บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ข้าวเปลือกที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองที่ 1 นำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากศูนย์วิจัยข้าวสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 200 กิโลกรัมและข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จากศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท จำนวน 100 กิโลกรัม ใช้ในการสร้างสมการ

การทดลองที่ 2 นำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากศูนย์วิจัยข้าวลพบุรี จำนวน 60 กิโลกรัม และข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จากศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี จำนวน 25 กิโลกรัม ใช้ในการทดสอบสมการ

3.2 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยมี 5 กรรมวิธี คือ ข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวสารพันธุ์ชัยนาท 1 และข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปนด้วยข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ระดับ 8, 16 และ 24 % ของน้ำหนักรวม ซึ่งคำนวณจากน้ำหนักรวมของข้าวทั้งหมดจะได้อัตราส่วนการปนโดยน้ำหนัก (กรัม) ในแต่ละอัตราส่วนการปน เช่น 8 % คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 น้ำหนัก 92 กรัม ปนด้วยข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 น้ำหนัก 8 กรัม

ศึกษาสมบัติทางกายภาพ คือ ขนาดและรูปร่าง นำไปวัดสเปกตรัมแล้ววัดค่าทางเคมี เพื่อสร้างสมการทำนาย

3.3 การเตรียมตัวอย่างข้าวสาร

นำข้าวเปลือกมากะเทาะเปลือกข้าวด้วยเครื่องกะเทาะข้าวเปลือก (Mini Testing Husker, MTH-35A, Thailand) จากนั้นนำข้าวกล้องมาขัดขาวด้วยเครื่องขัดขาว (Rice Miller, TVC, Thailand) นำข้าวสารที่ได้มาคัดขนาดด้วยเครื่องคัดขนาดเมล็ดข้าวเพื่อแยกข้าวต้นและข้าวหัก นำข้าวต้นที่ได้มาผสมให้ตัวอย่างมีความสม่ำเสมอด้วยเครื่องผสมตัวอย่าง (divider) สุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวสารของข้าวทั้ง 2 พันธุ์เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ คือ ขนาดและรูปร่างของตัวอย่างด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ดิจิตอล (vernier caliper, CD-6) รุ่น CD-6 และนำข้าวต้นบรรจุถุงพลาสติกเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การวัดสเปกตรัม

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์การวัดสเปกตรัม</u>

1. เครื่อง NIRSystem 6500 (Foss NIRSystem, Silver Spring, USA)
2. ชุดวัดตัวอย่าง Transportation module และเซลล์บรรจุตัวอย่าง coarse sample cell
3. โปรแกรม Vision® version 2.51 และโปรแกรม the Unscrambler®version 7.6 (Camo,Oslo,Norway)

<u>วิธีการวัดสเปกตรัม</u>

นำตัวอย่างข้าวเต็มเมล็ดพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ผสมด้วยข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ระดับ 8, 16 และ 24 % โดยน้ำหนัก และข้าวเต็มเมล็ดพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และชัยนาท 1 บริสุทธิ์ จำนวนตัวอย่างละ 200 กรัม กรรมวิธีละ 80 ตัวอย่าง ทั้งหมด 400 ตัวอย่าง นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem 6500 ในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร โดยใช้เซลล์บรรจุตัวอย่างสำหรับธัญพืช (coarse sample cell) และวัดค่าการสะท้อนกลับของแสง (reflectance) เปรียบเทียบกับแผ่นเซรามิคในชุด transportation module ขณะวัดสเปกตรัมควบคุมอุณหภูมิของบรรยากาศที่ 25 องศาเซลเซียส บันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุก 2 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่วัดสเปกตรัมแล้วมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คือ ปริมาณอะไมโลส

