

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมผลแดงโมสำหรับการทดลอง

แดงโมพันธุ์กินรีจากสวนแดงโม อำเภอ พังโคน จังหวัด สกลนคร โดยทำการสุ่มต้นแดงโมที่กำลังออกดอก จากนั้นรอวันที่ดอกบานนำป้ายพลาสติกผูกติดกับหลักไม้แล้วนำไปปักไว้กับดินข้างๆช่อดอกพร้อมเขียนระบุวันที่ดอกบานรวมทั้งหมด 80 ช่อ แล้วปล่อยให้ผลแดงโมเจริญเติบโต ซึ่งในกระบวนการทั้งหมดในข้างต้น นั้นจะทำซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ ในช่วงฤดูฝน ฤดูหนาวและฤดูร้อน รวมทั้งหมดแล้วจะได้ผลแดงโมที่จะนำมาทำการทดลอง 240 ผล อุปกรณ์ในการทดลอง ได้แก่ ไม้ลวกใช้สำหรับเป็นหลัก ป้ายพลาสติกพร้อมเชือกสำหรับผูก ตะกร้า และค้อนสำหรับทุบหลัก

3.1.1 การเก็บเกี่ยวแดงโมที่อายุต่างๆ

สุ่มเก็บแดงโมจำนวน 20 ผล 4 ครั้ง และ 3 ฤดู เพื่อตรวจสอบคุณภาพ ดังนี้

ฤดูฝน เมื่อผลแดงโมครบ 21 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูฝน เมื่อผลแดงโมครบ 23 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูฝน เมื่อผลแดงโมครบ 25 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูฝน เมื่อผลแดงโมครบ 27 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูหนาว เมื่อผลแดงโมครบ 21 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูหนาว เมื่อผลแดงโมครบ 23 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูหนาว เมื่อผลแดงโมครบ 25 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูหนาว เมื่อผลแดงโมครบ 27 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูร้อน เมื่อผลแดงโมครบ 21 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูร้อน เมื่อผลแดงโมครบ 23 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูร้อน เมื่อผลแดงโมครบ 25 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

