KMITL progress report
ให้ใช้แบบนี้จนกว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงแก้ไข

แบบรายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานโครงการวิจัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 1 รอบ 6 เดือน ประจำปีงบประมาณ 2557
หน่วยงาน คณะวิศวกรรมศาสตร์

ส่วนที่ 1. ข้อมูลทั่วไป

1. **ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)** การวิเคราะห์ฮิสตามีนและความสดของปลาซาร์ดีนด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

   (ภาษาอังกฤษ) Evaluation of Histamine in sardine fish and its freshness by near infrared spectroscopy technique

2. **รายนามคณะผู้วิจัย (ระบุคำนำหน้า เป็น นาง/นางสาว/นาย หน่วยงานต้นสังกัด หมายเลขโทรศัพท์ E-mail)**
   1. น.ส. ปานมนัส ศิริสมบูรณ์ **(หัวหน้าโครงการ)**
   2. นาง พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ **(ผู้ร่วมวิจัย)**

3. งบประมาณการวิจัยที่ได้รับ **729,000** บาท
   ☑ แหล่งงบประมาณแผนดิน (แบบปกติ) ☐ แหล่งเงินรายได้
   ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 1 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2556ถึงวันที่ 30 เดือน กันยายน พ.ศ. 2557

4. วัตถุประสงค์ของโครงการ
   1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการวิเคราะห์ฮิสตามีนและความสดของปลาซาร์ดีน ที่ตัวปลาโดยตรงเป็นวิธีไม่ทำลายซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์
   2. เพื่อสร้างแบบจำลองในการวิเคราะห์ฮิสตามีนและความสดของปลาซาร์ดีน ด้วยวิธีไม่ทำลายโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
   3. เพื่อประยุกต์แบบจำลองที่ได้ใน 2 ใช้จริงในโรงงานผลิตภัณฑ์ปลาซาร์ดีนกระป๋องเพื่อลดเวลาและแรงงานในการตรวจสอบคุณภาพปลาซาร์ดีนซึ่งหมายถึงการลดต้นทุนในการผลิต
   4. เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ในการประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการตรวจวัดฮิสตามีนและความสดของปลาซาร์ดีน เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตปลากระป๋อง

ส่วนที่ 2. การรายงานความก้าวหน้า

1. ตารางแสดงความก้าวหน้าของโครงการ ณ ช่วงรายงานเมื่อเทียบกับแผนการดำเนินงานทั้งโครงการ
   (การรายงานความก้าวหน้าอาจแสดงรายละเอียดของแต่ละเดือนหรือทุก 2 เดือน ก็ได้แล้วแต่พิจารณา)

การดำเนินงาน	เดือน 1	เดือน 2	เดือน 3	เดือน 4	เดือน 5	เดือน 6	เดือน 7	เดือน 8	เดือน 9	เดือน 10	เดือน 11	เดือน 12
1.ศึกษากระบวนการผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋องของโรงงาน ทั้งนี้เน้นการตรวจรับวัตถุดิบเข้าสู่โรงงาน	←- -→ ←——→											
2.ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับสารฮิสตามีนของเนื้อปลา และกระบวนการสกัด และการตรวจวัดตามมาตรฐานของ AOAC พร้อมฝึก	←- - - - -→ ←——→											

การดำเนินงาน	เดือน 1	เดือน 2	เดือน 3	เดือน 4	เดือน 5	เดือน 6	เดือน 7	เดือน 8	เดือน 9	เดือน 10	เดือน 11	เดือน 12
การสกัดและการวัด												
3.สุ่มตัวอย่างปลาซาร์ดีนที่โรงงานตรวจรับมาสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดช่วงความยาวคลื่น 700-2500 nm และ 1150-2150 nm ด้วยเครื่อง spectrometer จำนวนอย่างน้อย 120 ตัวอย่าง และวัดปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธีดั้งเดิม			⇠⇢ ⟷	⇠⇢ ⟷	⇠⇢ ⟷							
4.นำตัวอย่างปลาซาร์ดีน 120 ตัว จากโรงงานมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ สุ่มตัวอย่างแต่ละสภาวะทีละ 10 ตัว เพื่อสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดตามข้อ 3 และวัดปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธีดั้งเดิม						⇠⇢ ⟷	⟷					
5.แล้วนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณฮิสตามีนของปลาซาร์ดีน กับ Optical data โดยวิธีทาง Partial least square regression								⟷	⟷			
6.ทดสอบแบบจำลองเพื่อใช้ทำนายสารฮิสตามีนในเนื้อปลาของตัวอย่างที่เป็น Unknown										⟷		
7.ประยุกต์ใช้วิธีการในโรงงานผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋องหรือหน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋อง											⟷	
8.สรุปผล และ เขียนรายงาน												⟷