3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี</u>

1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น SPECORD 40
2. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
5. เครื่องบดเมล็ดข้าว (sample mill, Cemotect Foss Testor, Sweden)
6. ตะแกรงร่อนขนาด 100 เมซ (sieve)
7. เครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer; LD-846, Netherlands)
8. เครื่องวัดปริมาตรแบบอัตโนมัติ (auto pipette, Handy Step® electronic) ขนาดความจุ 1-10 มิลลิลิตร
9. ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) ขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร
10. โถดูดความชื้น (desiccators)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. กระป๋องอะลูมิเนียมที่มีฝาปิด (สำหรับ RVA)
12. ปากคีบ (forcep)
13. เครื่องวัดความหนืดของผลิตภัณฑ์แป้ง (Rapid Visco Analyser, Model 4, Australia)

สารเคมี

1. เอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) 95 %
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 นอร์มัล (NaOH 80 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
3. กรดเกลเชียลอะซิติก (CH_3COOH) เข้มข้น 1 นอร์มัล (CH_3COOH 60 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
4. สารละลายไอโอดีน (I_2) และโปแตสเซียสไอโอไดด์ (KI) (I_2 0.2 กรัม และ KI 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชา)
5. อะไมโลสบริสุทธิ์ (potato amylose)

3.5.1 การหาปริมาณอะไมโลสด้วยวิธี iodine-blue colorimetric แล้ววัดความเข้มสีด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Juliano, 1981)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

1. บดเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องบด ให้เป็นแป้งร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 100 เมซ ชั่งแป้งน้ำหนัก 0.1000 กรัม ใส่ในขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิตร ที่แห้งสนิท
2. เติมเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ
3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
4. ปั่นกวนตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก นาน 10 นาที ให้เป็นน้ำแป้ง แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
5. เตรียมขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ชุดใหม่เติมน้ำกลั่นปริมาณ 70 มิลลิลิตร กรดเกลเชียลอะซิติก 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร
6. ดูดน้ำแป้งตามข้อ 4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตรที่เตรียมไว้ตามข้อ 5 เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
7. เตรียม blank โดยเติมกรดเกลเชียลอะซิติก 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
8. วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(absorbance) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (nm) หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับศูนย์

9. นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณอะไมโลส(%)โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้

10. ปรับปริมาณอะไมโลสในแป้งที่วิเคราะห์ที่ระดับความชื้น 14.0% จากสูตร

$$\text{ปริมาณอะไมโลส (\%) ที่ระดับความชื้น 14.0 \%} = \frac{A \times 86}{100 - M}$$

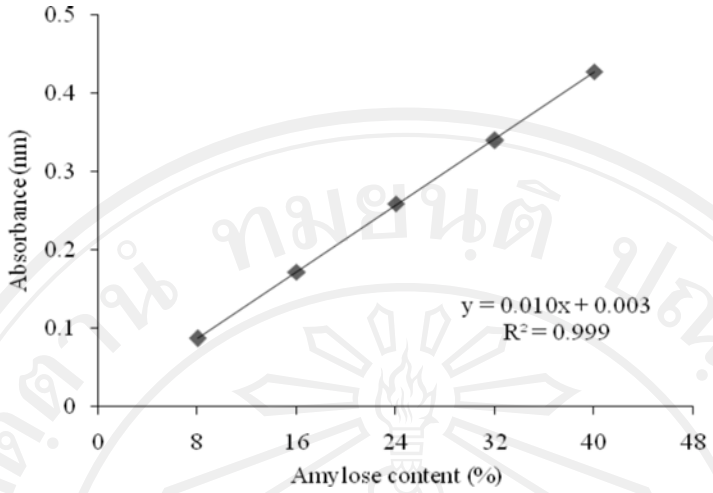
เมื่อ A = ปริมาณอะไมโลส (%) ในแป้งข้าวที่วิเคราะห์ได้

M = ปริมาณความชื้น (%) ในแป้งข้าวที่วิเคราะห์ได้

การเขียนกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งน้ำหนักอะไมโลสบริสุทธิ 0.0400 กรัม ใส่ในขวดแก้วปริมาตรที่แห้งสนิทแล้วดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างทำเป็นสารละลายมาตรฐาน
2. เตรียมขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เติมน้ำกลั่นขวดละ 70 มิลลิลิตร เติมกรดเกลเชียลอะซิติก 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 มิลลิลิตร ในขวดที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แล้วเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด
3. ดูดสารละลายมาตรฐานตามข้อ 1 ปริมาตร 1, 2, 3, 4, และ 5 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่าปริมาณอะไมโลส 8, 16, 24, 32 และ 40 % ตามลำดับ ใส่ในขวดที่เตรียมไว้ในข้อ 2 เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับศูนย์ เช่นเดียวกับขั้นตอนการเคราะห์ปริมาณอะไมโลสในข้อ 7
4. นำค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณอะไมโลสในสารละลายมาตรฐานมาเขียนเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 3.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะไมโลสและค่าการดูดกลืนแสง

