

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานโดยใช้เทคนิคอินฟราเรด
สเปกโตรสโกปี

STUDY ON COMPOSITIONS AND STANDARD IDENTIFICATIONS OF
HONEY BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPIC TECHNIQUE

ศุภกิจ หอวิมานพร
SUPPAKIT HOWVIMANPORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-EN-M-100-090

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรด
สเปกโตรสโกปี

STUDY ON COMPOSITIONS AND STANDARD IDENTIFICATIONS OF
HONEY BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPIC TECHNIQUE



T105063

ศุภกิจ หอวิมานพร

SUPPAKIT HOWVIMANPORN

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....105063

วัน,เดือน,ปี.....1 2 พ.ย. 2552

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-EN-M-100-090

**STUDY ON COMPOSITIONS AND STANDARD IDENTIFICATIONS OF
HONEY BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPIC TECHNIQUE**

SUPPAKIT HOWVIMANPORN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING IN AGRICULTURAL ENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2009

KMITL-2009-EN-M-100-090

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

Thesis Title Study on Compositions and Standard Identifications of Honey by Near Infrared Spectroscopic Technique

นักศึกษา นายศุภกิจ หอวิมานพร

รหัสประจำตัว 47060901

ปริญญา วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิศวกรรมเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์

หมายเลขวิทยานิพนธ์ KMITL-2009-EN-M-100-090

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ณัฏวิภา	เจียรไนวัชระ	ณัฏวิภา / ธีรชัชวาลย์
ดร.สุตาภัทร	แก้วนเขาเม็ง	สุตาภัทร / ธีรชัชวาลย์
ดร.ศุมาพร	เกษมสำราญ	ศุมาพร / ธีรชัชวาลย์
ดร.ประสันต์	ชุ่มใจหาญ	ประสันต์ / ธีรชัชวาลย์
รศ.ดร.ปานมนัส	ศิริสมบูรณ์	ปานมนัส / ธีรชัชวาลย์

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ วันพุธที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 เวลา 09.30-11.30 น.

สถานที่สอบ ณ อาคาร A ชั้น 3 ห้องประชุม 2

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิศวกรรมศาสตร์ รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย เดชหาญ)

คณบดี คณะวิศวกรรมศาสตร์

วันที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2552

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี
นักศึกษา	นายศุภกิจ หอวิมานพร
รหัสประจำตัว	47060901
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเกษตร
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ปานมนัส ศิริสมบุญ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มี วัตถุประสงค์เพื่อเป็นการศึกษาการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 nm ในการทำนายองค์ประกอบของน้ำผึ้งและการแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐาน โดยวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และ ซูโครสของน้ำผึ้ง โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (High Performance Liquid Chromatography HPLC) และการหาค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) และความชื้นด้วยการวัดโดยใช้ Refractrometer และใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปีสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมและค่าองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้ง ก่อนการทำชุดข้อมูล calibration ได้ใช้เทคนิค Principal Component Analysis (PCA) ตรวจสอบข้อมูลที่ผิดปกติจากกลุ่ม สร้างแบบจำลองด้วยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) โดยใช้สเปกตรัมเดิม หรือ ปรับแต่งสเปกตรัมด้วย First and Second Derivative (Savitzky-Golay algorithm with segment, 10 and 20 nm, second polynomial), Full Multiplicative Scatter Correction (MSC) และ Standard Normal Variance (SNV) แบบจำลองของฟรุกโตสที่การปรับแต่งสเปกตรัม 1st derivative with segment of 20 nm มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด เท่ากับ 0.851 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 7.69 % ค่า bias เท่ากับ 0.031 % ที่แบบจำลองของกลูโคสที่การปรับแต่งสเปกตรัม 1st derivative with segment of 20 nm มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด เท่ากับ 0.807 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 6.15 % ค่า bias เท่ากับ 0.47 % ที่แบบจำลองของซูโครสที่การปรับแต่งสเปกตรัม 2nd derivative with segment of 20 nm มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด เท่ากับ 0.937 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 4.07 % ค่า bias เท่ากับ 0.28 % ที่แบบจำลองของของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) ที่การปรับแต่งสเปกตรัม 2nd derivative with segment of 20 nm มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด เท่ากับ 0.965 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.57 % Brix ค่า bias เท่ากับ -0.23 %Brix

ที่แบบจำลองของความชื้น ที่การปรับแต่งสเปกตรัม MSC มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด เท่ากับ 0.979 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.47 % ค่า bias เท่ากับ 0.11 %

ส่วนการแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งจะใช้วิธี Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS – DA) และ Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) ในการแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานนั้นพบว่าวิธี PLS-DA สามารถแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน ได้ถูกต้องกว่าวิธีแบบ SIMCA ซึ่งค่าการแบ่งกลุ่มนั้นพบว่าแบบจำลองของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานจะทำนายตัวเองได้ถูกต้อง 92.3 % และทำนายกลุ่มอื่นได้ถูกต้อง 100 % ส่วนแบบจำลองของน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานจะทำนายตัวเองได้ถูกต้อง 100 % และทำนายอีกกลุ่มหนึ่งได้ถูกต้อง 92.3 % การทำนายโดยรวมมีความถูกต้อง 95.8 %

Thesis Title	Study on the compositions and standard Identifications of honey by near infrared spectroscopic technique
Student	Mr Suppakit Howvimanporn
Student ID.	47060901
Degree	Master of Engineering
Program	Agricultural Engineering
Year	2009
Title Advisor	Assoc. Prof. Dr. Panmanas Sirisomboon

ABSTRACT

This study aimed to use near infrared spectroscopy (NIRS) (1100-2500) in prediction of the honey composition and in identification of honey authenticity. The reference laboratory used high performance liquid chromatography (HPLC) to measure fructose, glucose, and sucrose of honey and digital refractometer to measure soluble solids (sweetness) and moisture content. NIRS was used to obtain NIR spectrum of major composition of honey. Before developing of calibration set, principal component analysis (PCA) was used to detect outlier spectrum. Partial least square regression (PLSR) was used to develop calibration model using raw spectrum or pre-treated spectrum by first and second derivative (Savigky-Goley algorithm with segment 10 and 20 nm, second polynomial, full multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variance (SNV). To predict fructose the model developed from spectra of first derivative with segment of 20 nm prediction correlation coefficient (r) of 0.851, standard error of prediction (SEP) of 7.69% and bias of 0.03%. To predict glucose, The model developed from first derivative with segment of 20 nm spectra provided r of 0.87, SEP of 6.15% and bias of 0.48%. To predict sucrose, the model developed from second derivative with segment of 20 nm provided r of 0.937, sep of 4.07% and bias of 0.29%. To predict soluble solids (sweetness), the model developed from second derivative spectra with segment of 20nm provided r of 0.965, SEP of 0.57% Brix and bias of 0.23% Brix. To predict moisture content, the model developed from MSC spectra provided r of 0.979, SEP of 0.47 % and bias of 0.11%

For identification of honey authenticity, partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and soft independent modeling of class analogy (SIMCA) were used. PLS-DA showed better performance in classifying groups of real honey and false honey than SIMCA. Model of real

honey could self-predict with 92.3% correctness and other group-predict with 100% correctness. Model of false honey could self-predict with 100% correctness and other group-predict with 92.3% correctness. The percentage of overall correct classification was 95.8 %.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างเรียบร้อย เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากท่านผู้มีพระคุณหลายท่าน โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. ปานมนัส ศิริสมบูรณ์ ที่ให้คำแนะนำ สั่งสอน ตลอดจนช่วยเหลือด้านทุนวิจัย ดร. ศุมาพร เกษมสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การอุปการะด้านเครื่อง NIR อาจารย์วรุณี ธนะแพสย์ สำหรับคำแนะนำและการใช้เครื่องมือ นื่องเสกและเจ้าหน้าที่จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี สจล. สำหรับคำแนะนำและการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์น้ำผึ้ง ที่ให้คำแนะนำและการช่วยเหลือที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ขอขอบคุณอาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะ

ขอบคุณพี่น้องทุกๆคน ในภาควิชาวิศวกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือ

และสุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้องและเพื่อนๆทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจที่คิดตลอดมา

ศุภกิจ หอวิมานพร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา.....	2
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.5 ขั้นตอนการศึกษา.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 วิธีการผลิตน้ำผึ้ง	4
2.2 คุณสมบัติของน้ำผึ้งตามมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ.2543.....	4
2.3 น้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน.....	5
2.4 การตลาดของน้ำผึ้งในประเทศไทย.....	7
2.5 HPLC : HIGH PERFORMANCE LIQUID CHOMATOGRAPHY	9
2.6 ทฤษฎีพื้นฐานของการวัดแบบ NIR spectroscopy.....	16
2.7 การปรับแต่ง NIR Spectra ก่อนการวิเคราะห์ (Pretreatment of spectral data).....	18
2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัม NIR.....	24
2.9 เทอมที่จำเป็นในการประเมินความแม่นยำและความถูกต้องของโมเดล.....	27
2.10 ประโยชน์ของการใช้เทคนิค NIR.....	35
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	36

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งที่นำมาทดลอง.....	38
3.2 การวิเคราะห์อ้างอิง.....	38
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัม NIR กับข้อมูลอ้างอิง.....	43
3.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	44
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปราย.....	46
4.1 ผลการทดลองการหาค่าประกอบของน้ำผึ้ง.....	46
4.2 ผลการทำกรทำนายการแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้ง.....	59
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	63
5.1 การทดสอบหาค่าประกอบของน้ำผึ้ง.....	63
5.2 การแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งไม่ได้มาตรฐาน.....	64
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	64
เอกสารอ้างอิง.....	65
ภาคผนวก.....	68
ภาคผนวก ก Relation between Brix value (%) and refractive index (nD)	68
ภาคผนวก ข Relationship between refractive index and water contents of honey.....	69
ภาคผนวก ค ผลการหาความชื้น	71
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์น้ำผึ้งด้วย HPLC.....	75
ภาคผนวก จ Results of PLS regression of honey	77
ภาคผนวก ฉ มาตรฐาน AOAC ในการวัดความชื้นและปริมาณน้ำตาลของน้ำผึ้ง.....	82
ภาคผนวก ช ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่.....	83

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ตารางแสดงองค์ประกอบมาตรฐานของน้ำผึ้งแท้	1
2.1 ช่วงคลื่นแม่เหล็กย่านอินฟราเรด	16
2.2 ตัวอย่างการคำนวณค่า Coefficient of variability (CV %)	28
2.3 การแปลความหมายของค่า r และ r^2	29
2.4 รูปแบบของความชื้น	30
2.5 ค่าทางสถิติ RPD และ RER	34
4.1 ค่าทางสถิติของชุด Calibration และชุด Prediction ขององค์ประกอบของน้ำผึ้ง	48
4.2 ผลของ PLS regression ของแต่ละองค์ประกอบของน้ำผึ้ง	49
4.3 ผลการคัดแยกน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานออกจากกันด้วย model SIMCA	60
4.4 ผลการคัดแยกน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานออกจากกันด้วย model PLD-DA	62

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC	9
2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC.....	10
2.3 ภาพขณะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่.....	11
2.4 การฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC.....	12
2.5 Column และอุปกรณ์	13
2.6 จำนวนจุดทั้งสองด้าน ($m = 2, n = 5$) ของการเฉลี่ย.....	18
2.7 Segment size และ Gap size ที่กำหนดในสเปกตรัมเพื่อคำนวณ Derivative	21
2.8 First Derivative และ Second Derivative เปรียบเทียบกับสเปกตรัมเดิม	22
2.9 การปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้ MSC.....	23
2.10 ตัวอย่างของประเภทความชัน.....	31
3.1 ขั้นตอนในการทดลอง.....	39
3.2 เครื่อง refractometer เพื่อวัดความชื้นร่วน (ATAGO - PAL2)	40
3.3 การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง	41
3.4 เครื่อง InfraAlyzer 500 (Bran+Luebbe)FQA-NIR Gun.....	42
3.5 ภาพการช่องใส่ตัวอย่าง.....	43
3.6 Sample cell สำหรับใส่ตัวอย่าง.....	43
4.1 raw spectra ของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส และความชื้น.....	46
4.2 ค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมเดิมของน้ำผึ้ง.....	47
4.3 สเปกตรัม NIR (2^{nd} derivative) ของของน้ำผึ้ง.....	48
4.4 ผลการทำนายน้ำตาลฟรุกโตสกับค่าอ้างอิงโดยวิธี HPLC.....	50
4.5 Regression coefficient ของ น้ำตาลฟรุกโตส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	50
4.6 X-loading weight plot ของ ฟรุกโตส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	51
4.7 แสดงผลการทำนายน้ำตาลกลูโคสกับค่าอ้างอิงโดยวิธี HPLC.....	52
4.8 Regression coefficient ของ น้ำตาลกลูโคส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	52
4.9 X-loading weight plot ของ กลูโคส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	53
4.10 ผลการทำนายน้ำตาลซูโครสกับค่าอ้างอิงโดยวิธี HPLC.....	54
4.11 Regression coefficient ของ น้ำตาลซูโครส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง	54
4.12 X-loading weight plot ของ ซูโครสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	55
4.13 ผลการทำนายค่า ความชื้นกับค่าอ้างอิง.....	56

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.14 Regression coefficient ของ ความชื้น ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	56
4.15 X-loading weight plot ของ ความชื้นที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	57
4.16 ผลการทำนายค่า Brix (ความหวาน) กับค่าอ้างอิง.....	58
4.17 Regression coefficient ของ Brix (ความหวาน) ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	58
4.18 X-loading weight plot ของ Brix(ความหวาน) ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง.....	59
4.19 ผลการคัดแยกน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานออกจากกันด้วยวิธี SIMCA.....	61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตน้ำผึ้งออกสู่ตลาดน้ำผึ้งเพื่อใช้บริโภคและเป็นส่วนประกอบต่างๆ ของอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ซึ่งน้ำผึ้งที่ผลิตออกมาในแต่ละท้องถิ่นจะมีลักษณะที่แตกต่างกันเช่น สี กลิ่น ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารของผึ้งในปัจจุบันเนื่องจากปริมาณน้ำผึ้งมีเป็นจำนวนมากและมาจากหลายแหล่ง การจำแนกกว่าน้ำผึ้งนั้นเป็นน้ำผึ้งที่ได้จากธรรมชาติหรือได้จากการปลอมปน หรือปรุงแต่งขึ้นจึงทำได้ยาก โดยปกติส่วนประกอบของน้ำผึ้งหลักจะประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และความชื้นดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 1.1 ตารางแสดงองค์ประกอบมาตรฐานของน้ำผึ้งแท้ [1]

ความชื้น	17.20%
น้ำตาลเลวูโลส Levulose หรือ D-Fructose	38.19%
น้ำตาลเดกโทส Dextrose หรือ D-Glucose	31.21%
น้ำตาลซูโครส Sucrose หรือน้ำตาลธรรมชาติ	1.31%
น้ำตาลมอลโทส Maltose	7.35%
น้ำตาลอย่างอื่น Higher Sugar	1.50%
รวม	96.76%
กรด Acids	0.57%
โปรตีน Protein	0.26%
แร่ธาตุ Minerals	0.17%
ส่วนประกอบอื่น Minor Component	2.21%
รวม	99.97%

นอกจากนี้สมบัติเฉพาะของน้ำผึ้งโดยทั่วไปนอกจากมีสี กลิ่น รสและสารอาหารแตกต่างกันแล้ว ยังมีสมบัติเฉพาะอย่างที่แตกต่างกันด้วย เช่น การตกผลึก การเปลี่ยนสี การดูดความชื้น[1]

องค์ประกอบของน้ำผึ้งที่ใช้วัดในห้องปฏิบัติการในโรงงานทำได้ยากและใช้เวลานานโดยใช้วิธี HPLC ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างยุ่งยากและใช้เวลาในการวิเคราะห์นานโดยใช้เวลาประมาณ 10 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่างและต้องใช้เวลาเตรียมการทำงานของเครื่องถึงประมาณ 2 ชั่วโมง ส่วนประกอบของน้ำผึ้งปลอมที่ขายในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล มีทั้งน้ำตาลทราย น้ำตาลโคคนด และ น้ำตาลมะพร้าว รายที่เจือปนด้วยน้ำตาลทรายมักใช้กรดอมล หรือกรดน้ำส้มเพื่อให้ น้ำตาลเหลวไม่จับตัว ส่วนน้ำผึ้งปลอมที่ทำด้วยน้ำตาลมะพร้าว หรือน้ำตาลโคคนด โดยการเติมน้ำตาลสดให้มีความเข้มข้นสูง ๆ แล้วตกใส่กระบอกทิ้งไว้ 2-3 เดือนเพื่อให้ น้ำตาลอื่นๆ ตกผลึกนอนกันและจับตัวกันรอบ ๆ กระบอกส่วนน้ำตาลที่เหลือใจกลางกระบอกจะมีลักษณะเหมือนน้ำผึ้ง ชาวบ้านเรียกน้ำตาลชนิดนี้ว่าน้ำตาลอู่นและยังมีอีกหลายวิธีซึ่งในการตรวจสอบนั้นทำได้ยากและใช้เวลามากในปัจจุบันมีการใช้เครื่องมือวัดที่ทันสมัยมากขึ้นช่วยลดเวลาในการตรวจสอบ วิธีการที่จะทำการศึกษานี้คือเทคนิค NIR Spectroscopy โดยทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่องวัดแบบ NIR Spectrometer ในช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆ กับค่าองค์ประกอบต่าง ๆ (กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส ความชื้น และ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้) ที่วัดได้จากวิธีการทางเคมีจากนั้นจึงนำไปสร้างสมการหรือแบบจำลองแบบเชิงปริมาณ เพื่อทำนายค่าองค์ประกอบต่าง ๆ นอกจากนี้ยังนำข้อมูลสเปกตรัม การดูดกลืนแสงไปสร้างแบบจำลองโดยวิธี Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) และ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) เพื่อจำแนก น้ำผึ้งว่าเป็นน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานหรือไม่ได้มาตรฐาน

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาหาองค์ประกอบของน้ำผึ้งที่มาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยโดยวิธีการทางเคมี และทำนายค่าด้วยเทคนิค NIR Spectroscopy

1.2.2 จำแนกกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานที่มาจากแหล่งต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค NIR Spectroscopy

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

สเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของน้ำผึ้งมีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบของน้ำผึ้งเช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส ความชื้น และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงคลื่นเนียร์อินฟราเรดของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน มีความแตกต่างกันและสามารถแยกกลุ่มกันได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาองค์ประกอบของตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผลิตในประเทศไทย ทั้งผึ้งเลี้ยงที่ปล่อยหากินในป่า ผึ้งป่า และน้ำผึ้งปลอม ที่จำหน่ายภายในประเทศ โดยใช้วิธีทางเคมีและเทคนิค NIR Spectroscopy

1.5 ขั้นตอนการศึกษา

1.5.1 ศึกษาตลาดน้ำผึ้งในประเทศไทย

1.5.1.1 การส่งออกและการนำเข้าของน้ำผึ้ง

1.5.1.2 การบริโภคภายในประเทศ

1.5.1.3 ใช้ในอุตสาหกรรม

1.5.2 ศึกษาการองค์ประกอบน้ำผึ้งในประเทศไทย

1.5.2.1 น้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน

1.5.2.2 น้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน

1.5.3 ศึกษา NIR Spectrum ของน้ำผึ้งในประเทศไทย

1.5.4 ศึกษาคุณสมบัติ และองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยวิธีการทางเคมีและเทคนิค NIR Spectroscopy

1.5.5 สร้างแบบจำลองเพื่อทำนายองค์ประกอบของน้ำผึ้ง โดยวิธี Partial Least Squares regression (PLS)

1.5.6 แบ่งกลุ่มระหว่างน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานด้วยเทคนิค Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) และ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)

1.5.7 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1.6.1 ได้แบบจำลองและเทคนิคทาง Near Infrared Spectroscopy ที่สามารถใช้ในการประเมินปริมาณองค์ประกอบของน้ำผึ้งเพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำผึ้งได้

1.6.2 สามารถนำเทคนิคทาง Near Infrared Spectroscopy ไปใช้ในการแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานได้

บทที่ 2

วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำผึ้ง คือน้ำหวานที่ผึ้งเก็บมาจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ (nectar) โดยผึ้งจะกลืนน้ำหวานลงสู่กระเพาะน้ำหวาน ซึ่งจะมีเอนไซม์ช่วยย่อยน้ำหวานแล้วนำมาเก็บไว้ในหลอดรวงผึ้ง จากนั้นน้ำผึ้งค่อยๆ บ่มตัวเองโดยการระเหยน้ำออกไปจนน้ำผึ้งมีปริมาณน้ำตามที่เข้มข้นขึ้นจนได้ระดับที่เหมาะสมกับการเก็บรักษา ฝัองงานก็จะปิดฝาหลอดรวง เราเรียกน้ำผึ้งนี้ว่า “น้ำผึ้งสุก” เป็นน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน คือมีน้ำอยู่ไม่เกิน 20-21 เปอร์เซ็นต์ น้ำผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ของน้ำหวานจากดอกไม้ และจากแหล่งน้ำหวานอื่น ๆ ที่ฝัองงานนำมาเก็บสะสมไว้ และผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพบางประการแล้วสะสมไว้ในรังผึ้ง [2]

2.1 วิธีการผลิตน้ำผึ้ง [3]

เมื่อฝัองงานเก็บน้ำหวานจากดอกไม้ลงสู่กระเพาะน้ำหวาน จะมีเอนไซม์จากต่อมน้ำลายขับออกมาเปลี่ยน หรือเมตาบอลิซึมน้ำตาลกลูโคส และ ฟรุคโตสเป็นน้ำตาลแปรรูป คือน้ำตาล ลิวโลส เดกซ์โทรส และมอลโทส นอกจากนั้นยังมีน้ำตาลอื่น ๆ อีก แต่มีจำนวนน้อยมากปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นตั้งแต่ผึ้งเริ่มบินกลับรัง ในขณะที่ผึ้งกระพือปีกจะเกิดพลังงานความร้อนช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ ตลอดจนช่วยเผาผลาญลดความชื้นในน้ำหวานให้กลายเป็นน้ำผึ้งเร็วขึ้น เมื่อฝัองงานกลับถึงรัง จะคายน้ำหวานแปรรูปนี้ให้กับฝัองงานประจำรังซึ่งจะรับกันด้วยปากต่อกปาก น้ำหวานแปรรูปนี้ยังไม่เป็นน้ำผึ้งที่สมบูรณ์ เพราะยังมีความชื้นหรือน้ำในน้ำหวานจำนวนมากถึง 30- 40 % ต่อมาฝัองงานประจำรังจะนำน้ำหวานนี้ไปเก็บในหลอดรวงน้ำผึ้งตอนเย็นผึ้งกลับรังกันเป็นส่วนใหญ่จะช่วยกันกระพือปีก ช่วยให้มีการระเหยของน้ำหวานอีก จนได้น้ำผึ้งที่สมบูรณ์คือน้ำเหลืออยู่เพียง 20- 25 % เท่านั้น หลังจากนั้นฝัองงานจะใช้ไขผึ้งปิดหลอดรวงที่เก็บน้ำผึ้งไว้เพื่อให้พลังงานในชีวิตประจำวันและยามขาดแคลนอาหารต่อไป

2.2 สมบัติของน้ำผึ้งตามมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543 [4]

สมบัติของน้ำผึ้งตามมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุขดังนี้

1. มีสี กลิ่นและรส ตามลักษณะเฉพาะของน้ำผึ้ง
2. มีน้ำตาลรีดิวซิงคิดเป็นน้ำตาลอินเวอร์ตไม่น้อยกว่าร้อยละ 65 ของน้ำหนัก
3. มีความชื้นไม่เกินร้อยละ 21 ของน้ำหนัก
4. มีน้ำตาลซูโครสไม่เกินร้อยละ 0.1 ของน้ำหนัก

5. มีสารที่ไม่ละลายน้ำไม่เกินร้อยละ 0.1 ของน้ำหนัก
6. มีเถ้าไม่เกินร้อยละ 0.6 ของน้ำหนัก
7. มีค่าความเป็นกรดไม่เกิน 40 มิลลิอิกวาแลนต์ของกรดต่อ 1 กิโลกรัม
8. มีค่าไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (Hydroxymethylfurfural) ไม่เกิน 80 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม
9. ไม่ใช้วัตถุเจือปนอาหาร
10. ไม่มีสี
11. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
12. ไม่มีสารพิษจากจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ
13. ตรวจพบยีสต์และราไม่เกิน 10 ต่อน้ำผึ้ง 1 กรัม
14. ไม่สารปนเปื้อนอื่น

2.3 น้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอม [1]

ความแตกต่างของน้ำผึ้งปลอมกับน้ำผึ้งแท้ ย่อมเป็นที่ยากรู้ในหมู่ผู้บริโภคน้ำผึ้งเพราะน้ำผึ้งปลอมมักมีขายอยู่ทั่วไปในดงในป่า ในหุบเขา และในแผ่นชนที่ด้อยพัฒนาทั้งหลาย เช่น กะเหรี่ยง แม้ว มูเซอร์ อีก็้อ ไทยใหญ่ โดยผู้ขายมักโฆษณาว่าเป็นน้ำผึ้งแท้ แม้ไม่เชื่อก็จะให้พิสูจน์ด้วยวิธีการต่างๆ อาทิ เช่น การใช้หัวไม้ขีดจุ่มลงไปใต้น้ำผึ้ง แล้วนำมาจุดข้อมคิดไฟ หากหยคน้ำผึ้งลงในน้ำ น้ำผึ้งนั้นย่อมไม่ละลาย ถ้าหยดบนกระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษเช็ดปาก ข้อมไม้ขีดขาบเข้าไปในกระดาษ แล้วถ้าหยดให้มด มดต้องไม่กิน เพราะน้ำผึ้งนั้นไม่ใช่น้ำตาลธรรมดาเป็นของวิเศษมดจึงไม่กล้ากิน หากหยดลงไปใต้น้ำชา (ชาจีน) น้ำชาต้องไม่เปลี่ยนสี คนส่วนมากหลงเชื่อเพราะไม่เคยรู้และเข้าใจหรือสัมผัสกับน้ำผึ้งแท้และเทียมมาก่อน

แต่จากการเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งที่วางขายโดยทั่วไป พบว่าน้ำผึ้งเทียมที่ทำมาจากน้ำตาลแล้วตั้งชื่อเป็นการค้าว่า น้ำผึ้ง ในรูปสลากที่ปิดขวดเป็นภาษาอังกฤษเช่นมีชื่อว่า Honey syrup โดยคำว่า Honey มีขนาดใหญ่ให้ดูเด่นส่วนคำว่า Syrup ขนาดเล็กนิดเดียว ความหมายก็คือน้ำเชื่อมที่มีชื่อว่า น้ำผึ้งนั่นเอง โดยมีชื่อเป็นการค้าต่าง ๆ กันเช่น IMPERIAL HONEY syrup, COLDEN HONEY Syrup, SIS HONEY Syrup นอกจากนี้ก็มีน้ำผึ้งที่ไม่ปิดสลากไม่มีชื่อทางการค้า ไม่สามารถทราบแหล่งผลิตหรือผู้จำหน่ายที่แท้จริง ผู้ขายมักจะบอกว่าเป็นน้ำผึ้งแท้จากธรรมชาติจริง ๆ บางรายใส่ตัวผึ้งลงไปล่อข้อยู่ในขวดให้เห็นด้วยว่าผึ้งไม่เนาเปื้อย ตัวอย่างที่ได้มามีทั้งที่เป็นน้ำผึ้งเทียมและน้ำผึ้งแท้ แต่ส่วนใหญ่ไม่แท้ส่วนประกอบของน้ำผึ้งเทียมที่ทำขายในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล น้ำตาลที่ใช้มีทั้งน้ำตาลทราย น้ำตาลโคคนด และน้ำตาลมะพร้าว รายที่ใช้น้ำตาลทรายมักเจือ

ปนด้วยนมกรด หรือกรดน้ำส้ม กรดส้ม กรดควิส้ม เพื่อให้น้ำตาลเหลวไม่จับตัวเป็นก้อนหรือผลึกใสสีแฉ่ง สีที่เข้มมีทั้งชนิดที่ใช้ปรุงอาหารและชนิดที่ใช้ย้อมผ้าซึ่งอันตรายต่อผู้บริโภค ใส่นะบะแซ (ผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลี) มีรสเปรี้ยวเล็กน้อยเพื่อให้เหนียวหนืดมากขึ้น บางรายใส่สารกันบูด ใส่อกลิ่นหอม น้ำผึ้งเทียมชนิดนี้จึงมีความเป็นมันและเมือกกลิ่น ไม่ซึมซาบเมื่อหยดลงบนกระดาษฟางหรือกระดาษซับ บางรายเป็นนักเคมีใช้สารเคมีที่มีความเป็นด่างผสมลงในส่วนผสมดังกล่าวเพื่อให้เกิดความเป็นกลางแล้วใช้เครื่องกวน Mixer กวนจนส่วนผสมนั้นเกาะตัวเข้ากันเป็นอย่างดี บางรายมีการใช้เครื่องนวด Homogenizer ที่สามารถนวดส่วนผสมนั้นให้เข้ากันทุกอนุภาคจนเป็นเนื้อเดียวกันหมด น้ำผึ้งเทียมชนิดนี้มีวิธีการทำที่ค่อนข้างยุ่งยากและประณีต แต่พิสูจนได้ง่ายเพียงขงลงในน้ำชาก็ทำให้น้ำชาเปลี่ยนสีคล้ำขึ้น

ส่วนน้ำผึ้งเทียมที่ทำด้วยน้ำตาลมะพร้าว หรือน้ำตาลโตนดนั้นทำได้ง่ายไม่ต้องใช้ความรู้และเทคโนโลยีอะไรเลย ระดับชาวบ้านธรรมดาาก็ทำได้ด้วยการเติวน้ำตาลสดให้มีความเข้มข้นสูงๆ แล้วตักใส่กระบอกไม้ไผ่ปิดฝาป้องกันสัตว์และสิ่งต่าง ๆ ตกลงไปเสร็จแล้วทิ้งไว้วัน ๑ ประมาณ 2-3 เดือน เพื่อให้น้ำตาลส่วนหนึ่งตกผลึกนอนก้นและจับตัวรอบ ๆ กระบอก น้ำตาลอีกส่วนหนึ่งซึ่งอยู่ใจกลางกระบอกไม้ไผ่ตกผลึกเป็นน้ำตาลเหลวเหนียวหนืดเล็กน้อย กลิ่นหอมคล้ายน้ำผึ้งชาวบ้านเรียกน้ำตาลในกระบอกนี้ว่าน้ำตาลหุงน หรือน้ำตาลอ่อน บางท้องถิ่นก็เรียกว่าน้ำผึ้ง นิยมใช้ในการกวนขนม กวนกระยาสารท กวนข้าวกระยาพิษหรือข้าวยาคุ น้ำผึ้งที่จากรมวิธีนี้มีกลิ่นหอมในตัวเอง มักถูกบรรจุขวดหรือบีบแล้วออกจำหน่ายเป็นน้ำผึ้งด้วยราคาค่อนข้างแพง เพื่อให้คนเชื่อถือ การพิสูจนด้วยชาจีนจะไม่ได้ผล เพราะสีของน้ำมีลักษณะเช่นเดียวกับน้ำผึ้งทุกประการ

สำหรับในสหรัฐอเมริกาสามารถใช้แป้งข้าวโพดหมักได้เป็นน้ำตาล (Corn Syrup) แล้วผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ จนได้น้ำตาลฟรุกโตสชั้นสูง (High Fructose) ซึ่งมีคุณค่าและสารอาหารเหมือนกับน้ำผึ้ง [5] ในจีน ใต้หวัน ก็สามารถทำได้และบรรจุขวดขายในรูปน้ำผึ้งแต่มีการบอกไว้ว่าเป็นน้ำผึ้งสังเคราะห์โดยใช้คำว่า Honey Artificial ญี่ปุ่นได้นำน้ำตาลชนิดนี้ไปให้ฝรั่งกินแล้วเก็บผลผลิตที่ได้มาจำหน่ายซึ่งมีสมบัติเช่นเดียวกับน้ำผึ้งในธรรมชาติแต่กลิ่นหอมน้อยกว่า