ฤดูร้อน เมื่อผลแดงโมครบ 27 วัน หลังดอกบานให้สุ่มเก็บแดงโมรวมทั้งหมด 20 ผล

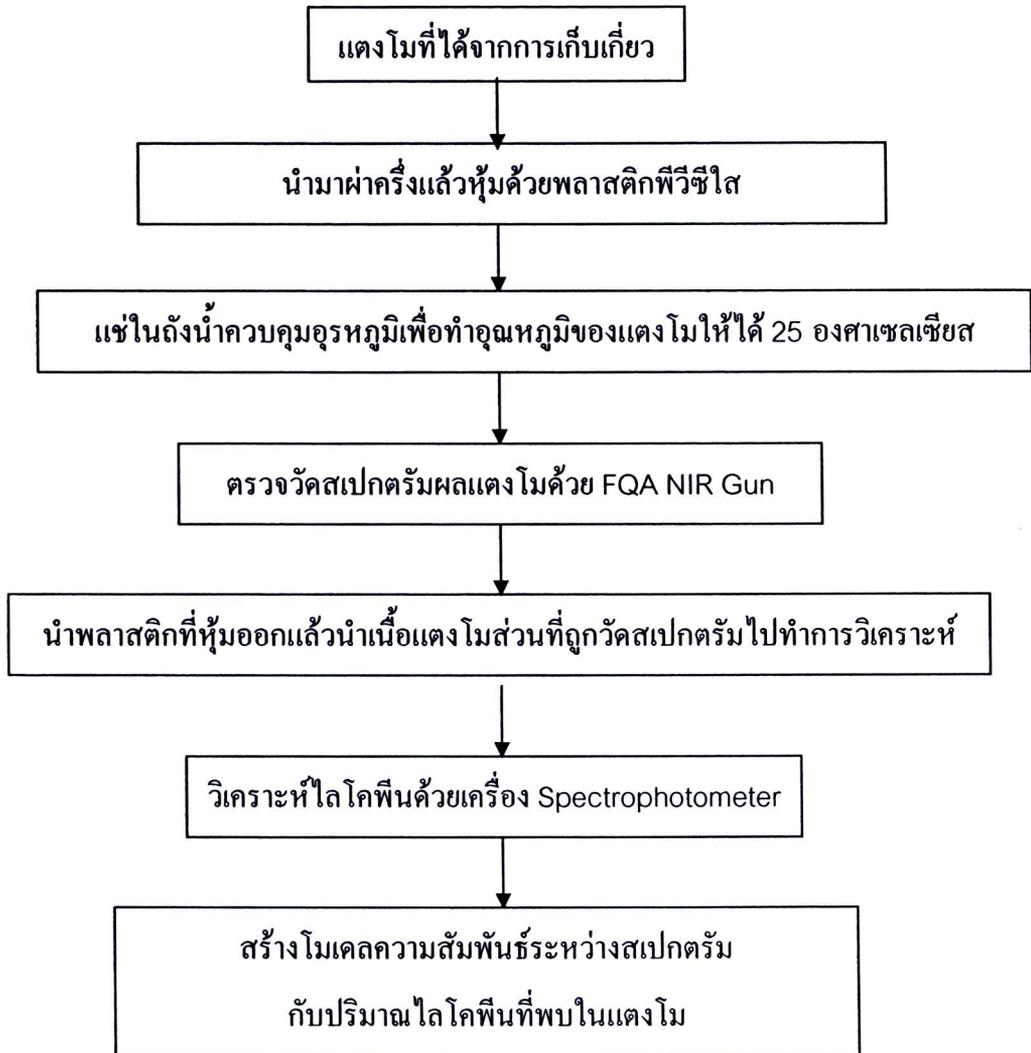
แผนผังแสดงการดำเนินการทดลอง แสดงในภาพที่ 3.1

3.2 การตรวจวัดแบบไม่ทำลายผลแดงโม

3.2.1 อุปกรณ์การตรวจวัดแบบไม่ทำลายผลแดงโม

1. เครื่อง FQA-NIR Gun (Shizuoka Shibuya Seiki, Hamamatsu, Japan)
2. วัสดุอ้างอิง (Ceramic)

3. พลาสติกพีวีซีใส หน้า 11 μm
4. ปากกาเคมี (Horse, Thailand)



