid)\*\*\*\* โดยนำน้ำคั้นที่เตรียมไว้ปริมาณ 5 มิลลิลิตรใส่ลงในบิกเกอร์เติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร การได้เทราด้วยสารละลาย 0.1 N (NaOH) โดยใช้เครื่อง pH meter วัดจนสารละลายมีความเป็นด่างมีค่าเท่ากับ 8.2 แล้วจึงนำปริมาณสารละลาย 0.1 N (NaOH) ที่ใช้มาคำนวณหาปริมาณกรดที่ได้เทราได้ มีหน่วยเป็นเบอร์เซ็นต์ ซึ่งในการวัดและอ่านค่าทำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ดังสมการที่ 3.1

$$\% \text{ Titratable acidity} = \frac{(\text{ml NaOH})(\text{N NaOH}) (\text{meg.wt.acid}) * 100}{\text{ml sample}} \quad (3.1)$$

\*\*\*\*(meg.wt.acid) citric acid = 0.064

#### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ

##### 4.1 การสร้างสมการ calibration ที่ใช้ทำนายค่าทางเคมี โดยขั้นตอน

การทำสมการ calibration จำเป็นต้องมีการเก็บตัวอย่าง (collecting sample) ที่นำมาวิเคราะห์อย่างเพียงพอ การเตรียมตัวอย่างนั้นจะต้องมีลักษณะอย่างเดียวกันกับตัวอย่างที่จะนำเครื่อง Near Infrared Spectroscopy มาใช้ต่อไป ในการทดลองนี้เป็นข้อมูลทางเคมีของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสมการ calibration ซึ่งเป็นปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) และปริมาณกรดที่ได้เทราท์ได้ (TA) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลค่าทางเคมีของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสมการ calibration

	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้(TSS)		ปริมาณกรดที่ได้เทราท์ได้ (TA)	
	CAL	VAL	CAL	VAL
จำนวนตัวอย่าง	309	103	309	103
ช่วงค่าทางเคมี (Min)	7.9	8.1	0.1924	0.2389
ช่วงค่าทางเคมี (Max)	15.5	14.9	0.8657	0.8572
Mean	11.7	11.6	0.4326	0.4307
SD	1.32	1.32	0.1025	0.1039
หน่วย		°Brix		% acidity

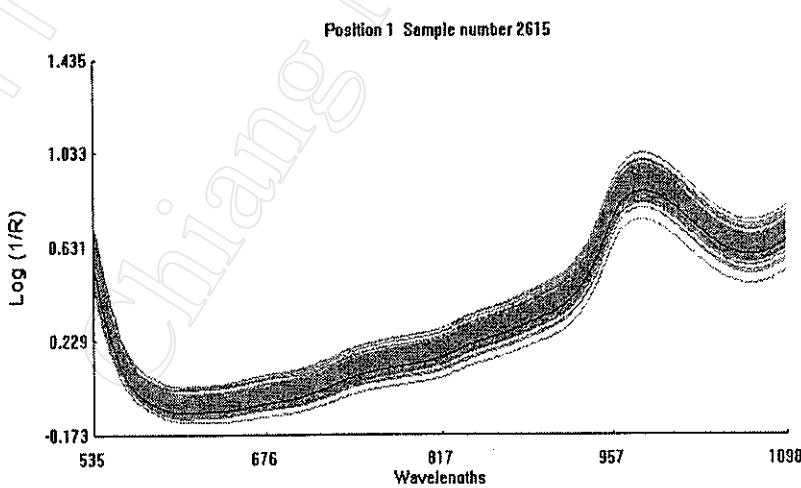
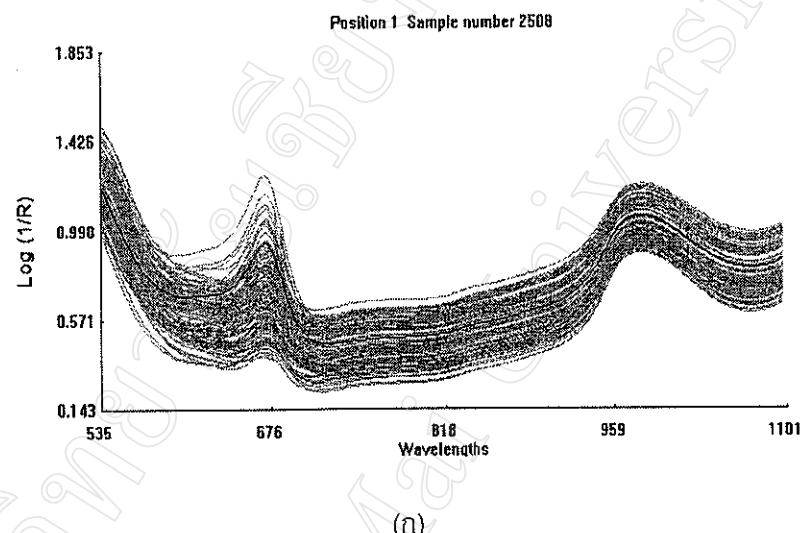
CAL = calibration set