น้ำผึ้งแท้ันมีทั้งที่เอาหัวไม้ขีดจุ่มลงไปแล้วจุดไฟคืดและจุดไม้คืด มีทั้งชนิดที่หยดลงไปในน้ำแล้วไม่ละลายและละลาย หวดในกระดาษฟาง กระดาษหนังสือพิมพ์แล้วซึมซาบเข้าไปในเนื้อกระดาษแล้วไม่ซึมเลย แต่ที่เป็นความจริงมากที่สุดก็คืออมคชอบกิน และชอบยิ่งกว่าน้ำตาลทุกชนิด หยดลงไปในน้ำชาต้องไม่เปลี่ยนสี สาเหตุที่น้ำผึ้งแท้หยดลงไปในน้ำละลายและหุดบนกระดาษแล้วซึมหรือเอาไม้ขีดจุ่มไปแล้วจุดไฟไม้คืดนั้นเป็นเพราะน้ำผึ้งมีความเข้มข้นสูง การพิสูจนน้ำผึ้งด้วยวิธีการดังกล่าวจึงใช้ไม่ได้ แม้แต่การใช้น้ำชาเป็นตัวทดสอบก็เช่นกัน น้ำตาลธรรมดาที่ใส่ลงไปในน้ำชาก็ไม่เปลี่ยนสี ด้วยเหตุนี้จึงมีการเอาน้ำตาลให้ฝรั่งกิน โดยเฉพาะผึ้งมิมที่เกาะทำรังตามกิ่งไม้เมื่อผึ้งเก็บสะสมน้ำตาลไว้ที่รวงรังเหนือคอนที่มีแผ่นรวงรังห้อยอยู่จนเต็มที่แล้วผู้เลี้ยงจึงตัดมาขายทั้งแผ่นรวงรัง เมื่อผู้ซื้อซื้อไปคั้นเอาเฉพาะน้ำผึ้งใส่ขวดไว้แล้วทำการชิมจะรู้สึกว่ารสเป็นน้ำตาล

ทดลองใส่ในน้ำซาก็ไม่เปลี่ยนสี แม้ผู้เลี้ยงที่ทำกันเป็นอุตสาหกรรมก็มีบางรายที่ไม่รักษา จรรยาบรรณ กระทำการคั่งกล่าวเพื่อผลผลิตให้เศรษฐกิจของตนเองดีขึ้น น้ำผึ้งอย่างนี้ไม่มีอันตราย ต่อผู้บริโภคแต่อย่างใด ถ้าไม่คิดในเรื่องความซื่อตรงและคำกำไรเกินควร ไม่เหมือนน้ำผึ้งที่มดไม่ ยอมกิน เพราะมีสารพิษเจือปนอยู่มากจึงไม่กล้ากิน อาจเป็นได้ว่าผู้ผลิตใช้สีที่มีสารพิษใส่ลงไป น้ำผึ้งอย่างนี้ไม่สมควรดื่มและกินเป็นอันตราย เพราะขนาดมดตัวเล็ก ๆ ไม่กล้ากินแล้วคนเราควร จะกินหรือ

2.4 การตลาดของน้ำผึ้งในประเทศไทย [6]

จากสถิติการจดทะเบียนฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งทั่วประเทศ ในปี 2547 มีจำนวน 1,567 ฟาร์มมีผึ้งที่เลี้ยงจำนวน 158,295 ตัวสามารถผลิตน้ำผึ้งได้ประมาณ 10,000 ตัน นมผึ้งประมาณ 100 ตัน เกสรผึ้งประมาณ 200 ตัน และไขผึ้งประมาณ 120 ตันซึ่งแหล่งเลี้ยงผึ้งกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของ ประเทศ ภาคเหนือมีการเลี้ยงมากที่สุดมีสัดส่วนร้อยละ 89.38 ของปริมาณการเลี้ยงผึ้งทั้งหมด จังหวัดที่มีการเลี้ยงมากที่สุดคือ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และแพร่ รองลงมาได้แก่ ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ มีสัดส่วนการเลี้ยงร้อยละ 4.42 ภาคกลางมีสัดส่วนการเลี้ยงร้อยละ 3.40 และ ภาคใต้ ส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงผึ้งโพรง มีสัดส่วนการเลี้ยงร้อยละ 2.80 ตามลำดับ สำนักวิจัย เศรษฐกิจการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ได้วิเคราะห์ต้นทุนการผลิตน้ำผึ้ง หลังจากผล ผลิตได้ จากการขายปี 2548 โดยการแบ่งการวิเคราะห์แยกเป็น 3 ขนาดฟาร์ม คือ ขนาดเล็ก ขนาด กลาง ขนาดใหญ่พบว่าฟาร์มขนาดใหญ่มีต้นทุนการผลิต (29.11 บาท/กก.) ต่ำกว่าฟาร์มขนาดกลาง (49.59 บาท/กก) และขนาดเล็ก (58.21 บาท/กก) เนื่องจากต้นทุนต่อหน่วยการผลิตเป็นไปตามขนาด การผลิตหรือเป็นไปตามความประหยัดตามขนาด (Economy of Scale) เพราะฟาร์มที่มีขนาดการ เลี้ยงหรือการลงทุนที่เหมาะสมที่จะผลิตผลผลิตได้ควบคู่กันไปในปริมาณมากและขายได้ราคาสูง โดยเฉพาะนมผึ้ง (Royal Jely) และการวิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทนในการค้ำน้ำผึ้งของพ่อ ค้าขายส่งและพ่อค้าขายปลีกพบว่าพ่อค้าขายปลีกจะได้รับผลตอบแทนในการค้า (58.23 บาท/กก.) มากกว่าพ่อค้าขายส่ง (15.07 บาท/กก) คิดเป็น 2.86 เท่า เพราะสามารถขายน้ำผึ้งได้ราคาสูงกว่า กิโลกรัมละ 35.67 บาท คิดเป็นร้อยละ 39.93 แต่ต้องใช้เวลาจำหน่ายนาน เนื่องจากความต้องการ บริโภคน้ำผึ้งมีน้อยเพราะน้ำผึ้งเป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ จะมีการบริโภคเฉพาะผู้บริโภคตาม กลุ่มอายุ ที่รู้ถึงคุณประโยชน์ของการบริโภคน้ำผึ้งเท่านั้นประกอบกับน้ำผึ้งคุณภาพดีจะมีราคาแพง และผู้บริโภคส่วนใหญ่ไม่ค่อยมั่นใจในการซื้อน้ำผึ้งเพื่อบริโภค เนื่องจากกลัวการปลอมปนของ น้ำผึ้ง

จากสภาพการณ์ปัจจุบันผู้เลี้ยงผึ้งยังประสบปัญหาด้านการผลิตและการตลาด ดังนี้คือ

ด้านการผลิต

1. พันธุ์ผึ้ง ยังไม่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่ ๆ เนื่องจากพันธุ์ผึ้งที่เลี้ยงอยู่ในปัจจุบันเป็นสายพันธุ์ที่ขยายการเพาะเลี้ยงต่อ ๆ กันมาในกลุ่มของผู้เลี้ยงผึ้งทำให้ประสิทธิภาพในการวางไข่ของผึ้งนางพญาลดลง

2. ต้นทุนการผลิตน้ำผึ้งร้อยละ 25 เป็นค่าอาหารโดยใช้น้ำตาลทรายเป็นส่วนผสมที่สำคัญและมีราคาแพงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงเมื่อเทียบกับต่างประเทศ เช่น จีน และเวียดนาม

3. แหล่งพืชอาหารผึ้ง แหล่งพืชอาหารผึ้งทั้งที่เป็นสวนผลไม้และแหล่งพืชอาหาร ตามธรรมชาติมีจำกัดทำให้มีการแย่งพื้นที่วางรังผึ้ง ส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งได้รับความเดือดร้อน

4. ขาดการจัดการที่ดี เช่น ทำการสลัดน้ำผึ้งเร็วเกินไป ในขณะที่น้ำผึ้งยังบ่มไม่ได้ที่ ทำให้ได้น้ำผึ้งคุณภาพต่ำมีความชื้นสูง ต้องเสียดค่าใช้จ่ายในกระบวนการระเหยน้ำเพื่อรักษาความชื้นตามมาตรฐานสากล ทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิต

5. ปัญหาการใช้สารเคมี ในช่วงฤดูเพาะปลูกเกษตรกรจะใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในไร่นาสวนผู้เลี้ยงที่วางรังผึ้งอยู่ใกล้บริเวณนั้นจะได้รับความเสียหายจากสารเคมี

6. เงินทุน เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งส่วนใหญ่ ต้องกู้เงินจากสถาบันการเงินในระบบและนอกระบบ เพื่อใช้จ่ายในการลงทุนเลี้ยงผึ้ง ที่สำคัญ คืออุปกรณ์การเลี้ยงผึ้งและอาหารผึ้ง โดยเฉพาะน้ำตาลที่มาใช้เลี้ยงผึ้งในช่วงที่ขาดแคลนพืชอาหารตามธรรมชาติ ซึ่งผู้เลี้ยงผึ้งต้องสำรองเงินไว้คราวละมาก ๆ

ด้านการตลาด

1. ตลาดน้ำผึ้งมีค่อนข้างจำกัดเนื่องจากน้ำผึ้งเป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ ความต้องการบริโภคจำกัดอยู่เฉพาะกลุ่มบุคคลและขนาดอายุ ที่รู้ถึงประโยชน์และคุณค่าของการบริโภคน้ำผึ้ง ประกอบกับราคาจำหน่ายปลีกค่อนข้างสูง การขยายการผลิตมากขึ้น จะทำให้ผู้เลี้ยงประสบปัญหา ราคาและตลาดจำหน่ายได้

2. ราคาผึ้ง ถูกกำหนดโดยผู้ซื้อซึ่งมีน้อยรายทำให้เกษตรกรไม่มีอำนาจในการต่อรองราคา ต้องอยู่ในภาวะจำยอมที่ต้องขายตามราคาของผู้ซื้อกำหนด

3. การติดสติ๊กเกอร์ที่แสดงการรับรองมาตรฐานของสินค้าในกลุ่มของเกษตรกรผู้ผลิตน้ำผึ้ง ยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควรและผู้บริโภคไม่มั่นใจในคุณภาพสินค้า

4. การขยายตลาดส่งออกน้ำผึ้งทำได้ยากเนื่องจากมีการแข่งขันสูงจากประเทศผู้ส่งออกอื่นๆ โดยเฉพาะประเทศจีนซึ่งเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่และมีราคาค่าต่ำกว่าไทย นอกจากนี้ยังมีการนำเอามาตรการที่ไม่ใช่ภาษีมากีดกันทางการค้า เช่น ด้านสุขอนามัยและอื่น ๆ โดยมีการดำเนินงานที่

เข้มงวดในการตรวจสอบ รวมทั้งกำหนดให้ยากต่อการปฏิบัติทำให้การส่งออกน้ำผึ้งของไทย ต้องเผชิญกับปัญหามากมายในการปรับตัวรวมทั้งบุกเบิกตลาดใหม่

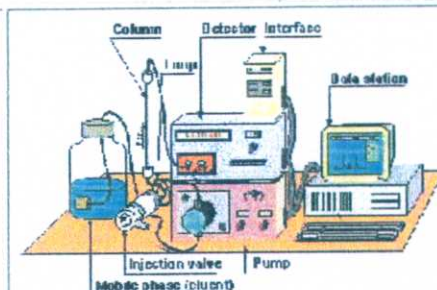
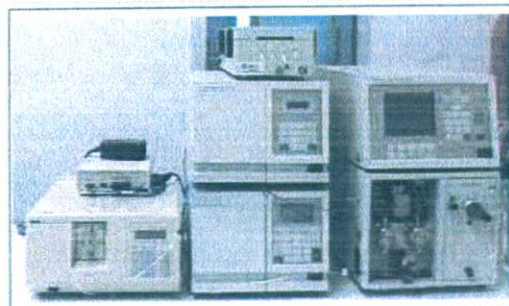
5.การใช้ประเทศไทยเป็นฐานการส่งออก โดยมีการลักลอบนำเข้าน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน จากประเทศอื่นเพื่อส่งต่อไป จำหน่ายประเทศที่สามและเป็นประเทศนำเข้าน้ำผึ้งคุณภาพจากไทย โดยใช้ตราสัญลักษณ์ของไทย ทำให้ไทยได้รับความเสียหาย

2.5 HPLC: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHOMATOGRAPHY [7]

HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบใน Stationary Phase ของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับ Detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analytes or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weight Compounds)

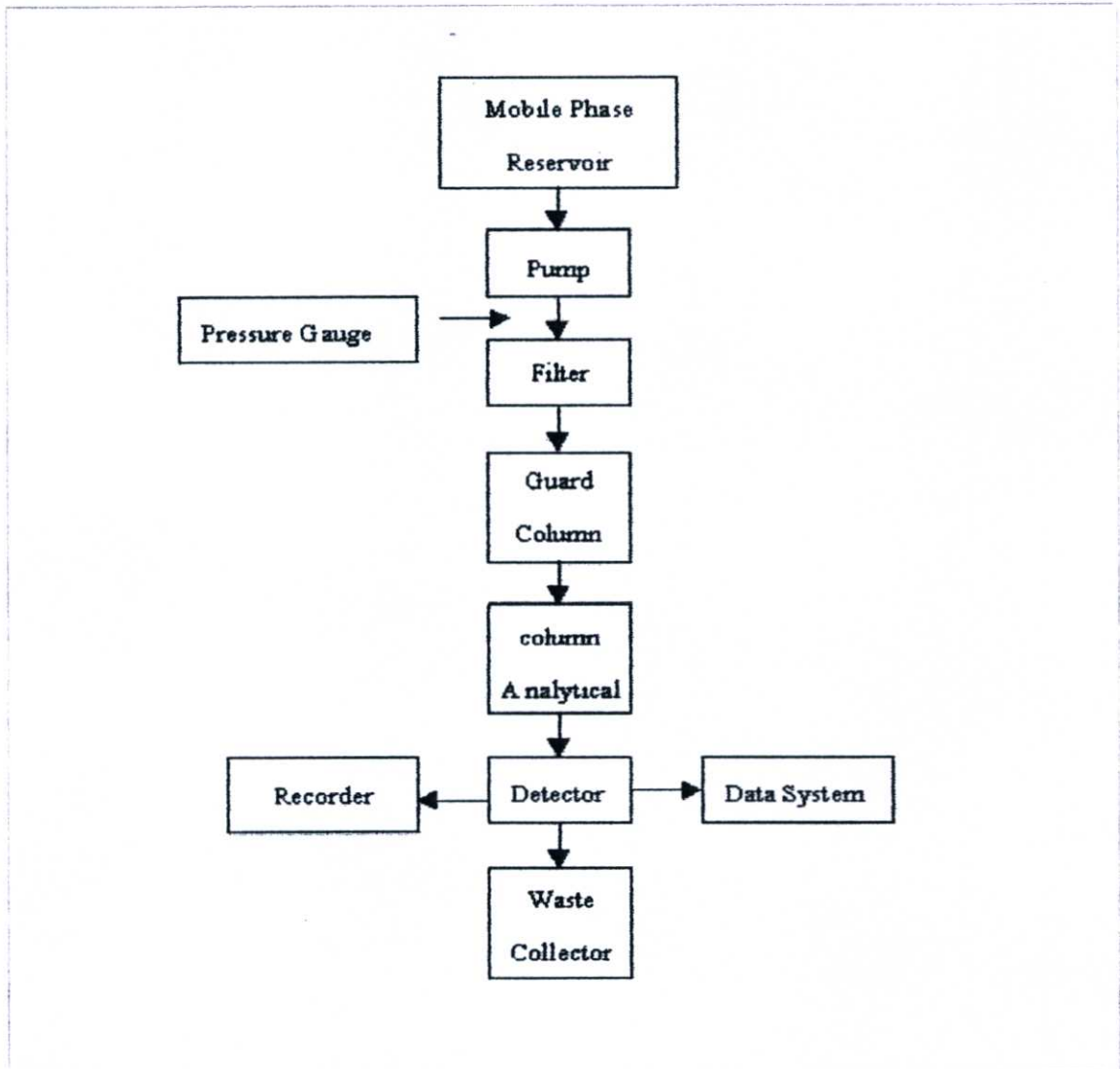
2.5.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คูโอแอนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสถียรภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโคร โมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100 % (กรองด้วย) การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC [7]

HPLC ประกอบด้วยส่วนต่างๆที่สำคัญตามหน้าที่ ภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แผนผังการทำงานของเครื่อง HPLC [7]

สถานะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่(Mobile Phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน Preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ และจะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ จุดประสงค์ของการไล่อากาศ คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ การไล่อากาศจะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นสารมีขั้ว (Polar Solvents) เครื่อง HPLC ของบางบริษัทสามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่อากาศก่อนได้



ภาพที่ 2.3 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ [7]

ระบบของปั๊ม (Pumping System)

มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่ามันจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆและคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป

ปั๊มแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
2. Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

หลักการเลือก Pumping System เพื่อใช้กับ HPLC ตัวอย่าง

1. ปั๊มและส่วนประกอบควรจะทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการกัดกร่อนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทั้งนี้รวมทั้งท่อ fittings และ flow cell ด้วย เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง เช่น polytetrafluoroethylene (PTFE) ,ruby และ sapphire
2. ควรจะต้องสามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ ที่มีปริมาณมาก ๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการขัดข้อง
3. สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000-6,000 psi เพื่อปั๊มให้เฟสเคลื่อนที่ ไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็ก ยาวขนาด 30 ซม. ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ และ อย่างน้อยต้องให้ความดันได้ถึงขนาด 500 psi
4. สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 mL / นาที เป็นอย่างน้อยและคงที่
5. ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ต้องไม่เกิน 1-2 %
6. ควรจะมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่
7. ต้องไม่มีพัลส์ (pluse) หรือมีตัวที่ใช้ลดพัลส์ (pluse damper) หรือไม่ทำให้เกิด Dectector

noise

อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices)

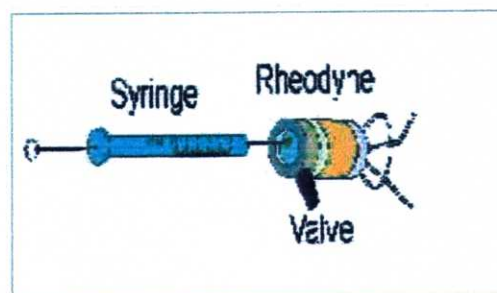
อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดความดัน ซึ่งอยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ เป็นสิ่งที่บ่งบอกว่ามีการอุดตันหรือไม่ หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้ การทราบความดันของเครื่องจะช่วยให้การปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำ Gradient Elution แบ่งได้ 2 แบบ

1. แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศ และต่อจากนั้นก็จะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์
2. แบบ High pressure gradient เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน Gradient Elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์

Sample Introduction Devices

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยัง Liquid chromatography (LC) คอลัมน์ นั้นมีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ดังนั้นวิธีการต่าง ๆ ที่จะใช้มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้คือ microsampling valve ส่วนวิธีที่ง่ายที่สุดคือใช้วิธีฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe และควรต้องระวังเนื่องจากความดันภายในสูง



ภาพที่ 2.4 แสดงการฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC [7]

Micro sampling Valve

การผ่านสารเข้า Liquid chromatography (LC) คอลัมน์โดยใช้ micro sampling valve สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้ micro sampling valve ที่ใช้ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 mL จนกระทั่งหลายมิลลิลิตร valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความสูงถึง 5,000-6,000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

Guard column

เหมือนกับ Column จึงคัดสารที่ไม่ elute หรืออนุภาคเล็ก ๆ เพื่อยืดอายุของ Column

ลักษณะทั่วไปของ Column

- คอลัมน์ทำด้วย Stainless steel
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกประมาณ 10 mm
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1,3,4.6 mm
- ความยาว 10,12.5,15,25 cm
- ขนาดอนุภาค 3,5,10 μm
- ปิดหัว-ท้ายด้วย Stainless steel gauze
- Reducing unions

ภายใน Column จะบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งจนเต็ม ซึ่งอนุภาคนี้อาจต้องบรรจุให้แน่นและไม่มีช่องว่าง จะต้องใช้ปั๊มช่วยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน อุณหภูมิของ Column สามารถควบคุมได้โดยการติดตั้ง Column ไว้ใน Heater Column ปัจจุบัน Column มีขนาดเล็กกลางเรียกว่า Micro bore column



ภาพที่ 2.5 แสดง Column และ อุปกรณ์ [7]

เครื่องตรวจวัด (Detector)

สิ่งที่ต้องการ คือ ความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถตรวจวัดสิ่งที้ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น เครื่องตรวจวัดในอุดมคติควรมีลักษณะดังนี้

- ความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับ(response) ได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื่อมถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพเชิง

เส้น(linearity) ในช่วงกว้าง

- ไม่ทำลายสาร

- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับ peak ที่ต้องการตรวจสอบ

เครื่องตรวจวัดของ Liquid chromatography (LC) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด

1. bulk property หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมทั้งของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors
2. solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-VIS , fluorescence หรือ electrochemical detectors เป็นต้น

ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors)

อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง ลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ยูวี-วิสิเบิลที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งเป็น 3 ชนิด

1. Fixed-wavelength UV detector
2. Variable UV-VIS detector
3. Photodiode-array detector

เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรคโตมิเตอร์ (Differential Refractometers)

นิยมมากใน HPLC รองลงมาจากเครื่องยูวี ดีเทคเตอร์ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดัชนีหักเห (refractive index ,RI) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายละลายอยู่ ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ สามารถ ให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด คราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดัชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่ เครื่อง RI ที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด

1. Fresnel Refractometer
2. Deflection Refractometer
3. Interferometric Refractometer

ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Detector)

มีสภาพความไวสูงเฉพาะ (elective) เนื่องจากมันมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากเมื่อนำมาตรวจหาสาร ในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่าง ๆ ที่มีปริมาณน้อย ๆ

การเลือกใช้และการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทาง Liquid Chromatography LC

การจะเลือกเทคนิคใดในการแยกสารตัวอย่างนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องพิจารณาดังนี้

1. ขบวนการของสารตัวอย่าง
2. วิธีที่ต้องการนำมาใช้แยกสารตัวอย่าง
3. ความสะดวกในการทดลอง
4. ประสิทธิภาพกับวิธีที่ใช้แยกสารตัวอย่าง
5. และสิ่งอื่น ๆ ที่อาจพิจารณา

การพัฒนาวิธีการแยกสารที่เฉพาะ

1. การเลือกวิธีของ LC
2. การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม
3. การกำหนดสภาวะของการทดลองที่เหมาะสม
4. การพิจารณาการใช้เทคนิคบางเทคนิคในการแก้ปัญหาการแยกให้ดีขึ้น

การประยุกต์ใช้งานทั่วไป

1. Petrochemical Analysis เช่น Aliphatic + Aromatic Hydrocarbons
2. Environmental Analysis เช่น PAHs , Pesticides , Herbicides
3. Pharmaceutical Analysis เช่น Drugs , Steroids
4. Natural Products เช่น Terpenoid
5. Biochemical Analysis เช่น Carbohydrates , Proteins
6. Thermoplastic Polymers
7. ใช้ทำให้สารที่สนใจในของผสมมีความบริสุทธิ์ขึ้น
8. ใช้ในงานควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์
9. ใช้ติดตามการดำเนิน ไปของปฏิกิริยาเคมีในการวิเคราะห์สารต่าง ๆ

ข้อจำกัดของเทคนิค

1. ในการระบุชนิดสารประกอบถูกจำกัดจำเป็นต้องมีสารมาตรฐานเทียบเคียงเสมอ ยกเว้นในกรณีที่มีการต่อเชื่อม กับเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (MS)
2. กำลังในการแยกถูกจำกัดในกรณีที่สารตัวอย่างมีความซับซ้อน
3. เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนานอาจกินเวลาถึง 2 ชั่วโมง
4. จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

2.6 ทฤษฎีพื้นฐานของการวัดแบบ NIR spectroscopy [8]

NIR Spectroscopy เป็นวิธีการวิเคราะห์โมเลกุลที่ไม่ทำลายตัวอย่าง โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างเป็นวิธีการที่ให้ผลที่เชื่อถือและรวดเร็ว ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ตั้งแต่การตรวจสอบวัตถุดิบไปจนถึงการตรวจสอบและปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้

NIRS (Near-infrared Spectroscopy) ได้ถูกนำมาใช้งานในช่วงปลายของทศวรรษ 1970 เป็นวิธีการวิเคราะห์โมเลกุลที่ไม่ทำลายตัวอย่าง โดยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกตัวอย่างดูดกลืนในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 700-2500 นาโนเมตร NIR Spectroscopy มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะด้านอาหารและยา ซึ่งได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกองค์ประกอบและคุณสมบัติทางกายภาพต่างๆ ของตัวอย่างทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้เป็นอย่างดี

หลักการ เมื่อฉายแสงในช่วงความยาวคลื่น NIR ลงไปบนตัวอย่าง แสงที่มีพลังงานเพียงพอจะถูกดูดกลืนและกระตุ้นให้เกิดการสั่นของโมเลกุลใน functional groups ต่างๆ 2 ลักษณะ คือ การยืดหด (stretching) และ การเปลี่ยนมุม (bending) ช่วงความถี่ overtones และ combination ของหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H, N-H และ S-H ซึ่งเป็น โมเลกุลหลักของสารอินทรีย์ ถ้าโครงสร้างโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ตรวจวัดมีความซับซ้อนสเปกตรัมที่ได้จะยังมีการซ้อนทับกันมากขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์สเปกตรัมเหล่านี้จึงต้องทำการแยกแยะและแสดงลักษณะเฉพาะโดยนำวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติ (Chemometrics) มาใช้ในการวิเคราะห์การดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของโมเลกุลสารอินทรีย์ ช่วงคลื่นอินฟราเรดสามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วง (ดังตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ช่วงคลื่นแม่เหล็กย่านอินฟราเรด [8]

ช่วงคลื่น	ช่วงความยาวคลื่น (nm)	จำนวนคลื่น (cm^{-1})
อินฟราเรดย่านใกล้ (near IR, NIR)	780-2,500	12,800-4,000
อินฟราเรดย่านกลาง (mid IR or fundamental IR)	2,500-50,000	4,000-200
อินฟราเรดย่านไกล (far IR)	50,000-1,000,000	200-10

ส่วนประกอบของเครื่อง NIR [8]

ส่วนประกอบหลักและการออกแบบเครื่องมือ Spectrometer แต่ละประเภทจะมีความคล้ายคลึงกัน โดยประกอบไปด้วย แหล่งกำเนิดแสง ตัวเลือกช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการตำแหน่งที่วางตัวอย่าง

แหล่งกำเนิดรังสีในช่วง NIR

โดยส่วนใหญ่จะใช้หลอดทังสเตนเพราะราคาถูกและใช้งานได้ทันที แล้วใช้ตัวฟิลเตอร์ช่วยกรองแสงในช่วงความถี่ที่ไม่ต้องการออกเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างร้อนจนเกินไป หรือใช้ LED เป็นแหล่งกำเนิดโดยค่าความยาวคลื่นที่ได้จะขึ้นกับสารที่ใช้ทำตัว LED อย่างไรก็ตาม LED ไม่สามารถให้ความยาวคลื่นในช่วง 1,700-2,500 นาโนเมตรได้ ซึ่งเป็นช่วงที่นิยมนำไปใช้งาน แต่ก็เหมาะสำหรับเครื่องมือแบบพกพาเพราะต้องการกำลังไฟฟ้าน้อย มีอายุการใช้งานที่ยาวนานและพลังงานของหลอดที่ได้อีกไม่เพิ่มสูงขึ้นแม้จะมีการเพิ่มกำลังวัตต์ของแหล่งกำเนิด

โมโนโครมาเตอร์ (Monochromator)

ช่วยในการกระจายแสงโดยอาศัยเกรตติง และควบคุมให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการด้วยช่องผ่านแสงเข้า (Entrance Slit) และช่องผ่านแสงออก (Exit Slit) ตัวอย่างจะมีการดูคลื่น หรือยินยอมให้รังสีทะลุผ่านหรือสะท้อนกลับนั้น ขึ้นกับรูปแบบและองค์ประกอบของตัวอย่างเช่น ของแข็ง ของเหลว อิมัลชัน สารแขวนลอย เป็นต้น

ตำแหน่งที่วางตัวอย่าง

จะต้องได้รับการออกแบบให้มีความเหมาะสม กับรูปแบบของการวิเคราะห์และปริมาณของอนุภาคที่ใช้วิเคราะห์ เช่น ถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่างจะเหมาะสำหรับตัวอย่างที่เป็นตะกอนแห้งหรือในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณมากถ้วยเหล่านี้จะมีการหมุน เป็นต้น เซลล์สำหรับใส่ตัวอย่างเหล่านี้จะต้องทำจากวัสดุที่ยอมให้แสงในช่วง NIR สามารถทะลุผ่านได้ เช่น ควอตซ์หรือแก้ว และมีระยะทางเดินของแสงที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่าง

อุปกรณ์สำหรับตรวจวัด (Detector)

ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการทาง Photoconductive Effect การเลือกเครื่องตรวจวัดนั้นขึ้นกับช่วงความยาวคลื่นและการออกแบบตัวแปรต่างๆ ของ Spectrometer

2.7 การปรับแต่ง NIR Spectra ก่อนการวิเคราะห์ (Pretreatment of spectral data) [9]

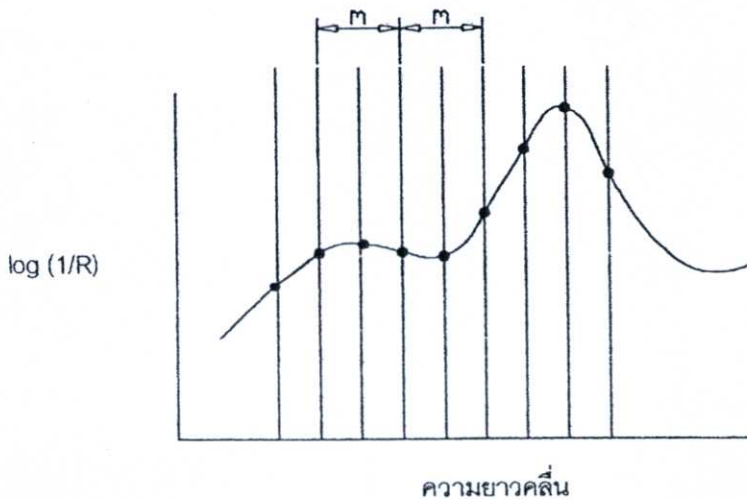
2.7.1 การลดผลกระทบจากสัญญาณรบกวน

เครื่องมือทั่วไป ที่ใช้วัดสเปกตรัมของรังสีย่าน NIR จะถูกออกแบบให้มีความคลาดเคลื่อนค่าในการวัดค่า $\log(1/R)$ และค่าความยาวคลื่น อย่างไรก็ตามสเปกตรัมที่วัดได้บางครั้งจะมีสัญญาณรบกวนแทรกเข้ามา ส่งผลให้สเปกตรัมไม่เรียบ มีวิธีการหลายวิธีที่ทำให้สัญญาณเรียบต่อเนื่อง ซึ่งจะกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากสเปกตรัมได้ วิธีเบื้องต้นที่จะช่วยลดสัญญาณรบกวนจะกระทำได้ โดย การวัดสเปกตรัมหลายๆครั้ง โดยนำตัวอย่างมาสแกนหลายๆครั้ง และใช้ค่าเฉลี่ยของสเปกตรัม

สำหรับวิธีการทางคณิตศาสตร์ที่สามารถนำมาใช้ลดสัญญาณรบกวนนอกเหนือจากวิธีเบื้องต้นดังกล่าวที่นิยมใช้ คือ

2.7.1.1 การเฉลี่ยเคลื่อนที่ (Running mean smooth or N-Point smooth)