ภาพที่ 3.1 แผนผังแสดงการดำเนินการทดลอง



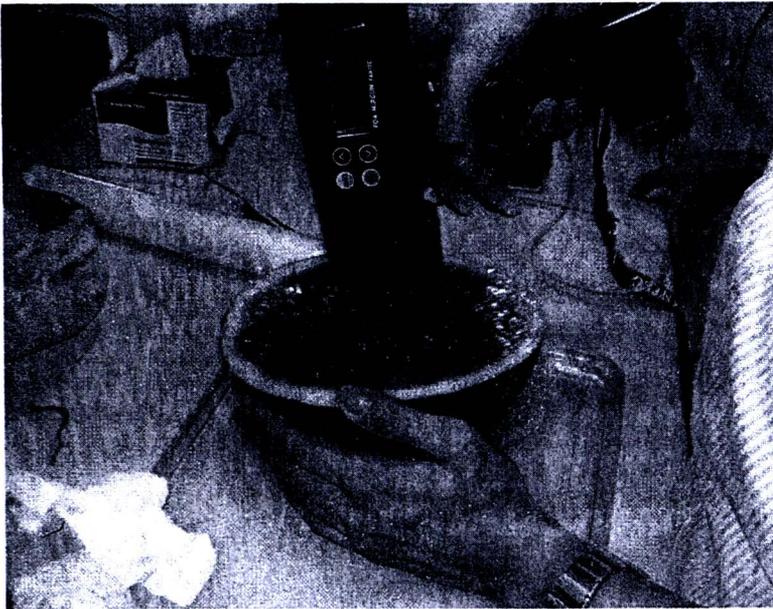
ภาพที่ 3.2 FQA-NIR Gun

3.2.2 การตรวจวัดแบบไม่ทำลายด้วยเครื่อง FQA NIR Gun ของผลแดงโม

การดำเนินการทดลองเพื่อวัดค่าการดูดกลืนคลื่นของผลแดงโม โดยใช้เครื่อง FQA NIR Gun (ภาพที่ 3.2) ซึ่งมีลักษณะการวัดแบบ Interactance มีช่วงคลื่นระหว่าง 600-1100 nm เกิดการดูดซับที่ความถี่แบบ Overtone และ หรือ/Combination ที่ความยาวคลื่น 700-900 nm มีการสั่นสะเทือน (Bond vibration) ของพันธะ C-H แบบ (Stretching, third และ fourth overtone) และ first overtone ของ C=C แบบ stretching และ ที่ความยาวคลื่น 1097-1000nm มีการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H แบบ bending และ แบบ stretching และทำการตรวจวัดที่ทุกๆ 2 นาโนเมตร

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำความสะอาดผลแดงโมโดยรอบด้วยกระดาษชำระ
2. วางแดงโมไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง
3. ผ่าแดงโมออกเป็น 2 ซีก แล้วนำพลาสติกใส่หุ้มบริเวณที่เป็นเนื้อของแดงโม
4. กำหนดตำแหน่งที่ตรวจวัดบริเวณกึ่งกลางของส่วนที่ถูกหุ้มด้วยพลาสติกใส่แล้วทำเครื่องหมายบอก จากตำแหน่งที่วัด
5. เริ่มการตรวจวัดที่ละตำแหน่ง โดยตั้งค่าที่เครื่อง FQA NIR Gun ให้ทำการตรวจวัด 3 ครั้งต่อตำแหน่ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 3.3 สแกนผลแดงโมด้วย FQA NIR Gun

3.3 การสกัดไลโคพีนออกจากแดงโมเพื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3.3.1 วัสดุ

1. เนื้อแดงโมบดละเอียด

3.3.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการสกัดไลโคพีน

1. มีด
2. เขียงพลาสติก
3. เครื่องปั่นผลไม้
4. ซ้อน
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. ตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
7. บีกเกอร์ขนาด 50,100 มิลลิลิตร
8. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
9. กระดาษฟอยล์
10. แท่งคนสาร
11. Magnetic stirrer
12. Pipette

13. Plastic pipette
14. Cells Quartz
15. เครื่อง Spectrophotometer
16. เครื่องดูดสาร
17. ขวดใส่สารละลาย
18. น้ำกลั่น
19. Ethanol เข้มข้น 90%
20. Acetone and 0.05% (w/v) butylated hydroxytoluene(BHT)
21. Hexane

3.3.3 วิธีการสกัดไลโคพีนจากแตงโม

3.3.3.1 เตรียมอุปกรณ์ โดยนำขวดรูปชมพู่มาหุ้มด้วยกระดาษฟอยด์

3.3.3.2 การเตรียมน้ำกลั่น

1. นำน้ำกลั่นไปแช่ในตู้แช่เพื่อปรับอุณหภูมิให้ได้ 5 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การเตรียม Ethanol เข้มข้น 90% จาก Ethanol เข้มข้น 95% จำนวนได้จากสมการ

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$95x V_1 = 90x100$$

$$V_1 = 94.7$$

1. นำ Ethanol เข้มข้น 95% มา 94.7 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. ได้ Ethanol เข้มข้น 90% นำไปใช้ในการทดลอง

3.3.3.3 การเตรียม Acetone and 0.05% (w/v) butylated hydroxytoluene(BHT)

1. นำ Acetone มา 100 มิลลิลิตร
2. ชั่ง butylated hydroxytoluene(BHT) มา 0.05 กรัม แล้วใส่ลงไป Acetone ที่เตรียมไว้
3. คนจนกว่าสารจะละลาย แล้วนำไปใช้ในการทดลอง

3.3.3.4 ขั้นตอนการสกัดไลโคพีนจากแตงโม

1. ใช้มีดผ่าเอาเนื้อของแตงโมตรงส่วนที่ถูกวัดสเปกตรัมไปชั่ง 20 กรัม
2. แยกเมล็ดออกแล้วบดเนื้อแตงโมให้ละเอียดด้วยเครื่องบดผลไม้

3. ชั่งแต่งโมบคละเอียด 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยด์
4. เติม Ethanol เข้มข้น 90% 25 มิลลิลิตร, Acetone and 0.05% (w/v) butylated hydroxytoluene(BHT) 25 มิลลิลิตร และ Hexane 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ
5. ปิดด้วยจุกยางแล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
6. เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร แล้วเขย่าต่ออีก 5 นาที
7. ทิ้งไว้อีก 15 นาที เพื่อรอให้สารละลายแยกชั้น เมื่อแยกแล้วจะเห็นเป็น 3 ชั้น
8. ดูดสารละลายชั้นบนสุด(Hexane)ด้วยPipetteแล้วใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นนำสารละลายที่จากการสกัด ไปวิเคราะห์ในชั้นตอนต่อไปทันที

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนในแตงโม

3.4.1 อุปกรณ์การวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนในแตงโม

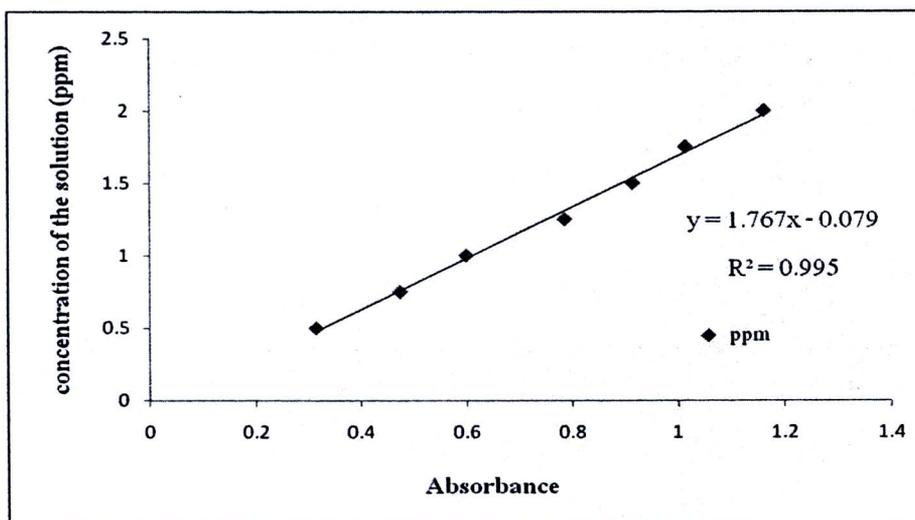
1. เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

3.4.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนในแตงโมโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

1. เตรียมสารละลายที่ได้จากการสกัดแตงโม (ขั้นตอนที่ 3.4.3.4) และสารละลายมาตรฐาน (Hexane) ใส่ใน Cells Quartz
2. เลือกความยาวคลื่นที่ 503 นาโนเมตร
3. วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและสารละลายที่ได้จากการสกัดแตงโม ตามลำดับ
4. อ่านค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง
5. คำนวณค่าความเข้มข้นของไลโคปีนในสารละลายที่ได้จากการสกัดแตงโม

3.4.3 การสร้างสมการเปรียบเทียบค่าที่วัดได้จาก Spectrophotometer ระหว่างไลโคปีนบริสุทธิ์กับค่าที่ได้จากการสกัด