⟷ แผนงานทั้งโครงการที่วางไว้ ⇠⇢ ผลการดำเนินงานจนถึงปัจจุบัน

หมายเหตุ ข้อมูลรายละเอียดกิจกรรม แผนงาน/รูปแบบตาราง เปลี่ยนแปลง หรือปรับได้ตามความเหมาะสม

2. รายละเอียดทางวิชาการที่ได้รับจากการวิจัย

- แสดงรายละเอียดความก้าวหน้างานวิจัยโดยย่อ โดยแสดงข้อมูลที่ชัดเจนและเข้าใจง่าย ซึ่งประกอบด้วยข้อมูล เชิงวิทยาศาสตร์ กราฟ ตาราง หรือภาพประกอบ (ถ้ามี) ตารางผลการทดลองการวัดค่าอ้างอิง (ดูเอกสารแนบ1)
- ในกรณีที่มีความก้าวหน้า สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ได้ อาจจะเขียนรายงานความก้าวหน้าในลักษณะของ "ร่าง" ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ (manuscript) ก็ได้ หรือกรณีที่มีผลงานเผยแพร่แล้วให้แนบบทความความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ระหว่างที่ทำการวิจัยที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้วด้วยจำนวน 1 ชุด "ร่าง" ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ (ดูเอกสารแนบ2)

3. สรุปผลการดำเนินงาน

☒ เป็นไปตามแผน ☐ ไม่เป็นตามแผน เนื่องจาก .....

.....

.....

4. ความก้าวหน้าการดำเนินงานโครงการวิจัยที่ดำเนินการไปแล้ว คิดเป็นร้อยละ 50

5. รายละเอียดแผนงานที่จะดำเนินการต่อไป 1. นำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณฮิสตามีนของปลาซาร์ดีน กับ Optical dataโดยวิธีทาง Partial least square regression 2. ทดสอบแบบจำลองเพื่อใช้ทำนายสารฮิสตามีนในเนื้อปลาของตัวอย่างที่เป็น Unknown 3. ประยุกต์ใช้วิธีการในโรงงานผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋องหรือหน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋อง 4. สรุปผล และ เขียนรายงาน

6. ปัญหา /อุปสรรค -

7. ข้อเสนอแนะ / แนวทางแก้ปัญหา -

9. กำหนดเวลาส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เดือน กันยายน พ.ศ. 2557

10. ข้าพเจ้าขอรับรองว่าข้อความดังที่กล่าวไว้ในข้างต้นเป็นจริงทุกประการ

ลงชื่อ .....

(รศ. ดร. ปานมนัส ศิริสมบูรณ์)
หัวหน้าโครงการ
วันที่ 25 มีนาคม 2557

ลงชื่อ .....
(.....)
หัวหน้าหน่วยงานที่หัวหน้าโครงการสังกัด
วันที่.....

เอกสารแนบ1

ตารางผลการทดลองการวัดค่าอ้างอิง

Sample No.	Histamine (ppm)	Sample No.	Histamine (ppm)	Sample No.	Histamine (ppm)	Sample No.	Histamine (ppm)	Sample No.	Histamine (ppm)
C1	4.71	C143	6.09	C188	2.91	C50	1.34	C94	5.68
C10	2.55	C144	3.17	C189	3.04	C51	0.39	C95	5.02
C100	1.83	C145	3.69	C19	2.25	C52	0.12	C96	5.02
C101	5.07	C147	3.43	C190	2.77	C53	0.39	C97	5.02
C102	6.99	C148	4.08	C191	3.82	C54	1.07	C98	3.70
C103	2.31	C149	3.95	C192	2.64	C55	0.80	C99	3.70
C104	2.07	C15	3.82	C193	3.3	C56	0.67		
C105	1.47	C150	4.21	C194	3.69	C57	0.54		
C106	1.35	C151	3.17	C195	3.43	C58	0.80		
C107	1.23	C152	2.51	C196	5	C59	1.07		
C108	3.27	C153	3.04	C197	6.44	C6	0.93		
C109	3.27	C154	2.12	C198	3.82	C60	1.07		
C11	4.47	C155	2.38	C199	1.34	C61	1.20		
C110	2.67	C156	3.95	C2	2.02	C62	0.80		
C111	2.79	C157	3.04	C20	2.15	C63	0.41		
C112	4.47	C158	2.25	C200	2.15	C64	0.27		
C113	3.39	C159	3.17	C21	2.29	C65	0.27		
C114	2.79	C16	2.77	C22	0.93	C66	1.59		
C115	2.91	C160	3.43	C23	1.88	C67	0.27		
C116	4.23	C161	6.44	C24	1.34	C68	0.27		
C117	5.19	C162	2.25	C25	0.80	C69	0.54		
C118	2.07	C163	1.86	C26	2.70	C7	0.54		
C119	2.31	C164	1.47	C27	3.10	C70	0.27		
C12	1.83	C165	4.08	C28	0.93	C71	0.27		
C120	3.99	C166	4.34	C29	0.93	C72	1.07		
C121	6.15	C167	2.91	C3	0.93	C73	1.59		
C122	3.27	C168	2.51	C30	0.66	C74	3.31		
C123	4.11	C169	4.34	C31	1.34	C75	2.78		
C124	3.03	C17	3.17	C32	1.07	C76	1.46		
C125	4.83	C170	3.43	C33	0.52	C77	1.72		
C126	3.51	C171	3.43	C34	1.88	C78	1.33		
C127	3.51	C172	5.52	C35	0.25	C79	2.65		
C128	3.27	C173	2.64	C36	0.12	C8	2.91		
C129	3.87	C174	4.08	C37	0.12	C80	3.70		
C13	2.79	C175	4.61	C38	0.25	C81	0.67		
C130	3.15	C176	2.77	C39	0.12	C82	1.33		
C131	5.55	C177	5.91	C4	1.47	C83	1.59		
C132	5.19	C178	6.04	C40	0.39	C84	1.46		
C133	2.79	C179	3.82	C41	1.07	C85	1.99		
C134	7.11	C18	3.04	C42	0.80	C86	2.25		
C135	4.77	C180	3.17	C43	0.12	C87	4.36		
C136	5.08	C181	2.51	C44	0.12	C88	2.91		
C137	4.06	C182	2.51	C45	2.7	C89	5.95		

C139	4.06	C183	2.51	C46	1.34	C9	3.57
C14	5.58	C184	3	C47	0.12	C90	3.44
C140	5.08	C185	3.69	C48	0.93	C91	4.89
C141	8.02	C186	4.47	C49	0.80	C92	5.15
C142	7.61	C187	2.91	C5	0.93	C93	5.15

วารสารสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย
ปีที่ xx ฉบับที่ x (xxxx) x-x
Available online at www.tsae.asia

บทความวิจัย

ISSN 1685-408X

การวิเคราะห์ฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสดด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีช่วงความคลื่นยาว

Evaluation of Histamine in Sardine Fish by Long Wave Near Infrared Spectroscopy

ปานมนัส ศิริสมบูรณ์[1], กิ่งดาว ชนะโชติ[1*]

Panmanas Sirisomboon[1], Kingdow Chanachot[1*]

[1]หลักสูตรวิศวกรรมเกษตร สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[1]Curriculum of Agricultural Engineering, Department of Mechanical Engineering, King Mongkut's Institite of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

*Corresponding author: Tel: 082-777-5688, E-mail: Al_kingdow_63@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อสร้างแบบจำลองการวิเคราะห์ฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสดด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยตรวจวัดสเปกตรัมของตัวอย่างปลาซาร์ดีน ด้วยเครื่อง MICRO NIR Spectrometer ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm โดยใช้ปลาซาร์ดีนสด *sadinell longiceps* จากประเทศจีน จำนวน 149 ตัว โดยลักษณะปลาที่ใช้ในการสแกนมีดังต่อไปนี้ ปลาเต็มตัว (Intact fish) ปลาผ่าครึ่งเอาก้างออก (Fillet) เนื้อปลาบด (Minced meat) และเนื้อปลาบดจะสแกนผ่านแก้ว (Minced meat with glass) จากนั้นนำข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นแสงดั้งเดิมและที่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์โดยวิธีต่างๆ ไปสร้างแบบจำลองในการทำนายปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) พบว่าแบบจำลองในการทำนายสามารถให้การทำนายปริมาณฮิสตามีนในเนื้อปลาบดและในเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้วได้ผลดีที่สุด โดยแบบจำลองทั้งสองได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Smoothing 5 point + Derivative S. Golay 2 nd 11 point โดยมีค่า (Coefficient of determination, R^2), (Standard error of prediction, SEP) และ Bias ของทั้งสองแบบจำลองเท่ากัน คือ 0.470, 27.209 ppm และ 1.094 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 7 จากค่า R^2 ระหว่าง 0.26- 0.49 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงกับค่าที่วัดโดยวิธีมาตรฐานมีความสัมพันธ์ที่ไม่ดี อาจเป็นเพราะองค์ประกอบภายในของปลามีน้ำมาก ทำให้เกิดการบดบังพีคของฮีสตามีนซึ่งมีปริมาณน้อยมากในระดับ ppm

คำสำคัญ: ฮิสตามีน, เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, การดูดกลืนแสง, การสะท้อนแสง