วิธีนี้มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด โดยมีหลักการคือ การแทนค่า $\log(1/R)$ แต่ละจุดหรือแต่ละความยาวคลื่น ด้วยค่าเฉลี่ยของค่า $\log(1/R)$ ในช่วงความยาวคลื่นที่มีจุดศูนย์กลางของช่วงตรงกับจุดที่ถูกแทนที่ จำนวนของจุดที่นำมาเฉลี่ย คือ $n = 2m + 1$ โดยที่ m คือ จำนวนของจุดทั้งสองด้านของจุดศูนย์กลาง ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ในภาพเลือก $m = 2$ ซึ่งจะได้ $n = (2 \times 2) + 1 = 5$ จุด การเฉลี่ยเริ่มจากการนำค่า $\log(1/R)$ ของทั้ง 5 จุดมารวมกันแล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยมาสร้างสเปกตรัมใหม่ โดยในช่วงความยาวคลื่นแรก (ความยาวคลื่นแรกถึงความยาวคลื่นที่ 5) โดยนำค่าเฉลี่ยดังกล่าวมาเป็นค่าสเปกตรัมที่ความยาวคลื่นที่ 3 หรือความยาวคลื่นที่จุดศูนย์กลางช่วง ต่อจากนั้นจะเลื่อนช่วงไปทางขวา 1 จุด แล้วคำนวณซ้ำจนครบตลอดช่วงความยาวคลื่น ข้อมูลสเปกตรัมที่สร้างขึ้นใหม่ในที่สุด จะมีจำนวนข้อมูลช่วงเริ่มต้นหายไป m ข้อมูล และช่วงท้ายหายไป m ข้อมูล



ภาพที่ 2.6 จำนวนจุดทั้งสองด้าน ($m = 2, n = 5$) ของการเฉลี่ย [10]

2.7.1.2 Savitzky-Golay smooth

เป็นวิธีที่ทำให้สัญญาณสเปกตรัมเรียบที่นิยมใช้มากที่สุด ซึ่งจะเลือกใช้ในกรณีที่

1. ข้อมูลมีสัญญาณรบกวนมากไม่เรียบ
2. ต้องการทำให้สัญญาณเรียบและยังคงรูปร่างของสเปกตรัมเหมือนกับที่เริ่มต้น
3. เมื่อรูปร่างของสเปกตรัมมียอดแหลมเป็นจำนวนมาก

หลักการของวิธีนี้คือ กำหนดข้อมูลในช่วงความยาวคลื่น ($m = 2m+1$) เหมือนกับวิธีการเฉลี่ยเคลื่อนที่ นำข้อมูลสเปกตรัม หรือ $\log(1/R)$ ในช่วงที่กำหนด โดยเริ่มจากข้อมูลจำนวน $2m+1$ จุดแรก มาหาสมการโพลีโนเมียล ที่สามารถนำมาคำนวณค่าสเปกตรัมที่แต่ละจุดหรือแต่ละความยาวคลื่นในช่วงได้ใกล้เคียงที่สุด โดยวิธี Least square เมื่อได้สมการแล้วนำมาคำนวณค่าสเปกตรัมที่จุดศูนย์กลางของช่วง แล้วนำค่าที่คำนวณไปแทนค่าสเปกตรัมเดิมที่จุดหรือความยาวคลื่นนั้น ค่าที่คำนวณได้ถือว่าเป็นค่าที่ใกล้เคียงค่าจริงมากกว่าสเปกตรัมที่เริ่มต้นที่ถูกแทนที่ เนื่องจากสัญญาณรบกวนได้ถูกกำจัดออกไปแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ เลื่อนช่วงที่เท่ากันนี้ไปทางขวา 1 จุด (อาจเป็น 2 nm หรือ 4 nm ขึ้นอยู่กับความละเอียดของข้อมูล) แล้วทำซ้ำตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น จนกระทั่งช่วงความยาวคลื่น ถูกเลื่อนไปจนครอบคลุมความยาวคลื่นหรือจุดสุดท้าย สเปกตรัมที่สร้างขึ้นใหม่จะมีจำนวนข้อมูลในส่วนต้นและส่วนท้าย หายไปเท่ากับ m จุดเหมือนดังกรณี การเฉลี่ยเคลื่อนที่

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเฉลี่ยเคลื่อนที่ที่จะพบว่า การใช้วิธี Savitzky-Golay จะยังคงรักษาขนาดของยอดแหลมในสเปกตรัมให้มีขนาดเท่ากับสเปกตรัมเริ่มต้น ไม่ว่าจะเป็ยยอดแหลมที่มีฐานกว้างหรือฐานแคบก็ตาม

2.7.2 การลดผลกระทบจากปัจจัยที่มีผลต่อค่าสเปกตรัม

2.7.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อค่าสเปกตรัม

ปัจจัยหลักๆที่ทำให้เกิดผลดังกล่าวต่อสเปกตรัมคือ ขนาดอนุภาคของตัวอย่าง (Particle size) และความชื้นในตัวอย่าง (moisture content) โดยปัจจัยทั้งสองจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการกระเจิงแสง (scattering) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ทำให้แสงเปลี่ยนทิศทาง อันเป็นผลจากการสะท้อนแสง การหักเห หรือการเบี่ยงเบนแสง แสงที่เกิดการกระเจิงจะไม่ทะลุทลวงลึกลงไปในตัวอย่งมาก และจะสะท้อนกลับมาที่ผิวของตัวอย่าง โดยแทบจะไม่มีข้อมูลการดูดกลืนแสง การกระเจิงแสงจะเกิดขึ้นในตัวอย่างที่มีอนุภาคเล็กกว่านั้นแล้วการกระเจิงแสงยังขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นของแสงด้วย เนื่องจากความเร็วของแสงที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกันจะไม่เหมือนกันเมื่อผ่านลงไปในตัวอย่งเดียวกัน ซึ่งทำให้เห็นสเปกตรัมได้รับผลกระทบจากขนาดอนุภาคที่แตกต่างกัน ไม่เท่ากันตลอดความยาวคลื่น โดยสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่นสูงจะแตกต่างกันมากกว่าสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่นต่ำ

2.7.2.2 วิธีการลดผลจากปัจจัยที่มีต่อสเปกตรัม

สเปกตรัมที่ได้จากการดูคลื่นแสงในย่านเนียร์อินฟราเรดเป็นสเปกตรัมที่มีการเหลื่อมซ้อนทับกันอยู่ (Overlapping band) ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงควรนำไปปรับแต่งด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์ก่อน เพื่อปรับสเปกตรัมให้มีความเด่นชัดมากขึ้น และลดความคลาดเคลื่อนให้น้อยลง วิธีการที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ

1. Derivative transformation

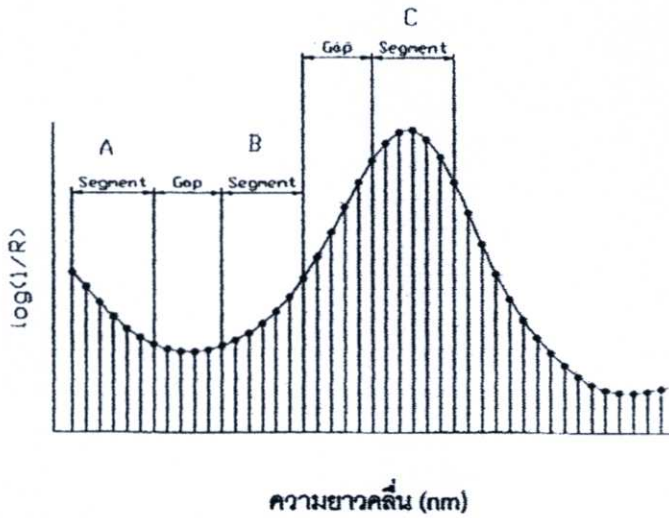
การหา Derivative ของสเปกตรัมเป็นวิธีที่ใช้ประโยชน์ในการแก้ปัญหาการซ้อนทับกันของจุดยอดในสเปกตรัม

1.1 First derivative การคำนวณ Derivative หรือ ความชันของสเปกตรัมสามารถทำได้ดังสมการ

$$\text{First derivative} = \text{Slope} = B - A \quad (2.1)$$

โดยที่ A และ B คือค่าเฉลี่ยสเปกตรัมของ Segments ที่มีช่วงเท่ากัน และอยู่ติดกัน

ในการคำนวณต้องกำหนดขนาดของ Segment และ Gap ก่อน ซึ่งขนาด Segment คือขนาดของความยาวคลื่นที่เราทำการเฉลี่ยให้ได้ค่าใหม่เพื่อเป็นตัวแทนขึ้นมาหนึ่งจุด แล้วทำการข้ามช่วงความยาวคลื่นไปเท่ากับขนาดของ Gap เพื่อเริ่มนับจุดแรกในการคำนวณ Segment ต่อไป ตัวอย่างดังในภาพที่ 2.6 เป็นสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่น ที่แต่ละจุดห่างกัน 2 นาโนเมตร มีขนาด Segment และ Gap เท่ากับ 12 และ 10 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยที่จุด A คือจุดที่ได้จากการหาค่าเฉลี่ยในช่วงความยาวคลื่น 12 นาโนเมตร (ขนาด Segment) จากนั้นข้ามไป 10 นาโนเมตร (ขนาด Gap) แล้วจึงเฉลี่ยอีกครั้งในช่วงความยาวคลื่น 12 นาโนเมตร เพื่อให้เป็นจุด B แล้วนำค่า A ลบจากค่า B ผลที่ได้นำไปแทนค่าสเปกตรัมที่จุดเริ่มต้นของ Segment แรกซึ่งคำนวณจะกระทำทุก Segment ต่อเนื่องกันไปจนตลอดความยาวคลื่น ต่อจากนั้นก็ขยับ Segment ไปทางขวา 1 จุด หรือ 2 นาโนเมตร แล้วคำนวณซ้ำเหมือนที่กล่าวมาจนเสร็จสิ้น First derivative ใช้ได้ผลกับตัวอย่างที่มีเนื้อสม่ำเสมอ และมีการกระจายของอนุภาคสม่ำเสมอทั่วถึง นอกจากนั้นแล้ว First derivative ของสเปกตรัมจะช่วยแก้ปัญหาที่สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น



ภาพที่ 2.7 Segment size และ Gap size ที่กำหนดในสเปกตรัมเพื่อคำนวณ Derivative[10]

1.2 Second derivative คือการคำนวณผลลบของค่าที่ได้จาก First derivative ที่ติดกันนั่นเอง หรือเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นการคำนวณหาการเปลี่ยนแปลงความชันของสเปกตรัมมาจาก

สมการ
$$\frac{d^2 \log(1/R)}{d\lambda^2} \quad (2.2)$$

ซึ่งเขียนแทนด้วย

$$d^2 \log(1/R)$$

สามารถคำนวณได้จาก

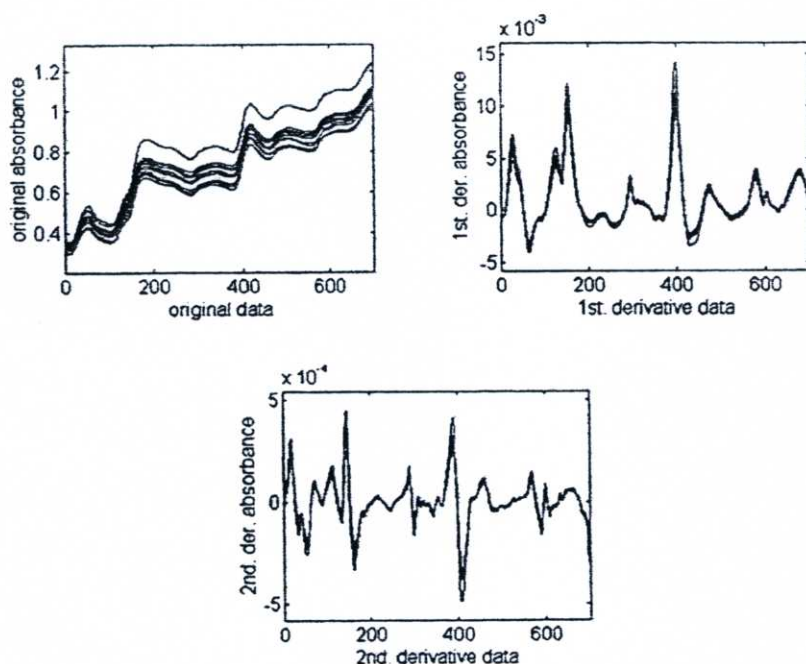
Second derivative = change in slope

= First derivative แรก - First derivative ถัดมา

= (C-B) - (B-A)

= C-2B+A (2.3)

โดยที่ A, B และ C เป็นค่าเฉลี่ยสเปกตรัมของ Segments ที่อยู่ติดกันและมีช่วงเท่ากัน



ภาพที่ 2.8 First Derivative และ Second Derivative เปรียบเทียบกับสเปกตรัมเดิม [10]

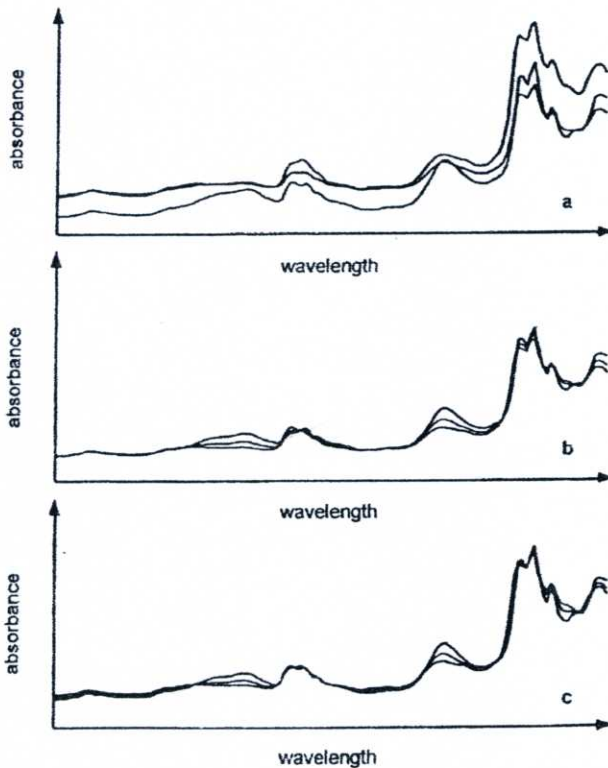
การคำนวณคล้ายกับ First derivative โดยในการคำนวณค่า Second derivative ของจุดแรก ต้องหาค่า C ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมในช่วงที่สาม หรือ C แล้วคำนวณผลลบของค่าเฉลี่ยใน Segment แรก และ Segment ที่สอง ซึ่งก็คือ B-A แล้วคำนวณผลลบของค่าเฉลี่ยใน Segment ที่สองและ Segment ที่สาม ซึ่งก็คือ C-B แล้วนำผลลบค่าแรกมาลบออกจากผลลบค่าที่สอง ตามสมการ ค่าผลลบสุดท้ายที่นำไปแทนค่าสเปกตรัมที่จุดแรกของ Segment แรก และคำนวณผลลบตามสมการ ไปจนครบตลอดช่วงความยาวคลื่นค่อจากนั้นจึงเลื่อนไปทางขวา 1 จุด หรือ 2 นาโนเมตร แล้วทำการหาซ้ำจนเสร็จสมบูรณ์ การใช้ Second derivative จะช่วยลดผลกระทบจากการกระเจิงแสง ทั้งที่เป็นผลเชิงบวกที่ทำให้ขนาดสเปกตรัมเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น และผลเชิงลบที่ทำให้ขนาดของสเปกตรัมเพิ่มขึ้นตามความยาวคลื่น Second derivative ใช้ได้ผลดีกับตัวอย่างที่มีขนาดอนุภาคต่างๆ ผสมผสานกันอยู่ First derivative ให้ความหมายเป็นค่าความยาวคลื่นที่แต่ละความยาวคลื่น ซึ่งทำให้แปลความหมายยากกว่า Second derivative ซึ่งได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจาก Second derivative จะให้จุดยอดตรงกับจุดยอดของสเปกตรัมเดิม แม้ว่าจะกลับหัว

2. Multiplicative Scatter Correction (MSC)

เป็นวิธีการที่ช่วยลดผลจากการกระเจิงของแสง ซึ่งโดยทั่วไปการกระเจิงของแสง (Scattered light) ค่อ NIR สเปกตรัม ที่ได้จากการวัดแบบ diffuse reflectance และแบบ transmission โดยทั่วไปการกระเจิงแสงทำให้ความชันของสเปกตรัมโดยรวมเปลี่ยนไป เปรียบเสมือนกับว่าสเปกตรัมถูกทำให้หมุนรอบจุดที่ความยาวคลื่นต่ำสุด (Multiplicative effect)

วิธีการ MSC คือทำการหมุนสเปกตรัมของแต่ละตัวอย่างให้มาตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ยโดยมีขั้นตอนคือ ในแต่ละตัวอย่างต้องหาค่าคงที่ค่าหนึ่งมาหาร ค่า $\log(1/R)$ ของทุกๆจุดเพื่อปรับความชันของสเปกตรัมที่เปลี่ยนไป หรือก็คือการปรับค่า $\log(1/R)$ ให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงเป็นสัดส่วนเพื่อให้มีค่าตรงกับสเปกตรัมเฉลี่ย

การใช้วิธี MSC ให้ผลต่อรูปร่างของสเปกตรัมแตกต่างจากการใช้วิธี Second Derivative อย่างเห็นได้ชัด แม้ว่าผลของการปรับแก้จะเป็นไปในแนวเดียวกันในการวิเคราะห์ โดยรูปร่างของสเปกตรัมหลังการใช้วิธี MSC แล้วจะมีรูปร่างไม่แตกต่างจากสเปกตรัมก่อนการปรับแก้มากนัก ในขณะที่รูปร่างของสเปกตรัมหลังจากวิธี Second Derivative จะแตกต่างจากสเปกตรัมเริ่มต้นอย่างชัดเจนการใช้วิธี MSC จะให้ผลได้ดีที่สุดถ้ามีการปรับแก้การเลื่อนตัวของสเปกตรัมก่อน



ภาพที่ 2.9 การปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้ MSC (a คือ สเปกตรัมดิบหลังจากการเพิ่มโดยสุ่มขนาดตัวอย่างที่มี pathlengths ต่างกัน b คือ สเปกตรัมเดิม c คือ สเปกตรัมที่ถูกปรับแต่งหลังการทำ MSC) [10]

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัม NIR [10]

การวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัม NIR ประกอบไปด้วยขั้นตอน 2 ขั้นตอนหลักเป็นอย่างน้อย คือ 1. ขั้นตอนการสร้างสมการที่ใช้ทำนาย (Calibration) และ 2. ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของสมการที่สร้างขึ้นมา (Validation) ในการทำ Calibration ก็เพื่อให้ได้สมการมาตรฐานที่ใช้ในการทำนายค่าคุณลักษณะคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทราบ ต่อจากนั้นต้องมีการนำสมการมาตรฐานที่ได้จากการทำ Calibration มาตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของสมการมาตรฐานในการทำนายคุณภาพ ซึ่งขั้นตอนนี้เรียกว่าการทำ Validation หรือ Verification เพื่อทดสอบสมการที่ได้ว่ามีความเหมาะสม หรือแม่นยำเพียงใด เมื่อได้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือแล้วจึงจะนำสมการที่ได้ไปใช้ทำนายค่าคุณลักษณะที่ต้องการศึกษาจากสเปกตรัม NIR ที่ทำการวัดมาได้ [10]

2.8.1 ขั้นตอนการทำ Calibration [10]

เมื่อเก็บรวบรวมข้อมูลมาแล้วแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ คือ

2.8.1.1 กำหนดตัวแปรอิสระ (Independent Variables) และตัวแปรตาม (Dependent Variables)

ตัวแปรอิสระ (Independent Variables) ที่นำมาใช้ในการสร้างสมการคือค่าที่อ่านได้จากสเปกตรัม NIR เช่น ค่า $\log(1/R)$ เป็นต้น

ตัวแปรตาม (Dependent Variables) หมายถึงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Reference Laboratory Methods เช่นความชื้นในแป้ง ด้วยวิธี Oven drying method

2.8.1.2 การสร้างสมการ Calibration

ในการสร้างสมการนั้นสิ่งสำคัญคือ การหาตัวแปรอิสระที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับค่าตัวแปรตามที่จะทำการวิเคราะห์คุณภาพ การคัดเลือกหาตัวแปรอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลัก คือ

1. Wavelength selection เป็นวิธีการคัดเลือกตัวแปรอิสระที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่จะทำการวิเคราะห์เทคนิคในการเลือกมีหลายแบบเช่น 1) เลือกจากความรู้ความชำนาญ หรือเอกสารอ้างอิงที่บ่งบอกถึงช่วงความยาวคลื่นที่คาดว่าจะสัมพันธ์กับค่าที่จะทำการวิเคราะห์ 2) อาจจะใช้เทคนิคทางสถิติในการคัดเลือกความยาวคลื่นที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์ เช่น Multiple regression หรือการสร้าง correlativegram โดยการสร้าง correlativegram เป็นการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแกน X คือความยาวคลื่น กับแกน Y คือค่า correlation อย่างง่ายของความสัมพันธ์ระหว่าง optical data กับการวัดความยาวคลื่นนั้นกับค่าวิเคราะห์ที่หามาได้ด้วยวิธี Reference measurement ซึ่งจะช่วยให้นักวิจัยสามารถคัดเลือกความยาวคลื่นที่มีความเป็นไปได้ที่จะสัมพันธ์กับค่าที่วิเคราะห์ ซึ่งการสร้างสมการ Calibration แบบ Wavelength selection อาศัยหลัก และวิธีการทางสถิติมาช่วยในการสร้างสมการ ได้แก่ Simple Linear Regression, Multiple Linear Regression

การสร้างสมการ Calibration โดยใช้ Simple linear regression หรือ Single term linear regression ในเทคนิค NIR เป็นการเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่สัมพันธ์กับค่าที่ต้องการวิเคราะห์เพียงความยาวคลื่นเดียว ซึ่งทำให้ค่า correlation ที่ได้มีค่าต่ำ จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการสร้างสมการ calibration Multiple Linear Regressions (MLR) เป็นวิธีการใช้ตัวแปรอิสระ (X) มากกว่า 1 ตัวในการประมาณค่าตัวแปรตาม (Y) ซึ่งเป็นค่าตัวแปรที่ได้จาก Reference Methods 1 ตัว จะทำให้สมการที่ได้ลดความผิดพลาดในการประมาณค่าลงได้ หากพิจารณาในเรื่องการใช้เทคนิค NIRS ในการหาความสัมพันธ์เชิงปริมาณของตัวอย่างก็หมายถึงการพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่หลายความยาวคลื่นนั่นเอง สมการ regression คือ

$$\text{สมการ regression } y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k \quad (2.4)$$

$$\text{model regression } Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k + e \quad (2.5)$$

ซึ่ง $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k =$ (partial regression coefficient) e คือเรซิดิว (residual)

2. Full spectrum analysis เป็นวิธีการคัดเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม (Selective wavelength) จากความยาวคลื่นทั้งหมดที่มีในสเปกตรัมมาสร้างสมการ calibration ดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว บางครั้งอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ถ้ามีการสร้างสมการที่ไม่ถูกต้อง อาจเกิดปัญหาทำให้ค่าที่ทำนายต่ำกว่าหรือสูงกว่าที่แท้จริง (Underestimation) อันเนื่องมาจากการเกิดความคลาดเคลื่อนจากการสร้างสมการ (Interference) หรือเกิดปัญหาเมื่อมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสร้างสมการทำนายมีน้อย จึงทำให้ได้สมการที่มีตัวแปรอิสระมากเกินไปในสมการ ทำให้ข้อมูลไม่น่าเชื่อถือ (Over fitting)

การใช้ข้อมูลทั้งหมดที่มีในทุกความยาวคลื่นของสเปกตรัม (Full spectrum) น่าจะเป็นหนทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวอย่างไรก็ตามปัญหาที่มีอยู่ คือการที่มีตัวแปรอิสระมากเกินไป

การใช้วิธีทางสถิติในการจัดกลุ่มแยกประเภทตัวแปรที่มีความเกี่ยวข้องกัน และทำการสร้างตัวแปรใหม่ที่เกิดมาจากตัวแปรเดิมจะช่วยทำให้แก้ปัญหาดังกล่าวได้ วิธีการทางสถิติที่นิยมใช้ได้แก่

Principal Components Regression (PCR) การทำ PCR จะเริ่มจากการทำ Principal Components Analysis (PCA) กับข้อมูลที่เป็นตัวแปรอิสระที่ได้มาจากข้อมูลของสเปกตรัมเพื่อสร้างองค์ประกอบหรือตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า New Factors ก่อน แล้วจึงนำค่าตัวแปรใหม่ที่สร้างขึ้นมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่ได้มาจากวิธี Reference Methods เพื่อสร้างสมการ calibration โดยใช้หลักการของ MLR

Principal Components Analysis (PCA) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการลดจำนวนของตัวแปรอิสระ ในกรณีที่ตัวแปรอิสระมีจำนวนมาก ยกตัวอย่างเช่น วัดค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมที่ 700 ความยาวคลื่น จำนวนสเปกตรัมดังกล่าว คือจำนวนของสเปกตรัมอิสระนั่นเอง การลดลงของ จำนวนตัวแปรมีวิธีการคือ แบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรขึ้นมาใหม่เรียกว่า factor หรือ องค์ประกอบ factor ที่สร้างขึ้น อีกนัยหนึ่งก็คือผลรวมของค่าสเปกตรัมทุกความยาว คลื่นที่มีน้ำหนักแตกต่างกัน factor จะมีได้หลาย factor โดยแต่ละ factor มีน้ำหนักแตกต่างกัน แต่ค่า สเปกตรัมที่ความยาวคลื่นต่างๆ ซึ่งประกอบกันเป็น factor นั้นๆ factor แรกจะถูกสร้างขึ้นมาให้ สามารถอธิบายความแปรปรวนของค่าสเปกตรัมได้มากที่สุด factor ที่สองอธิบายความแปรปรวนที่ เหลือ ซึ่งทำให้ factor แต่ละ factor แทบจะไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน (Non-Co linearity) ซึ่งเป็นข้อดี สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ เมื่อทำการหา factor เรียบร้อยแล้ว นำ factor ที่ได้มาทำ Regression กับค่าทางเคมีโดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด ทำให้ได้ค่า Chemical loading หรือ Calibration coefficient

Partial Least Square (PLS) Regression เป็นเทคนิคในการลดจำนวนตัวแปรเช่นเดียวกับวิธี PCR กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมจะเป็นอิสระจากกระบวนการทำสมการถดถอยของ สมการทำนาย ซึ่งใน PLS ทั้งสองกระบวนการจะถูกเชื่อมโยงเข้าไว้ด้วยกัน โดยมีการนำค่า องค์ประกอบทางเคมีมาคิดในกระบวนการหา factor ด้วย ซึ่งได้อธิบายถึง PLS ว่าเป็นเทคนิคใน การวิเคราะห์ข้อมูลแบบตัวแปรหลายตัวแปร โดยการสร้าง factor แบบสมการเชิงเส้นตรงจากข้อมูล ของสเปกตรัมเริ่มต้น และนำ factor ที่ได้ไปใช้ในการสร้างสมการถดถอย โดย factor ที่ได้จากการ สร้างสมการด้วยวิธีสถิติ PLS ต้องสามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูล และเกี่ยวข้องกับการ ประเมินค่าทางเคมีในเวลาเดียวกัน วัตถุประสงค์ของ PLS เพื่อต้องการลดจำนวนข้อมูลสเปกตรัม ให้ได้เฉพาะข้อมูลสเปกตรัมที่มีความสำคัญกับการทำนายค่าทางเคมีที่สนใจเท่านั้น เพื่อให้สามารถ ประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น

2.8.2 การทำ Validation

หลังจากที่ได้สร้างสมการแล้ว ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของสมการนั้น ก่อน นำไปใช้งานจริง ซึ่งการทดสอบสมการที่นิยมมี 2 วิธี คือ

2.8.2.1. Full cross validation

เป็นการทดสอบสมการภายในความหมายคือ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบสมการ เป็นตัวอย่างชุด มาตรฐานทั้งหมด ที่ใช้สร้างสมการประเมินค่าทางเคมีนั่นเอง มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างมาตรฐาน
2. ใช้ตัวอย่างมาตรฐานที่เหลือทำการสร้างสมการ
3. นำสมการที่ได้ประเมินค่าทางเคมีของตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 ที่ตัดออก

4. ใส่ตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 1 กลับคืนเข้าไป
5. ตัดตัวอย่างมาตรฐานตัวที่ 2 ออกจากชุดตัวอย่างมาตรฐาน
6. ทำขั้นตอนซ้ำข้างต้น จนครบทุกตัวอย่าง

จากนั้นทำการหาค่า Root Mean Square Error of cross validation (RMSECV)

2.8.2.2 การทดสอบผลการประเมิน (Prediction testing)

วิธีนี้จะทดสอบสมการแบบภายนอก โดยการเตรียมตัวอย่างชุดใหม่มาทำการวิเคราะห์ในสถานะการทดลอง เช่นเดียวกับชุดตัวอย่างมาตรฐาน เรียกชุดตัวอย่างที่นำมาทดลองสมการนี้ว่า ชุดทดสอบ (Testing set) ตัวแปรอิสระ (X) มากกว่าหนึ่งตัวในการประมาณค่าตัวแปรตาม (Y) สิ่งที่ต้องระวังคือ ปริมาณค่าทางเคมีที่ใช้ทดสอบต้องอยู่ในช่วงมาตรฐาน หลังจากได้สเปกตรัมจากชุดทดสอบก็นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณค่าทางเคมีจากสมการ จากนั้นดูผลการคำนวณที่ได้จากค่าทางสถิติ ซึ่งค่าทางสถิติที่ควรพิจารณาคือ ค่า Bias ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธี NIR กับค่าที่ได้จากวิธี Reference และค่า Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) หรือค่า Standard error of prediction (SEP) ซึ่งแสดงสมการในหัวข้อ 2.9

2.9 เทอมที่จำเป็นในการประเมินความแม่นยำและความถูกต้องของโมเดล [11]

สถิติที่ใช้ในการประเมินค่า NIRS calibration

2.9.1 ค่าเฉลี่ย (The mean)

ค่าเฉลี่ยเป็นค่าทางคณิตศาสตร์ของข้อมูลที่ใช้อ้างอิง (X) หรือ ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากเครื่องวัดสเปกตรัม (Y) ค่าเฉลี่ยนั้นจะถูกคำนวณจากผลรวมของค่า X หรือ Y และถูกหารโดยจำนวนของข้อมูล (N) ซึ่งเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\bar{X} = \sum X/N \quad (2.6)$$

2.9.2 Standard deviation (SD)

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลง หรือความแปรปรวนในข้อมูล นั่นคือ รากที่สอง ของความแปรปรวน สูตรในการหาค่า SD_x (หรือ SD_y) คือ

$$SD_x = \{(\sum X^2 - (\sum X)^2/N)/(N-1)\}^{1/2} \quad (2.7)$$

2.9.3 Coefficient of variability (CV %)

CV คือประชากร SD x 100 หารด้วยค่าเฉลี่ยของประชากร แสดงเป็นสมการได้ดังนี้

$$CV = (SD \cdot 100) / \text{Mean } X \text{ (หรือ } Y) \quad (2.8)$$

ค่า CV แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์

ค่า Coefficient of variability (CV %) ถูกแสดงออกมาในเทอมของเปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า CV นี้สัมพันธ์กับค่า SD กับ ค่าเฉลี่ย และยังแสดงถึงค่าความสัมพันธ์ของความแปรปรวนในกลุ่มประชากรซึ่งเป็นอิสระจากหน่วยที่ใช้ในการวัด ตารางที่ 2.2 แสดงให้เห็นตัวอย่างในการคำนวณค่า Coefficient of variability (CV %) ของคั่วแปร

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างการคำนวณค่า Coefficient of variability (CV %) [11]

ลำดับ	ค่าปริมาณโปรตีนของเมล็ดข้าวสาลี	ค่าสถิติ	ค่าที่ได้
1	9.7	N	12
2	11.9	Mean	13.08
3	17.3	ΣX	157.0
4	14.2	ΣX^2	2106.56
5	12.6	SD	± 2.18
6	10.3	CV %	16.67
7	15.1		
8	14.8		
9	11.1		
10	12.4		
11	13.5		
12	14.1		