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี oven drying (ISTA, 1999)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

1. บดเมล็ดข้าวด้วยเครื่องบด
2. นำกระป๋องอะลูมิเนียมอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
3. ชั่งเมล็ดข้าวที่ถูกบดแล้ว 5 กรัม ใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมตามข้อ 2 แล้วชั่งน้ำหนัก
4. อบตัวอย่างตามข้อ 3 ในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก
5. คำนวณหาปริมาณความชื้นโดยมาตรฐานน้ำหนักเปียก (%) จากสูตร

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

เมื่อ A = น้ำหนักกระป๋องอลูมิเนียมพร้อมฝา

B = น้ำหนักกระป๋องอลูมิเนียมพร้อมฝา และเมล็ดข้าวก่อนอบ

C = น้ำหนักกระป๋องอลูมิเนียมพร้อมฝา และเมล็ดข้าวหลังอบอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3 การวิเคราะห์ค่าความหนืด (Newport Scientific, 1998)

โดยเครื่องวัดความหนืดของผลิตภัณฑ์แป้ง Rapid Visco Analyser (RVA) ชั่งตัวอย่างแป้งที่ผ่านการบดและร่อนด้วยตะแกรงร่อน test sieve ขนาดรู 100 เมซ น้ำหนักตามสูตรที่ได้จากการคำนวณน้ำหนักแป้งด้านล่าง ใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียม (canister) สำหรับเครื่อง RVA จากนั้นเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรน้ำที่ได้จากการคำนวณ ลงในกระป๋องอะลูมิเนียมและใส่ใบพายเพื่อกวนตัวอย่างแป้งกับน้ำ ใส่กระป๋องตัวอย่างลงในเครื่องอย่างระมัดระวัง กำหนดการทำงานของเครื่องดังนี้ ความเร็วรอบของใบพัด 960 รอบต่อนาที (round per minute: rpm) ระยะเวลา 10 วินาที จากนั้นลดความเร็วรอบเหลือ 160 rpm จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง อุณหภูมิของเครื่องขณะทำการทดลองเป็นดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มเป็น 95 องศาเซลเซียส ในนาทีที่ 4.48 และคงที่ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 2.30 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส ในนาทีที่ 11 และคงที่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1.30 นาที สิ้นสุดการทดลองใช้เวลาทั้งหมด 12.30 นาที (ดังตารางที่ 3.1)

สูตรการคำนวณน้ำหนักแป้งและปริมาณน้ำที่ใช้

$S = (88x3.00)/(100-M)$

$W = (28.0-S)$

เมื่อ S = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

M = ปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (% wb)

W = ปริมาณน้ำที่ใช้ (มิลลิลิตร)

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดการทำงานของเครื่องวิเคราะห์ความหนืด

เวลา	รายละเอียดการทำงาน	อุณหภูมิ (°C) และความเร็ว(rpm)
00:00:00	อุณหภูมิ	50 °C
00:00:00	ความเร็ว	960 rpm
00:00:10	ความเร็ว	160 rpm
00:01:00	อุณหภูมิ	50 °C
00:04:48	อุณหภูมิ	95 °C
00:07:18	อุณหภูมิ	95 °C
00:11:06	อุณหภูมิ	50 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