Abstract

Objective of this research was to evaluate the histamine in sardine by measuring spectra of sardine samples using MICRO NIR spectrometer (1150-2150 nm). The 149 fresh sardine fish (*sadinell longiceps*) from China were subjected to the experiment in four different forms including intact fish, fillet, minced meat, and minced meat through glass. The absorbance spectra with or without different mathematic pretreatment were used to develop the prediction model for histamine using Partial Least Square Regression (PLSR). The best form of fish that gave better model performance was minced meat and minced meat with glass. The best model was developed after spectra pretreatment of Smoothing (5 points) + Derivative S. Golay 2 nd 11 point and they provided the same coefficient of determination (R^2), Standard Error of Prediction (SEP) and bias of 0.470, 27.209 ppm and 1.094 ppm, respectively with 7 PLS factors. The R^2 between 0.26-0.49 indicated that the correlation between optical data and the reference values of histamine was not good. This might be because fish contained a lot of water and the water absorbance band coverred the peak of the histamine content which was very low in ppm level.

Keywords: Histamine, Near Infrared Spectroscopy, Absorbance, Reflectance

1 บทนำ

อุตสาหกรรมการทำปลาซาร์ดีนกระป๋องนับเป็นกิจการที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศไทย จากสถิติของกรมศุลกากร [1] รายงานว่า ประเทศไทยมีการส่งออกปลาซาร์ดีนกระป๋อง ปี 2554 (ม.ค. – มี.ค.) ปริมาณ 16,909.69 ตันคิดเป็นมูลค่า 1,153.39 ล้านบาท และปี 2555 (ม.ค. – มี.ค.) ปริมาณ 24,444.99 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,919.96 ล้านบาท อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 44.56 ตัน คิดเป็นมูลค่า 66.46 ล้านบาท การตรวจรับปลาซาร์ดีนเข้าสู่โรงงานจำเป็นต้องตรวจความสดของปลาโดยวัดปริมาณฮิสตามีน (histamine) เนื่องจากในเนื้อปลามีสารฮิสติดีน (histidine) ที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นต่อร่างกายและสารฮิสติดีนเป็นสารตั้งต้นของสารฮิสตามีน (histamine) ที่เกิดจากการเก็บรักษาปลาไว้เป็นเวลานานในอุณหภูมิสูงเกินไปทำให้แบคทีเรียที่เป็นตัวสร้างเอนไซม์ histidinedecarboxylase ทำการย่อยสลายกรดอะมิโนฮิสติดีนให้กลายเป็นสารฮิสตามีนซึ่งเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ ฉะนั้นระดับฮิสตามีนในเนื้อปลาเป็นดัชนีหนึ่งในการบ่งบอกความสดของปลาและการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในเนื้อปลาจึงเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภค และอายุการเก็บรักษาเนื้อปลา การทดสอบฮิสตามีนจึงเป็นกลยุทธ์ในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยซึ่งสามารถใช้โดยผู้ประกอบการอาหารทะเล จากรายงานของ Köse et al. [2] กล่าวว่า ระดับการควบคุมปริมาณฮิสตามีนในปลาตระกูล scombrotoxic มีค่าประมาณ 10-200 ppm ระดับที่ผิดปกติของฮิสตามีน คือ สูงกว่า 50 ppm ซึ่งกำหนดในสหรัฐอเมริกา [3 อ้างโดย 2]

การวัดปริมาณฮิสตามีนโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลาและขั้นตอนที่ซับซ้อนด้วยวิธีการที่มีราคาแพงใช้สารเคมีจำนวนมาก ซึ่งวิธีการที่ยอมรับในการนำเข้าและส่งออกในอุตสาหกรรมปลากระป๋องคือวิธีตามมาตรฐานของโรงงานซึ่งประยุกต์มาจากมาตรฐานสากล AOAC Official Method 977.13 และ AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood [4] โดยวิธี Fluorometric Method ด้วยเครื่อง Fluorometer ซึ่งต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก เช่น Histamine dichloride, o-Phthaldialdehyde (OPT), Phosphoric acid และ Ion-exchange resin เป็นต้น

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่รวดเร็ว แม่นยำ ไม่ต้องใช้สารเคมี เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง แต่การนำเทคโนโลยีนี้มาใช้จำเป็นต้องมีการสร้างแบบจำลองเพื่อใช้ในการทำนาย (Calibration model) ก่อนการนำไปใช้งานเพื่อเปรียบเทียบความแม่นยำกับวิธีอ้างอิงที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน หากพิสูจน์ได้ว่ามีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้จะใช้เวลาเพียง 2-3 วินาที ในการวิเคราะห์ทำให้ลดต้นทุนในการตรวจรับปลาซาร์ดีนเข้าสู่โรงงาน ดังนั้นด้วยเหตุผลและความสำคัญดังที่กล่าวมาจึงทำการวิจัย เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการวิเคราะห์ฮิสตามีนของปลาซาร์ดีน ที่ตัวปลาโดยตรงเป็นวิธีไม่ทำลายซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

2 อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่างปลา

ปลาที่ใช้ในโครงงานวิจัยคือซาร์ดีนสด *sadinell longiceps* จากประเทศจีนซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาจากบริษัทไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่น โปรดักส์ จำกัด มหาชน จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 149 ตัวจะแบ่งออกเป็นสองชุด คือชุดแรก 100 ตัวจะถูกสุ่มมาจากบล็อกที่แช่เยือกแข็งไว้ในห้องเย็นของโรงงาน อุณหภูมิประมาณ -20°C โดยการสุ่มจะสุ่มตามกรรมวิธีของโรงงาน คือจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 25 ตัวจำนวน 4 บล็อก ปลาที่ถูกแช่เยือกแข็งจะถูกนำมาแช่น้ำประมาณ 5-10 นาที จนกว่าอุณหภูมิตัวปลาจะเป็น 0 °C แล้วนำขึ้น และชุดที่สองอีก 49 ตัว จะสุ่มตามกรรมวิธีของโรงงานเช่นกัน คือจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 7 ตัว จำนวน 7 บล็อก แล้วนำมาแช่น้ำประมาณ 5-10 นาที แล้วนำขึ้น โดยในชุดที่สองจะเป็นการปรับระดับฮิสตามีน โดยจะเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ที่เวลาที่แตกต่างกัน 7 ช่วงเวลา คือ 10, 20, 30, 40, 50 60 และ 70 hr ช่วงเวลาละ 7 ตัว ปลาที่ละลายแล้วจะแช่น้ำแข็งไว้ รักษาอุณหภูมิประมาณ 0°C ก่อนนำออกมาทดลองในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25°C ลักษณะปลาที่ใช้ในการสแกนมีดังต่อไปนี้ ปลาเต็มตัว (Intact fish) ปลาผ่าครึ่งเอาก้างออก (Fillet) และ เนื้อปลาบด (Minced meat)

2.2 การสแกนคลื่นแสงที่มองเห็นได้และหรือคลื่นเนียร์อินฟราเรด

ปลาที่นำออกมาใช้ผ้าซับน้ำออก แล้วสแกนบริเวณกลางลำตัวปลา ด้วยเครื่อง MICRO NIR (JDSU, USA) ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm จากนั้นนำปลามาผ่าครึ่ง นำด้านที่ไม่มีก้างมาสแกนเนื้อปลาด้านในโดยวางบนจานแก้วกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm สูง 20 mm ด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ จากนั้นนำชิ้นเนื้อปลามาชั่งน้ำหนักประมาณ 80 g (ตัดบริเวณส่วนที่ผ่านการสแกน) นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่น (OKU SAN NO, Thailand) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเนื้อปลาที่ปั่นได้ใส่ในจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm สูง 15 mm จากนั้นจะนำปลาบดมาสแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์บริเวณด้านหน้าเนื้อปลาบดและผ่านก้นจานแก้ว การสแกนทุกแบบทำ 2 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีน

เนื้อปลาบดที่ผ่านการสแกนไปวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธีทางเคมีดั้งเดิมตามมาตรฐานของโรงงานซึ่งประยุกต์มาจากมาตรฐานสากล AOAC Official Method 977.13 และ

AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood [4] ด้วยเครื่อง Fluorometer (Quantech, USA)

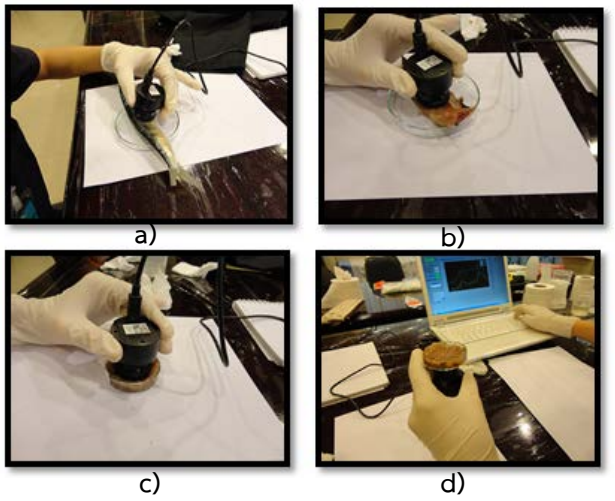

Figure 1 Fish sample presentation for MICRO NIR spectrometer a) Intact fish, b) Fillet, c) Minced meat and d) Minced meat through glass.

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและสร้างแบบจำลอง

ก่อนทำการวิเคราะห์ต้องทำการตรวจสอบค่านอกกลุ่ม (Outlier) ของข้อมูลฮิสตามีนโดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\frac{X - \bar{X}}{SD} > 3$$

โดยที่ X คือ ค่าฮิสตามีนที่วัดจากวิธีทางเคมี $\bar{X}$ คือค่าเฉลี่ยของฮิสตามีน และ SD คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและนำข้อมูลของสเปกตรัมที่ได้มาตรวจสอบค่านอกกลุ่มด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนกับการดูดกลืนคลื่นที่ความยาวคลื่นต่างๆ ตั้งแต่ 1255-2067 nm สำหรับตัวอย่างปลาเต็มตัว, 1181-2030 nm สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา และ 1159-2036 nm สำหรับตัวอย่างเนื้อปลาบด และเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว โดยวิธีทาง Chemometric แบบ Partial least squares regression โดยแบ่งข้อมูลเป็นสองชุดคือ ชุดสร้างแบบจำลองและชุดพิสูจน์แบบจำลองโดยมีอัตราส่วนข้อมูล 8:2 ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากเครื่องสเปกโทรมิเตอร์วิเคราะห์โดยโปรแกรม Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) โดยมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธี Smoothing S. Golay, Normalization (Mean, Maximum, Range), baseline offset, standard normal variate (SNV), de-trending, SNV+ de-trending, multiplicative scattering correction (MSC), first derivative (5 and 11 points) และsecond derivative (5 and 11 points) และจะคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดจะพิจารณาจากค่า Coefficient of determination (R^2) ที่สูงที่สุด Standard error of prediction (SEP) และ Bias ต่ำที่สุด

3 ผลและวิจารณ์

จากการตรวจวัดสเปกตรัมของฮิสตามีนบริสุทธ์ พบว่ามีพีคเกิดขึ้นที่เลขคลื่น 3942, 4304 และ 5909 cm^{-1} (2537, 2323 และ 1692 nm) (Figure 2)

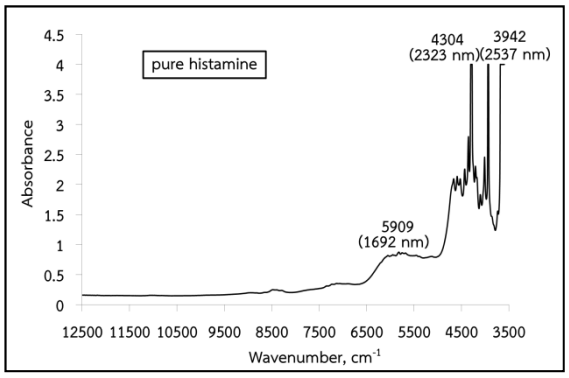

Figure 2 Average spectrum of pure histamine

จากการตรวจวัดสเปกตรัมแบบ Reflectance ของเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ในตัวอย่างปลาทั้งตัว พบว่าพีคการดูดกลืนคลื่นเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1432, 1705 และ 1882 nm ตามลำดับ (Figure 3) ซึ่งพีคที่กว้างในช่วง 1350-1500 nm และ 1800-2050 nm เป็นพีคของน้ำ

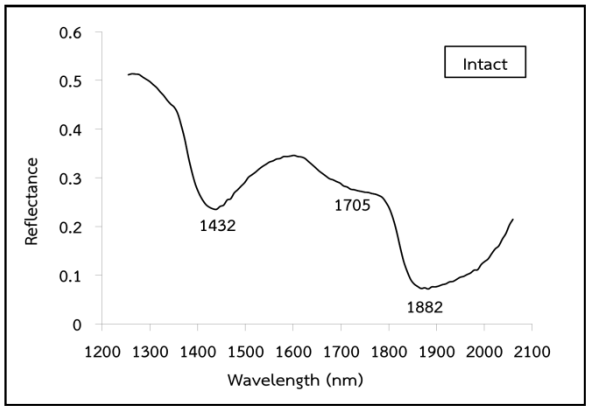

Figure 3 Average spectrum of intact fish

ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา พบว่าพีคการดูดกลืนคลื่น ไม่เด่นชัดที่ความยาวคลื่น 1417, 1698 และ 1860 nm ตามลำดับ (Figure 4)

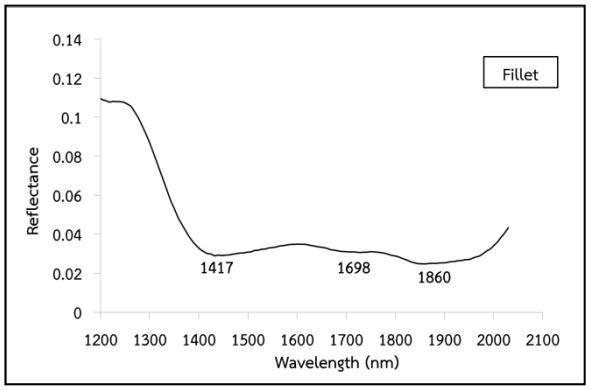

Figure 4 Average spectrum of fillet

ในตัวอย่างเนื้อปลาบด พบว่าพีคการดูดกลืนคลื่นเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1417, 1690 และ 1853 nm ตามลำดับ (Figure 5) ซึ่งพีคที่ 1690 nm เป็นพีคของฮิสตามีน