2.9.4 Bias (ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดย NIRS และข้อมูลที่อ้างอิง)

เมื่อทำนายค่าคั่วแปรที่ต้องการของข้อมูลในเซตตัวอย่าง Validation ค่า Bias หมายถึงความแตกต่างระหว่างค่าอ้างอิงและค่าที่ทำนายโดย NIRS และเป็นการวัดความแม่นยำโดยรวมของ calibration ในโลกความเป็นจริงของทางการค้าและอุตสาหกรรม Bias เป็นหนึ่งในสิ่งที่สำคัญมากในทางสถิติ Bias สามารถเกิดขึ้นได้แม้เมื่อค่าสถิติสัมพันธ์ความสัมพันธ์และ SEP แสดงว่าค่า calibration นั้นดีเยี่ยม

สูตรสำหรับการคำนวณ Bias คือ

$$(\sum X/N) - (\sum Y/N) \quad (2.9)$$

เมื่อ X = ค่าอ้างอิง และ Y = ค่าที่ได้จากการทำนาย โดย NIRS สามารถเป็นบวกหรือลบก็ได้

2.9.5 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Coefficient of correlation, r)

สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) แสดงระดับ ซึ่งข้อมูล 2 เซต (ข้อมูลตัวเลข X และ Y) สอดคล้องซึ่งกันและกัน ความสอดคล้องที่สมบูรณ์จะไม่มี ความแตกต่างกันเลยระหว่าง 2 เซต ข้อมูล ผลของค่า r จะเท่ากับ 1.00 ในทางปฏิบัติ นั้นเป็นไปได้ X และ Y อาจจะมี ความสัมพันธ์ เป็นเชิงบวกหรือลบก็ได้

สูตรสำหรับการคำนวณ r คือ

$$r = \frac{\sum(x \cdot y) - [\sum x \cdot \sum y] / N}{\{[\sum x^2 - (\sum x)^2 / N] \cdot [\sum y^2 - (\sum y)^2 / N]\}^{1/2}} \quad (2.10)$$

2.9.6 สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, r²)

แสดงสัดส่วนของความแปรปรวนในข้อมูล X ที่สามารถอธิบายโดยความแปรปรวนใน ข้อมูล Y ค่าของ r² จะเป็นบวกเสมอ โดยไม่คำนึงถึงเครื่องหมายของ r ผลประโยชน์ในทางปฏิบัติ r² ให้ข้อมูลมากกว่า r และ ใช้กันมากกว่า r การแปลความหมายของค่า r และ r² อยู่ในตาราง 2.3

2.9.7 Regression coefficient (b) และ intercept (a)

สัมประสิทธิ์ Regression, b_{yx} (ยังเรียกว่า slope อีกด้วย) และจุดตัด a แสดงถึงระดับที่ค่า y ถูกทำนายจากค่า x ในความสัมพันธ์ที่สมบูรณ์ระหว่าง X และ Y (ซึ่งทั้ง X และ Y เป็นข้อมูลชนิด เดียวกัน เช่น ปริมาณโปรตีนโดยสเปกตรัม NIR และโดยวิธีอ้างอิง) ค่า r และ b จะเท่ากับ 1.000 และ a เท่ากับ 0.000 แต่เนื่องจากว่าไม่สามารถหลีกเลี่ยงค่า error ได้ ดังนั้น b อาจจะมีมากกว่าหรือ น้อยกว่า 1.000 และ a จะต่างจาก 0

ตารางที่ 2.3 การแปลความหมายของค่า r และ r² [11]

ค่าของ r	r ²	การแปลความหมาย
Up to +/-0.5	Up to 0.25	ไม่สามารถใช้ใน NIR calibration
+/-0.51-0.70	0.26-0.49	เป็นความสัมพันธ์ที่แย่มาก ควรหาเหตุผล
+/-0.71-0.80	0.50-0.64	OK สำหรับการคัดเลือกอย่างหยาบๆ

+/-0.81-0.90	0.66-0.81	OK สำหรับการคัดเลือกและการประมาณค่าอย่างหยาบๆ
+/-0.91-0.95	0.83-0.90	ใช้ด้วยความระมัดระวังในการประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่ รวมถึงการวิจัย
+/-0.96-0.98	0.92-0.96	ใช้ในการประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ
+/-0.99+	0.98+	ดีเยี่ยม ใช้ได้กับทุกการประยุกต์ใช้

ในเทคโนโลยี NIRS ระดับ error ของ optical data จะต่ำกว่าข้อมูลอ้างอิงเสมอ ซึ่งเป็นผลดีในการใช้ Multiple Linear Regression (MLR) ในการพัฒนา calibration ซึ่งสมมุติว่าไม่มี error ในค่า X (optical data) เช่นเดียวกับกรณีของ r, สัมประสิทธิ์ Regression และจุดตัด มีค่าเป็นไปได้อย่างแน่นอน และค่าลบอีกด้วย

สูตรในการคำนวณ b คือ

$$\frac{(\sum X \cdot Y) - [(\sum X \cdot Y) / N]}{[\sum Y^2 - (\sum Y)^2 / N]} = \frac{r \cdot SD_y}{SD_x} \quad (2.11)$$

สูตรในการคำนวณ a คือ

$$a = Y \text{ bar} * (b * X \text{ bar}) \quad (2.12)$$

2.9.8 การแจกแจงความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดย NIRS และค่าอ้างอิง

รูปแบบหรือการแจกแจงความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนาย NIRS และค่าอ้างอิง ควรจะศึกษาสำหรับทุกๆ การ calibration ที่ยังไม่ได้ทดสอบมาก่อน มี 9 รูปแบบลักษณะความชันของความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่ทำนายจาก NIRS และค่าอ้างอิง สิ่งนี้ได้อธิบายไว้ในตารางที่ 2.4 การที่ความชันเปลี่ยนแปลงจะเกิดพร้อมๆ กันกับค่า bias โดยรวมที่เป็นบวกหรือลบโดยการแก้ไข ความชัน/bias อาจจะใช้ประโยชน์ได้ Bias (ประเภท 8 และ 9) สามารถเกิดขึ้นได้โดยที่ความชันไม่มีความแตกต่าง

ตารางที่ 2.4 รูปแบบของความชัน[11]

No.	ค่าอ้างอิงต่ำ	ค่าอ้างอิงสูง
1	แน่นอน	แน่นอน
2	แน่นอน	สูง
3	แน่นอน	ต่ำ
4	สูง	ต่ำ
5	ต่ำ	สูง

ซึ่งไม่เหมือนกับ RMSEP โดย SEP ไม่เกี่ยวข้องกับ bias SEP คำนวณจากผลการทำนายของเซตตัวอย่างที่ไม่ได้ถูกใช้ในการพัฒนา calibration เซตตัวอย่างนี้คือ Prediction เซตตัวอย่างที่ถูกใช้ใน validation ของ calibration ประกอบด้วยตัวอย่างชนิดเดียวกัน นั่นคือความไม่เกี่ยวข้องอย่างสมบูรณ์ต่อเซตตัวอย่าง calibration บ่อยครั้งที่ตัวอย่าง validation คือส่วนหนึ่งของ single population จากทั้งเซตตัวอย่าง calibration และ validation รวมกัน ในเงื่อนไขนี้ เป็นกรณีที่ดีมากในการใช้เทอม SEV เพื่อแสดง Standard error of validation บางสูตรใช้ $N-2$ ขณะที่อื่นๆใช้ $N-(2)^{1/2}$ แทน $N-1$ ในทางปฏิบัติ ความเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างเพียงเล็กน้อย โดยมีเงื่อนไขว่าเซต validation ต้องมีอย่างน้อย 40-50 ตัวอย่าง

ค่า Standard error of calibration (SEC) ซึ่งก็คือค่า SD ของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดย NIR และตัวอย่างค่าอ้างอิงในเซตตัวอย่าง calibration การดูความสัมพันธ์ความยาวคลื่นติดกัน มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกันอย่างมากและถ้าใช้ MLR, r และ SEC จะดีขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนตัวแปรต้นมากขึ้น สิ่งนี้เรียกว่า over-fitting ของข้อมูล (multicollinearity) ถ้าการทำ validation แสดงค่า r ต่ำ และ SEP สูงจนยอมรับไม่ได้ เซต calibration สามารถถูกทำนายและโดยเฉพาะแต่ละข้อมูล SEC อาจแสดงให้เห็นว่ามี outliers 1 หรือมากกว่านั้น การเอาออกอาจทำให้ค่า r และ SEP ดีขึ้นตามหลักค่า SEP ควรจะสูงกว่า SEC เสมอ

2.9.10 ค่า error มาตรฐานของ cross-validation (SECV)

Cross-validation สามารถใช้ตัวอย่างชุดเดียวกันกับที่ใช้ในการสร้าง calibration โมเดลเพื่อทำ validation สิ่งนี้ทำโดยชักตัวอย่างออกหนึ่งตัวอย่างหรือกลุ่มของหลายตัวอย่างจากชุด calibration และทำการปรับปรุงโมเดล calibration ด้วยตัวอย่างที่เหลืออยู่ ตัวอย่างที่ถูกกำจัดเป็นตัวอย่างที่ทำนายและบันทึกค่าความผิดพลาด แล้วนำตัวอย่างนั้นกลับมาแล้วชักตัวอย่างอื่นออกไปและทำซ้ำกระบวนการจนกระทั่งตัวอย่างทั้งหมดถูกใช้ในการพัฒนาโมเดลและทำนาย ซึ่งบันทึกค่าความผิดพลาด จะไม่มีตัวอย่างที่ถูกทำนายถูกใช้ในการพัฒนาโมเดลซึ่งเราได้ใช้ทำนาย ถ้าเอาออกเพียงทีละ 1 ตัวอย่างวิธีนี้เรียกว่า "full" หรือ "one-out" cross-validation ถ้านำชุดตัวอย่างออกจะเรียกว่า "segmented" cross-validation ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างที่เหลืออยู่ระหว่างค่าที่ถูกทำนายโดย NIRS และค่าอ้างอิง คือ The standard error of cross-validation (SECV)

Cross-validation ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง และถูกใช้ในหลายกรณีพิมพ์ แต่มีข้อเสียที่ว่าไม่มีข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ bias หรือ ความชัน/intercept เพราะว่าตัวอย่างทั้งหมดถูกชักออกจากชุดประชากรเดียวกัน สำหรับชุดตัวอย่างเล็ก (ถึง $N=100$) นิยมใช้ cross-validation มากกว่าวิธี test-set ในการวิเคราะห์โมเดล calibration เหตุผลก็คือชุดตัวอย่างขนาดเล็กนั้นมีความน่าเชื่อถือในการเลือกตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมดซึ่งเป็นไปได้ใน test-set. One-out cross-

validation ใช้เพียงแค่ 2-3 วินาทีด้วยคอมพิวเตอร์ และให้ภาพที่แท้จริงของประสิทธิภาพของโมเดล calibration

ส่วนชุดตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (300-400+) ควรจะใช้ประมาณ 20% ของตัวอย่าง เป็น validation test set แรก อีก 20% สำหรับ validation test set ที่สองและใช้ที่เหลือ 60% เพื่อสร้างโมเดล calibration

2.9.11 Root mean square of the difference (RMSD, RMSEP)

เป็นเทอม Root mean square of the prediction (RMSEP) ค่า Root mean square ของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดย NIRS และค่าอ้างอิงเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของสมการ calibration ค่า RMSD ได้รวมค่า bias error ถ้าไม่มีค่า bias อยู่ SEP และ RMSD จะมีค่าเท่ากัน การใช้ค่าสถิติ RMSD ถูกแนะนำมากกว่า SEP

สูตรการคำนวณ RMSD คือ

$$\text{RMSD} = \{[\sum(X - Y)^2]/N - 1\}^{1/2} \quad (2.14)$$

การรายงานผลโดยใช้ SEP กับ Bias แสดงถึงความแม่นยำของการทำนายได้ดี เนื่องจาก RMSD เกี่ยวข้องกับ Bias แต่ไม่ได้แสดงขนาดและเครื่องหมาย

2.9.12 Ratio of SEP to the SD (RPD)

RPD ย่อมาจาก Ratio of (Standard error of) Prediction (Validation) to (Standard) Deviation อัตราส่วนของ (ค่า error มาตรฐาน) การทำนาย (validation) กับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือ RPD คือสถิติอย่างง่ายที่ทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของ SEP ในเทอมของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลอ้างอิง คำนวณโดยการหาร SD ของค่าอ้างอิงที่ใช้ใน validation (SD_x) ด้วย SEP

$$\text{RPD} = (SD_x (\text{ตัวอย่าง validation}))/\text{SEP} \quad (2.15)$$

อีกวิธีหนึ่งคือใช้สูตร

$$\text{RPD} = 1/(1-r^2)^{1/2} \quad (2.16)$$

ซึ่งผู้ใช้ส่วนมากพบว่าการใช้สูตรแรกง่ายกว่า

ค่า SEP ควรต่ำกว่า SD มากๆ ซึ่งอัตราส่วนควรเท่ากับ 5 หรือมากกว่า บางกรณีตัวอย่างมีความสม่ำเสมอมาก ค่า SD จึงไม่สูง ซึ่ง RPD อาจจะไม่สูง แต่ถ้า SEP ต่ำกว่า SD มาก คำนั้น RPD เท่ากับ 2.5-3.0 ก็อาจแสดงถึงการวิเคราะห์ที่แม่นยำถ้า SD มีค่าเพียง 0.4-0.5

2.9.15 Ratio of the SEP to the range (RER)

วิธีอื่นๆ ที่ใช้ในหารมาตรฐาน SEP คือการหาความสัมพันธ์ของ SEP ต่อช่วงกว้างของข้อมูลอ้างอิง อัตราส่วนของ SEP ต่อช่วง RER แสดงดังสูตรต่อไปนี้

$$RER = (\text{ช่วงในข้อมูล validation อ้างอิง})/SEP \quad (2.17)$$

ค่า RER ควรจะสูงที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ แต่ก็สามารถสูงขึ้นอย่างผิดปกติโดยตัวอย่างเดียวที่มีความเข้มข้นสูงมาก ขณะที่ SD คือ ไม่มีผลกระทบจากค่า ค่าเดียว ตารางที่ 2.5 อธิบายผลของค่า RPD และ RER

ตารางที่ 2.5 ค่าทางสถิติ RPD และ RER [12]

ค่า RPD	ค่า RER	การแบ่งกลุ่ม	การประยุกต์ใช้
0.0-2.3	จนถึง 6	แย่มาก	ไม่แนะนำ
2.4-3.0	7-12	แย่	คัดเลือกแบบหยาบๆ
3.1-4.9	13-20	พอใช้	คัดเลือก
5.0-6.4	21-30	ดี	ควบคุมคุณภาพ
6.5-8.0	31-40	ดีมาก	ควบคุมขั้นตอน
8.1+	41+	ดีเยี่ยม	ได้ทุกการประยุกต์ใช้

2.9.16 สรุป

การอธิบายการสรุปของค่าสถิติเหล่านี้ SEP แสดงความแปรผันในความเบี่ยงเบนของ X จาก Y และ bias ค่าเฉลี่ยซึ่งแสดงความแตกต่างของผล SEP ร่วมกับ Bias แสดงความแม่นยำโดยรวมของกระบวนการทดสอบค่า RPD สร้างความสัมพันธ์ SEP กับ SD ของข้อมูลอ้างอิง และสร้างมาตรฐานของการแปลความหมายของ SEP ค่า RPD ที่สูง (อย่างดีที่สุดเท่ากับ 5 หรือมากกว่า แต่ที่อย่างน้อยคือที่ 3) แสดงประสิทธิภาพในการทำนาย NIR SEP คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จึงมีข้อจำกัดเช่นเดียวกับ SD

ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์, r หรือค่าการตัดสินใจ, r^2 แสดงความใกล้เคียงของความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการทำนายของ NIR และข้อมูลอ้างอิง ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่สูงกับค่า SEP และ Bias ที่ต่ำ ร่วมด้วย slope ที่เข้าใกล้ 1.0 หมายความว่าผล NIRS ถูกต้องในช่วงข้อมูลที่วัด และยังคงอยู่ด้วยภายใต้เงื่อนไขว่าค่าสถิตินี้ได้จากจำนวนตัวอย่างที่มากเพียงพอ ตัวอย่างควรมีอย่างน้อย 25 ตัวอย่างสำหรับทุกๆ ความยาวคลื่นโดยใช้ MLR และที่อย่างน้อยที่สุด 15 ตัวอย่างต่อปัจจัยในการใช้ PLS regression ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่สูง (>0.95) กับค่า bias โดยตลอด หรืออย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองที่มากที่สุด หมายความว่ายังคงมีความคลาดเคลื่อนอย่างแน่นอน

Slope แสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของค่าที่สัมพันธ์กับค่าอ้างอิง ค่า slope เท่ากับ 1 คือค่าที่ดีเยี่ยม เพราะมันแสดงว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงในเซตทั้งสองของข้อมูลเหมือนกันทุกประการ ความเบี่ยงเบนจาก 1.0 ที่มากกว่า 0.05 ควรจะต้องแก้ไข slope และค่า bias ที่อาจเป็นไปได้ ความเบี่ยงเบนที่มากกว่า 0.1 มีนัยสำคัญมาก และต้องการการสืบสวนไปยังสาเหตุ ค่า regression ทางสถิติ b และ a สามารถใช้ในสมการ $y = a + bx$ เพื่อแก้ไขให้ถูกต้องของ slope และ bias ในทางปฏิบัติ การเปลี่ยน slope ไม่ควรทำ โดยทั่วไป ถ้าค่า slope มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก 1.0 โมเดล calibration อาจจะไม่ดีในการทำนายสำหรับตัวอย่างที่ตามมา

การปรับปรุง slope/bias จะช่วยทำให้ทำนายตัวอย่างที่มีค่าสูงมากได้แม่นยำขึ้น โดยค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์จะไม่เปลี่ยน ถ้าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์น้อย (<0.8) โดยปกติจะเป็นไปไม่ได้ที่ NIRS จะทำนายได้แม่นยำสูงสม่ำเสมอ ถึงแม้ว่าจะปรับปรุง slope/bias แล้วเพราะว่าโมเดล calibration อาจจะไม่สามารถใช้ได้ ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่ต่ำระหว่างข้อมูลที่ทำนายโดย NIRS และข้อมูลอ้างอิงหมายความว่าวิเคราะห์ NIR ไม่ประสบความสำเร็จ ถ้าสาเหตุของข้อผิดพลาด (error) ของผล NIR ที่ไม่ดี ได้ถูกศึกษาอย่างระมัดระวัง รวมถึงการวิเคราะห์ค่าอ้างอิง แต่ผลยังคงไม่ดี แสดงถึง NIRS นั้นไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์, r^2 , bias และค่า RPD คือค่าทางสถิติที่มีความสำคัญมากที่สุดสำหรับการประเมินค่าความมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์โดย NIRS

2.10 ประโยชน์ของการใช้เทคนิค NIR [13]

ประโยชน์จากการใช้ NIR มีข้อดีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิเคราะห์ทางเคมี หรือการวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น สำหรับการนำเครื่อง NIR ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีประโยชน์มากมาย เช่น

1. เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง รวมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย
2. เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ประหยัดระยะเวลา เชื่อถือได้ และปลอดภัย

3. เป็นวิธีที่สามารถใช้ทดแทนการ วิเคราะห์ทางเคมีได้ในระยะยาว จึงสามารถลดต้นทุนการผลิตอีกทั้งไม่ใช้สารเคมีในการเตรียมตัวอย่างดังนั้นจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

4. ในการวัดสเปกตรัมแต่ละครั้งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อทำนายค่าต่างๆได้หลายค่าในเวลาเดียวกัน

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Garcia-Alvarez, M., Huidobro J.F., Hermida M., Rodriguez-Otero J.L., (2000). การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้ง โดยการวิเคราะห์ Near-Infrared transreflectance spectroscopy

เป็นการวิเคราะห์ น้ำตาล ฟรุกโตส กลูโคส และความชื้นในน้ำผึ้งโดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 161 ตัวอย่าง โดยจะใช้ตัวอย่างที่เก็บในปี 1992(46),1995(58),และ 1996 (57) การวิเคราะห์อ้างอิง จะใช้วิธี Enzymatic ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ฟรุกโตส และ กลูโคส และใช้วิธี refractometric ในการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นจากนั้นจะทำการสร้างสมการ calibration ของตัวอย่างแต่ละปีและนำไปทำนายค่าในกลุ่มตัวอย่างของปีอื่นจะได้ผลการทำนายออกมาได้ดี และสร้างสมการ Calibration รวมของทั้ง 3 ปี โดยแบ่งตัวอย่างเป็นชุด calibration set 121 ตัวอย่างและ prediction set 40 ตัวอย่างผลการทำนายได้ก็จะได้ผลการทำนายที่ดี

Downey, G., Fouratier, V., and Kelly, J.D., (2003).การตรวจน้ำผึ้งปลอมปนโดยการเติมน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส โดยใช้ Near-Infrared transreflectance spectroscopy

การวิเคราะห์จะเก็บตัวอย่างจากเกษตรกร โดยตรงในประเทศไอส์แลนด์ และนำมาเติมน้ำตาลฟรุกโตส และ กลูโคสผสมกัน ในอัตราส่วน 0.7:1, 1.2,1 และ 2.3:1 w/w เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบน้ำผึ้ง และน้ำผึ้งที่ผสมจะทำการปรับค่าของแข็งที่ละลายได้ และนำมาวัดด้วย Visible and near infrared (400-2498 nm) transreflectance spectra น้ำผึ้งจะถูกเลือกก่อนและหลังการเติมน้ำตาลที่ระดับ 7, 14, และ 21 w/w ด้วยสารละลายที่ผสมกันระหว่างกลูโคสกับฟรุกโตส การวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์โดยใช้ discriminant partial least squares regression (PLS1), k-nearest neighbours (k-NN) และ soft independent modeling of class analogy (SIMCA) มาใช้ในการแยกแยะระหว่างน้ำผึ้งที่เติมน้ำตาลกับน้ำผึ้งที่ไม่เติมน้ำตาลผลที่ได้สรุปว่าวิธีการทั้ง 3 จะมีการคัดแยกได้ถูกต้อง.

Corbella, E., and Cozzolino, D. (2005). การใช้ Visible and near infrared and near infrared spectroscopy ในการแบ่งกลุ่มแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้งจากตัวอย่างน้ำผึ้งในประเทศ อูรูไกว

ในการศึกษานี้จะใช้ Visible and near infrared and near infrared spectroscopy เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งจากประเทศอูรูไกวซึ่งทราบข้อมูลของแหล่งที่มาจากแหล่งดอกไม้ใดในการสร้างโมเดลจะใช้ principal component analysis,discriminant partial least squares

(DPLS) regression และ linear discriminant analysis (LDA) ตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 50 ตัวอย่างจาก 2 แหล่งกำเนิดก็คือที่ได้จาก ยูคาลิปตัส และ ดอกหญ้า นำมารวมกันและสุ่มเลือกมาเป็นกลุ่ม calibration 25 ตัวอย่าง และ predicting 25 ตัวอย่าง ผลการแบ่งกลุ่มของ (DPLS) และ (LDA) ในการแบ่งกลุ่ม จากค่าเฉลี่ย มีความถูกต้องมากกว่า 75% ของน้ำผึ้งดอกหญ้า และ มากกว่า 85 % ของ น้ำผึ้งยูคาลิปตัส จากผลที่ได้นี้การวัดแบบ Vis-NIR spectroscopy ใช้ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างน้ำผึ้ง จากแหล่งกำเนิดได้และจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้.

Dvash, L., Afik O.; Shafir S.; Schaffer A., Yeselson Dag A.Y., Landau S., (2002). การหาค่าโดย ใช้ Near infrared spectroscopy ของ perseitol สำหรับแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้งจาก avocado

ในรายงานการศึกษานี้เป็นการใช้ near-infrared(NIR) reflectance spectroscopy ในการหา ความเข้มข้นของ perseitol ของน้ำผึ้ง น้ำตาลนี้เป็นสมบัติเฉพาะของน้ำผึ้ง avocado โดยค่าอ้างอิงที่ ใช้สำหรับงานนี้จะได้จากวิธี high-performance liquid chromatography ในจำนวนน้ำผึ้ง 109 ตัวอย่าง นำมาวัดหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ยจะได้ perseitol ในตัวอย่างน้ำผึ้งเพียง 0.48 % ค่าความ แม่นยำของการทำนายจะถูกใช้สมการ regression แบบ modified partial least squares และจะใช้ principal component regression ในการทำ pretreatment โดยใช้พื้นฐาน first and second derivative ผลของการทำนายจะออกมาดี ($R^2 > 0.95\%$) และใช้ครึ่งหนึ่งของตัวอย่างในการสร้างโมเดลผลที่ได้ น่าพอใจ ($R^2 = 0.87$) ค่า bias มีค่าต่ำ 0.005% และค่า SEP มีค่าต่ำ = 0.13% สรุปได้ว่าจะใช้ได้กับ น้ำผึ้งที่ผึ้งได้เก็บเกี่ยวน้ำหวานจาก avocado แต่จะใช้ไม่ได้กับน้ำผึ้งจากแหล่งอาหารอื่น ๆ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งที่นำมาทดลอง

ตัวอย่างน้ำผึ้งทั้งหมด 90 ตัวอย่างได้ถูกรวบรวมมาจากแหล่งจำหน่าย และสถานที่ผลิตที่แตกต่างกันทั้งที่เป็นน้ำผึ้งที่มีฉลากถูกต้องและไม่มีฉลากที่มีจำหน่ายอยู่ในประเทศไทย และ ทำการบันทึกสถานที่จำหน่ายและสถานที่ผลิตของน้ำผึ้งซึ่งได้รับข้อมูลจากแหล่งน้ำผึ้งที่ได้มา น้ำผึ้งที่ได้มาจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

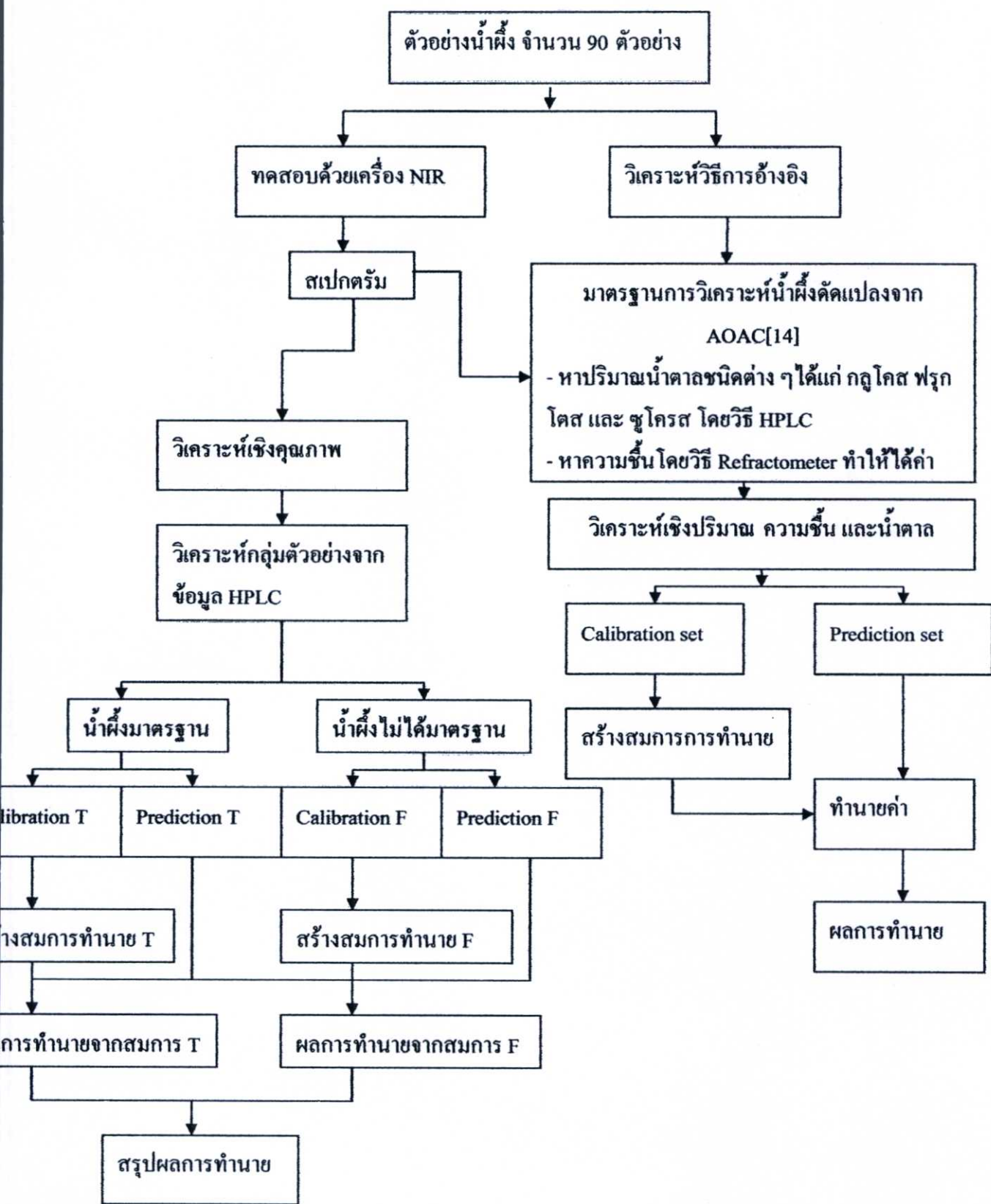
3.2 การวิเคราะห์อ้างอิง

3.2.1 การทดลองวิเคราะห์อ้างอิงเพื่อหาความชื้นของน้ำผึ้ง
วัสดุและอุปกรณ์

1. refractometer รุ่น (ATAGO – PAL2 Japan) ดังภาพที่ 3.1
2. ตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 90 ตัวอย่าง
3. อุปกรณ์ทำความสะอาดน้ำกลั่น กระดาษทิชชู
4. เทอร์โมมิเตอร์

วิธีการทดลองดัดแปลงจากวิธีการ AOAC [14]

1. เตรียมน้ำผึ้งโดยจะแบ่งน้ำผึ้งออกเป็น 2 กลุ่มในหนึ่งตัวอย่าง
2. ปรับอุณหภูมิห้องที่ใช้ในการวัดให้คงที่ (28 องศาเซลเซียส)
3. ปรับเครื่องวัด โดยใช้น้ำกลั่นเป็นค่าการวัดอ้างอิง
4. หยดตัวอย่างน้ำผึ้งลงในส่วนของช่องใส่ตัวอย่างของเครื่องและกดปุ่มสตาร์ทเครื่องจะทำการวัดและแสดงผลออกมาที่จอแสดงผล ผลที่แสดงจะออกมาเป็นค่าปริมาณเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้(ความหวาน)
5. บันทึกค่าของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน)ของน้ำผึ้งแต่ละตัวอย่าง
6. นำค่าของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) ไปทำการเทียบเพื่อหาค่า Reflective Index ในตาราง ภาคผนวก ก
7. นำค่า Reflective Index ที่ได้ไปเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตาราง ภาคผนวก ข และก่อนใช้ตารางจะทำการปรับแก้อุณหภูมิตามข้อเสนอนี้ท้ายตาราง
8. บันทึกผลค่าความชื้นของน้ำผึ้งแต่ละตัวอย่าง



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนในการทดลอง



ภาพที่ 3.2 เครื่อง refractometer รุ่น (ATAGO – PAL2 japan)

3.2.2 วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบ มาตรฐานของน้ำผึ้ง (น้ำตาลเดอโลส หรือ D-Fructose น้ำตาลเดกโทส หรือ D-Glucoses และน้ำตาล Sucrose) [14]

โดยใช้การวิเคราะห์ แบบ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แยกองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้ง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำผึ้ง 90 ตัวอย่าง
2. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พร้อมอุปกรณ์
3. เครื่องแก้ว บีกเกอร์ ปีเปต ขวดแก้ว ขนาดต่าง ๆ
4. เครื่องชั่งดิจิตอลความละเอียดที่ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
5. สารเคมี น้ำ (HPLC เกรด) และ อะซิโตไนไตรท์ (CH_3CN)