สร้างสมการโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมและปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้จากวิธีเคมี โดยการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค Partial least squares regression (PLSR) โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าทางเคมีด้วยโปรแกรม the Unscramble และสร้างสมการโดยใช้วิธี test set โดยแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสร้างสมการทำนาย (calibration set) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นระหว่างข้อมูลทางเคมีที่วัดได้ด้วยวิธีมาตรฐานกับข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของข้าวในช่วงความยาวคลื่น 1100 – 2500 นาโนเมตร และกลุ่มทดสอบสมการ (validation set) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐานที่ได้ ซึ่งมีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างและทดสอบสมการเทียบมาตรฐานของปริมาณอะไมโลสของตัวอย่างทั้ง 5 กรรมวิธี คือ ข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวสารพันธุ์ชัยนาท 1 และข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปนด้วยข้าวพันธุ์ชัยนาท 1ที่ระดับ 8, 16 และ 24 % โดยน้ำหนัก ดังตารางรางที่ 3.2 แล้วแปลงข้อมูลสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum หรือ Log(1/R)) ด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ คือ smoothing, first derivative, second derivative และ multiplicative scatter correction (MSC) และทำการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้ 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 โดยมีขั้นตอน ดังแผนภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.2 จำนวนตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการสร้างและทดสอบสมการเทียบมาตรฐานทางเคมีในกลุ่มสร้างสมการเทียบมาตรฐานและกลุ่มทดสอบสมการ

กรรมวิธี	จำนวนตัวอย่าง	
	กลุ่มสร้างสมการ	กลุ่มทดสอบสมการ
ขาวดอกมะลิ 105	41	39
8%	41	39
16%	41	39
24%	41	39
ชัยนาท 1	41	39
รวม	205	195

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างข้าวพันธุ์ KDML 105 ที่ผสมด้วยข้าวพันธุ์ CN 1 ที่ระดับ 8, 16 และ 24% และข้าวพันธุ์ KDML 105 และ CN 1 บริสุทธิ์ ตัวอย่างละ 200 กรัม

↓

วัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIR ที่ช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร (ตัวแปรอิสระ (x))

↓

นำตัวอย่างข้าวที่วัดสเปกตรัมแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส (ตัวแปรตาม (Y))

↓

แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม
กลุ่มสร้างสมการ และกลุ่มทดสอบสมการ

↓

แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์

↓

ใช้โปรแกรม the Unscrambler สร้างสมการด้วยเทคนิค PLSR ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัม (ตัวแปรอิสระ (x)) และข้อมูลวิเคราะห์ทางเคมี(ตัวแปรตาม (Y))

↓

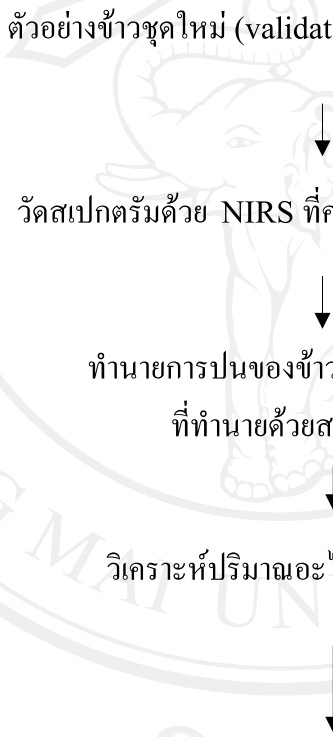
สมการเทียบมาตรฐาน

แผนภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการใช้โปรแกรม the Unscrambler สร้างสมการด้วยเทคนิค PLSR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การทดสอบสมการด้วยตัวอย่างข้าวชุดใหม่ (unknown sample set)

นำตัวอย่างข้าวจากการทดลองที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 จากศูนย์วิจัยข้าวลพบุรี และข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จากศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี มาใช้ในการทดสอบสมการ โดยนำมาวัดสเปกตรัมและวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส โดยทุกขั้นตอนจะทำเหมือนขั้นตอนการสร้างสมการทำนาย แล้วนำข้อมูลไปทดสอบสมการด้วยโปรแกรม the Unscrambler® เปรียบเทียบค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (standard error of prediction; SEP) และค่า SEP ของตัวอย่างกลุ่มทดสอบสมการ (unknown sample) ที่ได้ โดยมีขั้นตอนดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบสมการด้วยตัวอย่างตัวอย่างข้าวชุดใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved