

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์การทดลอง

1. ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง จากอำเภอฟาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 200 ผล
2. เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance, Mettler Toledo, PB 3002-5, Switzerland)
3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ แบบดิจิตอล (Digital refractometer, ATAGO, Model PR-101, Japan)
4. เครื่องไทเทรตอัตโนมัติ (Autotitrator, SCHOTT, TitroLine easy, Belgium)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter, SCHOTT GERATE, Consort C 831, Belgium)
6. เครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Near infrared spectrophotometer, NIRSystem 6500, Foss NIR system, Silver spring, USA)
7. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper, Mitutoyo, Japan)
8. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, รุ่น UM 500, MEMMERT, Buchenbach, Germany)

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะและอาการฟ้ามในผลส้ม สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมี

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาการฟ้ามของผลส้มกับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ 2 วิธี 2.1 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน 2.2 multiple linear regression – discriminant analysis (MLR-DA)

การทดลองที่ 3 การทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐานที่ได้จากการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะและอาการฟ้ามในผลส้ม สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมี

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง จำนวน 50 ผล (ที่พบอาการฟ้าม จำนวน 25 ผล และไม่พบอาการฟ้าม จำนวน 25 ผล) จากสวนในพื้นที่อำเภอฟาง จังหวัดเชียงใหม่มาประเมินอาการฟ้าม วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมี เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างผลส้มปกติกับผลส้มฟ้าม ดังนี้

1.1 การประเมินอาการฟ้ามของผลส้ม

นำผลส้มสายน้ำผึ้งไปประเมินการเกิดอาการฟ้ามในแต่ละตำแหน่งโดยทำการแกะเปลือกออกทีละส่วนเพื่อดึงภาพที่ 4 แล้วให้คะแนนความฟ้ามของทั้ง 12 ตำแหน่งในแต่ละลูก ดังนี้

คะแนน A ไม่มีอาการฟ้าม

คะแนน B มีอาการฟ้ามน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนน C มีอาการฟ้าม 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนน D มีอาการฟ้าม 51-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนน E มีอาการฟ้ามมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด



ภาพที่ 3.1 วิธีการประเมินความฟ้ามในแต่ละตำแหน่ง

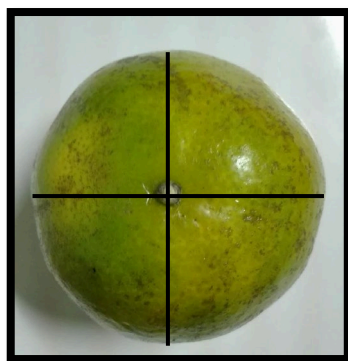
1.2 สมบัติทางกายภาพ

1.2.1 ขนาด น้ำหนัก และสีของผลส้ม

นำผลส้มมาวัดขนาด (Size) ได้แก่ ความสูง (Height) เส้นผ่านศูนย์กลาง (Diameter) และเส้นรอบวงของผล ด้วยเครื่องเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper, Mitutoyo, Japan) การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจะวัดเป็นแนวเครื่องหมาย + ดังภาพที่ 3.2

จากนั้นชั่งน้ำหนักผลส้มแต่ละผลด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance, Mettler Toledo, PB 3002-5, Switzerland)

แล้วจึงวัดสีเปลือกผลส้มและแสดงในค่า L^* , C^* และ h° ด้วยเครื่องวัดสี (Color meter, Minolta CR-400, Japan)



ภาพที่ 3.2 การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของผลส้ม

1.2.2 ค่าความถ่วงจำเพาะ โดยใช้วิธี Platform scale (Moshenin, 1986) โดยนำผลส้มไปชั่งน้ำหนักในอากาศ จากนั้นนำผลส้มไปชั่งน้ำหนักในน้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า (Digital balance, Mettler Toledo, PB 3002-5, Switzerland) เพื่อหาน้ำหนักผลโดยการแทนที่น้ำ ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักผลแทนที่น้ำ} = (\text{น้ำหนักภาชนะ} + \text{น้ำ} + \text{ผล} + \text{ส้ม}) - (\text{น้ำหนักภาชนะ} + \text{น้ำ} + \text{ผล})$$

จากนั้นนำน้ำหนักของผลส้มที่ชั่งในอากาศและน้ำหนักของผลส้มที่แทนที่น้ำไปหาค่าความถ่วงจำเพาะของผลส้ม ดังสมการ

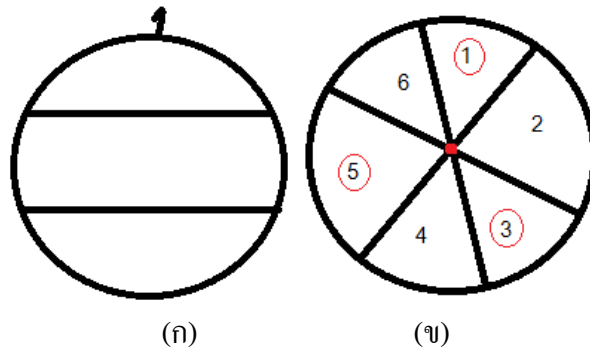
$$\text{ความถ่วงจำเพาะ (SG)} = \frac{\text{น้ำหนักของผลที่ชั่งในอากาศ} \times \text{ค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำ}}{\text{น้ำหนักผลที่แทนที่ในน้ำ}}$$

เมื่อ ค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำ = 1

1.2.3 การหาความชื้นในผลส้ม (moisture content)

การหาปริมาณความชื้นของผลส้มโดยใช้ตู้อบลมร้อน (รุ่น UM 500, MEMMERT, Buchenbach, Germany) วิธีการของ (ASAE Standards, 1994) ทำได้โดยผ่าเนื้อส้มออกเป็น 3 ส่วนตามขวางให้มีขนาดเท่าๆกัน ดังภาพที่ 3.3 (ก) จากนั้นนำแต่ละส่วนมาหั่นเป็น 6 ชิ้นเท่าๆกันแล้วเลือกมา 3 ชิ้นจากแต่ละส่วน ดังภาพที่ 3.3 (ข) ชั่งน้ำหนักก่อนอบไล่ความชื้น จากนั้นนำไปบรรจุในกระป๋องอะลูมิเนียม (Aluminum can) แล้วนำไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการให้ความร้อน นำตัวอย่างมาพักในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงชั่งน้ำหนักภายหลังการอบไล่ความชื้น คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ความชื้นมาตรฐานเปียก (Wet basis)(เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$



ภาพที่ 3.3 (ก) แสดงการผ่าส้มออกเป็น 3 ส่วนตามขวาง (ข) แสดงการหั่นเป็น 6 ชิ้นของแต่ละส่วน

1.3 สมบัติทางเคมี

1.3.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ (Total soluble solids, TSS)

ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ คือปริมาณของสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลายที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ของแข็งที่ละลายน้ำได้มักจะเป็นน้ำตาล และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งกรดอะมิโน และกรดแอสคอร์บิกด้วย (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

วิธีวิเคราะห์

นำผลส้มแต่ละผลมาแยกเนื้อผลกลีบเว้นกลีบ (เฉพาะกลีบที่ทำเครื่องหมาย) ดังภาพที่ 3.4 คั้นน้ำจากกลีบผลส้มปริมาตร 10 ml มาวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ ด้วยเครื่องดิจิตอลรีแฟรกโทมิเตอร์ ซึ่งอ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์ ทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง



ภาพที่ 3.4 แสดงตำแหน่งกลีบที่นำมาทำน้ำคั้นในผลส้มแต่ละผล

1.3.2 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity, TA)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ โดยการนำน้ำคั้นของเนื้อส้มเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ มาไทเทรตกับสารละลายด่างมาตรฐานกระทั่งถึงจุดยุติ (End point) ที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 8.2 ทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

การเตรียมสารละลาย

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, MERCK, Darmstadt, Germany) 4.0 กรัม ละลาย ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

นำน้ำคั้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากัน แล้วจึงไทเทรตด้วยเครื่องไทเทรตอัตโนมัติ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล กระทั่งสารละลายมีค่า pH เท่ากับ 8.2 บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำส้มคั้น) โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้ (AOAC, 2000)

1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.07 กรัม

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1N)} \times \text{ปริมาตรของ NaOH (ml.)} \times 0.07 \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำคั้น (ml.)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.07

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาการฟ้ามของผลส้มกับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

นำส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจำนวน 200 ผล ที่พบอาการฟ้าม จำนวน 125 ผล และผลส้มปกติ (ไม่พบอาการฟ้าม) จำนวน 75 ผล สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาการฟ้ามของผลส้มกับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี โดยนำผลส้มทั้งสองกลุ่มมาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรด สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่สัมพันธ์กับ

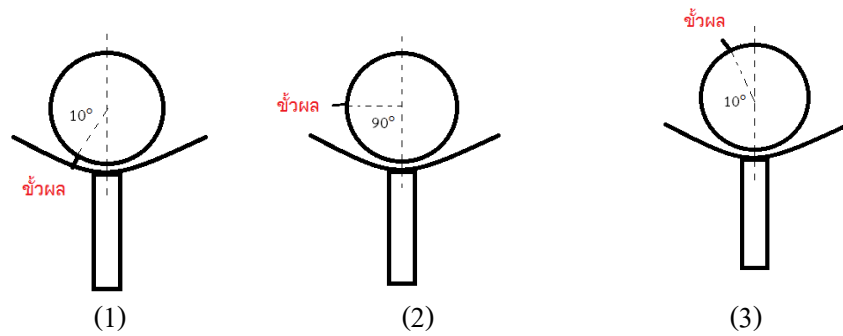
อาการฟ้ามด้วยวิธีมาตรฐาน แล้วจึงนำไปหาความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ได้จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1.1 การวัดสเปกตรัม

นำผลส้มทั้งสองกลุ่มจำนวน 200 ผล ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem 6500 ในช่วงความยาวคลื่น 700 – 1100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงคลื่นสั้นโดยมีค่าความยาวคลื่นห่างกันค่าละ 2 nm ช่วงคลื่นนี้สามารถเข้าไปในผลส้มได้ดีกว่าช่วงคลื่นยาว การวัดใช้หัววัดชนิดใยแก้วนำแสง Fiber optic probe ด้วยระบบ Interaction เพื่อบันทึกข้อมูลสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ ของผลส้ม ได้แก่ (1) ขั้วผล (2) แก้มผล และ (3) ด้านล่างผล ดังภาพที่ 3.5 โดยเก็บข้อมูลสเปกตรัมบริเวณรอบขั้วผล จำนวน 4 ตำแหน่งโดยวางผลส้มให้ขั้วผลทำมุม 10° กับ probe แล้วหมุนไปทางขวาครั้งละ 90° ดังภาพ รอบแก้มผลจำนวน 4 ตำแหน่งโดยวางผลส้มให้ขั้วผลทำมุม 90° กับ probe แล้วหมุนไปทางขวาครั้งละ 90° และ บริเวณรอบท้องผลจำนวน 4 ตำแหน่ง โดยวางผลส้มให้ด้านล่างผลทำมุม 10° กับ probe แล้วหมุนไปทางขวาครั้งละ 90° รวม 12 ตำแหน่งต่อผล ดังภาพที่ 3.6 และภาพที่ 3.7 โดยจะต้องทำการวัดค่าอ้างอิงจากวัสดุอ้างอิง (Reference) นั่นคือแท่งเพปเปอร์ลอนสีขาวก่อนทำการวัดสเปกตรัม เพื่อให้ได้ข้อมูลสเปกตรัมที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ และทำสมการถดถอยต่อไป



ภาพที่ 3.5 ตำแหน่งที่วัดสเปกตรัมบนผลส้ม (1) ขั้วผล (2) แก้มผล และ (3) ด้านล่างผล



ภาพที่ 3.6 ตำแหน่งการวางผลส้มบน probe ในการเก็บข้อมูลรอบๆ (1) ขั้วผล (2) แก้มผล (3) ด้านล่างผล



ภาพที่ 3.7 แสดงวิธีการวางผลส้มและหมุนไปทางขวาครั้งละ 90°

2.1.2 ประเมินความฟ้าม

นำผลส้มสายน้ำผึ้งไปประเมินการเกิดอาการฟ้าม ดังนี้

คะแนน A ไม่มีอาการฟ้าม

คะแนน B มีอาการฟ้ามน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนน C มีอาการฟ้าม 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนน D มีอาการฟ้าม 51-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนน E มีอาการฟ้ามมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

2.1.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสเปกตรัมกับสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี

นำผลจากการทดลองที่ 1 มาพิจารณาเพื่อหาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของผลส้มที่สัมพันธ์กับอาการฟ้าม แล้วจึงนำผลส้มที่ผ่านการวัดสเปกตรัมแล้วในข้อ 2.1 มาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของแต่ละผล

2.1.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (calibration model)

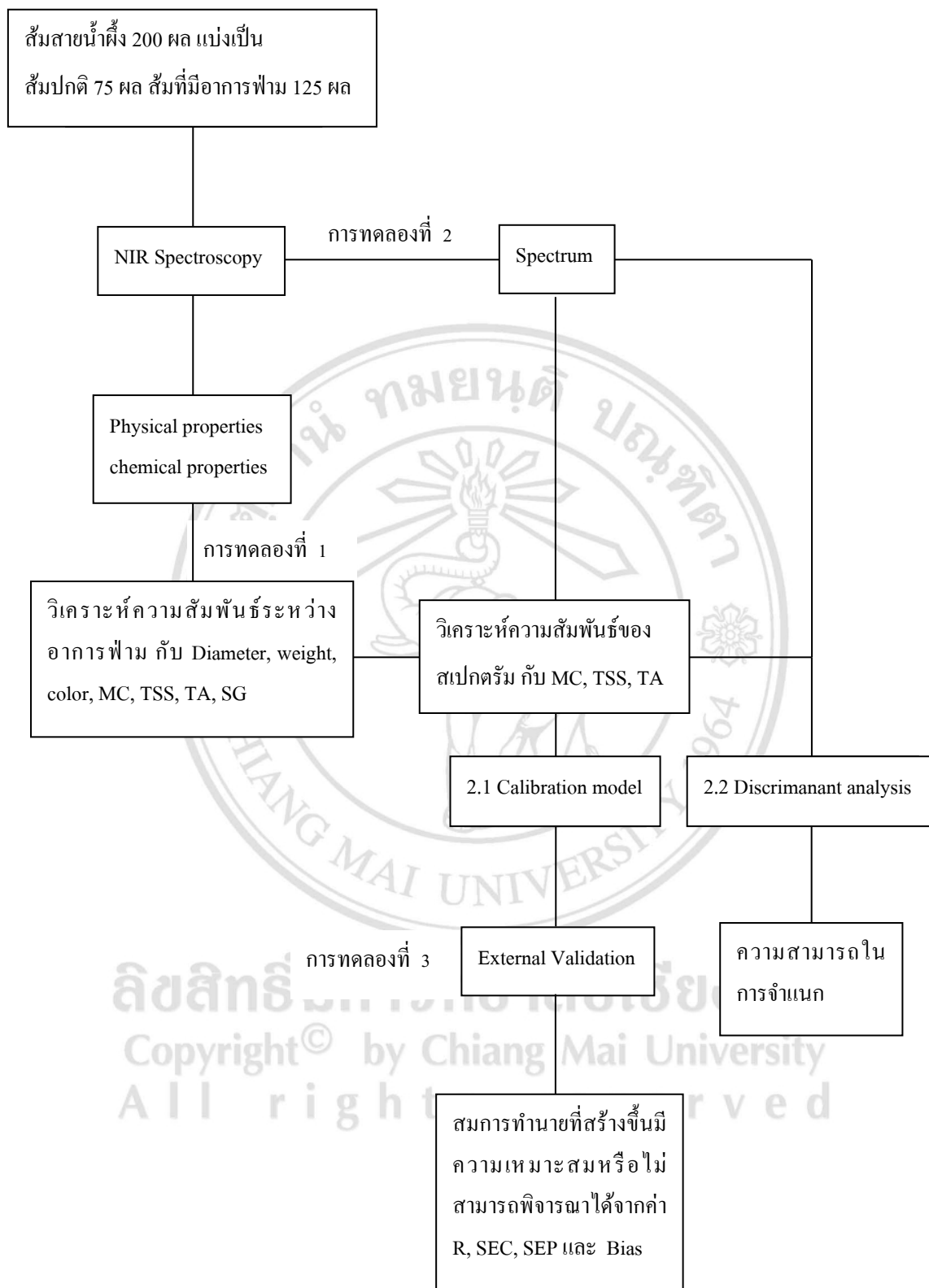
นำข้อมูลสเปกตรัมของผลส้มที่ได้จากข้อ 2.1.1 มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี ด้วยการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค Partial least squares regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler ® version 9.8 (Camo, Oslo, Norway) โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสร้างสมการ (Calibration set) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้น และกลุ่มทดสอบสมการ (Validation set) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพหรือความสามารถของสมการถดถอยเชิงเส้นในการทำนายสมบัติทางกายภาพและเคมีดังกล่าวของตัวอย่าง จากนั้นนำข้อมูลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลส้มที่ฟ้ามและผลส้มที่ไม่ฟ้าม

2.2 multiple linear regression – discriminant analysis (MLR-DA)

การวิเคราะห์ด้วยวิธี multiple linear regression – discriminant analysis (MLR-DA) เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ วิธีการคือ ใช้ multiple linear regression ซึ่งเป็นการเลือกความยาวคลื่นที่สำคัญมาวิเคราะห์ควบคู่กับ วิธี discriminant analysis เพื่อคัดแยกผลส้มฟ้ามออกจากผลส้มไม่ฟ้ามออกจากผลส้มปกติ โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler ® version 9.8 (Camo, Oslo, Norway)

การทดลองที่ 3 การทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน

นำผลส้มจากแหล่งอื่น จำนวน 50 ผล มาทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน โดยวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem 6500 ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกับสมการเทียบมาตรฐาน แล้วทำนายอาการฟ้ามของผลส้มด้วยสมการเทียบมาตรฐาน แล้วจึงนำผลส้มไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี นำข้อมูลที่ได้จากการทำนายด้วยสมการเทียบมาตรฐานมาศึกษาความแม่นยำด้วยวิธีทางสถิติ



ภาพที่ 3.8 สรุปขั้นตอนการทดลองทั้งหมดในงานวิจัย