วิธีการทดสอบ

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สภาวะในการแยกคือคอลัมน์ Luna 5u NH_2 ขนาด 250x 4.6 mm วัสดุภาคไหล อะซิโตไนไตรท์ /น้ำ (60/20 โดยปริมาตร) อัตราการไหล 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที ความคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดมาตรฐานหักเห(RI)

2. สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

2.1 น้ำตาลฟรุกโตส 3.804 กรัม ใส่ไปใน Volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายโดยน้ำ 50 mL และเติมอะซิโตไนไตรท์ (CH_3CN) จนได้ระดับเต็ม

2.2 น้ำตาลกลูโคส 3.010 กรัม ใส่ไปใน Volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายโดยน้ำ 50 mL และเติมอะซิโตไนไตรท์ (CH_3CN) จนได้ระดับเต็ม

2.3 น้ำตาลซูโครส 0.602กรัม ใส่ไปใน Volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายโดยน้ำ 50 mL และเติมอะซิโตไนไตรท์ (CH_3CN) จนได้ระดับเต็ม

3. การเตรียมสารละลายน้ำผึ้ง

น้ำผึ้ง 1 กรัมในปีกเกอร์ขนาดเล็กเจือจางกับน้ำ 10 mL และเติมอะซิโตไนโตรที่ CH_3CN 10 mL ใช้แท่งคนให้น้ำผึ้งละลายในสารละลายจนหมดและกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด $0.45 \mu\text{m}$

4. Chromatography

ฉีด $50 \mu\text{L}$ สารละลายมาตรฐานไปในโครมาโตกราฟดังภาพที่ 3.3 แล้วตั้งไว้ช่วงเวลาหนึ่ง วัดความสูงของพีค และทำการเช็คอีกครั้งหนึ่ง ทำซ้ำโดยใช้สารละลายที่จะทดสอบ คำนวณปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส จากค่าอินทิเกรตหรือค่าความสูงของพีค

$$\text{เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล} = 100 (\text{PH}/\text{PH}') \times (\text{V}/\text{V}') \times (\text{W}/\text{W}') \quad (3.1)$$

เมื่อ	PH และ PH'	คือพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำผึ้งและสารละลายมาตรฐานตามลำดับ
	V และ V'	คือ ปริมาณสารละลายน้ำผึ้งและสารละลายมาตรฐาน (ซึ่งเท่ากับ 20 และ 100) ตามลำดับ
	W และ W'	คือน้ำหนักของน้ำผึ้งที่นำมาทดสอบ (1 กรัม) และน้ำหนักมาตรฐานของน้ำตาล กลูโคส (3.010 กรัม) ฟรุคโตส (3.804 กรัม) และซูโครส (0.602 กรัม) ตามลำดับ



ภาพที่ 3.3 การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC

3.2.3 การวิเคราะห์น้ำผึ้งโดย NIR spectroscopy

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำผึ้งส่วนที่เหลือจากการวัดด้วยวิธี Refractometer ซึ่งหนึ่งตัวอย่างจะแบ่งออกเป็นสองกลุ่มทำให้มีตัวอย่างในการวัด 180 ตัวอย่าง
2. เครื่องวัด NIR spectrum (BRAN+LUEBBE InfraAlyzer 500, Germany) พร้อมอุปกรณ์ (ภาพที่ 3.3)
3. อุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง Sample cell (ภาพที่ 3.5)
4. คอมพิวเตอร์ประมวลผล
5. อุปกรณ์ทำความสะอาดน้ำกลั่น และ ทิชชู

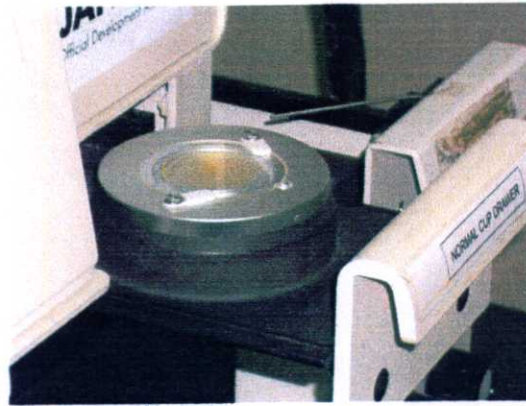
วิธีการทดลอง

การวิเคราะห์น้ำผึ้งด้วยเครื่อง NIR spectrophotometer เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำผึ้ง โดยจะมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

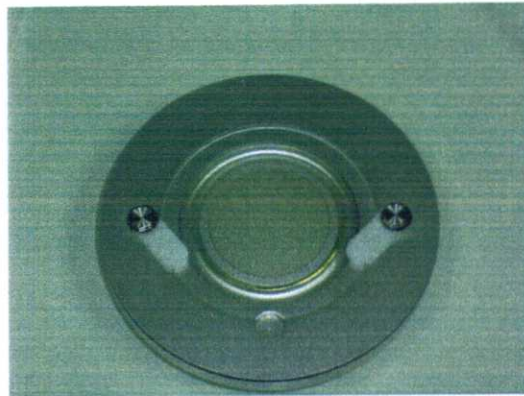
1. เปิดเครื่อง (BRAN+LUEBBE InfraAlyzer 500, Germany)และคอมพิวเตอร์ที่จะทำการบันทึกผล
2. การปรับเทียบเครื่องจะใช้แผ่นเซรามิกมาตรฐานเป็นค่าอ้างอิงของเครื่อง
3. เตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งหยดลงใน Sample cell ที่สำหรับใส่ตัวอย่างและนำแผ่นกระจกปิดเพื่อให้ น้ำผึ้งมีความหนาตามขนาดของ Sample cell ที่กำหนดในการทดลองนี้จะใช้ที่ 3 mm และทำการตรวจสอบฟองอากาศและสิ่งเจือปนในตัวอย่างว่าไม่มีอะไรเจือปนเพราะจะมีผลต่อสเปกตรัมที่ได้จากการทดลอง(ภาพที่ 3.5)
4. นำตัวอย่างเข้าเครื่องในช่องใส่ตัวอย่างดัง(ภาพที่ 3.4) และเลื่อนปิด
5. กดสแตร์ที่เครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อทำการสแกน
6. เครื่องจะทำการสแกนที่ความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร เครื่องจะบันทึกผลการดูดกลืนคลื่นทุก ๆ 2 นาโนเมตร
7. การบันทึกเครื่องจะทำการบันทึกสเปกตรัม โดยจะบันทึกเป็นค่าเป็นค่า $\log 1/R$
8. ผลของสเปกตรัมที่ได้จะถูกบันทึกและส่งไปวิเคราะห์ด้วย Program Unscrambler เพื่อวิเคราะห์ผลและปรับปรุงสเปกตรัมที่ได้ให้เหมาะสมในการวิเคราะห์ต่อไป



ภาพที่ 3.4 เครื่อง InfraAlyzer 500 (Bran+Luebbe)



ภาพที่ 3.5 ภาพการช่องใส่ตัวอย่าง



ภาพที่ 3.6 Sample cell สำหรับใส่ตัวอย่าง

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัม NIR กับข้อมูลอ้างอิง

3.3.1 อุปกรณ์และซอฟต์แวร์การวิเคราะห์ข้อมูล

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

3.3.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ค่าอ้างอิงของปริมาณองค์ประกอบของน้ำผึ้งจะถูกกำจัดค่าที่ผิดปกติ (outlier) โดยสมการตรวจสอบ (outlier สมการ 3.2)

$$\frac{X - \bar{X}}{SD} \geq 3 \quad (3.2)$$

X คือ ข้อมูลปริมาณองค์ประกอบ \bar{X} คือ ค่าเฉลี่ย และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สเปกตรัมของน้ำผึ้งที่ผิดปกติ ไม่เข้ากลุ่ม (outlier) ถูกตรวจด้วยวิธี PCA ข้อมูลสเปกตรัมของน้ำผึ้งจะรวมเข้ากับค่าอ้างอิงและทำการแบ่งชุดข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม Calibration และกลุ่ม Prediction โดยใช้อัตราส่วน 5:2 จากนั้นทำการปรับแต่งสเปกตรัม

ในการวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองนั้นจะใช้ข้อมูลจากกลุ่ม Calibration ในการสร้างแบบจำลองจะใช้แบบจำลองที่ได้จากค่าสเปกตรัมเดิมและจากค่าสเปกตรัมที่ได้รับการปรับแต่งโดยวิธีดังนี้

1. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี Full multiplicative scatter correction (MSC)
2. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี First and Second Derivative โดยใช้ช่วงข้อมูล 5 จุด (10 nm) และ 10 จุด (20 nm) (Savitzky-Golay algorithm, second polynomial)
3. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี Standard Normal Valiant (SNV)

หลังจากทำการปรับแต่งสเปกตรัมตามวิธีดังที่ได้กล่าวมาแล้วเสร็จสิ้นจากนั้นจะสร้างแบบจำลองที่ใช้ในการประเมินองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำผึ้ง ด้วยวิธี วิธี Partial Least Square (PLS) โดยใช้ช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 1100-2500 nm ซึ่งเมื่อได้แบบจำลองแล้วนั้นจะนำแบบจำลองที่ได้มาทำนายค่าปริมาณองค์ประกอบของน้ำผึ้ง Validation หลังจากนั้นจึงนำผลการทำนายที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ แบบจำลองของแต่ละองค์ประกอบถูกคัดเลือกกว่าเป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดบนพื้นฐานของค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) ที่สูงที่สุด ค่า Standard error of prediction (SEP) ที่ต่ำที่สุด ค่า bias ที่ต่ำที่สุด ค่า อัตราส่วนระหว่างช่วงข้อมูลต่อ SEP (RER) ควรสูงเท่าที่จะเป็นไปได้ ถ้าค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6 ไม่แนะนำในการประมาณค่า 7-12 เหมาะสำหรับการคัดเลือกแบบหยาบๆ 13-20 เหมาะสำหรับการคัดเลือก 21-30 คดีต่อการควบคุมคุณภาพ 31-40 ดีมากในการควบคุมกระบวนการ และค่าอัตราส่วนระหว่าง SD ต่อ SEP (RPD) ควรสูงกว่า 3 ถ้าค่า 3.1-4.9 พอใช้สำหรับการคัดเลือกแบบหยาบๆ 5-6.4 คดีต่อการควบคุมคุณภาพ 5.5-8.0 ดีมากสำหรับการควบคุมกระบวนการ [11]

3.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

เป็นการวิเคราะห์สเปกตรัมของน้ำผึ้งเพื่อแบ่งกลุ่มระหว่างน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอม ข้อมูลสเปกตรัมของน้ำผึ้งปลอมจะแบ่งชุดข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม Calibration และกลุ่ม Prediction โดยใช้อัตราส่วน 5:2 ข้อมูลสเปกตรัมของน้ำผึ้งแท้จะแบ่งชุดข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม Calibration และกลุ่ม Prediction โดยใช้อัตราส่วน 5:2 จากนั้นทำการปรับแต่งสเปกตรัม

ในการวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองนั้นจะใช้ข้อมูลจากกลุ่ม Calibration ในการสร้างแบบจำลองจะใช้แบบจำลองที่ได้จากค่าสเปกตรัมเดิมและจากค่าสเปกตรัมที่ได้รับการปรับแต่งโดยวิธีดังนี้

1. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี Full multiplicative scatter correction (MSC)
2. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี First and Second Derivative โดยใช้ช่วงข้อมูล 5 จุด (10 nm) และ 10 จุด (20 nm) (Savitzky-Golay algorithm, second polynomial)
3. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี Standard Normal Valiant (SNV)

หลังจากทำการปรับแต่งสเปกตรัมตามวิธีดังที่ได้กล่าวมาแล้วเสร็จสิ้นจากนั้นจะสร้างแบบจำลองเพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมด้วยวิธี Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) และวิธี Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)

3.4.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แบบ Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)

การวิเคราะห์แบบ SIMCA เป็นการวิเคราะห์โดยใช้วิธี PCA นำมาวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งโดยนำสเปกตรัมของน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานในชุด Calibration มาทำการวิเคราะห์โดยใช้ทำแบบจำลอง PCA เพื่อใช้ในการทำนายและใช้สเปกตรัมของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานในชุด Calibration นำมาทำ PCA จะทำให้ได้แบบจำลอง PCA ของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน นำแบบจำลอง PCA ของทั้งน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานมาทำนายค่าว่าน้ำผึ้งในชุด Validation เป็นกลุ่มใดและวิเคราะห์ว่าแบบจำลองมีความแม่นยำในการทำนายได้ถูกต้องหรือไม่

3.4.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แบบ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)

การวิเคราะห์แบบ PLS-DA เป็นการวิเคราะห์โดยใช้วิธี PLS นำมาวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งโดยตัวแปรต้นคือสเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วง NIR และตัวแปรตามคือความเป็นน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำที่ไม่ได้มาตรฐาน เพื่อสร้างแบบจำลองโดยตัวแปรตามในการสร้างแบบจำลองน้ำจะแทนด้วย 0 และ 1 (Yes = 1 , No = 0) แบบจำลองที่ได้จะนำไปทำนายในชุด Validation โดยค่าที่ได้จะเป็นค่า การทำนายเทียบกับค่าที่ได้จากการวัด โดยค่าจากการทำนายค่า Y

$Y > 0.5$ ซึ่งมากกว่าค่าเฉลี่ย จึงจัดอยู่ในกลุ่มของ 1

$Y < 0.5$ ซึ่งน้อยกว่าค่าเฉลี่ยจึงจัดอยู่ในกลุ่มของ 0

ถ้าค่า Y จากการทำนายมีค่าตรงกับค่าอ้างอิงก็จะสรุปว่าการทำนายนี้ถูกต้อง

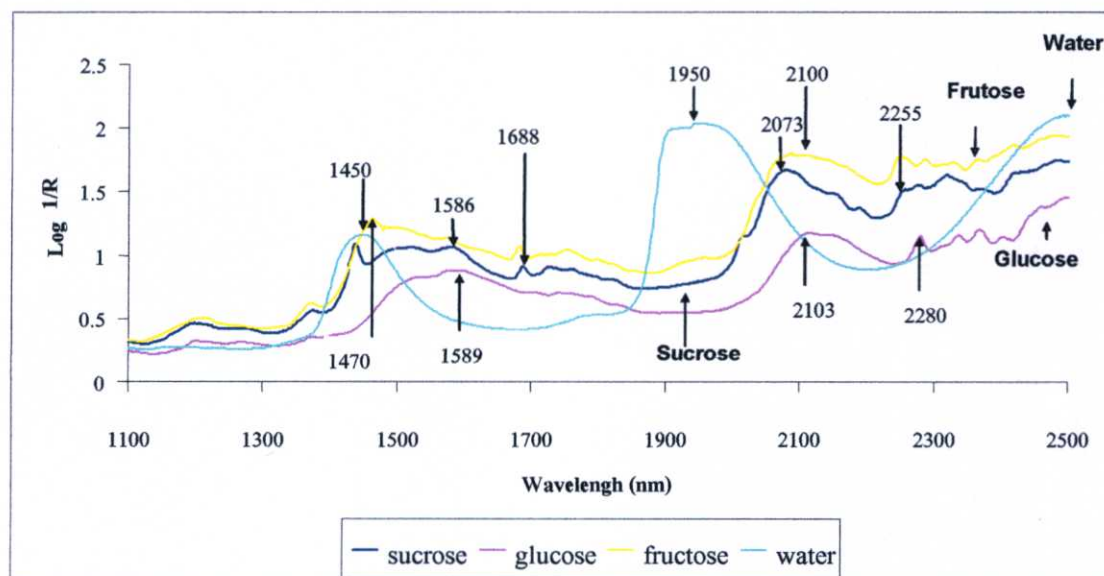
บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปราย

4.1 ผลการทดลองการหาองค์ประกอบของน้ำผึ้ง

จากการทดลองพบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งจะมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส (ดูภาคผนวก ง) และความชื้น (ดูภาคผนวก ค) ภาพที่ 4.1 ภาพ raw spectra ของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส และน้ำ สเปกตรัมของน้ำตาลฟรุกโตสมีพีคที่เด่นชัดที่ 1470 nm และที่ 2100 nm (the combinatio of O-H deformation band and C-O stretch band) [15] อ้างอิงจาก [19] สเปกตรัมของน้ำตาลกลูโคสมีพีคที่เด่นชัดที่ 1589 nm และ 2103 nm เป็นพีคของน้ำตาลกลูโคส [15] ที่ 2280 nm (combination of C-H stretch band and deformation band[15]อ้างอิงจาก [19] สเปกตรัมของน้ำตาลซูโครสมีพีคที่เด่นชัดที่ 1586 nm 2073 nm และ 2255 nm จะเป็นพีคของน้ำตาลซูโครส [15] และสเปกตรัมของความชื้นจะมีพีคที่เด่นชัดที่ 1450 nm และ 1950 nm จะเป็นพีคของน้ำ [15]

จากการทดลองพบว่าน้ำผึ้งจำนวน 90 ตัวอย่างนี้มีน้ำผึ้งที่เป็นน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมปนอยู่ซึ่งจะมีปริมาณองค์ประกอบที่แตกต่างกันและมีสเปกตรัมที่แตกต่างกัน ดังผลในการทดลองนี้

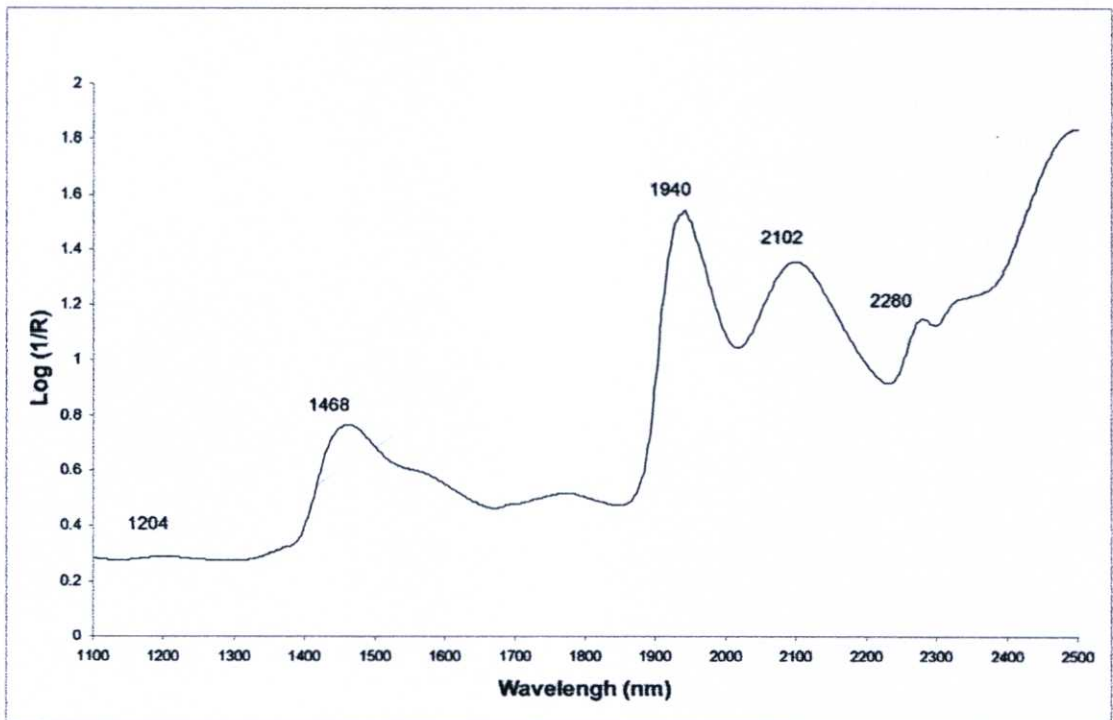


ภาพที่ 4.1 raw spectra ของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และ ซูโครส

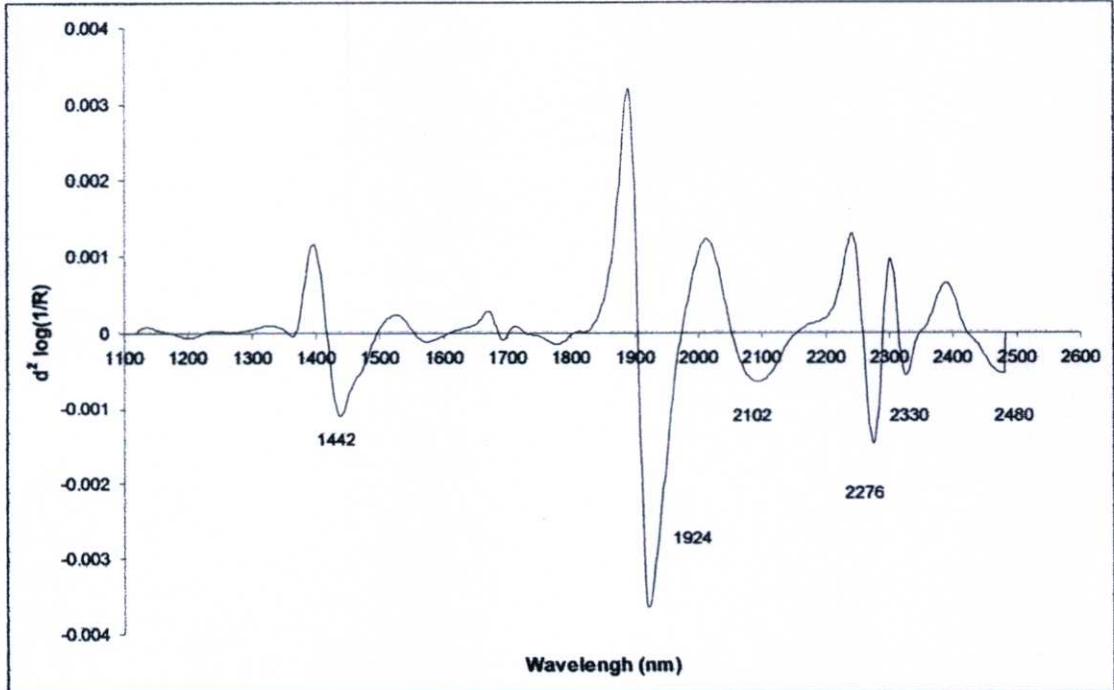
4.1.1 สเปกตรัมของน้ำผึ้ง

จากภาพที่ 4.2 แสดงสเปกตรัมเคมิก เกลี่ยของน้ำผึ้ง ที่ความยาวคลื่น 1100-2500 nm และ คลื่นการดูดซับสูงที่สุดที่ 1204 nm (C-H stretch second overtone) ที่ 1468 nm (C-H stretch second overtone) ของน้ำ และที่ 1940 nm (C-H stretch first overtone) ของน้ำการดูดกลืนแสงที่ 2102 nm เป็น C-H deformation and combination หรือ C-O stretch combination overtones) [15] [16] [17] อ้างอิงจาก [18] และ ที่ 2280 nm (combination of C-H stretch band and deformation band)[15]อ้างอิงจาก [19]

จากภาพที่ 4.3 แสดงสเปกตรัม 2^{nd} derivative ของน้ำผึ้ง และ NIR แสดงคลื่นการดูดซับสูงที่สุดที่ 1442 nm และ 1924 nm คลื่นการดูดซับนี้น่าจะเป็นคลื่นดูดซับของน้ำซึ่งเกิดการขยับตัวของคลื่นที่เกิดจากการทำ 2^{nd} derivative บริเวณ 2102 nm แสดงคลื่นการดูดซับ C-H deformation and combination หรือ C-O stretch combination overtones ที่ 2276 nm (C-H combination, C-C stretch overtones หรือ C-O stretch combination overtones และทั้ง สองความยาวคลื่นจะเป็นการแสดงถึง น้ำตาลในน้ำผึ้ง [15][16][17]อ้างอิง โดย [18] และ ที่ 2330 nm เป็นค่าการดูดซับของกลูโคสในน้ำผึ้ง [15] และที่ 2480 nm ความยาวคลื่นนี้ไม่ระบุว่าเป็นการดูดซับของสารใดในเอกสารอ้างอิงอื่น



ภาพที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมเคมิกของน้ำผึ้ง



ภาพที่ 4.3 สเปกตรัม NIR (2nd derivative) ของของน้ำฝัง

4.1.2 ผลของ PLS regression

จากตารางที่ 4.1 แสดงถึงจำนวนตัวอย่าง (n) ช่วงข้อมูล (range) ค่าเฉลี่ย (mean) และค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของชุดข้อมูล Calibration และชุด Prediction ของน้ำฝัง

จากตารางที่ 4.2 แสดงผลของ PLS regression ของแต่ละองค์ประกอบของน้ำฝัง พบว่า องค์ประกอบที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุดคือ ความชื้นจะมีค่าอยู่ที่ 0.979 % ค่า ผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.47 % และค่า bias ของความชื้น เท่ากับ 0.11 %

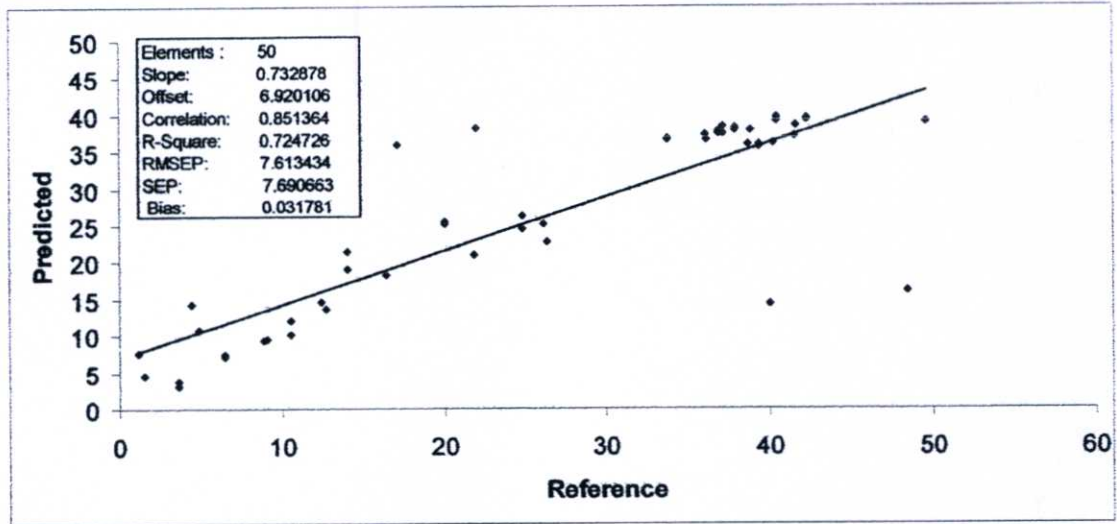
ตารางที่ 4.1 ค่าทางสถิติของชุด Calibration และชุด Prediction ขององค์ประกอบของน้ำฝัง

parameters	n	Calibration set			Prediction set			
		Range	mean	SD	n	range	mean	SD
ฟรุกโตส	126	0.64-49.52	24.9	14.56	50	1.13-49.52	25.79	14.66
กลูโคส	126	2.37-39.76	24.41	10.27	50	5.21-39.76	25.08	10.02
ซูโครส	126	1.53-44.58	12.41	10.5	50	1.71-44.58	13.08	11.15
ของแข็งที่ละลายได้	126	72.35-85.55	78.42	2.36	50	73.55-82.30	78.58	2.18
ความชื้น	122	15.20-24.80	19.11	2.17	50	15.20-24.40	19.11	2.29

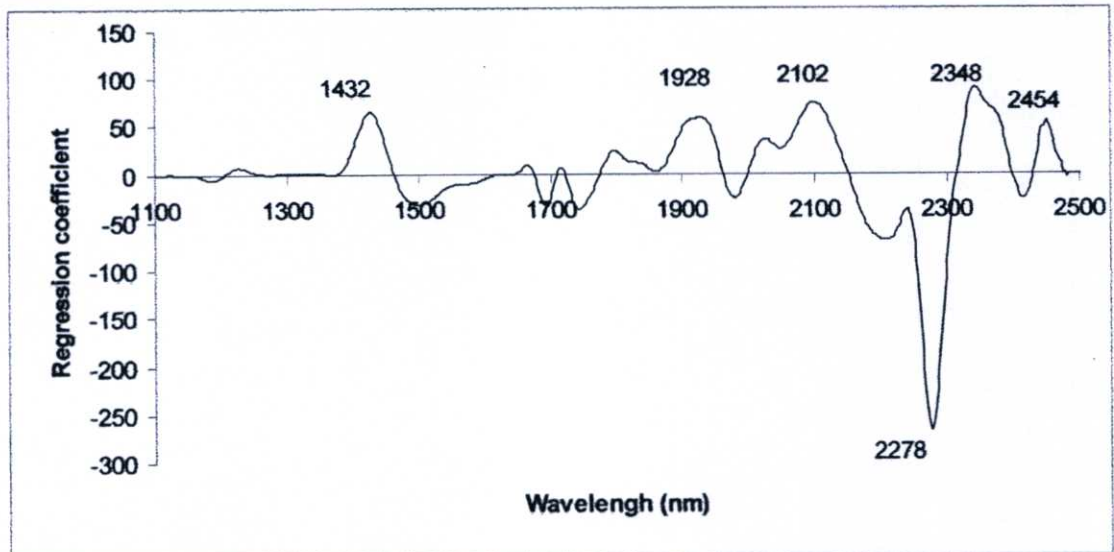
ตารางที่ 4.2 ผลของ PLS regression ของแต่ละองค์ประกอบของน้ำผึ้ง (ตารางรวมแสดงในภาคผนวก จ)

ชนิด	Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction				
			r	SEC	Bias	r	SEP	Bias	RPD	RER
ฟรุกโตส	1st derivative with segment of 20 nm	2	0.872	7.12	-9.43E-04	0.851	7.69	0.03	6.29	1.89
กลูโคส	1st derivative with segment of 20 nm	6	0.906	4.36	1.27E-06	0.807	6.15	0.48	5.62	1.63
ซูโครส	2nd derivative with segment of 20 nm	3	0.856	5.42	4.13E-07	0.937	4.07	0.29	10.53	2.74
ของแข็งที่ละลายได้	2nd derivative with segment of 20 nm	4	0.95	0.73	-2.60E-06	0.965	0.57	-0.23	15.2	3.8
ความชื้น	MSC	2	0.933	0.78	-5.47E-07	0.979	0.47	0.11	19.6	4.9

จากภาพที่ 4.4 ผลการทำนาย น้ำตาลฟรุกโตสเปรียบเทียบกับค่าที่วัดจริง โดยการวัดด้วยวิธี HPLC ซึ่งองค์ประกอบ น้ำตาลฟรุกโตสนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด ที่ชุด 1st derivative with segment of 20 nm r เท่ากับ 0.851 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 7.69 % ค่า bias เท่ากับ 0.03 % ค่า RER เท่ากับ 1.89 และ ค่า RPD เท่ากับ 6.29



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทำนายน้ำตาลฟรุกโตสกับค่าอ้างอิงโดยวิธี HPLC