VAL = validation set

SD = standard deviation

ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ออกมารีทสุดจำเป็นต้องมีตัวอย่างสูมที่ถูกต้องและเพียงพอและเป็นตัวแทนที่ดีของประชากร ซึ่งขั้นตอนสร้างสมการ calibration เมื่อกำหนดตัวแปรอิสระ (independent variables) ที่นำมาใช้สร้างสมการ calibration คือค่าที่อ่านได้จากวิเคราะห์สเปกตรัม NIR ของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่มีเปลือกและปอกเปลือก ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.7 ซึ่งค่าที่นำมาอาจเป็นค่าที่อ่านได้จากความยาว

ช่วงคลื่นใดช่วงคลื่นหนึ่ง หรือบางความยาวช่วงคลื่นที่เกี่ยวข้องกับสารที่จะทำการวิเคราะห์ (selected wavelength) หรือนำมาจากทุกๆ ค่าของความยาวช่วงคลื่นที่ทำการศึกษา (full spectrum) การนำค่าที่อ่านได้จากสเปกตรัมอาจมีการนำเทคนิคทางคณิตศาสตร์เข้ามาช่วยในการแปลงข้อมูล เช่น derivative เพื่อทำให้ข้อมูลของตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามมากขึ้น และตัวแปรตาม (dependent variables) หมายถึงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าทางเคมีด้วยวิธี reference laboratory methods



ภาพที่ 3.7 ข้อมูลค่าทางเคมีที่เป็นสเปกตรัม (ก) ผลสัมมไปกเปลี่ยน (ข) ผลสัมปอกเปลี่ยน

2) การสร้างสมการ calibrations ในการสร้างสมการนั้นสิ่งที่สำคัญคือ การหาตัวแปรอิสระที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่ทำการวิเคราะห์คุณภาพ ซึ่งการคัดเลือกหาตัวแปรอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลักคือ

ก. wavelength selected Method เป็นวิธีการที่ทำการคัดเลือกตัวแปรอิสระเฉพาะ wavelength ที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่จะทำการวิเคราะห์ สามารถเลือกได้โดยเอกสารอ้างอิงที่บ่งบอกถึงความยากลื้นที่คาดคะเนว่ามีความสัมพันธ์กับค่าที่จะทำการวิเคราะห์ เทคนิคทางสถิติในการคัดเลือกความยากลื้นที่มีความสัมพันธ์ เช่น Multiple Linear Regression (MLR)

ข. full spectrum analysis methods การใช้วิธีคัดเลือกความยากลื้นที่เหมาะสม (selective wavelength) จากความยากลื้นทั้งหมดที่มีในสเปกตรัมมาสร้างสมการ calibration อาจจะมีข้อผิดพลาดได้ เมื่อจากค่าข้อมูลที่ไม่ถูกต้องอาจเกิดปัญหาทำให้ค่าทำงานยต่ำกว่าหรือสูงกว่าค่าที่แท้จริง (underestimation) เกิดจากความคลาดเคลื่อนจากการสร้างสมการ calibration หรือเกิดจากมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสร้างสมการ calibration มีจำนวนน้อยและทำให้ได้สมการ calibration ที่มีตัวแปรอิสระมากเกินไปในสมการ calibration ข้อมูลที่ได้ไม่น่าเชื่อถือเกิด over fitting การใช้ข้อมูลทั้งหมดที่มีอยู่ทุกความยากลื้นของสเปกตรัม (full spectrum) เป็นวิธีทางสถิติที่ใช้ได้แก่ Principal Component Regression (PCR) และ Modify Partial Least Component Regression (MPLSR)

3) เทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่ช่วยในการแปลงข้อมูลสเปกตรัมก่อนทำการ calibration ข้อมูลเริ่มต้นในการนำมาสร้างสมการ calibration มีความสำคัญมากบ่อยครั้ง ที่ข้อมูลสเปกตรัมมีความแปรปรวนมาก เนื่องมาจากสิ่งรอบกวนอื่นๆ รวมอยู่ในสเปกตรัม ทำให้สมการ calibration ที่สร้างขึ้นมาไม่มีความแม่นยำในการทำงานได้ความถูกต้องน้อยลง ดังนั้นจึงใช้วิธีทางคณิตศาสตร์เข้ามาช่วยในขั้นตอนการสร้างสมการ calibration เพื่อให้ได้สมการ calibration ที่ดีขึ้น วิธีทางคณิตศาสตร์ที่นำมาใช้ในการแปลงข้อมูลสเปกตรัม เช่น derivative ฟูน์กชันใหญ่จะใช้ first หรือ secondary derivative ที่ช่วยในการเกิด overlapping peak

4.2 ขั้นตอน validation เป็นขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของสมการ calibration ที่เหมาะสมแล้วว่ามีความสามารถนำมาทำงานข้อมูลชุดอื่นที่เป็นประชากรกลุ่มเดียวกันได้หรือไม่ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ค่าทางเคมีให้เป็นชุด X และเครื่อง NIR spectroscopy ให้เป็นชุด Y นำผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ว่าการทำงาน

ค่าคุณภาพด้วยเครื่อง NIR spectroscopy นั้นมีความถูกต้องมากแค่ไหนจากค่าสถิติ SEP และค่าเฉลี่ยของการทำนายข้อมูลชุด Y กับข้อมูลชุด X มีความแตกต่างกันหรือไม่ Bias

การวิเคราะห์ใช้โปรแกรมสำเร็จวุป WinISI เว็บไซต์ทางสถิติดังนี้

1) ใช้โปรแกรมสำเร็จวุป WinISI เพื่อวิเคราะห์หาสมการ calibration ด้วยวิธี Multiple Linear Regression (MLR) เป็นโปรแกรมที่เลือกค่าสเปกตรัมที่ความยาวคลื่นต่างๆ ได้

2) ใช้โปรแกรมสำเร็จวุป WinISI มาวิเคราะห์โดยวิธี Modified Partial Least Squares (MPLSR) Principal Component Regression (PCR) โดยใช้ข้อมูลทั้งหมดที่ความยาวคลื่นตัดต่อซึ่งความยาวคลื่น 700–1100 นาโนเมตร

ค่าทางสถิติที่ใช้ในการพิจารณาสมการ calibration

1) R คือ correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่บอกรถึงข้อมูลชุด X และข้อมูลชุด Y มีความสัมพันธ์กันมากน้อยแค่ไหน ค่าที่คำนวณได้ควรจะมีค่าเข้าใกล้ 1 หากค่าที่ได้มีค่าเข้าใกล้หรือเท่ากับ 1 มากเท่าไร ทำให้มีความมั่นใจในการนำสมการ calibration มาใช้ในการทำนายค่าทางเคมีได้

2) SEC คือ standard error of calibrations คือ ค่าที่บอกรถึงสมการ calibration ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้ในการทำนายต่อไปได้ดีหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรจะมีค่าน้อยๆ

3) SEP คือ standard error of prediction คือ ค่าที่บอกรถึงการนำเอาสมการ calibration สามารถทำนายค่าทางเคมีที่ได้จากเครื่อง NIR spectroscopy มีความถูกต้องมากน้อยแค่ไหน ค่าที่คำนวณได้ควรจะมีค่าน้อยๆ

4) Bias คือ The average of difference between actual value and NIR value คือที่บอกรถึงค่าเฉลี่ยของการทำนายข้อมูล Y และค่าเฉลี่ยข้อมูลชุด X มีความแตกต่างกันหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรจะมีค่าน้อยๆ

5) RPD คือ The ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือค่าอัตราส่วนระหว่างค่า standard deviation ของค่าทางเคมีที่ได้จากการวิเคราะห์และค่า SEP ควรจะมีค่ามากกว่า 3 จึงจะดี

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีการสร้างสมการ calibration เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานการประเมินค่าทางเคมี ของผลสัมฤทธิ์ทางการแพทย์อย่างน้ำผึ้งโดยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.2 ตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใช้กำหนดความเข้มของแต่ละลักษณะโดย เป็นตัวเลขที่บอกรายละเอียดของคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น เวลาหืน

1.3 สมมติฐานที่ต้องการทดสอบว่าความเชื่อมโยงของตัวแปรทางเคมีและเครื่องมือมาตรฐานที่ใช้ได้ถูกต้องในกระบวนการทดสอบ