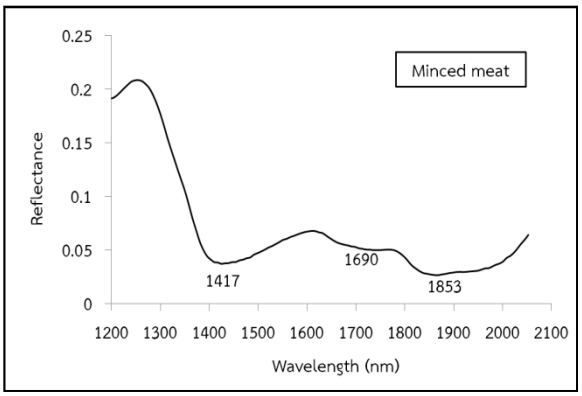

Figure 5 Average spectrum of minced meat

และ ในตัวอย่างเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว พบว่าพีคการดูดกลืนคลื่นแสงเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1410, 1653, 1816 และ 1941 nm ตามลำดับ (Figure 6) ซึ่งพีคที่กว้างในช่วง 1350-1500 nm และ 1900-2050 nm เป็นพีคของน้ำ

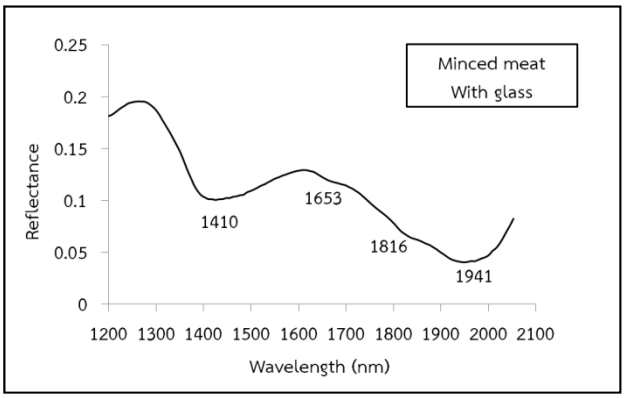

Figure 6 Average spectrum of minced meat with glass

Table 1 Statistic of histamine content (ppm) in sardine of calibration set and prediction set

Sample	Calibration set					Prediction set				
	N	Mean	Max	Min	SD	N	Mean	Max	Min	SD
Intact	233	23.364	188.190	-1.450	36.207	57	23.826	188.190	-1.250	37.276
Fillet	235	23.101	188.190	-1.450	36.075	58	24.006	154.970	-1.250	37.049
Minced meat	238	27.454	188.190	-1.450	36.052	58	24.305	154.970	-1.250	37.389
Minced meat with glass	236	23.085	188.190	-1.450	36.112	58	23.663	153.010	-1.250	36.729

Ramark: N= Number of scanned spectra, Mean= Average, Max= Maximum, Min= Minimum, SD= Standard Deviation

Table 2 Result of PLS modelling for histamine in sardine

Sample (Wavelength Range, nm)	Pre treatment	PC	Calibration set			Prediction set		
			R^2	SEC	Bias	R^2	SEP	Bias
Intact 1255-2060	De-trending	8	0.570	23.750	-1.691e-05	0.467	27.485	-8.231
	Raw spectrum	13	0.609	22.582	-2.325e-05	0.307	30.069	-7.622
	SNV+ De-trending	10	0.609	22.640	2.225e-06	0.253	30.727	-9.587
Fillet 1181-2030	SM11 point+ Normalize Range	8	0.354	28.994	2.215e-05	0.389	30.764	-1.612
	SM 11 point+ Derivative S.Golay 2nd 5 point	6	0.358	28.908	-4.232e-06	0.318	30.289	-4.204
Minced meat 1159-2053	SM 5 point+ Derivative S.Golay 2nd 11 point	7	0.409	27.726	7.763e-08	0.470	27.209	1.094
	SM 5 point+	5	0.340	29.280	4.410e-06	0.376	29.516	-0.682

	Normalize Max							
Minced meat with glass 1158-2053	SM 5 point+ Derivative S.Golay 2nd 11 point	7	0.489	27.726	7.763e-08	0.470	27.209	1.094
	SM 5 point	19	0.608	22.59	-0.0002	0.136	33.954	-3.433