การเปรียบเทียบค่าปริมาณไลโคปีนจะเริ่มจากการเตรียมสารละลายไลโคปีนบริสุทธิ์ให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 ppm โดยจะใช้ Hexane เป็นตัวทำละลาย จากนั้นจะนำสารละลายที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้มีค่าหลายระดับ เนื่องจากในการสร้างสมการเปรียบเทียบค่าจำเป็นต้องมีช่วงของข้อมูลที่หลากหลาย เพื่อให้สมการที่ได้มีค่าน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยในการทดลองนี้ได้ทำที่ความเข้มข้น 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 และ 2 ppm ตามลำดับ จากนั้นก็จะนำสารละลายที่ได้ทุกความเข้มข้นมาวัดค่าการดูดซับคลื่นที่ 503 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer ค่าที่ได้จากการวัดจะถูกนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดซับคลื่นที่ 503 นาโนเมตร (Absorbance) กับค่าความเข้มข้นของสารละลายไลโคปีน และหาสมการเพื่อนำไปใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของปริมาณไลโคปีนที่สกัดได้จากตัวอย่างแตงโม แสดงดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดซับคลื่นที่ 503 นาโนเมตร (Absorbance) กับค่าความเข้มข้นของสารละลายไลโคพิน ที่ความเข้มข้นไลโคพิน 7 ระดับ (0.5-2 ppm)

เมื่อได้สมการที่สามารถทำนายความเข้มข้นของปริมาณไลโคพินดังภาพที่ 3.4 แล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากขั้นตอนที่ 3.4.2 มาแทนในสมการก็จะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของปริมาณไลโคพินที่สกัดได้ในหน่วย ppm

3.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดย SPSS

ทำการจัดกลุ่มปริมาณไลโคพินของแต่ละอายุการเก็บเกี่ยวที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วย Spectrophotometer โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ $p \leq 0.05$

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัม VIS-NIR กับข้อมูลอ้างอิงจาก Spectrophotometer

3.6.1 อุปกรณ์และซอฟต์แวร์การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เครื่องคอมพิวเตอร์
2. ซอฟต์แวร์ The Unscrambler Version 9.8 (CAMO, Oslo, Norway)

3.6.2 การเตรียมข้อมูลก่อนการปรับแต่งสเปกตรัม

(ข้อมูลที่ได้จากการสแกนจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Unscrambler 9.8 software (Camo ASA, Oslo, Norway))

1. ค่าอ้างอิงของปริมาณไลโคพินในแตงโมถูกกำจัดค่าที่ผิดปกติ (Outliner) ออก โดยสมการตรวจสอบค่าที่ผิดปกติ สมการที่ 3.1

$$\frac{x - \bar{x}}{SD} \geq 3 \quad (3.1)$$

X คือ ค่าปริมาณไลโคพีน X คือ ค่าเฉลี่ย และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. สเปกตรัมของแสงโมแต่ละอายุการเก็บเกี่ยวทั้งฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อนถูกกำจัดสเปกตรัมที่ผิดปกติ ไม่เข้ากลุ่มออกด้วยการคัดด้วยตาและวิธี PCA

3. ข้อมูลสเปกตรัมของแสงโมถูกรวมเข้ากับค่าปริมาณไลโคพีน เรียงตัวอย่างจากน้อยไปหามาก โดยจะทำการแบ่งชุดข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม Calibration และกลุ่ม Prediction โดยใช้อัตราส่วน 5:2

สเปกตรัมที่นำมาใช้ในการสร้างโมเดลแบ่งเป็น 2 ชุด คือ ช่วง 607–1,068 นาโนเมตร และช่วง 700–1,100 นาโนเมตร เนื่องจากช่วงหลังไม่รวมความยาวคลื่นเนื่องจากแสงที่ทำให้เกิดสี

3.6.3 การปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองนั้นจะใช้ข้อมูลจากกลุ่ม Calibration ในการสร้างแบบจำลอง จะใช้แบบจำลองที่ได้จากค่าสเปกตรัมเดิมและจากค่าสเปกตรัมที่ได้รับการปรับแต่งโดย วิธีดังนี้

1. Raw spectra
2. Multiplicative Scatter Correction (Full MSC)
3. Baseline Offset
4. Standard Normal Variate (SNV)
5. Savitzky-Golay first differentiation ที่ derivative segment 11 nm
6. Savitzky-Golay first differentiation ที่ derivative segment 21 nm
7. Savitzky-Golay second differentiation ที่ derivative segment 11 nm
8. Savitzky-Golay second differentiation ที่ derivative segment 21 nm

3.6.4 การสร้างแบบจำลอง

หลังจากทำการปรับแต่งสเปกตรัมตามวิธีดังที่ได้กล่าวมาแต่ละวิธีแล้ว สร้างแบบจำลองที่ใช้เพื่อประเมินค่าปริมาณไลโคพีน ในแสงโม ด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) โดยใช้ช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 608-1180 nm เพราะช่วงอื่นมีสัญญาณรบกวนเกิดขึ้น ซึ่งเมื่อได้แบบจำลองแล้ว จะนำแบบจำลองที่ได้มาทำนายค่าปริมาณไลโคพีน ของแสงโม ของกลุ่มข้อมูลชุด Prediction หลังจากนั้นจึงนำผลการทำนายที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โมเดลของแต่ละองค์ประกอบถูกคัดเลือกบนพื้นฐานของค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) ที่สูงที่สุด ค่า Standard error of prediction (SEP) ที่ต่ำที่สุด ค่า bias ที่ต่ำที่สุด ค่า $|r|$ ระหว่าง 0.71-0.80 ใช้ได้สำหรับการคัดแยกอย่างหยาบ 0.81-0.90 ใช้ได้สำหรับการคัดแยกหรือการประมาณค่า ค่าอัตราส่วนระหว่างช่วงข้อมูลต่อ SEP (RER) ควรสูงเท่าที่จะเป็นไปได้ ถ้าค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ไม่แนะนำในการประมาณค่า 6-8 เหมาะสำหรับการคัดแยกแบบหยาบๆ 9-11 เหมาะสำหรับการคัดเลือก 12-14 คัดต่อการควบคุมคุณภาพ 15-18 ดีมากในการควบคุมกระบวนการและค่าอัตราส่วนระหว่าง SD ต่อ SEP (RPD) ควรสูงกว่า

2.4 ถ้าค่า 2.5-2.9 พอใช้สำหรับการคัดเลือกแบบหยาบๆ 3.0-3.4 คดีต่อการควบคุมคุณภาพ 3.5-4.0 ดีมาก สำหรับการควบคุมกระบวนการ [7]

3.6.5 การพิสูจน์ความแม่นยำของแบบจำลองด้วยกลุ่มตัวอย่างใหม่

จากการทดลองข้างต้นทำให้ได้แบบจำลองการวิเคราะห์ค่าปริมาณไลโคพีน ของแตงโมที่ดีที่สุดของแต่ละฤดู ดังนั้นจึงได้ทำการสุ่มตัวอย่างแตงโมที่จะมาเป็นชุดทำนายค่าความหวานจากห้างสรรพสินค้าจำนวน 15 ผล ซึ่งแตงโมที่ได้จากการสุ่มมานั้นเป็นแตงโมที่วางจำหน่ายในช่วงการเพาะปลูกของฤดูร้อน ที่อายุการเก็บเกี่ยว 25 วันหลังดอกบาน (อายุเก็บเกี่ยวทางการค้า) ดังนั้นจึงเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดที่เพาะปลูกในฤดูร้อนและทุกฤดู (ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน) มาเพื่อใช้ในการทำนาย การปรับแต่งค่าสเปกตรัมของกลุ่มตัวอย่างใหม่จะต้องใช้วิธีเดียวกับที่ใช้ในการปรับแต่งสเปกตรัมของแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ถูกเลือก