1.4 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวน (variance) และสหสัมพันธ์ (regression analysis)

## 2. การวัดคุณภาพทางด้านเคมี

การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์ เช่น ที่มีความสำคัญต่อ รสชาติของผลิตภัณฑ์ เช่น

2.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS)

2.2 ปริมาณกรดที่ได้ (TA) ในรูปของกรดซิตริก (citric acid) (ขั้นตอน การวิเคราะห์ เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจสอบด้วย NIRS)

2.3 อัตราส่วนระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) ต่อปริมาณกรดที่ได้ (TA) TSS / TA ratio

ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีจะต้องมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ต่ำ เช่น ผู้ประเมินจะอภิปรายร่วมกัน เพื่อให้สอดคล้องถึงลักษณะจำเพาะของผลิตภัณฑ์ โดยเทียบเคียงจากสารเคมี อริบิยานะรูปสีกากและ สีความหมายและทำความเข้าใจให้ถูกต้องตามคำอธิบายดังนี้

คำอธิบายคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น ลักษณะต่างๆ และการให้คะแนน

1. ความชื้น (juiciness) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสูง เช่น ผลไม้สด หรือผักผลไม้ที่ต้องการให้ความชื้นสูง เช่น กุ้งเผา

2. ความเปรี้ยว (sourness) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีความเปรี้ยว เช่น ผลไม้ เช่น มะนาว หรือส้ม

3. ความหวาน (sweetness) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีความหวาน เช่น น้ำตาล หรือน้ำเชื่อม

4. กลิ่นและรสที่ผิดปกติ (off-flavor) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นและรสชาติไม่ดี เช่น กลิ่นของอาหารเสียหาย เช่น ไข่เสียหาย หรือกลิ่นของเนื้อสัตว์เสียหาย

5. ขานนิม ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนตามความรู้สึกของตนของการให้คะแนนต้องพิจารณา ตามความรู้สึกเวลาเดียวกันว่าออกแรงมากหรือน้อยและเหลือชาบากหรือน้อย

6. ความชอบ (preference) ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนตามความรู้สึกของตนของการให้คะแนน 1 หมายถึงคุณภาพต่ำไม่เป็นที่ยอมรับ

การแสดงลำดับของคุณภาพที่กำหนด ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่อธิบายคุณสมบัติ และลักษณะของผลสัมมεี่ยวหวานพันธุ์สายนำ้ผึ้งตามแบบทดสอบดังนี้

#### แบบทดสอบการประเมินทางด้านประสิทธิภาพ

1. ความฉ่ำน้ำ	ฉ่ำน้ำมากที่สุด	= 5
	ฉ่ำน้ำมาก	= 4
	ฉ่ำน้ำปานกลาง	= 3
	ฉ่ำน้ำเล็กน้อย	= 2
	ไม่ฉ่ำน้ำ	= 1
2. ความเปรี้ยว	เปรี้ยวมากที่สุด	= 5
	เปรี้ยวมาก	= 4
	เปรี้ยวปานกลาง	= 3
	เปรี้ยวเล็กน้อย	= 2
	ไม่เปรี้ยว	= 1
3. ความหวาน	หวานมากที่สุด	= 5
	หวานมาก	= 4
	หวานปานกลาง	= 3
	หวานเล็กน้อย	= 2
	ไม่หวาน	= 1
4. กลิ่นและรสชาติปกติ	กลิ่นและรสชาติที่ปกตินามากที่สุด	= 5
	กลิ่นและรสชาติที่ปกตินามาก	= 4
	กลิ่นและรสชาติที่ปกติปานกลาง	= 3
	กลิ่นและรสชาติที่ปกติ เล็กน้อย	= 2
	กลิ่นและรสชาติที่ไม่ปกติ	= 1

5. เนื้อสัมผัส	ชานนิ่มมากที่สุด	=	5
	ชานนิ่มมาก	=	4
	ชานนิ่มปานกลาง	=	3
	ชานนิ่มเล็กน้อย	=	2
	ชานไม่นิ่ม	=	1
6. กลิ่นหอม	กลิ่นหอมมากที่สุด	=	5
	กลิ่นหอมมาก	=	4
	กลิ่นหอมปานกลาง	=	3
	กลิ่นหอมเล็กน้อย	=	2
	ไม่มีกลิ่นหอม	=	1
7. ความชอบ	ชอบมากที่สุด	=	5
	ชอบมาก	=	4
	ชอบปานกลาง	=	3
	ชอบเล็กน้อย	=	2
	ไม่ชอบ	=	1