1

Remark: SM= Smoothing, PC= PLS factor, SNV= Standard normal variate, R^2= Coefficient of determination, SEC= Standard error of Calibration, SEP= Standard error of prediction, Bias= average error

จาก Table 1 แสดงทางสถิติของค่าฮิสตามีนของปลาซาร์ดีน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ Calibration set และ Prediction set ค่าที่ติดลบแสดงถึงปริมาณฮิสตามีนที่วัดโดย fluorometer มีค่าน้อยมากและออกนอกช่วงสมการมาตรฐานของการวัด

Table 2 แสดงสมรรถนะของแบบจำลอง PLS สำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนในตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยแสดงแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับชุด Prediction และ ชุด Calibration จะเห็นได้ว่าในตัวอย่างเนื้อปลาบดและตัวอย่างเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้วแบบจำลองสามารถทำนายความแม่นยำได้เท่ากัน แสดงว่าจานแก้วไม่มีผลต่อสเปกตรัม ซึ่งจะเห็นว่าการสแกนเนื้อปลาบดได้ผลดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบดเนื้อปลาทำให้เนื้อของตัวอย่างสม่ำเสมอขึ้นและน้ำบางส่วนได้ระเหยออกไปจากตัวอย่าง และจากการสแกนเนื้อปลาบดจะเห็นพีคของฮิสตามีนปรากฏดัง Figure 5 จาก Williams [5] ระบุว่าค่า R^2 ระหว่าง 0.26-0.49 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงกับค่าที่วัดโดยวิธีมาตรฐานมีความสัมพันธ์ที่ไม่ดี ความแม่นยำที่ต่ำอาจเป็นเพราะเนื้อปลามีปริมาณน้ำมาก ดังจะเห็นใน Figure 3 ในกรณีตัวอย่างปลาเต็มตัว พบพีคเด่นชัดที่เป็นพีคกว้างของน้ำที่ความยาวคลื่น 1450 และ 1940 nm ในกรณีตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Figure 4) เกิด over absorbtion (ดูดกลืนคลื่นมาก) คือสัญญาณการสะท้อนกลับของคลื่นต่ำมาก ในช่วงประมาณ 0.3 และในกรณีของเนื้อปลาบดและเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว (Figure 5 and 6) ลักษณะของสเปกตรัมพบการดูดกลืนแสงของน้ำมาก (พีคของน้ำสูง) แต่มีการดูดกลืนคลื่นของฮิสตามีนน้อยกว่า จากเหตุผลดังกล่าวประกอบกับปริมาณที่ต่ำของฮิสตามีนในเนื้อปลาจึงทำให้ความแม่นยำในการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีไม่เพียงพอ

4 สรุป

จากการวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการสะท้อนแสงของปลาซาร์ดีนจากการตรวจวัดเครื่อง MICRO NIR Spectrometer (JDSU, USA) ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm กับปริมาณฮิสตามีนในเนื้อปลา พบว่าแบบจำลองในการทำนายสามารถให้การทำนายปริมาณฮิสตามีนในเนื้อปลาบดและในเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้วได้ผลดีที่สุด โดยแบบจำลองได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Smoothing 5 points + Derivative S. Golay 2 nd 11 points โดยมีค่า มีค่า R^2, SEP และ Bias คือ 0.470, 27.209 และ 1.094 ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 7 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงกับค่าที่วัดโดยวิธีมาตรฐานมีความสัมพันธ์ที่ไม่ดี อาจเป็นเพราะองค์ประกอบภายในของปลามีน้ำมาก ทำให้เกิดการบดบังพีคของ ฮีสตามีนซึ่งมีปริมาณน้อยมากในระดับ ppm

5 กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บริษัท ไทยยูเนี่ยนโฟรเซ่น โปรดักส์ จำกัด มหาชน จังหวัดสมุทรสาคร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บข้อมูล ตัวอย่างปลาและเครื่องมือในการวัดปริมาณฮิสตามีน

6 เอกสารอ้างอิง

[1] กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศกองประมงต่างประเทศกรมประมง ประมวลข้อมูลจากกรมศุลกากร 2012. การส่งออกกสินค้าประมงของไทย, แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/v07255.pdf เข้าถึงเมื่อ 15 กรกฎาคม 2556.

[2] Köse S., Kaklıkkaya N., Koral S., Tufan B., Buruk K. C, Aydın F. 2011. Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method, Journal of Food Chemistry 125, 1490-1497.

[3] Federal Register. 1995. Decomposition and histamine--raw, frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related, Species 60, 39754–30956.

[4] AOAC international. 2005. AOAC Official Method 977.13 and AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood.

[5] Williams, P. 2007. Near-infrared Technology-Getting the Best out of Light, Canada: PDK Grain.