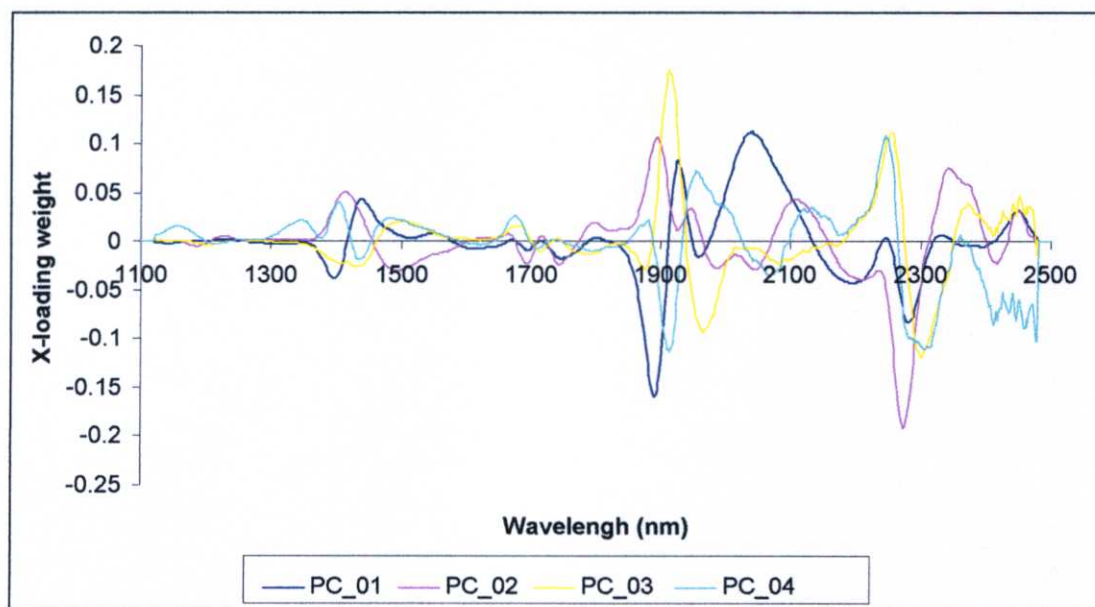


ภาพที่ 4.5 Regression coefficient ของน้ำตาลฟรุกโตส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

Regression coefficient ใช้เป็นพื้นฐานแรกในการตรวจผลกระทบของความยาวคลื่นต่างๆ (X-variable) ในการทำนายตัวแปรตาม (Y) และค่าสัมบูรณ์ของ Regression coefficient ที่มีค่าสูงชี้ถึงความสำคัญและอิทธิพลของความยาวคลื่นนั้นต่อโมเดลอย่างมีนัยสำคัญ [20]

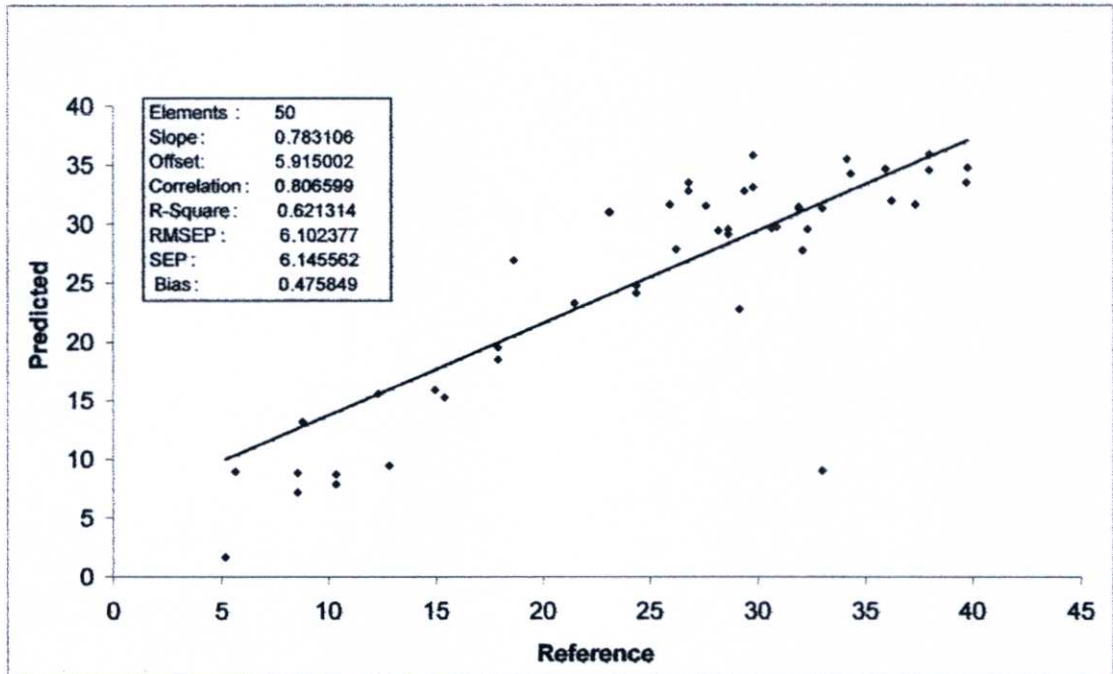
จากภาพที่ 4.5 กราฟ Regression coefficient ของน้ำตาลฟรุกโตสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้งมีพิกที่มีความสำคัญต่อที่ 2102 nm คลื่นการดูดซับ C-H deformation and combination หรือ C-O stretch combination overtones ที่ 2278 nm (C-H combination, C-C stretch overtones หรือ C-O stretch combination overtones และทั้งสองความยาวคลื่นจะเป็นการแสดงถึงน้ำตาลในน้ำผึ้ง [15][16][17]อ้างอิงโดย [18] และที่ 1432, 1928, 2348, 2454 nm เป็นค่าการดูดซับที่มีผลกระทบต่อโมเดล

X-loading weight plot นั้นถ้าความยาวคลื่นซึ่งมีค่า X-loading weight มากแสดงว่ามีความสำคัญมากต่อการทำนายตัวแปรอิสระ จากภาพที่ 4.6 แสดง X-loading weight plot ของน้ำตาลรุกโตสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง PC 1 2 3 และ 4 ครอบคลุมความแปรปรวนในสเปกตรัม 93 3 1 และ 1 % ตามลำดับ X-loading weight ของ PC 1 แสดงถึงความยาวคลื่นที่มีอิทธิพลต่อโมเดล X-loading weight ที่ 1450 (O-H stretch first overtone) ของน้ำ [15] 1892 1928 และ 2044 nm ยกเว้นที่ 1412, 1580, 1792, 1912, 1948, 1974, 2136, 2254, 2314, 2358, 2412 nm ส่วนของ PC 2 ซึ่งให้เห็นว่าความยาวคลื่นที่เด่นชัดมีอิทธิพลต่อโมเดล 2276 nm (C-H combination, C-C stretch overtones หรือ C-O stretch combination overtones ความยาวคลื่นจะเป็นการแสดงถึงน้ำตาลในน้ำผึ้ง [15][16][17] อ้างอิงโดย [18] ส่วนที่ 1460, 1594, 1778, 1964, 2072, 2314, 2400 nm จะไม่มีผลกับโมเดล ส่วน X-loading weight ของ PC 3 แสดงถึงความยาวคลื่นที่มีผลกับโมเดล 1916, 2250 nm ส่วนของ PC 4 ปรากฏว่าที่ความยาวคลื่น 2252 nm มีผลกับโมเดล



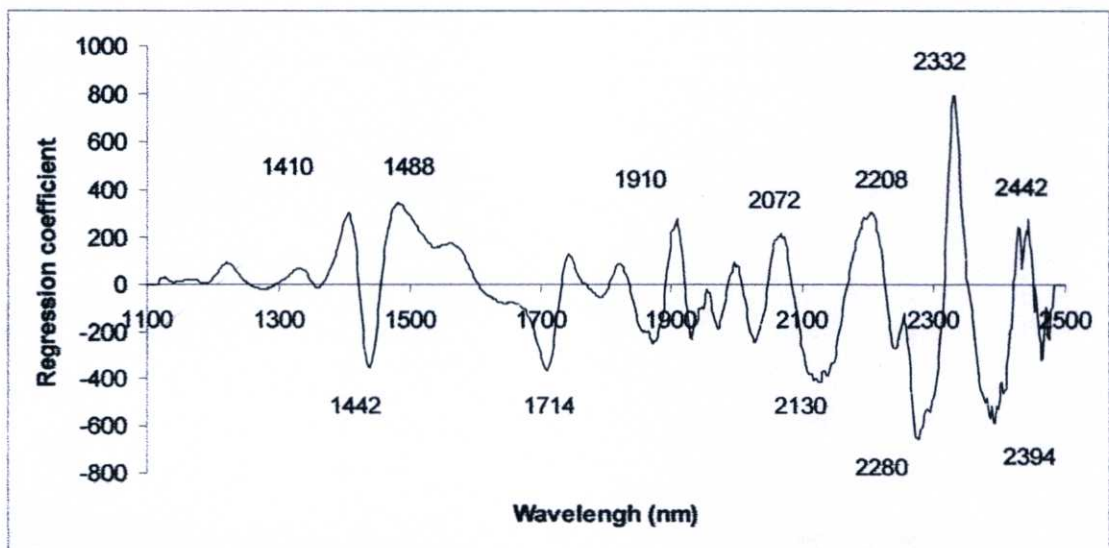
ภาพที่ 4.6 X-loading weight plot ของ ฟรุคโตส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

จากภาพที่ 4.7 ผลการทำนาย น้ำตาลกลูโคสเปรียบเทียบกับค่าที่วัดจริงจากน้ำผึ้ง โดยการวัดด้วยวิธี HPLC ซึ่งองค์ประกอบ น้ำตาลกลูโคสนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด ที่ชุด 1st derivative with segment of 20 nm เท่ากับ 0.807 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 6.15 % ค่า bias เท่ากับ 0.48 % ค่า RER เท่ากับ 1.63 และ ค่า RPD เท่ากับ 5.62



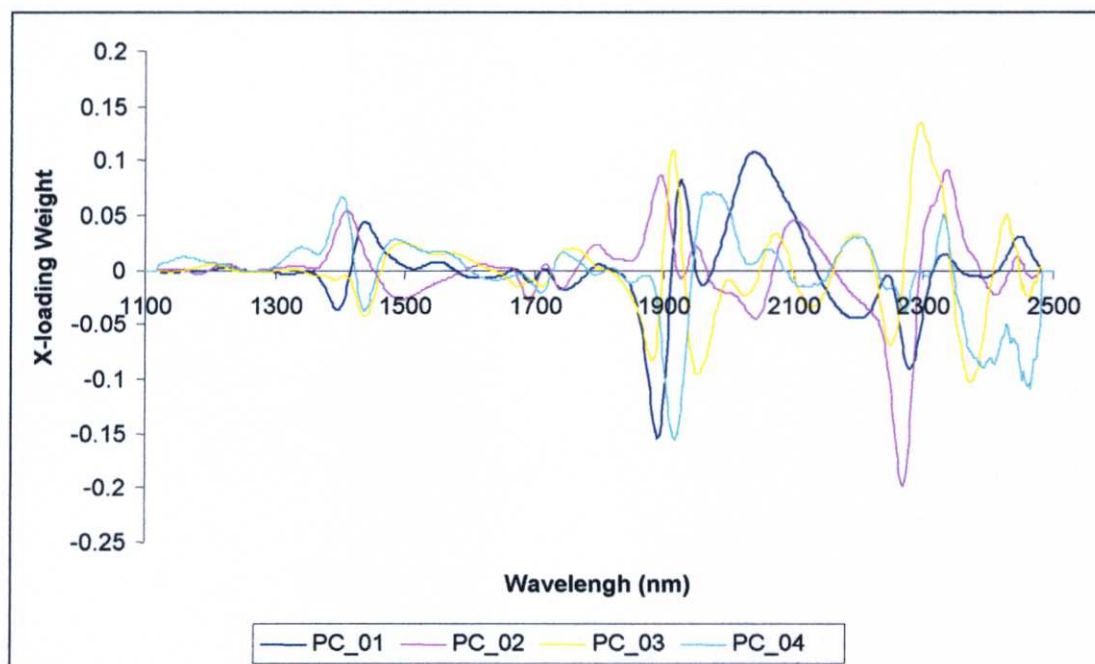
ภาพที่ 4.7 ผลการทำนายน้ำตาลกลูโคสกับค่าอ้างอิงโดยวิธี HPLC

จากภาพที่ 4.8 กราฟ Regression coefficient ของน้ำตาลกลูโคส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง พืชที่มีความสำคัญสูงที่ 2280 nm (combination of C-H stretch band, and deformation band[14]อ้างอิงจาก [18]และที่ 2330 nm เป็นคลื่นการดูดซับของน้ำตาลกลูโคส[15] และยังปรากฏ พืชที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อโมเดล คือที่ความยาวคลื่น 1410,1442,1488,1714,1910,2072,2130,2208, 2394,2442 nm



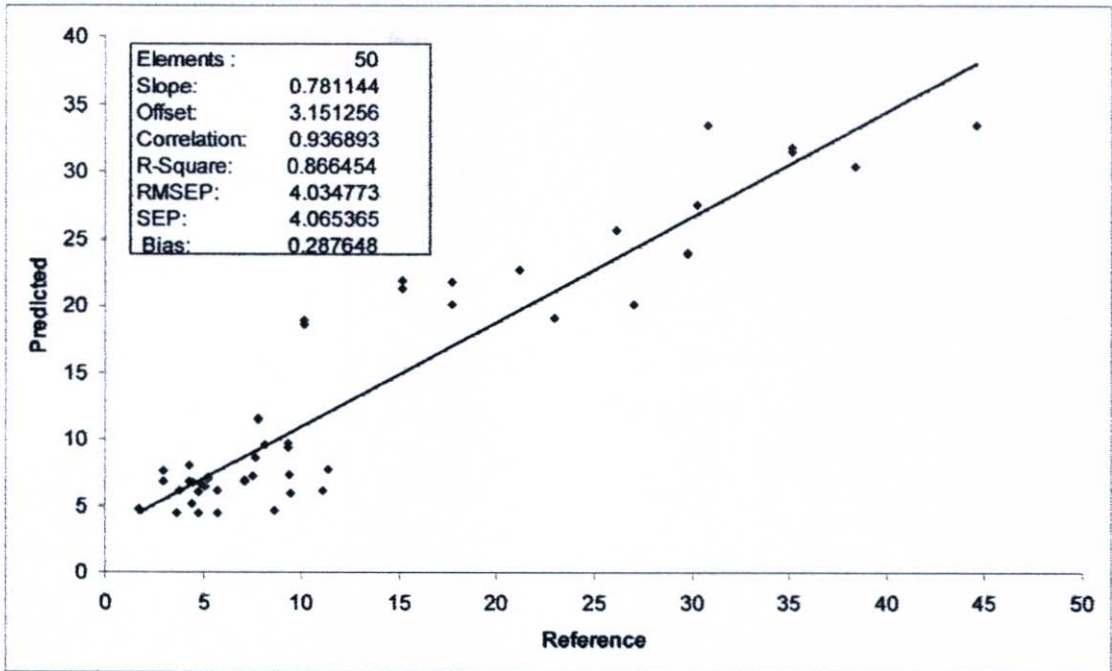
ภาพที่ 4.8 Regression coefficient ของ น้ำตาลกลูโคส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

จากภาพที่ 4.9 แสดง X-loading weight plot ของ กลูโคสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง PC 1 2 3 และ 4 ครอบคลุมความแปรปรวนในสเปกตรัม 91.32 และ 2% ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 1440 nm เป็นช่วงการดูดกลืนคลื่นของกลูโคส [15] 1892, 1930, 2048 nm มีอิทธิพลสูงต่อโมเดลใน PC 1 ส่วน PC 2 มีพีคที่เด่นชัดคือ 1896 2340 nm PC 3 ที่ 2300 จะมีพีคที่เด่นชัดที่สุด



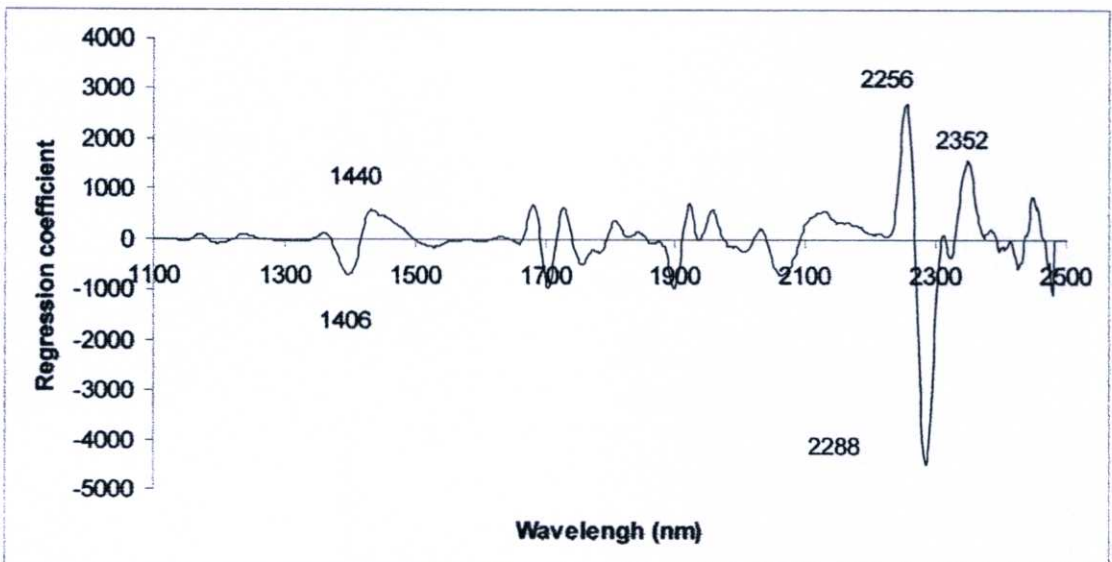
ภาพที่ 4.9 X-loading weight plot ของ กลูโคส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

จากภาพที่ 4.10 ผลการทำนาย น้ำตาลซูโครสเปรียบเทียบกับค่าที่วัดจริงจากน้ำผึ้งซึ่ง โดยก วัดด้วยวิธี HPLC ซึ่งองค์ประกอบ น้ำตาลซูโครสนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด ที่ชุด 2^{nd} derivative with segment of 20 nm เท่ากับ 0.937 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 4.07% ค่า bias เท่ากับ 0.29% ค่า RER เท่ากับ 2.74 และ ค่า RPD เท่ากับ 10.53



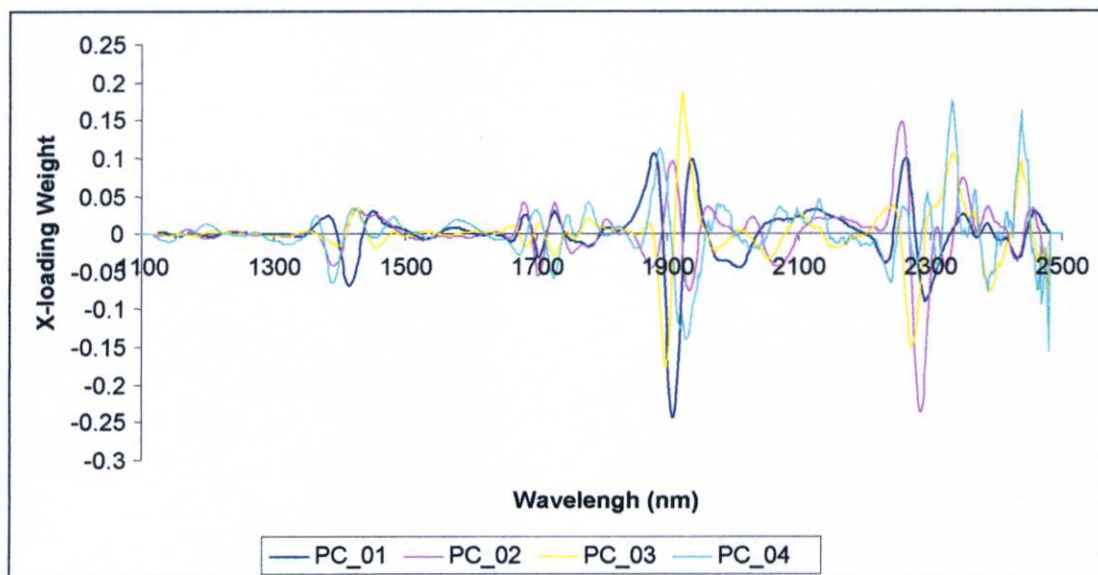
ภาพที่ 4.10 ผลการทำนายน้ำตาลซูโครสกับค่าอ้างอิงโดยวิธี HPLC

จากภาพที่ 4.11 กราฟ Regression coefficient ของน้ำตาลซูโครส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้งที่ที่มีความสำคัญสูงที่ 1440 เป็นการดูดกลืนคลื่นแสงของน้ำตาลกลูโคส [15] ที่ 2255 เป็นการดูดกลืนคลื่นแสง NIR ของน้ำตาลซูโครส [15] และ ยังปรากฏพีคที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อ โมเดล คือที่ความยาวคลื่น 1406 2288 และ 2352 nm



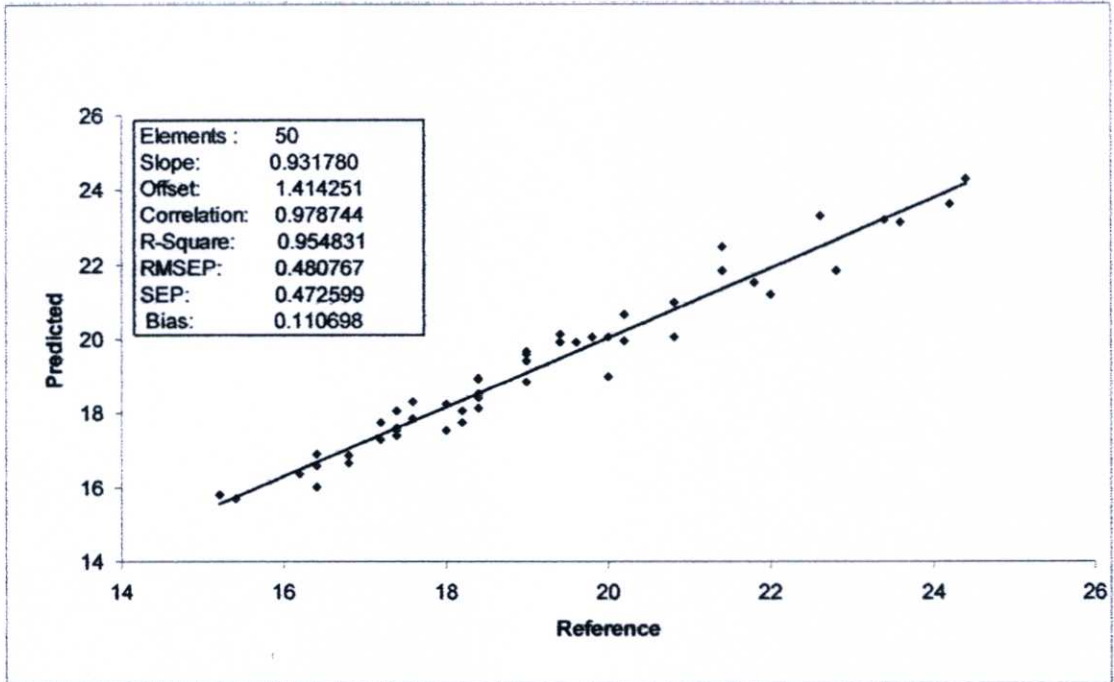
ภาพที่ 4.11 Regression coefficient ของ น้ำตาลซูโครส ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

จากภาพที่ 4.12 แสดง X-loading weight plot ของ น้ำตาลซูโครสที่สเปกตรัม NIR ของ น้ำผึ้ง PC 1 2 3 4 และ 5 ครอบคลุมความแปรปรวนในสเปกตรัม 91 4 2 1 และ 1% ตามลำดับ ที่ ความยาวคลื่น 1886 1934 และ 2264 nm มีอิทธิพลสูงต่อโมเดลใน PC 1 ส่วน PC 2 มี 1910 เป็น ความยาวคลื่นที่มีอิทธิพลกับโมเดล



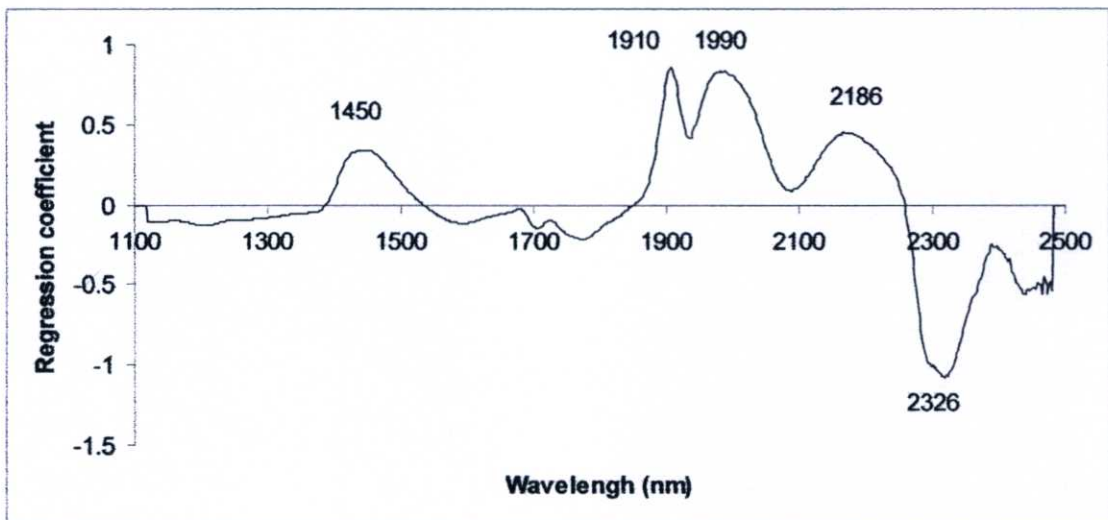
ภาพที่ 4.12 X-loading weight plot ของ ซูโครสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

จากภาพที่ 4.13 ผลการทำนาย ค่าความชื้นเปรียบเทียบกับค่าที่วัดจริงจากน้ำผึ้งซึ่ง โดยกา วัดด้วยวิธีอ้างอิง ค่าความชื้นนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด ที่ชุดสเปกตรัม MSC ค่า r เท่ากับ 0.979 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.47% ค่า bias เท่ากับ 0.11% ค่า RER เท่ากับ 4.9 และ ค่า RPD เท่ากับ 19.6



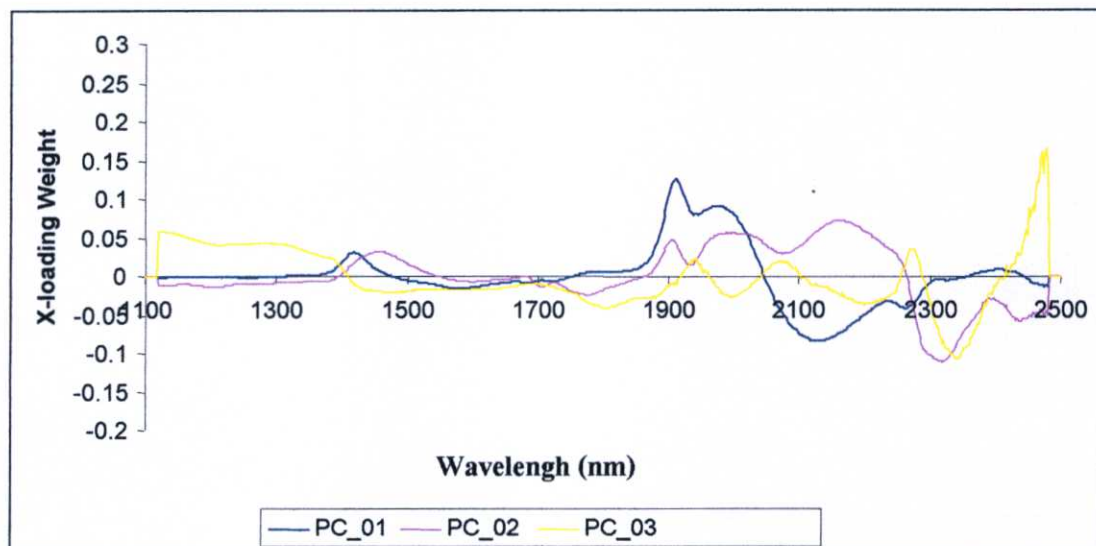
ภาพที่ 4.13 ผลการทำนายค่า ความชื้นกับค่าอ้างอิง

จากภาพที่ 4.14 กราฟ Regression coefficient ของความชื้น ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้งฟักที่มีความสำคัญสูงที่ 1450 (O-H stretch first overtone) เป็นค่าการดูดกลืนคลื่นแสง NIR ของน้ำ [15] และ ยังปรากฏพีคที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อ โมเดล คือที่ความยาวคลื่น 1910, 1990, 2186, และ 2326



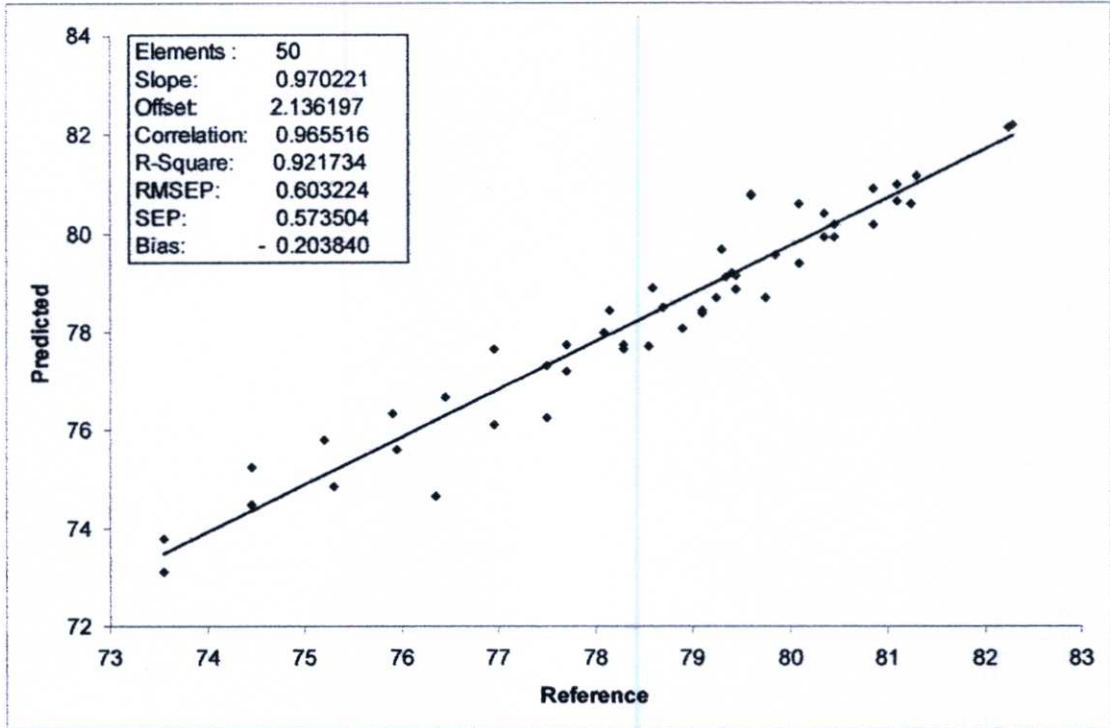
ภาพที่ 4.14 Regression coefficient ของ ความชื้น ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

ภาพที่ 4.15 แสดง X-loading weight plot ของ น้ำตาลซูโครสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง PC 1 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวนในสเปกตรัม 95.2 และ 2 % ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 1914 nm มีอิทธิพลสูงต่อโมเดลใน PC 1 ส่วน PC 2 ที่ 2170 nm มีผลกับโมเดล



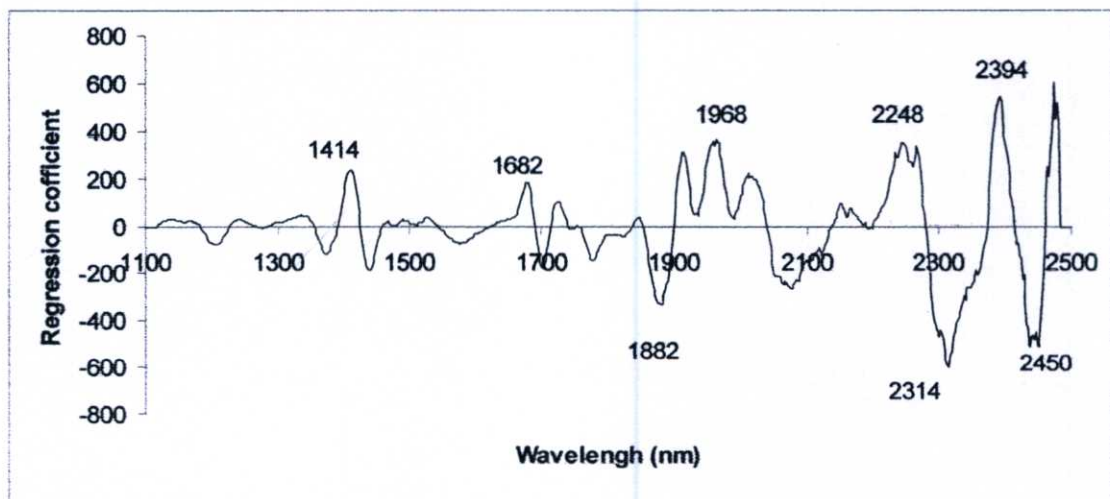
ภาพที่ 4.15 X-loading weight plot ของ ความชื้นที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

ภาพที่ 4.16 ผลการทำนายค่าของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) เปรียบเทียบกับค่าที่วัดจริง จากน้ำผึ้ง โดยการวัดด้วยวิธีอ้างอิง HPLC นี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) สูงที่สุด ที่ชุดสเปกตรัม^{2nd} derivative with segment of 20 nm ค่า r เท่ากับ 0.965 ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.57 % ค่า bias เท่ากับ -0.20% ค่า RER เท่ากับ 3.8 และ ค่า RPD เท่ากับ 15.2



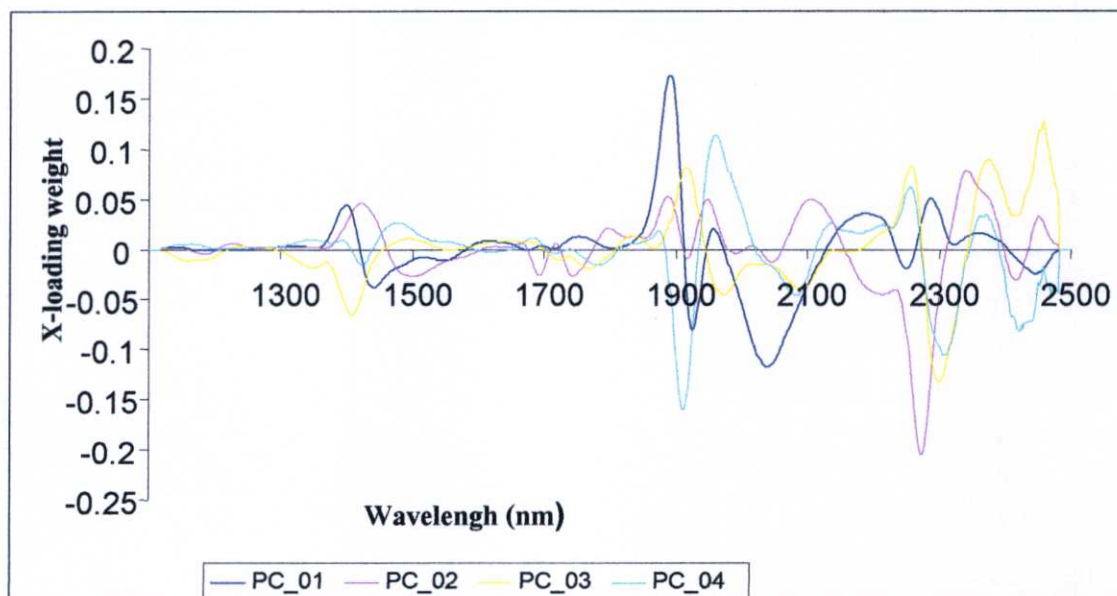
ภาพที่ 4.16 ผลการทำนายค่าของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) กับค่าอ้างอิง

ภาพที่ 4.17 กราฟ Regression coefficient ของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้งที่มีความสำคัญสูงที่ 2314 เป็นค่าการดูดกลืนคลื่นแสง NIR ของ Hemicellulose [15] และ ยังปรากฏพีคที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อโมเดล คือที่ความยาวคลื่น 1414, 1682, 1882, 1968, 2248, 2394 และ 2450 nm



ภาพที่ 4.17 Regression coefficient ของของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) ที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง

ภาพที่ 4.18 แสดง X-loading weight plot ของของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) น้ำตาลซูโครสที่สเปกตรัม NIR ของน้ำผึ้ง PC 1 2 3 และ 4 ครอบคลุมความแปรปรวนในสเปกตรัม 93 3 1 และ 1% ตามลำดับ PC 1 ที่ 1890 nm มีผลกับ โมเดล



ภาพที่ 4.18 X-loading weight plot ของของแข็งที่ละลายได้(ความหวาน)ที่สเปกตรัม NIRของน้ำผึ้ง

4.2 ผลการทำนายการแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้ง

4.2.1 ผลการแบ่งกลุ่มแบบ Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)

ผลการแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งในการใช้วิธีการแบ่งกลุ่มแบบ Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) โดยใช้ สเปกตรัมดั้งเดิม (Raw spectrum) และสเปกตรัมที่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น 2 วิธี ได้แก่

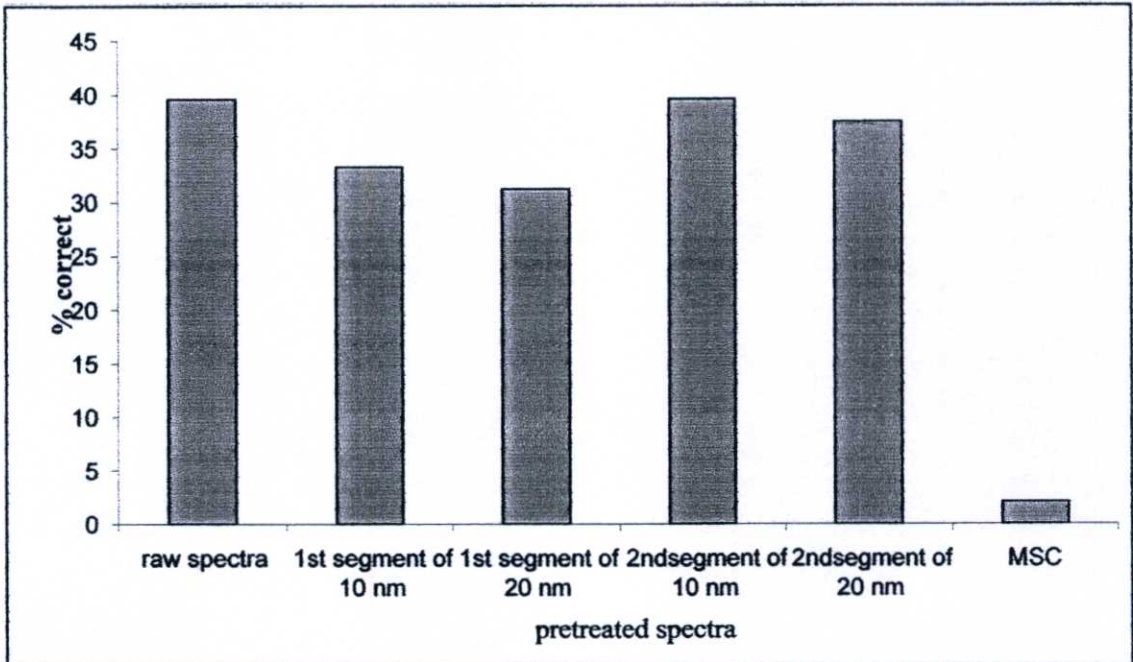
1. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี First and Second Derivative โดยใช้ช่วงข้อมูล 5 จุด (10 nm) และ 10 จุด (20 nm) (Savitzky-Golay algorithm, second polynomial)
2. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี Full multiplicative scatter correction (MSC)

โดยเมื่อเปรียบเทียบความถูกต้องในการคัดแยกด้วยการสร้างแบบจำลองจากสเปกตรัมของน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมโดยวิธี SIMCA ดังตารางที่ 4.3 พบว่า แบบจำลองที่สร้างจาก สเปกตรัมของน้ำผึ้งปลอมโดยจัดการสเปกตรัมด้วย 2nd derivative segment of 20 nm สามารถคัดแยกกลุ่มเดียวกันได้ถูกต้องสูงสุด 80.8 % และคัดแยกในกลุ่มน้ำผึ้งแท้ที่ดีที่สุดด้วยการจัดการสเปกตรัมด้วยวิธี MSC คือ 77 % ส่วนแบบจำลองที่สร้างจาก สเปกตรัมของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานโดยจัดการสเปกตรัมด้วยวิธี MSC สามารถคัดแยกกลุ่มน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานได้ถูกต้องที่สุดคือ 96.2%และคัดแยกใน

กลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานดีที่สุดด้วยการจัดการสเปกตรัมด้วยวิธี 1st segment of 10 nm ,20 nm, 2nd derivative segment of 20 nm คือ 95.5 %

ตารางที่ 4.3 ผลการคัดแยกน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานออกจากกันด้วยวิธี SIMCA

pretreated spectra	Honey group	No. of Honey for prediction		Model		% correct
				ไม่ได้มาตรฐาน	ได้มาตรฐาน	
raw spectra	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	69.3	92.3	61.5
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		4.5	81.8	13.63
รวม		48		รวม		39.58
1 st segment of 10 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	77	84.6	61.5
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		0	95.5	0
รวม		48		รวม		33.3
1 st segment of 20 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	69	84.6	53.8
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		9	95.5	4.54
รวม		48		รวม		31.25
2 nd segment of 10 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	76.9	92.3	69.2
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		9	86.4	1
รวม		48		รวม		39.58
2 nd segment of 20 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	80.8	88.5	69.2
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		0	95.5	0
รวม		48		รวม		37.5
MSC	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	19.2	96.2	3.84
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		77	27.3	0
รวม		48		รวม		2.08



ภาพที่ 4.19 ผลการทำนาย % ความถูกต้อง

ภาพที่ 19 เป็นผลการทำนาย % ความถูกต้องแสดงค่า pretreated spectra ที่ดีที่สุดคือค่า raw spectra และ 2nd segment 10 nm

4.2.2 ผลการแบ่งกลุ่มแบบ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)

ผลการ แบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งในการใช้วิธีการ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) โดยใช้สเปกตรัม ดั้งเดิม (Raw spectrum) และสเปกตรัมที่มีการจัดการ สเปกตรัม เบื้องต้น 2 วิธี ได้แก่

1. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี First and Second Derivative โดยใช้ช่วงข้อมูล 5 จุด (10 nm) และ 10 จุด (20 nm) (Savitzky-Golay algorithm, second polynomial)
2. การปรับแต่งค่าสเปกตรัมด้วยวิธี Full multiplicative scatter correction (MSC)

โดยเมื่อเปรียบเทียบความถูกต้องในการคัดแยกด้วยการสร้าง แบบจำลองจากสเปกตรัม ของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าแบบจำลอง ที่ สร้างจากสเปกตรัม ของน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน สามารถคัดแยกกลุ่มน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน ได้ ถูกต้อง 100% สามารถคัดแยกกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน ได้ 92.3% ส่วนแบบจำลอง ที่สร้างจาก สเปกตรัม ของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานสามารถคัดแยกกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานได้ถูกต้อง 92.3% ส่วน การแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งไม่ได้มาตรฐานมีความถูกต้อง 100 % ส่วนการจัดการสเปกตรัมนั้น ไม่มีผล ต่อ การคัดแยกของแบบจำลองทั้งของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน การทำนาย โดยรวมมีความถูกต้อง 95.8 %

ตารางที่ 4.4 ผลการคัดแยกน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานออกจากกันด้วยแบบจำลอง PLS-DA

pretreated spectra	Honey group	No. of Honey for prediction		Model		% correct
				ไม่ได้มาตรฐาน	ได้มาตรฐาน	
raw spectra	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	92.3	92.3	92.3
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		100	100	100
รวม		48	รวม			95.8
1 st segment of 10 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	92.3	92.3	92.3
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		100	100	100
รวม		48	รวม			95.8
1 st segment of 20 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	92.3	92.3	92.3
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		100	100	100
รวม		48	รวม			95.8
2 nd segment of 10 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	92.3	92.3	92.3
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		100	100	100
รวม		48	รวม			95.8
2 nd segment of 20 nm	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	92.3	92.3	92.3
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		100	100	100
รวม		48	รวม			95.8
MSC	ได้มาตรฐาน	26	Honey of correct classification	92.3	92.3	92.3
	ไม่ได้มาตรฐาน	22		100	100	100
รวม		48	รวม			95.8

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ศึกษาองค์ประกอบน้ำผึ้ง โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี ตรวจสอบที่น้ำผึ้งโดยตรง ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ทำลายตัวอย่าง ทำการวัดแบบ Transflectance ช่วงความยาวคลื่น 1100 -2500 nm ในการตรวจวัดและจำแนกน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานออกจากกันและใช้เวลาในการวัดเพียง 5 นาทีต่อตัวอย่างซึ่งเร็วกว่าวิธีการอ้างอิง

5.1 การทดสอบหาองค์ประกอบของน้ำผึ้ง

5.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำผึ้ง

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งพบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งจะประกอบด้วย น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และความชื้น ซึ่งการวิเคราะห์องค์ประกอบดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลจะทำโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (HPLC) ส่วนการหาความชื้นจะทำการ วัดด้วยเครื่อง Refractrometer พบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานมีความแตกต่างจาก น้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานอย่างเห็นได้ชัดเจนซึ่งน้ำที่ไม่ได้มาตรฐานจะมีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส(0.6- 27.5%โดยน้ำหนัก) และน้ำตาลกลูโคส(2.4-37.3โดยน้ำหนัก) น้ำตาลซูโครส(1.5-44.6โดยน้ำหนัก) ความชื้น (15.2- 24.8โดยน้ำหนัก)ที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งส่วนน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐานจะมี องค์ประกอบหลักน้ำตาลฟรุกโตส (33.7-49.5โดยน้ำหนัก) กลูโคส (24.4- 39.8โดยน้ำหนัก)และ น้ำตาลซูโครส (1.8-11.3โดยน้ำหนัก)ความชื้น (15.2-23.8โดยน้ำหนัก)เกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งน้ำผึ้ง จะกำหนดปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส มากกว่า 30 % โดยน้ำหนัก น้ำตาลกลูโคส 20 %โดยน้ำหนัก น้ำตาลซูโครส ไม่เกิน 12 % โดยน้ำหนัก ความชื้นจะไม่เกิน 25 % จะจัดในกลุ่มน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน ส่วนที่มีองค์ประกอบต่ำกว่านี้จะจัดอยู่ในกลุ่มน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยจากการทดสอบพบว่า น้ำผึ้งในประเทศไทยมีการผลิตน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานออกมาจำหน่ายในปริมาณสูงมากจาก ตัวอย่างทั้งหมด 90 ตัวอย่างพบว่าจะมีน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานอยู่ ถึง 50 ตัวอย่างและน้ำผึ้งที่ได้ มาตรฐาน 40 ตัวอย่างซึ่งเมื่อผู้บริโภคได้บริโภคน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้จะทำให้มีผลเสียต่อ สุขภาพซึ่งน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้จะมีคุณค่าทางอาหารเหมือนกับน้ำหวานที่แต่งกลิ่นน้ำผึ้ง

5.1.2 การทำนายองค์ประกอบของน้ำผึ้งโดยใช้เทคนิค NIR

การใช้เทคนิค NIR spectroscopy ในการทำนายองค์ประกอบของน้ำผึ้ง โดยใช้แบบจำลองที่ได้จากค่าสเปกตรัมเดิม สเปกตรัมถูกปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Full multiplicative scatter correction (MSC) หรือ Second Derivative (Savitzky-Golay algorithm, second polynomial) โดยใช้ PLS regression สามารถทำนายองค์ประกอบของน้ำผึ้ง ที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส ค่าของแข็งที่ละลายได้ (ความหวาน) และความชื้นและผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ได้ (r) สูงที่สุดคือความชื้น จะมีค่าอยู่ที่ 0.979 % ค่าผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.47% และค่า bias ของความชื้น เท่ากับ 0.11 %ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ สูงสุดค่า (r) 0.95-0.98 ใช้ในการประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่รวมถึงการประกันคุณภาพ [11]

5.2 การแบ่งกลุ่มน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐาน

5.2.1 การวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานด้วยวิธี SIMCA

สเปกตรัมของน้ำผึ้งสามารถแยกน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมได้ในแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากกลุ่มน้ำผึ้งปลอมจะมีการคัดแยกน้ำผึ้งในกลุ่มตัวเอง ได้ดีที่สุดใน 80.8 % และทำนายกลุ่มอื่นได้ดีที่สุด 77 % และแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากกลุ่มน้ำผึ้งแท้จะมีการคัดแยกน้ำผึ้งในกลุ่มตัวเอง ได้ดีที่สุดใน 96.2 % และทำนายกลุ่มอื่นได้ดีที่สุด 95.5 %

5.2.2 การวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานด้วยวิธี PLS-DA

สเปกตรัมของน้ำผึ้งสามารถแยกน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมได้ในแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากกลุ่มน้ำผึ้งปลอมจะมีการคัดแยกน้ำผึ้ง ได้ดีมากมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องสูงสุดในการทำนายกลุ่มของตัวเอง 100 % และในการทำนายกลุ่มอื่น 92.3 %และแบบจำลองที่สร้างขึ้นจากกลุ่มน้ำผึ้งแท้จะมีการคัดแยกน้ำผึ้ง ได้ดีมากมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องสูงสุดในการทำนายกลุ่มของตัวเอง 92.3 % และในการทำนายกลุ่มอื่น 100 % วิธีการนี้จึงเหมาะที่จะทำการคัดแยกกลุ่มน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานออกจากกัน การทำนายโดยรวมมีความถูกต้อง 95.8 %

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ในการศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งซึ่งน้ำผึ้งในการทดลองนี้จะเป็นการสร้างแบบจำลองจากน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานซึ่งจะทำให้ความแตกต่างขององค์ประกอบมาก อาจทำให้การทำนายผิดพลาดไป

5.3.2 ในการแบ่งกลุ่มของน้ำผึ้งมาตรฐานและน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานนั้นจะมีน้ำผึ้งที่ค่าองค์ประกอบคล้ายน้ำผึ้งมาตรฐานอยู่ซึ่งเป็นการปลอมปนแบบผสมจึงทำให้องค์ประกอบของน้ำผึ้งที่ไม่ได้มาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งมาตรฐานในปริมาณมากมีผลทำให้การคัดแยกผิดพลาด

เอกสารอ้างอิง

- [1] แสนนัค หงษ์ทรงเกียรติ เทคโนโลยีการเลี้ยงผึ้งกรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2531
- [2] จากวิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี [Online]. Available : <http://th.wikipedia.org/wiki>, 2552
- [3] บริษัท ไทยลานนาฟาร์มผึ้ง จำกัด [Online]. Available : <http://www.thailanna.co.th>, 2009
- [4] ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2553[Online]. Available : <http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntfmoph/ntf211.htm>, 2543
- [5] Irene Kushnir.,1979.Sufars and Sugar Products.J.Association Off. Anal.Chem.Vol.62, No.4. 917-920
- [6] สำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่[Online]. Available : http://ndoae.doe.go.th/news/news_0102.html, 2548
- [7] ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [Online]. Available : <http://www.kmitl.ac.th/sisc/HPLC/Model.htm>, 2550
- [8] นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์. “หลักการพื้นฐานของเทคนิคอินฟราเรดย่านใกล้สเปกโตรสโกปี” การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก. 2545. หน้า 39 – 48
- [9] อนุพันธ์ เทิดวงศ์วรกุล. “การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์” การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก. 2545. หน้า 78 – 96
- [10] ธงชัย สุวรรณสิขณณ์. “การวิเคราะห์สเปกตรัม NIR ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ (Data Analysis of NIR Spectra: Qualitative and Quantitative Analysis)” การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อ

การแข่งขันในเวทีการค้าโลก. 2545. หน้า 116 – 119

- [11] Williams, P. “Near-infrared Technology – Getting the best out of light”. Edition 5.0. **A short course in the practical implementation of near-infrared spectroscopy for the user.** PDK Grain, Nanaimo, Canada. 2007
- [12] Kasemsamran, S. “**Nondestructive Quantitative Analysis of biomedical Samples by Near Infrared Spectroscopy with Chemometrics and Development of novel Chemometric Methods for quantitative Analysis.**” Ph. D. Thesis. Kwansai Gakuin University, Japan. 2005
- [13] วารุณี ธนะแพศย์. “สถานการณ์และการใช้ประโยชน์ด้วยเทคนิค NIR ในประเทศไทย: แนวโน้มงานวิจัยในด้านเทคนิค NIR ในความต้องการของอุตสาหกรรมและมาตรฐานคุณภาพของสินค้า” โครงการสัมมนาวิชาการ การควบคุมมาตรฐานคุณภาพของสินค้าทางการเกษตรและอุตสาหกรรมโดยวิธีไม่ทำลาย เพื่อการแข่งขันบนเวทีการค้าโลก. 2550. หน้า 21-31
- [14] AOAC, (2000). AOAC Official Method 969.38, moisture in honey. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edition. AOAC International, USA.
- [15] Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H., (1993). Practical near infrared spectroscopy with application in food beverage analysis., longman scientific & technical: harlow, UK., p 28-33.
- [16] Cozzolino, D. and Corbella, E. Apic. J. Res. 42,16 (2003)
- [17] Murray, I in Proceedings of the International NIR/NIT Conference, Ed by Hollo, J. Kaffka, K.J and Gonczy, J.L. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, p.13 (1986)
- [18] Corbella, E., and Cozzolino, D. (2005). The use of visible and near infrared spectroscopy to classify the floral origin of honey samples produced in Uruguay. J.Near Infrared Spectroscopy. 13, (63-68)

- [19] Garcia-Alvarez, M., Huidobro J.F., Hermida M., Rodriguez-Oteroj J.L., (2000). Major componenes of honey analysis by near-infrared transflectance spectroscopy. *Agric. Food Chem.*, 48, 5154-5158.
- [20] Liu, F., He, Y., Wang, L., & Pan H. "Feasibility of the use of visible and near infrared spectroscopy to assess soluble solids content and pH of rice wines." **Journal of Food Engineering**, 83(3), 2007. pp. 430-435

ภาคผนวก ก

Relation between Brix value (%) and refractive index (nD)[Digital hand-held pocket refractometer PAL]

%	n 20/D	%	n 20/D	%	n 20/D
0	1.33299	35	1.39032	70	1.46546
1	1.33442	36	1.3922	71	1.4679
2	1.33586	37	1.39409	72	1.47037
3	1.33732	38	1.396	73	1.47285
4	1.33879	39	1.39792	74	1.47535
5	1.34062	40	1.39986	75	1.47787
6	1.34175	41	1.40181	76	1.4804
7	1.34325	42	1.40378	77	1.48295
8	1.34477	43	1.40576	78	1.48552
9	1.34629	44	1.40776	79	1.48811
10	1.34782	45	1.40978	80	1.49071
11	1.34935	46	1.41181	81	1.49333
12	1.35093	47	1.41385	82	1.49597
13	1.3525	48	1.41592	83	1.49862
14	1.35408	49	1.41799	84	1.50129
15	1.35568	50	1.42009	85	1.50398
16	1.35729	51	1.4222	86	1.5067
17	1.35891	52	1.42432	87	1.5094
18	1.36054	53	1.42647	88	1.5122
19	1.36218	54	1.42863	89	1.5149
20	1.36384	55	1.4308	90	1.5177
21	1.36551	56	1.43299	91	1.5205
22	1.3672	57	1.4352	92	1.5234
23	1.36889	58	1.43743	93	1.5262
24	1.3706	59	1.43967	94	1.5291
25	1.37233	60	1.44193	95	1.532
26	1.37406	61	1.4442		
27	1.37582	62	1.4465		
28	1.37758	63	1.44881		
29	1.37936	64	1.45113		
30	1.38115	65	1.45348		
31	1.38296	66	1.45584		
32	1.38478	67	1.45822		
33	1.38661	68	1.46061		
34	1.38846	69	1.46303		

*Refractive index values for Brix 0 to 85% in the above table have been

Officially determined by ICUMSA (International Committee of Uniform

Method of Sugar Analysis held in 1974)

ภาคผนวก ข

Table 969.38 Relationship between refractive index and water contents of honey

Water content,%	Refractive index			Water content,%	Refractive index			Water content,%	Refractive index		
	20°C ^b	60°F ^c	40°C		20°C ^b	60°F ^c	40°C		20°C ^b	60°F ^c	40°C
13	1.5044	1.5053	1.4998	17.6	1.4925	1.4935	1.4881	22.2	1.481		
13.2	1.5038	1.5048	1.4993	17.8	1.492	1.493	1.4876	22.4	1.4805		
13.4	1.5033	1.5043	1.4988	18	1.4915	1.4925	1.487	22.6	1.48		
13.6	1.5028	1.5038	1.4983	18.2	1.491	1.492	1.4865	22.8	1.4795		
13.8	1.5023	1.5033	1.4978	18.4	1.4905	1.4915	1.486	23	1.479		
14	1.5018	1.5027	1.4973	18.6	1.49	1.491	1.4855	23.2	1.4785		
14.2	1.5012	1.5022	1.4968	18.8	1.4895	1.4905	1.485	23.4	1.478		
14.4	1.5007	1.5017	1.4962	19	1.489	1.49	1.4845	23.6	1.4775		
14.6	1.5002	1.5012	1.4957	19.2	1.4885	1.4895	1.484	23.8	1.477		
14.8	1.4997	1.5007	1.4952	19.4	1.488	1.489	1.4835	24	1.4765		
15	1.4992	1.5002	1.4947	19.6	1.4875	1.4885	1.4829	24.2	1.476		
15.2	1.4987	1.4997	1.4942	19.8	1.487	1.488	1.4824	24.4	1.4755		
15.4	1.4982	1.4992	1.4937	20	1.4865	1.4875	1.4819	24.6	1.475		
15.6	1.4976	1.4986	1.4932	20.2	1.486	1.487	1.4814	24.8	1.7745		
15.8	1.4971	1.4981	1.4927	20.4	1.4855	1.4865	1.4809	25	1.474		
16	1.4966	1.4976	1.4922	20.6	1.485	1.486	1.4804				
16.2	1.4961	1.4971	1.4916	20.8	1.4845	1.4855	1.4799				
16.4	1.4956	1.4966	1.4911	21	1.484	1.485	1.4794				
16.6	1.4951	1.4961	1.4906	21.2	1.4835	1.4845	1.4788				
16.8	1.4946	1.4956	1.4901	21.4	1.483	1.484	1.4783				
17	1.494	1.4951	1.4896	21.6	1.4825	1.4835	1.4778				
17.2	1.4935	1.4946	1.4891	21.8	1.482	1.483	1.4773				
17.4	1.493	1.494	1.4886	22	1.4815	1.4825	1.4768				

a Values for 20°C and 60°F are Wedmore's calculation (Bee world36 ,197(1995): 40°C values are calculated from Auerbach and Borries equation(Z Nahr. Genussm. 22,353-358(1924)]. Values > 22.0% were extended by FAO/WHO Codex Committee on Method of Analysis and Sampling (1968)

b If refractive index is measured at temperature above (below) 20°C,add(subtract) 0.00023/°C above(below) 20°C before using table.

C If refractive index is measured at temperature above (below) 60°F,add(subtract) 0.00013/°F above(below) 60°F before using table.

ภาคผนวก ค

ตารางบันทึกผลการทดลอง % ความชื้นของน้ำผึ้งที่ทราบแหล่งที่มาในชุด calibration จากการหาค่าจาก

Refractrometer

	แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %		แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %
1	Utaradit 1	70.8	>25	46	bouy longe 1	79.8	17.6
	Utaradit 2	71.3	>25		bouy longe 2	79.5	18
2	Peerapan 1	81.1	16.4	47	imperial 1	80.2	17.4
	pelapan 2	79.4	18.2		imperial 2	80.4	17.2
3	Payao 1	74.9	22.8	48	mong fang 1	79.1	18.4
	Payao 2	75.2	23.6		mong fang 2	77.0	20.6
4	Doikum 1	81.2	16.4	49	lamyai fasion 1	79.4	18.2
	Doikum 2	81.2	16.4		lamyai fasion 2	78.9	18.8
5	Pakbog 1	78.7	19	50	alavan 1	78.4	19.2
	Pakbog 2	78.7	19		alavan 2	78.9	18.8
6	Wangnuae 1	76.3	21.4	51	langnees 1	81.3	16.2
	Wangnuae 2	76.4	21.2		langnees 2	79.6	18
7	makajan 1	76.9	20.8	52	writrose 1	81.2	16.4
	makajan 2	78.6	19		writrose 2	81.4	16.2
8	Doi saked 1	78.4	19.2	53	aro 1	79.3	18.4
	doysaket 2	78.3	19.4		aro 2	79.9	17.6
9	Chantaburi 1	78.3	19.4	54	valalom lopburi 1	75.9	21.8
	Chantaburi 2	78.3	19.4		valalom lopburi 2	75.6	22.2
10	Konkaen1.1	78.3	19.4	55	valalom pitsanulok 1	76.4	21.2
	Konkaen1.2	77.5	20.2		valalom pitsanulok 2	77.5	20.2
11	Konkaen2.1	73.8	24	56	vatchapong 1	81.1	16.4
	konkan 2.2	72.9	24.8		vatchapong 2	80.9	16.6
12	Konkaen3.1	74.1	23.6	57	hoybong 1	80.3	17.4
	Konkaen3.2	74.6	23.2		hoybong 2	80.3	17.4
13	Konkaen4.1	74.3	23.4	58	yasotorn 1	73.6	24.2

	แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %		แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %
	Konkaen4.2	73.3	24.4		yasotorn 2	73.6	24.2
14	Konkaen5.1	75.3	22.4	59	thai honey 1	80.3	17.4
	Konkaen5.2	75.9	21.8		thai honey 2	79.9	17.6
15	km 8 1	78.3	19.4	60	motor way 1	77.8	19.8
	km 8 2	78.7	19		motor way 2	77.6	20
16	charvala fram 1	79.6	18	61	siam honey 1	80.5	17
	charvala fram 2	73.9	23.8		siam honey 2	79.3	18.4
17	bangkok 1	72.6	>25	62	chonburi B 1	78.1	19.6
	bangkok 2	72.4	>25		chonburi B 2	78.3	19.4
18	esarn 1	78.3	19.4	63	huytakay kan 1	75.7	22
	esarn 2	78.6	19		huytakay kan 2	74.5	23.2
19	pattananicom 1	79.8	17.6	64	kokpai 1	79.3	18.4
	pattananicom 2	80.8	16.8		kokpai 2	78.3	19.4
20	varuka 1	79.8	17.6	65	panjasri 1	80.1	17.4
	varuka 2	77.9	19.8		panjasri 2	79.8	17.6
21	mouth five 1	79.4	18.2	66	ladkrabang taa 1	81.3	16.2
	mouth five 2	78.2	19.4		ladkrabang taa 2	81.2	16.4
22	suppa 1	79.7	17.8	67	pakdee L 1	78.7	19
	suppa 2	78.9	18.8		pakdee L 2	79.4	18.2
23	suppa g 1	79.3	18.4	68	pakdee paa 1	79.8	17.6
	suppa g 2	76.3	21.4		pakdee paa 2	79.1	18.4
24	authai 1	75.7	22	69	pakdee five 1	81.3	16.2
	authai 2	80.6	17		pakdee five 2	81.5	16
25	Tarad thai 1	79.5	18	70	pednantawan 1	77.3	20.4
	Tarad thai 2	79.3	18.4		pednantawan 2	77.4	20.2
26	kosit 1	78.6	19	71	jutalos 1	79.4	18.2
	kosit 2	78.2	19.4		jutalos 2	78.7	19
27	kan 1	77.2	20.4	72	pattawan 1	77.4	20.2
	kan 2	76.1	21.6		pattawan 2	79.3	18.4

	แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %		แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %
28	petchaboon 1	77.8	19.8	73	labdoun 1	74.4	23.4
	petchaboon 2	77.7	20		labdoun 2	73.9	23.8
29	sukothai 1	76.9	20.8	74	sapanmai boylong1	77.7	20
	sukothai 2	77.6	20		sapanmai boylong2	77.8	19.8
30	plaa 1	79.1	18.4	75	sapanmai prom 1	72.3	>25
	plaa 2	79.4	18.2		sapanmai prom 2	74.4	23.4
31	plaa B 1	81.1	16.4	76	sapanmai 100 1	75.8	22
	plaa B 2	81.0	16.6		sapanmai 100 2	76.1	21.6
32	ambrosia L 1	80.9	16.6	77	jitlada 1	80.4	17.2
	ambrosia L 2	81.2	16.4		jitlada 2	78.9	18.8
33	ambrosia T 1	79.5	18	78	namchem 1	77.3	20.4
	ambrosia T 2	80.3	17.4		namchem 2	76.1	21.6
34	prama 1	76.7	21	79	pufa 1	79.1	18.4
	prama 2	76.7	21		pufa 2	77.7	20
35	loungean 1	80.0	17.6	80	pulong 1	85.6	<13
	loungean 2	79.3	18.4		pulong 2	80.1	17.4
36	pattananicom T 1	79.3	18.4	81	Tesco 1	79.6	18
	pattananicom T 2	79.2	18.4		Tesco 2	79.4	18.2
37	suppa lamyai 1	78.7	19	82	imgergold 1	79.6	18
	suppa lamyai 2	79.3	18.4		imgergold 2	79.5	18
38	china 1	75.1	22.6	83	namgom 1	76.7	21
	china 2	74.6	23.2		namgom 2	76.9	20.8
39	lang phing 1	82.3	15.2	84	phoumdin 1	75.4	22.4
	lang phing 2	82.1	15.4		phoumdin 2	75.9	21.8
40	pudin 1	80.3	17.4	85	nakonpatom 1	80.8	16.8
	pudin 2	80.4	17.2		nakonpatom 2	80.7	16.8
41	songsarm 1	79.2	18.4	86	fresh 1	80.2	17.4
	songsarm 2	79.7	17.8		fresh 2	79.2	18.4
42	chomchon 1.1	80.8	16.8	87	lanna 1	80.9	16.6

	แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %		แหล่งที่มาของน้ำผึ้ง	Brix	Water content, %
	chomchon 1.2	80.4	17.2		lanna 2	79.2	18.4
43	chomchon 2.1	80.4	17.2	88	helty meat 1	79.4	18.2
	chomchon 2.2	80.4	17.2		helty meat 2	80.4	17.2
44	ban lai 1	77.7	20	89	chaiyapom 1	77.9	19.8
	ban lai 2	77.7	20		chaiyapom 2	77.9	19.8
45	phang van 1	80.2	17.4	90	joho honey.1	82.3	15.2
	phang van 2	80.1	17.4		joho honey.2	81.8	15.8

ภาคผนวก ง

ตารางผลการทดลองหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ด้วยวิธี HPLC

ลำดับ	แหล่งที่มา	ฟรุกโตส	กลูโคส	ซูโครส	ลำดับ	แหล่งที่มา	ฟรุกโตส	กลูโคส	ซูโครส
1	Utaradit	68.16	92.43	7.30	46	bouy longe	42.07	33.93	4.36
2	Peerapan	13.73	27.19	11.82	47	imperial	36.68	39.76	3.63
3	Payao	48.39	39.19	8.14	48	mong fang	18.73	18.12	13.39
4	Doikum	17.13	23.06	7.62	49	lamyai fasion	38.42	29.74	9.09
5	Pakbog	19.07	31.90	7.71	50	alavan	39.57	30.13	8.59
6	Wangnuae	10.77	17.72	27.16	51	langnees	38.78	30.85	4.81
7	makajan	3.31	11.39	16.45	52	writrose	40.41	36.24	2.97
8	Doi saked	2.93	8.62	22.97	53	aro	40.43	37.94	1.78
9	Chantaburi	6.67	12.80	33.72	54	valalom lopburi	1.13	12.27	29.76
10	Konkaen	1.52	8.59	44.58	55	valalom pitsanulok	37.17	31.96	3.25
11	Konkaen	0.64	5.21	35.09	56	vatchapong	38.67	28.54	10.42
12	Konkaen	4.44	9.53	27.08	57	hoybong	37.84	27.59	9.97
13	Konkaen	13.67	18.65	11.06	58	yasotom	1.09	2.37	24.32
14	Konkaen	4.83	8.75	26.97	59	thai honey	16.37	22.60	1.65
15	km 8	15.84	18.48	10.32	60	motor way	22.58	29.35	4.44
16	charvala fram	41.57	34.16	2.78	61	siam honey	37.14	31.77	5.25
17	bangkok	21.83	28.17	1.71	62	chonburi B	10.54	21.47	17.72
18	esarn	44.42	34.35	9.44	63	huytakay kan	10.50	15.40	16.84
19	pattananicom	38.80	36.21	4.30	64	kokpai	27.52	35.98	5.98
20	varuka	40.17	32.74	7.93	65	panjasri	15.93	17.89	20.64
21	mouth five	21.97	28.51	5.63	66	ladkrabang taa	6.45	6.86	30.78
22	suppa	41.42	33.01	5.72	67	pakdee L	36.11	26.45	9.31
23	suppa g	5.09	5.18	36.31	68	pakdee paa	36.96	30.27	4.62
24	authai	7.81	8.71	29.98	69	pakdee five	37.23	30.96	4.59

ลำดับ	แหล่งที่มา	ฟรุกโตส	กลูโคส	ซูโครส	ลำดับ	แหล่งที่มา	ฟรุกโตส	กลูโคส	ซูโครส
25	Tarad thai	39.56	38.32	4.78	70	pednantawan	24.78	26.27	4.90
26	kosit	36.16	26.79	8.07	71	jutalos	25.60	37.35	3.65
27	kan	11.50	21.51	24.47	72	pattawan	24.37	25.89	4.90
28	petchaboon	39.98	29.16	9.34	73	labdoun	14.04	29.77	1.53
29	sukothai	43.43	37.46	3.82	74	sapanmai boylong	12.43	14.94	16.06
30	plaa	42.22	39.66	5.70	75	sapanmai prom	4.27	10.32	21.15
31	plaa B	36.88	31.88	7.53	76	sapanmai 100	3.63	5.67	26.10
32	ambrosia L	41.49	32.08	9.12	77	jitlada	38.34	33.17	9.40
33	ambrosia T	41.75	37.31	5.08	78	namchem	6.17	7.38	30.05
34	prama	40.25	35.94	4.22	79	pufa	27.02	25.06	7.81
35	loungean	26.09	29.56	5.53	80	pulong	34.15	26.19	9.52
36	pattananicom T	49.52	25.17	2.96	81	Tesco	34.54	26.83	7.10
37	suppa lamyai	8.83	8.82	30.25	82	imgergold	38.82	32.32	4.50
38	china	20.72	28.79	7.26	83	namgom	20.13	23.67	10.10
39	lang phing	9.08	11.06	34.51	84	phoumdin	12.67	16.95	15.14
40	pudin	39.34	28.83	11.35	85	nakonpatom	37.47	30.62	6.22
41	songsarm	25.85	23.13	7.73	86	fresh	41.30	34.52	3.77
42	chomchon	11.49	14.14	38.39	87	lanna	36.04	28.63	7.37
43	chomchon	10.52	13.10	35.47	88	heltymeat	19.99	23.22	5.15
44	ban lai	26.37	35.66	4.30	89	chaiyapom	3.60	8.53	17.91
45	phang van	37.00	32.49	5.18	90	joho honey.	33.71	24.37	9.31

ภาคผนวก จ

Results of PLS regression of honey

ชนิด	Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction				
			r	SEC	Bias	r	SEP	Bias	RPD	RER
ฟรุคโตส	raw	3	0.87	7.16	-2.72E-06	0.849	7.764	-0.27	6.23	1.88
	1st derivative with segment of 10 nm	2	0.872	7.12	-6.18E-07	0.85	7.7	0.14	6.28	1.89
	1st derivative with segment of 20 nm	2	0.872	7.12	-9.43E-04	0.851	7.69	0.03	6.29	1.89
	2nd derivative with segment of 10 nm	2	0.871	7.13	-5.57E-07	0.833	8.12	0.74	5.96	1.79
	2nd derivative with segment of 20 nm	2	0.869	7.2	-7.29E-08	0.84	7.95	0.55	6.09	1.83
	MSC	2	0.869	7.2	-1.58E-06	0.835	8.08	0.27	5.99	1.8
	SNV	2	0.869	7.2	-1.64E-07	0.835	8.08	0.27	5.99	1.8

Results of PLS regression of honey (ต่บ)

ชนิด	Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction				
			r	SEC	Bias	r	SEP	Bias	RPD	RER
กลุ่บ	raw	5	0.88	4.88	-3.56E-06	0.797	6.17	0.23	5.6	1.62
	1st derivative with segment of 10 nm	3	0.87	5.05	-2.20E-07	0.786	6.29	0.43	5.49	1.59
	1st derivative with segment of 20 nm	6	0.906	4.36	1.27E-06	0.807	6.15	0.48	5.62	1.63
	2nd derivative with segment of 10 nm	3	0.883	4.82	2.27E-07	0.767	6.51	0.63	5.31	1.54
	2nd derivative with segment of 20 nm	5	0.92	4.04	1.47E-06	0.776	6.59	0.83	5.24	1.52
	MSC	6	0.914	4.16	1.47E-05	0.793	6.55	0.11	5.27	1.53
	SNV	4	0.882	4.82	1.14E-05	0.804	6.06	0.18	5.7	1.65

Results of PLS regression of honey (ต่อ)

ชนิด	Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction				
			r	SEC	Bias	r	SEP	Bias	RPD	RER
ซูโครส	raw	7	0.887	4.85	-7.80E-06	0.916	4.5	0	9.53	2.48
	1st derivative with segment of 10 nm	4	0.861	5.33	4.28E-07	0.934	4.25	-0.06	10.09	2.62
	1st derivative with segment of 20 nm	3	0.852	5.49	-6.70E-07	0.936	4.28	0.09	10.02	2.61
	2nd derivative with segment of 10 nm	5	0.92	4.13	-1.09E-06	0.898	4.93	0.41	8.7	2.26
	2nd derivative with segment of 20 nm	3	0.856	5.42	4.13E-07	0.937	4.07	0.29	10.53	2.74
	MSC	4	0.852	5.5	8.25E-07	0.924	4.52	-0.12	9.48	2.47
	SNV	4	0.852	5.49	-7.72E-07	0.923	4.55	0	9.42	2.45

Results of PLS regression of honey (ต่อ)

ชนิด	Pretreatment	PC s	Calibration			Prediction				
			r	SEC	Bias	r	SEP	Bias	RPD	RER
ค่าของแข็ง ที่ละลายได้ (ความ หวาน)	raw	3	0.938	0.82	-1.82E-06	0.961	0.6	-1.3	14.6	3.6
	1st derivative with segment of 10 nm	3	0.939	0.81	-2.48E-06	0.963	0.583	-0.09	15	3.7
	1st derivative with segment of 20 nm	3	0.94	0.8	-2.66E-06	0.964	0.579	-0.1	15.1	3.8
	2nd derivative with segment of 10 nm	4	0.95	0.73	-2.60E-06	0.965	0.576	-0.23	15.2	3.8
	2nd derivative with segment of 20 nm	4	0.936	0.83	-2.60E-06	0.965	0.603	-0.2	14.5	3.6
	MSC	2	0.936	0.83	-2.48E-06	0.963	0.594	-0.19	14.7	3.7
	SNV	2	0.936	0.83	-2.60E-06	0.963	0.596	-0.19	14.7	3.7

Results of PLS regression of honey (ต่อ)

ชนิด	Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction				
			r	SEC	Bias	r	SEP	Bias	RPD	RER
ความชื้น	raw	3	0.933	0.78	-5.16E-07	0.975	0.51	0.12	18	4.5
	1st derivative with segment of 10 nm	3	0.938	0.75	-4.14E-07	0.977	0.49	0.13	18.8	4.7
	1st derivative with segment of 20 nm	3	0.939	0.74	-4.53E-07	0.977	0.49	0.13	18.8	4.7
	2nd derivative with segment of 10 nm	5	0.964	0.576	-3.67E-07	0.954	0.69	0.14	13.3	3.3
	2nd derivative with segment of 20 nm	5	0.945	0.71	-5.71E-07	0.973	0.53	0.13	17.4	4.3
	MSC	2	0.933	0.78	-5.47E-07	0.979	0.47	0.11	19.6	4.9
	SNV	2	0.933	0.78	-2.81E-07	0.979	0.47	0.11	19.6	4.9

ภาคผนวก ฉ

มาตรฐาน AOAC ในการวัดความชื้นและปริมาณน้ำตาลของน้ำผึ้ง

44.4.04

AOAC Official Method 969.38
Moisture in Honey
 First Action 1969
 Final Action

A. Direct Drying

Proceed as in 925.45C or D (see 44.1.03) using test portion weighed to yield ca 1 g solids. Add, if necessary, few mL H₂O to incorporate test portion thoroughly with the sand. Dry at <70°C (preferably 60°C) under pressure ≤50 mm Hg (6.7 kPa).

B. By Means of Refractometer

Determine refractometer reading of honey at 20°C and obtain corresponding percent moisture from Table 969.38. If determination is made at temperature other than 20°C, correct reading to standard temperature of 20°C according to footnote.

Reference: JAOAC 52, 729(1969).

44.4.13

AOAC Official Method 977.20
Separation of Sugars in Honey
 Liquid Chromatographic Method
 First Action 1977
 Final Action

A. Apparatus

(a) *Liquid Chromatograph*.—Equipped with isocratic solvent delivery system, manual injector, refractive index detector, and recording/computing integrator.

(b) *Column*.—300 × 4 (id) mm μ-Bondapak/Carbohydrate (Waters Associates, No. 84038).

(c) *Test solution clarification kit*.—Available in kit form from chromatography suppliers; 0.45 μm filters stable in organic solvents are suitable.

(d) *Syringes*.—10 μL (No. 701-N) point style No. 1, 2 × 0.020 in. od, 25 gauge needle (Hamilton Co.).

B. Reagents

(a) *Mobile phase*.—LC grade acetonitrile diluted with H₂O (83 + 17). Degas mobile phase daily by magnetic stirring 15 min under vacuum.

(b) *Sugar standard solution*.—Place 3.804 g fructose (Mallinckrodt Chemical Works), 3.010 g glucose (Mallinckrodt Chemical Works), and 0.602 g sucrose into 100 mL volumetric flask, dissolve in 50 mL H₂O, and add CH₃CN to volume. Composition of standard approximates 5 g honey dissolved in 50 mL aqueous CH₃CN (1 + 1).

C. Operating Conditions

Fructose, glucose, and sucrose are baseline separated and quantitated in 20 min under following conditions: flow rate, 1.0 mL/min (3.45 MPa; ca 500 psi); temperature, ambient (ca 23°C); detector set so that 380 μg fructose gives full-scale peak. Mono-, di-, and trisaccharides are eluted from column in order of MW.

D. Preparation of Test Solution

Weigh 5.000 g test portion in small beaker and transfer to 50 mL volumetric flask with 25 mL H₂O. Immediately dilute to volume with CH₃CN and filter through 0.45 μm filter, using clarification kit.

E. Chromatography

Inject 10 μL standard solution into chromatograph. Establish retention times, measure peak heights, and check reproducibility. Repeat for test solution. Calculate glucose, fructose, and sucrose from integrator values or from peak heights as follows:

$$\text{Weight percent sugar} = 100 \times (PH/PH') \times (V/V') \times (W/W')$$

where *PH* and *PH'* = peak heights (or integrator values) of test solution and standard, respectively; *V* and *V'* = mL test and standard (50 and 100) solutions, respectively; and *W* and *W'* = g test portion (5.000) and standard, respectively.

References: JAOAC 60, 838(1977); 62, 515(1979).

CAS-57-48-7 (fructose)

CAS-50-99-7 (glucose)

CAS-57-50-1 (sucrose)

ภาคผนวก ข

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

P. Sirisomboon, and S .Howvimanporn , “**Determination of soluble solids of honey by near infrared spectroscopy**” The 10th Annual conference of Thai society of agricultural engineering. International conference on innovation in agricultural, food and renewable energy productions for Mankind. 1-3 April 2009. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

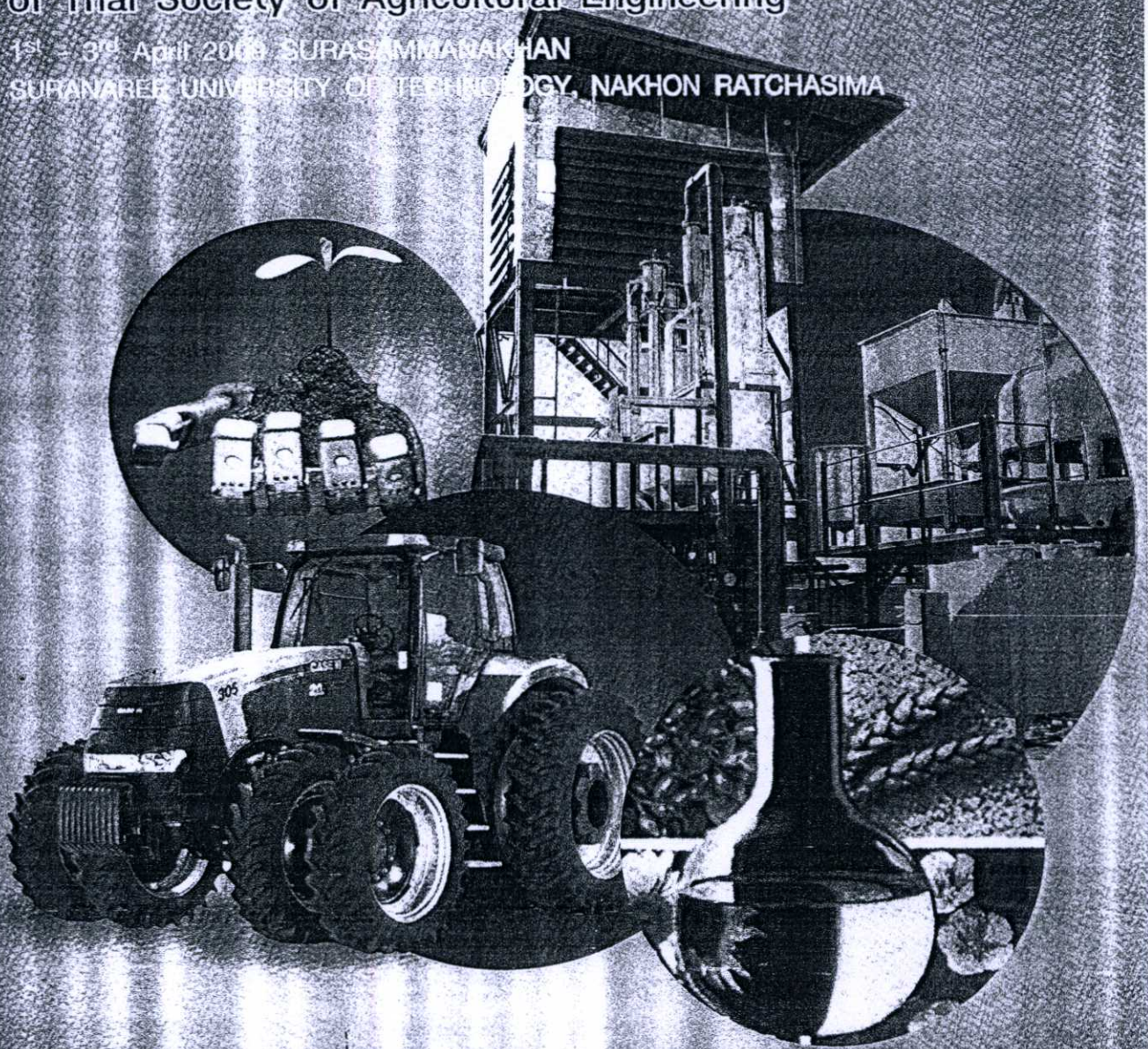


The 10th Annual Conference

of Thai Society of Agricultural Engineering

1st - 3rd April 2009 SURASAMMAKHAH

SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, NAKHON RATCHASIMA



INNOVATIONS

in Agricultural, Food and Renewable Energy
Productions for Mankind

Determination of Soluble Solids of Honey by Near Infrared Spectroscopy

Panmanas SIRISOMBOON¹, Suppakit HOWVIMONPORN^{*2}

Abstract

The objective of this research was to determine the soluble solids of honey by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). The honey samples from different sources were subjected to NIR transmittance to obtain the absorbance spectra (1100-2500 nm). NIR models were developed based on partial least square (PLS) using raw spectra, and pre-processing spectra including first derivative, second derivative, multiplicative scatter correction (MSC), standard normal variance (SNV), and normalization (mean, maximum, and range mean). The result showed that among the different types of spectra of honey, the second derivative spectra had the highest correlation coefficient between predicting and reference values ($r=0.89$), and the lowest standard error of prediction (SEP) of 0.93 % with bias of 0.065 %.

[Keywords] Near Infrared Spectroscopy (NIRS), Honey, partial least square regression (PLS)

I Introduction

Honey is a natural biological product of complex and variable composition. Within the European Union, it is defined (Council Directive, 2001, cited by Downey *et al.*, 2003) by council Directive 2001/110/EC as "the natural sweet substance produced by *Apis mellifera* bees from the nectar of plants or from secretions of living parts of plants or excretions of plant-sucking insects on the living parts of plants, which the bees collect, transform by combining with specific substances of their own, deposit, dehydrate, store and leave in honeycombs to ripen and mature." Fructose and glucose together account for 85-95% of honey carbohydrates (Crane, 1976 cited by Garcia-Alvarez *et al.*, 2000). The amount of water in honey is of major importance to its stability against fermentation and granulation (White, 1978). The refractometer reading of honey can indicate the percent of moisture in honey (AOAC Official Method 969.38, 2000). Therefore the soluble solids in honey also related to fermentation and granulation of honey. In the reviewed literature some articles were found that described honey analysis by NIR spectroscopy (Cho and Hong, 1998; Ha *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1999; Garcia-Alvarez *et al.*, 2000; Anthony *et al.*, 2002; Dvash, *et al.*, 2002; Downey, Fouratier and Kelly, 2003; Gerard *et al.*, 2003; Corbella and Cozzolino, 2005;). However, there was no article reported on soluble solids of honey. Therefore, the aim of our work was to determine the soluble solids of honey by Near Infrared Spectroscopy (NIRS).

II Materials and methods

The 90 honey samples were obtained from different sources in Thailand

Reference analysis

Soluble solids of honey samples were analyzed by handheld refractometer (Atago PLA-2, Japan). Each sample was measured for 2 replicates.

NIR spectroscopy

A NIR wavelength scanning instrument (BRAN+LUEBBE InfraAlyzer 500, Germany) were used to scan the samples of honey in a 0.3 mm pathlength transmittance cell with a scanning range from 1100-2500 nm and wavelength increments of 2 nm. The scanning was conducted simultaneously with reference analysis at room temperature (about 27 °C). Data were recorded as $\log(1/R)$ where R is the transmittance energy. Data processing and development of appropriate chemometric method were carried out with the analysis program Unscrambler 9.8 software (Camo ASA, Oslo, Norway). A preliminary examination of the spectra datasets for unusual or outlying samples was performed by principal component analysis (PCA). NIR models were developed based on partial least square regression (PLS) using raw spectra, and pretreatment spectra by used first and second derivatives of the Savitzky Goley method with two different derivative segment, 10 and 20 nm, with polynomial order of 2, multiplicative

* Corresponding author, Tel.: 0-859483086; E-mail address: suppa.m. @hotmail.com

¹ Associate Professor Department of Agricultural Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkabang, Bangkok, 10520, Thailand

² Department of Agricultural Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkabang, Bangkok, 10520, Thailand

scatter correction (MSC), standard normal variance (SNV) and normalization (mean, maximum, and range mean). The calibration accuracy is described by correlation coefficient (r) (equation 1), standard error of prediction (SEP) (equation 2) and bias (equation 3) (Williams, 2007).

$$r = \frac{\sum XY - [(\sum X \sum Y) / N]}{\left\{ \left[\sum X^2 - \left[(\sum X)^2 / N \right] \right] \left[\sum Y^2 - \left[(\sum Y)^2 / N \right] \right] \right\}^{1/2}} \quad (1)$$

$$SEP = \left\{ \sum (X - Y)^2 - \left[\sum (X - Y) \right]^2 / N - 1 \right\}^{1/2} \quad (2)$$

$$bias = \frac{\sum (X - Y)}{N} \quad (3)$$

III Results and Discussion

Fig 1 (a) shows the average raw spectrum of honey different source. Due to their high water content, the NIR spectra of the honey were influenced by the two broad water bands at 1450 nm (stretch of the O-H bond first overtone, De Belie et al., 2003) and 1940 nm (stretch of the O-H bonds and O-H deformation, De Belie et al., 2003). Absorption bands around 2100 nm assigned to combination of O-H deformation band and C-O stretch band, at 2280 nm the combination of C-H stretch and deformation band (Osborne et al., 1993 cited by Garcia-Alvarez et al., 2000), and at 2330 nm which are mainly associated with glucose (Osborne and Fearn, 1986) in honey.

Fig 1 (b) shows the average second derivative spectrum by Savitzky Golay method at 20 nm derivative segment with polynomial order of 2 of honey. The all peaks appeared in average raw spectrum appeared again in the second derivative spectrum except 2480 nm where there is no band assignment in any literature.

Table 1 shows the statistic values of honey soluble solids of calibration and prediction sets. Table 2 shows the results of PLS regression for each pretreatment of spectra. All of the calibration models had correlation coefficient of 0.97 with standard error of calibration (SEC) of 0.51-0.54. The most accurate model for prediction was second derivative pretreatment spectra. The second derivative model had the highest value of correlation coefficient between predicting values and reference values ($r=0.89$) with the standard error of prediction (SEP) of 0.93 % and bias of 0.065%.

IV Conclusions

The near infrared spectroscopy (NIRS) can be used to predict the soluble solids of honey. The r of 0.81-0.90 is appropriate for screening and some other "approximate"

calibrations (Williams, 2007). Therefore, the described NIR spectroscopy technique has potential to replace the existing quality control standard methods which are mostly very time consuming.

References

- AOAC, (2000). AOAC Official Method 969.38, moisture in honey. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edition. AOAC International, USA.
- Cho, H.J.; Hong, S.H., (1998). Acacia honey quality measurement by near-infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 6, A329-A331.
- Corbella, E., and Cozzolino, D. (2005). The use of visible and near infrared spectroscopy to classify the floral origin of honey samples produced in Uruguay. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 13, (63-68).
- Council Directive 2001/110/EC. (20 December 2001) O.J. L10/47.
- Crane, E., (1976) Honey: A comprehensive Survey; Heinemann: London, UK.
- Davies A.M.C., 2002. A preliminary study on the characterization of honey by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 10, 121-13.5
- De Belie, N., Pedersen, D. K., Martens, M., Bro, R., Munck, L., De Baerdemaeker, J., (2003). The use of visible and near-infrared reflectance measurements to assess sensory changes in carrot texture and sweetness during heat treatment. *Biosystems Engineering*, 85(2), 213-225.
- Downey, G., Fourtier, V., and Kelly, J.D., (2003). Detection of honey adulteration by addition of fructose and glucose using near infrared transmittance spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 11, 447-456.
- Dvash, L., Afik O.; Shafir S.; Schaffer A., Yeselson Dag A.Y., Landau S., (2002). Determination by Near-Infrared Spectroscopy of perseitol used as a marker for the botanical origin of avocado (*persea americana* Mill.) honey. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5283-5287.
- Garcia-Alvarez, M., Huidobro J.F., Hermida M., Rodriguez-Otero J.L., (2000). Major componenes of honey analysis by near-infrared transmittance spectroscopy. *Agric. Food Chem.*, 48, 5154-5158.
- Ha, J., Koo, M., Ok, H., (1998). Determination of the constituents of honey by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 6, A367-A369.
- Osborne. B.G, Fearn, T., (1986). Near infrared spectroscopy in food analysis., longman scientific & technical: Harlow, UK., p 133
- Osborne. B.G, Fearn, T., Hindle, P.H., (1993). Practical near infrared spectroscopy with application in food beverage analysis., longman scientific & technical. harlow, UK., p 28-33.
- Qiu, P.Y.; Ding H.B.; Tang Y.K.; Xu, R.J., (1999). Determination of

The 10th Annual Conference of Thai Society of Agricultural Engineering

“International Conference on Innovations in Agricultural, Food and Renewable Energy Productions for Mankind”, 2009.

chemical composition of commercial honey by near infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2760-2765.

White, J.W., Honey, Jr., (1978). In *Advances in Food Research*; Chichester, C.O., Mrak, E. M., Stewart, G. F., Eds.; Academic Press; New York.; Vol 24, p 298.

Williams, P. (2007). *Near-infrared Technology – Getting the best out of light*. Edition 5.0. A short course in the practical implementation of near-infrared spectroscopy for the user. PDK Grain, Nanaimo, Canada.

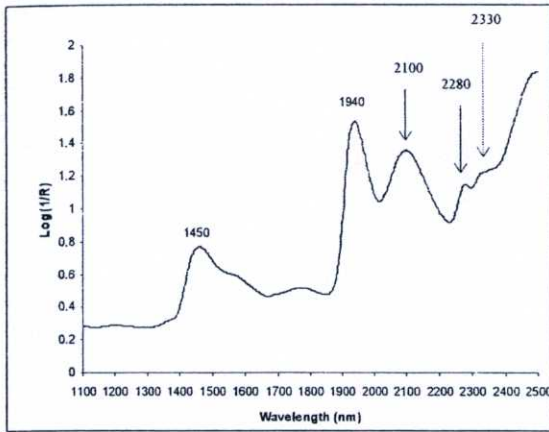


Fig. 1(a) Average raw spectra of Honey

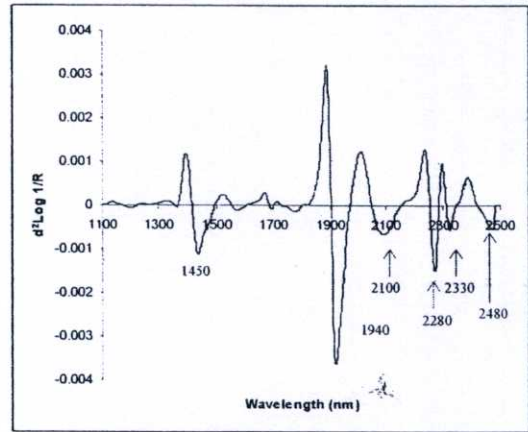


Fig. 1(b) Average second derivative raw spectra of Honey

Table 1

Statistic values of honey component of calibration and prediction sets

Parameters	Calibration set				Prediction set			
	n	range	mean	SD	n	range	mean	SD
honey	125	78.6-82.3	78.6	2.2	48	78.6-81.5	74	2

Table 2

Results of PLS regression of honey

Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction		
		r	SEC	Bias	r	SEP	Bias
raw	3	0.97	0.52	-9.7665e-07	0.88	0.97	0.096
1 st derivative with segment of 10 nm	2	0.97	0.54	-1.038e-06	0.87	0.99	0.1
1 st derivative with segment of 20 nm	2	0.97	0.52	-9.155e-07	0.87	1.07	0.35
2 nd derivative with segment of 10 nm	3	0.97	0.55	-1.038e-06	0.84	1.1	0.07
2nd derivative with segment of 20 nm	4	0.97	0.51	-7.324e-07	0.89	0.93	0.065
MSC	2	0.97	0.55	-1.038e-06	0.88	0.98	0.106
SNV	3	0.97	0.54	-9.766e-07	0.87	0.98	0.106
Mean Normalization	3	0.97	0.51	-1.282e-06	0.89	0.95	0.1
Maximum Normalization	3	0.97	0.52	-1.038e-06	0.88	0.96	0.098
Range Mean Normalization	3	0.97	0.51	-1.221e-06	0.89	0.96	0.1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายศุภกิจ หอวิมานพร

วัน เดือน ปีเกิด 23 ธันวาคม 2523

ที่อยู่ 15 ซอยสวนสยาม 3 แยก 5 แขวงคันนายาว เขตคันนายาว กรุงเทพฯ 10230
โทรศัพท์ 029179447

ประวัติการศึกษา 2542 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียม
อุดมศึกษาน้อมเกล้า
2546 ระดับปริญญาตรี วศ.บ. (วิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูป)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ประสบการณ์ทำงานและงานวิจัย วิศวกร โรงงานผลิตพัฒนอุตสาหกรรม ตำแหน่ง Technical support and
service engineer (บริษัทอาทิตย์จักรกล จำกัด)