

การปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างและการสแกนคลื่นเนียร์อินฟราเรด
เพื่อการวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสด

IMPROVEMENT OF SAMPLE PREPARATIONS
AND NEAR INFRARED SCANNING METHODS
FOR MEASURING HISTAMINE CONTENT IN FRESH SARDINE

กิงดาว ชนะโชติ

KINGDOKW CHANACHOT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-EN-M-100-166

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างและการสแกนคลื่นเนียร์อินฟราเรด
เพื่อการวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสด

IMPROVEMENT OF SAMPLE PREPARATIONS
AND NEAR INFRARED SCANNING METHODS
FOR MEASURING HISTAMINE CONTENT IN FRESH SARDINE



T139417

กิงดาว ชนะโชติ
KINGDOW CHANACHOT

เลขทะเบียน... 139417
วันเดือนปี... 3 พ.ย. 2558

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร
คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558

KMITL-2015-EN-M-100-166

IMPROVEMENT OF SAMPLE PREPARATIONS
AND NEAR INFRARED SCANNING METHODS
FOR MEASURING HISTAMINE CONTENT IN FRESH SARDINE

KINGDOW CHANACHOT

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

2015

KMITL-2015-EN-M-100-166

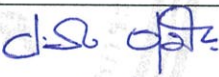



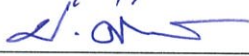
COPYRIGHT 2015

FACULTY OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างและการสแกนคลื่นเนียร์อินฟราเรด
เพื่อการวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสด
Thesis Title Improvement of Sample Preparations and Near Infrared Scanning
Methods for Measuring Histamine Content in Fresh Sardine
นักศึกษา นางสาวกิ่งดาว ชนะโชติ
รหัสประจำตัว 56601348
ปริญญา วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา วิศวกรรมเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์
หมายเลขวิทยานิพนธ์ KMITL-2015-EN-M-100-166

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ประสันต์	ชุ่มใจหาญ	
ดร.จิราพร	ศรียกัญญาภรณ์ จงยิ่งเจริญ	
รศ.ดร.อนุพันธ์	เทอดวงศ์วรกุล	
ดร.วสุ	อุดมเพทายกุล	
รศ.ดร.ปานมนัส	ศิริสมบูรณ์	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ วันพฤหัสบดีที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 เวลา 13.00-15.00 น.
สถานที่สอบ ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติใหม่ ห้อง HM-301

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิศวกรรมศาสตร์ รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร. คมสัน มาลีสี)

ณ บดี คณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างและการสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรดเพื่อการวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ตินสด
นักศึกษา	นางสาวกิงดาว ชนะโชติ
รหัสประจำตัว	56601348
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเกษตร
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ปานมนัส ศิริสมบุญ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาผลของการปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างและการตรวจวัดด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เพื่อพัฒนาสมรรถนะของแบบจำลองในการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ตินสดก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตปลาซาร์ตินกระป๋อง โดยทดลองเดิมใช้เครื่อง FT-NIR spectrometer ในแบบสะท้อนแบบแพร่เปลี่ยนเป็นเครื่อง FT-NIR spectrometer โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง แทนการวัดแบบสะท้อนแบบแพร่ ส่วนเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer และเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer ปรับปรุงเงื่อนไขในการสแกนโดยปรับการตั้งค่า Integrating time ใหม่ให้เหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิด (ปลาเต็มตัว ชิ้นเนื้อปลาและเนื้อปลาบด) มีการเพิ่มช่วงปริมาณฮิสตามีนจากเดิม 0.250-8.020 ppm เป็น -1.050 –188.190 ppm สร้างแบบจำลองโดยวิธี Partial least squares regression พบว่า แบบจำลองที่ได้มาจากการจัดการสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างปลาเต็มตัวด้วยวิธี Vector normalization ด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer ในช่วงคลื่น 12500-3600 cm^{-1} ซึ่งตัดเอาช่วงเลขคลื่น 9404-7499 และ 5454-4599 cm^{-1} มาใช้ในการสร้างแบบจำลองสามารถให้การทำนายได้ดีกว่าเครื่องอื่น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณา (R^2) ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการทำนาย (SEP) และค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (Bias) คือ 0.696, 16.100 ppm และ 5.950 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 7 ส่วนแบบจำลองได้มาจากการจัดการสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างปลาเต็มตัวด้วยวิธี De-trending ด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm ได้ผลการทำนายรองลงมา ซึ่งตัดเอาสเปกตรัมช่วงความยาวคลื่น 1255-2060 nm มาสร้างแบบจำลอง โดยมีค่า R^2 ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง SEP และ Bias คือ 0.515, 27.485 ppm และ -8.231 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 8 และ แบบจำลองได้มาจากการจัดการสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาด้วยวิธี Range Normalization ด้วย Short wavelength diode array spectrometer ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm ใช้ช่วงความยาว

คลื่น 608-1069 nm ในการสร้างแบบจำลองให้ค่า R^2 ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง, SEP และ Bias คือ 0.500, 25.956 ppm และ -1.166 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 10

เมื่อเปรียบเทียบสมรรถนะกับแบบจำลองเดิม การใช้ FT-NIR spectrometer แบบใช้หัววัดใยแก้วนำแสงและ Short wavelength diode array spectrometer ที่ปรับตั้งค่าการสแกนใหม่ สามารถปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้นได้ ส่วน Long wavelength diode array spectrometer ที่ปรับตั้งค่าการสแกนใหม่ ไม่สามารถปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม ค่า R^2 ระหว่าง 0.66-0.81 นั้น แสดงว่าสามารถนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ไปใช้สำหรับการแบ่งกลุ่มและประมาณค่าอย่างหยาบๆ ได้ แต่ยังไม่สามารถนำไปใช้ระบุค่าอย่างละเอียดได้ อย่างไรก็ตามหากโรงงานเพียงต้องการทราบค่าอย่างประมาณก็สามารถทำได้โดยวัดที่ปลาทั้งตัวโดยใช้ FT-NIR spectrometer โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง

Thesis	Improvement of sample preparations and near infrared scanning methods for measuring histamine content in fresh sardine
Student	Miss Kingdow Chanachot
Student ID	56601348
Degree	Master of Engineering
Program	Agricultural Engineering
Year	2015
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Panmanas Sirisomboon

ABSTRACT

The objective of this research was to study on the improvement of sample preparations in fresh sardine before entering into canning factory and of near infrared scanning methods on the performance of prediction models for histamine evaluation. In the old experiment, the FT-NIR spectrometer in diffuse reflectance mode was used while in improved experiment, the FT-NIR spectrometer using optic fiber probe in interactance mode was used. For long wavelength diode array spectrometer and short wavelength diode array, the scanning method was changed by setting new integrating time to suit the different types of sample (intact fish, fillet and minced meat). The histamine range in fish was adjusted from 0.250-8.020 ppm to -1.050 - 188.190 ppm.

The model were developed by partial least squares (PLS) regression. The model obtained by using vector normalization pretreated spectra of intact fish scanned by FT-NIR spectrometer in the wavenumber range $12500-3600\text{ cm}^{-1}$ where the $9404-7499$ and $5454-4599\text{ cm}^{-1}$ were used for model development provided the best prediction in which coefficient of determination (R^2) of prediction, standard error of prediction (SEP) and bias of 0.696, 16.100 ppm and 5.950 ppm, respectively, were obtained with 7 PLS factors. The model developed by using de-trending pretreated spectra of intact fish scanned by long wavelength diode array spectrometer in the wavelength range of 1150-2150 nm where the 1255-2060 nm was used for model development, provided R^2 of prediction, SEP and bias of 0.515, 27.485 ppm and -8.231 ppm, respectively with 8 PLS factors. The model developed by using range

normalization pretreated spectra of fillet scanned by short wavelength diode array spectrometer in the wavelength range of 600-1100 where the range of 608-1069 nm was used for model development, provided R^2 of prediction, SEP and bias of 0.500, 25.956 ppm and -1.166 ppm, respectively with 10 PLS factors.

When compared with the old models, the model obtained by using FT-NIR spectrometer with optic fiber probe and short wavelength diode array spectrometer with new scanning setting could improve the prediction performance. The long wavelength diode array spectrometer with new setting could not. However, R^2 is between 0.66-0.81 indicated that the near infrared spectroscopy developed in this research could be used for screening and rough estimation. The FT-NIR spectrometer combined with fiber optic probe could be used in the factory, if the rough estimation of histamine in sardine was acceptable.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงงานฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่นโปรดักส์ จำกัด (มหาชน) ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างปลา สถานที่ในการเก็บข้อมูลและเครื่องมือในการวัดอิสตามีน

ศูนย์วิจัยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สำหรับผลิตผลทางการเกษตรและอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รศ.ดร. ปานมนัส ศิริสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาด้านวิชาการและการจัดทำโครงงาน รวมทั้งอาจารย์หลักสูตรวิศวกรรมเกษตร สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ พร้อมทั้งให้ความรู้แก่คณะผู้วิจัยโครงงานนี้จนสำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้การสนับสนุนการทำงาน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา กระทั่งการศึกษาค้นคว้าโครงงานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และมีความซาบซึ้งในความกรุณาอันดียิ่งจากทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา และขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัว ทั้งคุณยาย คุณแม่ คุณป้า และพี่น้องทุกคน ที่อยู่เบื้องหลังในความสำเร็จที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา

กิงดาว ชนะโชติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I-II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III-IV
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI-IX
สารบัญตาราง.....	X-XI
สารบัญภาพ.....	XII-XV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1-2
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา.....	3
1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
1.7 ขั้นตอนการศึกษา.....	6
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 อุตสาหกรรมปลาชาร์ทินกระป๋อง.....	7
2.1.1 ประวัติความเป็นมาของปลาชาร์ทินกระป๋อง.....	7
2.1.2 กระบวนการผลิตปลาชาร์ทินกระป๋อง.....	7-9
2.1.3 ผลกระทบทางเศรษฐกิจ.....	9
2.1.3.1 มูลค่าการผลิต.....	9-10
2.1.3.2 มูลค่าการส่งออก-นำเข้ารายปี.....	10
2.2 การตรวจวัดปริมาณฮิสตามีน.....	11-20
2.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับ NIRS.....	20
2.3.1 หลักการพื้นฐานของ NIR.....	20-22
2.3.2 หลักการของสเปกโทรสโกปีการสั่น (Vibrational) ขอลโมเลกุล.....	22-24
2.3.3 ส่วนประกอบหลักของเครื่องสเปกโตรมิเตอร์.....	25-26
2.3.3.1 FT-NIR spectrometer (Matrix).....	26-29
2.3.3.2 Long wavelength diode array spectrometer.....	30-31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.3.3 Short wavelength diode array spectrometer.....	31-32
2.3.4 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์โดยวิธีทางคณิตศาสตร์.....	32
2.3.4.1 ไม่มีการจัดการข้อมูลเบื้องต้น.....	32
2.3.4.2 ลบโดยค่าคงที่ (Subtraction of Constant Offset).....	32-33
2.3.4.3 การลบโดยเส้นตรง (Subtraction of a Straight Line).....	33
2.3.4.4 Smoothing.....	33
2.3.4.5 Vector Normalization.....	34
2.3.4.6 Multiple Scatter Correction (MSC)	34
2.3.4.7 Standard Normal Variate (SNV).....	34-35
2.3.4.8 Derivative.....	35
2.3.4.9 Normalization.....	36
2.3.4.10 Baseline offset.....	37
2.3.5 การเลือกจำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสม.....	37
2.3.5.1 การสร้างสมการโดยวิธี partial least square regression (PLS-Regression).....	38-42
2.3.6 สัมประสิทธิ์ที่ใช้ในการประเมินความแม่นยำ และความถูกต้องของแบบจำลองการทำนาย.....	42
2.3.6.1 ค่าเฉลี่ย (Mean).....	42
2.3.6.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD).....	42
2.3.6.3 ค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (Bias).....	42-43
2.3.6.4 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Coefficient of correlation, R).....	43
2.3.6.5 สัมประสิทธิ์การพิจารณา (Coefficient of correlation, R^2).....	43-44
2.3.6.6 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของแบบจำลอง (Standard error of calibration, SEC).....	44
2.3.6.7 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (Standard error of prediction, SEP).....	44-45
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	45-48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	49
3.1 การปรับวิธีการสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด.....	49-57
3.2 วิธีการปรับปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดิน.....	57-59
3.3 ตัวอย่างปลาที่ใช้ในการทดลอง1สำหรับสร้างแบบจำลอง.....	60
3.4 การสแกนปลาซาร์ดินด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด.....	60
3.5 วิธีการวิเคราะห์ฮิสตามีนโดยวิธีมาตรฐาน.....	61-62
3.6 การสร้างแบบจำลองและการพิสูจน์แบบจำลอง.....	63
3.6.1 การวิเคราะห์ค่าผิดปกติ (Outlier).....	63
3.6.2 การสร้างสมการในการทำนาย.....	63-64
3.7 วิธีการวิเคราะห์สมรรถนะของแบบจำลอง.....	64-65
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	66
4.1 ผลการปรับการสแกนด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด.....	66
4.1.1 FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany).....	66
4.1.2 Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	67
4.1.3 Short wavelength diode array spectrometer (Fantec, Japan).....	67-69
4.2 ผลการศึกษาวิธีการปรับปริมาณฮิสตามีน.....	70
4.2.1 ผลการวิเคราะห์การขยายช่วงฮิสตามีนให้สูงขึ้น.....	70
4.2.2 ผลการปรับระดับปริมาณฮิสตามีน.....	71-73
4.3 สเปกตรัมของปลาซาร์ดิน.....	74-77
4.4 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสอง.....	78-82
4.5 สมรรถนะของแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ปรับปรุงแล้ว.....	83
4.5.1 ผลการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนของเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany).....	83-89

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.2 ผลการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนของเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	90-97
4.5.3 ผลการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนของเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan).....	97-103
4.6 การเปรียบเทียบสมรรถนะแบบจำลองเดิมกับแบบจำลอง ที่ได้จากวิธีการปรับปรุงแล้ว.....	104-107
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	108
5.1 ผลการเปรียบเทียบสมรรถนะแบบจำลองเดิมกับแบบจำลองที่ปรับปรุง.....	108-109
5.2 ผลจาก Regression coefficient plot และ x-loading weight.....	109
5.2.1 ผลจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix).....	109
5.2.2 ผลจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer.....	109
5.2.3 ผลจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer.....	110
เอกสารอ้างอิง.....	111-115
ภาคผนวก.....	116
ภาคผนวก ข.....	120-134
ประวัติผู้เขียน.....	134

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณผลผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋องในปี 2550-2557 (ตัน).....	10
2.2 ปริมาณการจำหน่ายปลาซาร์ดีนกระป๋องภายในประเทศ ในปี 2552- 2558 (ม.ค.- ก.พ.).....	11
2.3 การแบ่งช่วงของอินฟราเรด.....	21
2.4 ส่วนประกอบหลักของเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบต่างๆ.....	25
2.5 คุณลักษณะทางเทคนิคของ FT-NIR Spectrometer (Matrix, Bruker, Germany).....	29
2.6 Specification for Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	30-31
2.7 Specification for Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan).....	32
2.8 การแปลความหมายของค่า R และ R ²	44
3.1 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนด้วย เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบต่างๆ ในการทดลองเมื่อปี พ.ศ. 2555.....	55
3.2 ข้อมูลทางสถิติของค่าฮิสตามีนของปลาซาร์ดีน ในการทดลองเมื่อปี พ.ศ. 2555.....	59
4.1 การตั้งค่าปรับปรุ่เครื่องสเปกโตรมิเตอร์เพื่อสร้างแบบจำลองที่ดีที่สุด.....	69
4.2 ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาซาร์ดีนในงานวิจัยเมื่อปี พ.ศ. 2555.....	70
4.3 ผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิห้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีน.....	72
4.4 ผลของปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาซาร์ดีนในงานวิจัยที่มีการปรับปรุ่.....	74
4.5 แสดงผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิห้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณ ฮิสตามีนของงานวิจัยที่ปรับปรุ่.....	75
4.6 การดูดซับคลื่นในสเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างปลา ปรากฏพิคซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะใน โมเลกุลของตัวอย่างปลาซาร์ดีนที่สแกนด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้งสาม 3 ชนิด.....	79
4.7 พิคสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองในตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ทั้งสามชนิด ซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะในโมเลกุลของตัวอย่างปลาซาร์ดีน.....	81-82
4.8 ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีน (ppm) ที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่าง ปลาที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix).....	84
4.9 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดด้วย FT-NIR spectrometer (Matrix).....	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.10 พิกที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการนำค่านอกกลุ่มออก (Intact (outlier)) ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR Spectrometer.....	89
4.11 ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดินที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลา ที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (ppm).....	91
4.12 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาชาร์ดินในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดด้วย Long wavelength diode array spectrometer.....	92
4.13 พิกที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer.....	96-97
4.14 ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน (ppm) ที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่าง ปลาที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (ppm).....	98
4.15 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาชาร์ดินในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดด้วย เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer.....	99
4.16 พิกที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer.....	103
4.17 การเปรียบเทียบค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดินของการทดลองเดิมกับการ ทดลองที่มีการปรับปรุงแล้วสำหรับตัวอย่างปลาที่สแกนด้วย เครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด (ppm).....	108
4.18 การเปรียบเทียบแบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาชาร์ดินสำหรับ ตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด.....	109-110

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของฮิสตีตินและฮิสตามีน.....	4
1.2 แสดงแผนผังขั้นตอนของการศึกษาของงานวิจัย.....	6
2.1 Sir William Herschel ผู้ค้นพบช่วงรังสีอินฟราเรดย่านใกล้.....	21
2.2 ตำแหน่งรังสีสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดย่านใกล้ในแถบสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า.....	22
2.3 การกระทำของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ากับสารต่างๆ.....	22
2.4 การเกิด Overtone bands.....	23
2.5 หลักการโดยทั่วไป (ผ่าน Filter).....	26
2.6 หลักการโดยทั่วไป (ผ่าน Grating).....	26
2.7 Michelson Interferometer.....	28
2.8 Cube- Corner Interferometer.....	28
2.9 หัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes).....	29
2.10 NIR สเปกตรัมของมือคน; วัดแบบการสะท้อนแบบแพร่.....	33
2.11 ข้อมูลสเปกตรัมและความเข้มข้นในรูปแบบเมทริกซ์ ในตัวอย่างนี้มีตัวอย่างคาลิเบรชัน M ตัวอย่างที่วัดและ - ในขั้นตอนที่สอง - N ความยาวคลื่นทั้งหมดของผลสเปกตรัมจะถูกเขียนใน แถว (M, N) เมทริกซ์ เมทริกซ์นี้จะเทียบเท่ากับข้อมูลสเปกตรัมเมทริกซ์ X. ในทางเดียวกันค่า องค์ประกอบทั้งหมด L จะเขียนลงไปใน (M, L) เมทริกซ์ของข้อมูลความเข้มข้น.....	39
2.12 Schematic diagrame for the factorization of the spectral data matrix X.....	40
3.1 การสแกนตัวอย่างปลาด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์แบบต่างๆ.....	50
3.2 สเปกตรัมของฮิสตามีนบริสุทธิ์ในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) $12500 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spaectrometer (MPA, Bruker, Germany).....	51
3.3 สเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และ เนื้อปลาบด (minced meat) ที่สแกนด้วย เครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany).....	52
3.4 สเปกตรัมเฉลี่ยของปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet), เนื้อปลาบด (minced meat) และ เนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว (minced meat with glass) ที่สแกนด้วย เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	52
3.5 สเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และ เนื้อปลาบด (minced meat) ที่สแกนด้วย เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan).....	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วย เครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact)...	56
3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วย เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) โดยสแกนตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (fillet).....	56
3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วย Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) โดยสแกนตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (fillet).....	57
3.9 ลักษณะตัวอย่างปลาที่ใช้ในการสแกน.....	60
3.10 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน.....	62
3.11 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	64
4.1 FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany).....	66
4.2 Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	67
4.3 Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan).....	67
4.4 วิธีการสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด.....	68
4.5 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้อง (สมการเส้นตรง).....	73
4.6 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้อง (สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล).....	73
4.8 สเปกตรัมของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และเนื้อปลาบด (minced meat) ที่ช่วงเลขคลื่น 11500-4500 cm^{-1} ที่สแกนด้วย เครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany).....	75
4.9 สเปกตรัมของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet), เนื้อปลาบด (minced meat) และเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว (minced meat with glass) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1200-2000 nm ที่สแกนด้วย เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.10 สเปกตรัมของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และเนื้อปลาบด (minced meat) ที่ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm ที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan).....	76
4.11 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany).....	79
4.12 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA).....	79
4.13 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan).....	80
4.14 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany) ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก (Intact (outlier)) ในชุดสร้างแบบจำลอง (Calibration set).....	86
4.15 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany) ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก (Intact (outlier)) ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set).....	87
4.16 Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีน ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก (Intact (outlier))	88
4.17 ค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีน.....	88
4.18 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ในชุดสร้างแบบจำลอง (Calibration set).....	93

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.19 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนาย โดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set).....	93
4.20 Regression coefficient plot ของสมการปริมาณฮิสตามีน ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact).....	95
4.21 ค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact).....	95
4.22 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนาย โดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ในชุดสร้างแบบจำลอง (Calibration set).....	100
4.23 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนาย โดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set).....	100
4.24 Regression coefficient plot ของสมการปริมาณฮิสตามีน ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet).....	101
4.25 ค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet).....	102

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมการทำปลาซาร์ดีนกระป๋องนับเป็นกิจการที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศไทย จากสถิติของกรมศุลกากร [1] รายงานว่า ประเทศไทยมีการส่งออกปลาและผลิตภัณฑ์ปลาซาร์ดีน ปลาซาร์ดีนเนลล่าและปลาบร็อลิ่งหรือปลาแปรตที่บรรจุภาชนะที่อากาศผ่านเข้าออกไม่ได้ซึ่งเป็นปลาทั้งตัวหรือเป็นชิ้นแต่ไม่บดจัดเป็นประเภทปลาที่ปรุงแต่งหรือทำไว้ไม่ให้เสียในปี 2557 เป็นปริมาณ 1,136,748,478 กก. คิดเป็นมูลค่า 120,246,675,551 บาท

ในโรงงานผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋อง ก่อนรับปลาเข้าสู่โรงงาน ต้องมีการตรวจรับปลาซาร์ดีน โดยการตรวจความสดของปลาด้วยการวัดปริมาณฮิสตามีน (histamine) เนื่องจากในเนื้อปลามีสารฮิสติดีน (histidine) ที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นต่อร่างกายและสารฮิสติดีนเป็นสารตั้งต้นของฮิสตามีน ซึ่งเกิดจากการเก็บรักษาปลาไว้นานที่อุณหภูมิสูงเกินไปทำให้แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮิสติดีน decarboxylase ซึ่งจะย่อยสลายกรดอะมิโนฮิสติดีน ให้กลายเป็นฮิสตามีน ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ ฉะนั้นระดับ histamine ในเนื้อปลาเป็นดัชนีหนึ่งในการบ่งบอกความสดของปลาและการวิเคราะห์ปริมาณ histamine ในเนื้อปลาจึงเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภค และอายุการเก็บรักษาเนื้อปลา การทดสอบฮิสตามีนจึงเป็นกลยุทธ์ในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยซึ่งสามารถใช้โดยผู้ประกอบการอาหารทะเล จากรายงานของ Köse et al. [2] กล่าวว่า ระดับการควบคุมปริมาณฮิสตามีนในปลาตระกูล scombrotoxic มีค่าประมาณ 10-200 ppm ระดับที่ผิดปกติของฮิสตามีนคือ สูงกว่า 50 ppm ซึ่งกำหนดในสหรัฐอเมริกา (Federal Register (1995) [3] อ้างโดย Köse et al. [2])

จากการวิจัยเบื้องต้นเมื่อปีพ.ศ. 2555 [4] การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Feasibility of evaluation of histamine in sardine by near infrared spectroscopy technique) งานวิจัยนี้จัดทำโดยความร่วมมือระหว่างศูนย์วิจัยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสำหรับผลผลิตทางการเกษตรและอาหารกับ บมจ. ไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่น โปรดักส์ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการวิเคราะห์ฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนที่ตัวปลาโดยตรง เป็นวิธีไม่ทำลายตัวอย่าง รวดเร็ว แม่นยำ เป็นที่ยอมรับได้ ช่วยประหยัดเวลาในการวิเคราะห์เพราะใช้เวลาเพียง 2-3 วินาที ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ไม่ต้องใช้สารเคมี และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ในการวิเคราะห์ทำให้ลดต้นทุนในการตรวจรับปลาซาร์ดีนเข้าสู่โรงงาน แต่การนำเทคโนโลยีนี้มาใช้จำเป็นต้องมีการสร้างแบบจำลองเพื่อใช้ในการทำนาย (Calibration model) ก่อนการนำไปใช้งานเพื่อเปรียบเทียบความ

แม่นยำกับวิธีอ้างอิงที่เป็นมาตรฐานของโรงงาน ซึ่งวิธีการที่ยอมรับในการนำเข้าและส่งออกในอุตสาหกรรมปลากระป๋องคือวิธีตามมาตรฐานของโรงงานซึ่งประยุกต์มาจากมาตรฐานสากล AOAC Official Method 977.13 และ AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood ด้วยเครื่อง Fluorometer (Quantech, USA) [5] วิธีนี้จะใช้สารเคมีเช่น Histamine dichloride, o-Phthaldialdehyde (OPT), Phosphoric acid และ Ion-exchange resin เป็นต้น การวัดปริมาณฮิสตามีนโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลาและขั้นตอนที่ซับซ้อนด้วยวิธีการที่มีราคาแพง ใช้สารเคมีจำนวนมาก ในการวิเคราะห์ทำให้ลดต้นทุนในการตรวจรับปลาซาร์ดีนเข้าสู่โรงงาน และจากการวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองในการทำนายความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับแสงกับปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีน จากการตรวจวัดสเปกตรัมด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้งสามเครื่องคือเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany), Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) และ Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) พบว่าแบบจำลองในการทำนายฮิสตามีนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น (wavelength) 1150-2150 nm สามารถให้การทำนายได้ดีกว่าเครื่องอื่น สำหรับลักษณะตัวอย่างเนื้อปลาสับ (Minced meat) ได้ผลดีที่สุด โดยแบบจำลองได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Smoothing (19 points) + Baseline offset โดยมีค่า R^2 , SEP และ Bias คือ 0.601, 0.990 และ -0.008 ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 14 อย่างไรก็ตามค่า R^2 ระหว่าง 0.50-0.64 นั้นสามารถนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดไปใช้สำหรับการแบ่งกลุ่มอย่างหยาบ (Rough screening) ยังไม่สามารถนำไปใช้ระบุค่าหรือในการควบคุมกระบวนการในโรงงานได้อย่างไรก็ตาม จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนโดยใช้เทคนิคนี้ แต่ต้องการปรับปรุงแบบจำลองและจากการวิเคราะห์ข้อมูลของปริมาณฮิสตามีนในปลาตระกูล *scombrotoxic* มีค่าประมาณ 10-200 ppm ซึ่งกำหนดในสหรัฐอเมริกา (Federal Register, 1995 [3] อ้างโดย Köse et al. [2])

ดังนั้นในการสร้างแบบจำลองจึงจำเป็นที่จะต้องมีส่วนช่วงปริมาณฮิสตามีนครอบคลุมช่วงปริมาณของ histamine ดังกล่าว การทำนายค่าฮิสตามีนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer พบว่าถ้าปริมาณฮิสตามีนมีค่าน้อยมากและทำนายได้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง สาเหตุอาจจะเป็นเพราะรูปแบบในการวัดอาจไม่เหมาะสมกับตัวอย่าง เพราะไม่สามารถสแกนสเปกตรัมได้ตลอดช่วงความยาวคลื่น จะเกิดการสะท้อนกลับของคลื่นมาก (Over absorption) ที่ช่วงความยาวคลื่นยาว (Long wavelength) จึงเปลี่ยนเป็นเครื่อง FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany) โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) แทนการวัดแบบ Diffuse Reflectance ซึ่งจะช่วยให้ช่วงฮิสตามีนให้สูงขึ้นและเป็นการแก้ปัญหาทำให้ทำนายได้ถูกต้องมากขึ้น และจากสเปกโตรมิเตอร์แบบ Long wavelength diode array spectrometer และ Short wavelength diode array spectrometer สามารถสแกนได้ตลอดช่วงความยาวคลื่น แต่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง

(Absorbance) มีค่าน้อย จึงต้องมีการปรับการตั้งค่า Integrating time ใหม่ รวมถึงการขยายช่วง ปริมาณฮิสตามีนให้สูงขึ้นด้วย จะสามารถแก้ปัญหา ทำให้ทำนายได้ถูกต้องมากขึ้น

ดังนั้นจึงเป็นแนวความคิดของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาและปรับปรุงแบบจำลองในการวิเคราะห์ ปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดินสดด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีก่อนเข้าสู่โรงงานผลิต ปลาซาร์ดินกระป๋อง โดยปรับปรุงวิธีการสแกน การตั้งค่าเครื่องสเปกโทรมิเตอร์และเพิ่มช่วงปริมาณ ฮิสตามีน

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของการปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างและการตรวจวัดด้วยเทคนิคเนียร์ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เพื่อพัฒนาสมรรถนะของแบบจำลองในการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลา ซาร์ดินสดก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตปลาซาร์ดินกระป๋อง

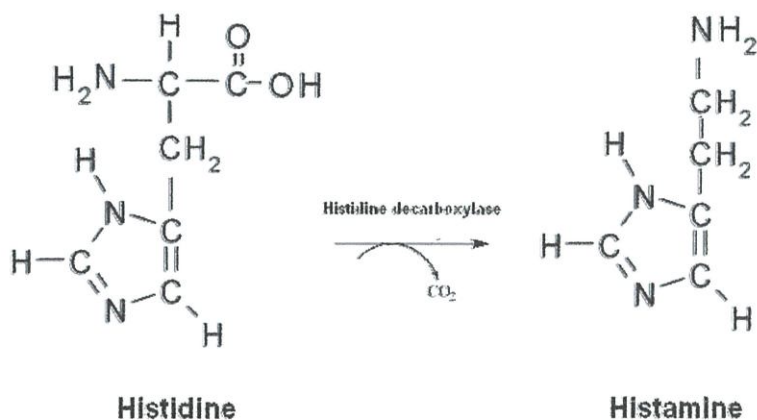
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

การปรับปรุงวิธีการสแกนด้วยการเปลี่ยนเป็นเครื่อง FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany) โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) แทนการวัดแบบ Diffuse Reflectance และการปรับการตั้งค่า Integrating time ใหม่ ในเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer และ Short wavelength diode array spectrometer นอกจากนี้ การเพิ่มช่วงปริมาณฮิสตามีนให้สูงขึ้น ในช่วงประมาณ 10-200 ppm จะทำให้ได้สเปกตรัมที่มีข้อมูล ของการดูดกลืนคลื่นที่เปลี่ยนแปลงตามปริมาณฮิสตามีนในช่วงที่มากขึ้น ซึ่งหมายถึงแบบจำลองที่มี การปรับปรุงจะสามารถทำนายได้แม่นยำและถูกต้องมากขึ้น

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในงานวิจัย

การสั่นสะเทือนของพันธะทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับฮิสตามีน Scombrototoxin เกิดจากแบคทีเรีย ที่สร้างเอนไซม์ histidine decarboxylase ซึ่งย่อยสลายกรดอะมิโน-ฮิสติดีน (histidine) ที่มีอยู่มาก ในโปรตีนเนื้อปลาให้เปลี่ยนเป็นฮิสตามีน (histamine) ซึ่งเป็นสารพิษและบ่งชี้การเน่าเสียของปลา [5] ซึ่งจะเห็นว่าโครงสร้างทางเคมีของฮิสตามีนประกอบด้วย พันธะ CH, NH, CH₂, C=C และ NH₂ (รูปที่ 1.1) ซึ่งคลื่นเนียร์อินฟราเรดมีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 700-2500 nm ซึ่งจะเกิดการดูดซับที่ ความถี่แบบ Overtone และ/หรือ Combination เช่น ที่ความยาวคลื่น 1140 nm เป็นการ สั่นสะเทือนแบบ 2×C-H str. + C-H def. ที่ความยาวคลื่น 1500 nm เป็นการสั่นสะเทือนแบบ

N-H str. First overtone ของโครงสร้าง NH ที่ความยาวคลื่น 746, 913, 1053, 1215, 1415, 1725 และ 2323 nm มีการสั่นสะเทือนของ CH₂ ที่ความยาวคลื่น 2347 nm เป็นการสั่นสะเทือนแบบ CH₂ sym. str. + =CH₂ def. ของโครงสร้าง HC=CH CH₂ และ 779, 1030, 1060 และ 1530 nm เป็นการสั่นสะเทือนของโครงสร้าง RNH₂ [7]



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของฮิสทีดีนและฮิสตามีน [6]

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการทดสอบตัวอย่างปลาซาร์ดีน *sardinella longiceps* เพื่อตรวจหาปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีน และปรับปรุงแบบจำลอง โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ในการตรวจหาปริมาณฮิสตามีนจะใช้คลื่นเนียร์อินฟราเรดด้วย spectrometer 3 ชนิด คือ FT- NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany) ช่วงเลขคลื่น (Wavenumber) 12500-3600 cm⁻¹ หรือช่วงความยาวคลื่น (Wavelength) 700-2500 nm และมีการปรับ gain (Gain adjustment) เพื่อปรับแสงที่เข้าสู่ดีเทคเตอร์ (Detector) ให้เหมาะสม ค่า Ref หมายถึง ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัมใดๆ ส่วน A B และ C preamp gain หมายถึง การขยายสัญญาณ (amplify) ขนาด x3, x30 และ x300 ตามลำดับ ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact) มีการตั้งค่า preamp gain ของตัวอย่างเป็น A และ preamp gain ของ background เป็น A ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) และ ในตัวอย่างเนื้อปลาบด (Mince meat) มีการตั้งค่า preamp gain ของตัวอย่าง เป็น C และ preamp gain ของ background เป็น A, Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm โดยมีการตั้งค่า Integrating time 1000 μs และ จำนวนตัวอย่างเพื่อหาค่าเฉลี่ย

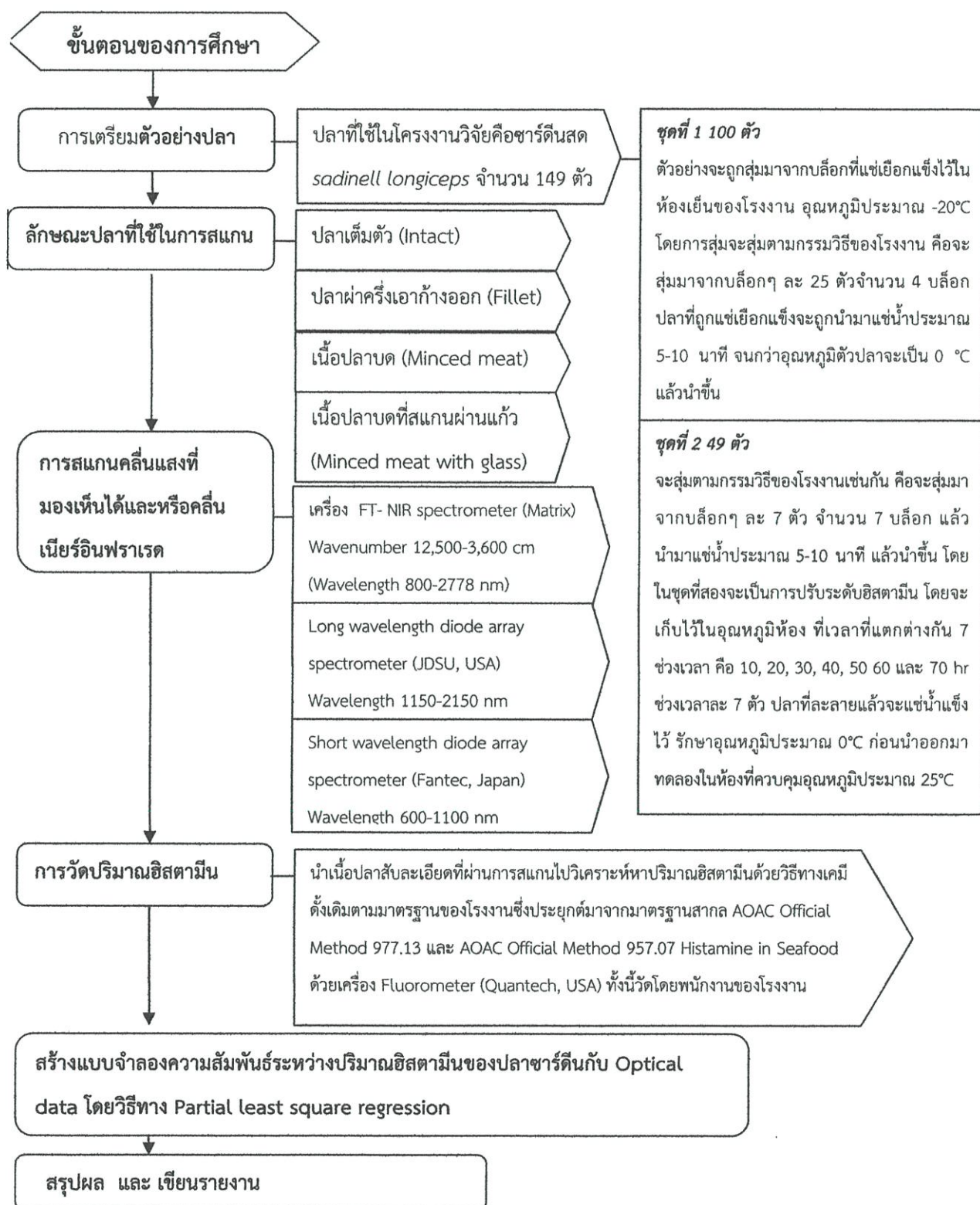
เท่ากับ 5000 ใช้ในตัวอย่างปลาทุกชนิด และ Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm โดยมีค่า Integrating time 150 ms ในตัวอย่างปลาเต็มตัวและเนื้อปลาสด และ integrating time 25 ms ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. การวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นวิธีการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางเคมีที่รวดเร็ว แม่นยำ ไม่ต้องใช้สารเคมี เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง จึงประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์
2. ผลจากกระบวนการวิจัยที่น่าเชื่อถือ จะเป็นแนวทางให้โรงงานผลิตปลาซาร์ดีนระบองพิจารณาวิธีทางเลือกในการตรวจวัดฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสดด้วยวิธีที่ทันสมัย
3. เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ในการประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเพื่อการตรวจวัดฮิสตามีนและความสดของปลาซาร์ดีน เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตปลากระป๋อง
4. สามารถพัฒนาการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ทางวิศวกรรมเกษตร ผ่านระบบการวิจัย และได้มหาบัณฑิตที่มีคุณภาพ

1.7 ขั้นตอนของการศึกษา

รูปที่ 1.2 แสดงแผนผังขั้นตอนของการศึกษาของงานวิจัย



รูปที่ 1.2 แผนผังขั้นตอนของการศึกษาของงานวิจัย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมปลาซาร์ดีนกระป๋อง

2.1.1 ประวัติความเป็นมาของปลาซาร์ดีนกระป๋อง [8]

การผลิตอาหารกระป๋องครั้งแรกนั้นเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1804 เมื่อ “จักรพรรดินโปเลียนที่ 1” ได้สั่งให้พ่อครัวที่ชื่อ “นิโคลาส ฟรองซัวร์ อับเปิร์ต” ไปคิดค้นวิธีการเก็บอาหารให้อยู่ได้นานๆ เพื่อใช้เป็นเสบียงอาหารให้แก่ทหารในช่วงสงคราม โดยในช่วงแรกนั้นอาหารจะถูกบรรจุลงในขวดและใช้จุกไม้ปิด ต่อมาในปี ค.ศ. 1810 นักประดิษฐ์ชาวอังกฤษที่ชื่อ “ปีเตอร์ ดูรันด์” ได้คิดและพัฒนากระป๋องโลหะที่สามารถนำอาหารมาบรรจุและผนึกปิดฝาได้ขึ้นมา ซึ่งเป็นรูปแบบกระป๋องที่นำมาใช้จนในปัจจุบัน [8] ในอุตสาหกรรมการผลิตปลากระป๋อง ปลาที่ใช้ในการทำปลากระป๋องคือ ปลาซาร์ดีน ซึ่งคำว่า “ซาร์ดีน” คือชื่อพันธุ์ปลาที่นำมาทำเป็นปลากระป๋อง เป็นการเรียกโดยรวมของปลาขนาดเล็กหลายชนิดในวงศ์ปลาหลังเขียวที่นำมาแปรรูปเป็นปลากระป๋อง โดยมีได้หมายถึงชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ คณะกรรมการ Codex Alimentarius Commission (เป็นความร่วมมือขององค์การอาหารและเกษตร (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) และ องค์การอนามัยโลก (World Health Organization ,WHO) ด้านความปลอดภัยของอาหารเพื่อคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค) ได้ตั้งมาตรฐานของปลาซาร์ดีน โดยมีการจัดตั้งคณะกรรมการเพื่อรับฟังความเห็นจากทุกประเทศว่าต้องการให้ปลาพันธุ์ใดที่จะใช้เป็นปลาซาร์ดีนได้ ตัวอย่างเช่น ในนอร์เวย์จะใช้ปลาสแปรตและเฮอรัริง อเมริกาใต้จะใช้ปลาแองโซวี ส่วนฝรั่งเศสและโปรตุเกสจะใช้ปลาฟิลเชิร์ด เป็นต้น ถ้าสังเกตฉลากข้างกระป๋องจะมีการระบุพันธุ์ปลาที่ใช้ทำปลาซาร์ดีนกระป๋องนั้น [9]ปลาซาร์ดีนเป็นปลาทะเลชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sardina pilchardus* อยู่ในวงศ์ปลาหลังเขียว (Clupeidae) จัดเป็นเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่อยู่ในสกุล *Sardina* ในเนื้อปลาซาร์ดีนให้คุณค่าทางอาหารมากกว่านมถึง 3 เท่า โดยเนื้อปลาจำนวน 100 กรัม ให้สารอาหารต่าง ๆ เช่น โอมEGA 3 ถึง 200 กรัม ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายมนุษย์ในแต่ละสัปดาห์ นอกจากนี้แล้วยังมี ฟอสฟอรัส, ทองแดง, แมกนีเซียม, เหล็ก, แมงกานีส, ไลโคปีน และวิตามินบี ด้วย [9]

2.1.2 กระบวนการผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋อง [10]

ปลากระป๋องเป็นอาหารสำเร็จรูปสามารถนำมาปรุงอาหารได้หลากหลาย และที่สำคัญสามารถเก็บไว้ได้นานทั้งนี้เนื่องจากการผลิตปลากระป๋องใช้หลักการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนสูงที่

สามารถทำลายและยังยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยอาหารกระป๋องเป็นการบรรจุอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทจึงมีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายอย่างยิ่ง คือ คลอสทริเดียม โบทูลินัม (*Clostridium botulinum*) เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และเจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน โดยทั่วไปพบเชื้อนี้ได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ ผัก เนื้อ นม ลำไส้ของปลา และสัตว์ทะเลอื่นๆ อาหารที่อยู่ในสภาพไม่มีออกซิเจนและผ่านความร้อนไม่เพียงพอ เชื้อนี้จะมีการเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สารพิษที่เชื้อมีสร้างขึ้นมีผลต่อการทำลายระบบประสาท โดยหากบริโภคอาหารที่มีสารพิษชนิดนี้จะทำให้เกิดอาการอาการ คือ กลืนลำบาก พูดไม่ชัด แขนขาอ่อนแรง คลื่นไส้อาเจียน เป็นอัมพาต หายใจขัด และอาจเสียชีวิตได้ในที่สุด อย่างไรก็ตาม เชื้อนี้จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ดังนั้นในการผลิตอาหารกระป๋อง นักวิทยาศาสตร์การอาหารจึงแบ่งกลุ่มอาหารที่บรรจุกระป๋องเป็น 2 กลุ่ม เพื่อกำหนดอุณหภูมิในการผลิตให้เหมาะสม ดังนี้คือ

1. กลุ่มอาหารที่เป็นกรด (Acid foods) คือ อาหารที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ส่วนมากเป็นพวกผลไม้ เช่น สับปะรด ส้ม หรือผักที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะเขือเทศ กระเจี๊ยบแดง เป็นต้น สามารถใช้อุณหภูมิในการผลิตประมาณ 100 องศาเซลเซียส ได้

2. กลุ่มอาหารที่เป็นกรดต่ำ (Low acid foods) คือ อาหารที่มีค่า pH 4.5 หรือสูงกว่า ส่วนมากเป็นอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ และผักต่างๆ เช่น ปลา เนื้อ หมู ข้าวโพดฝักอ่อน หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น จึงต้องใช้อุณหภูมิในการผลิตสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส ปลากระป๋องจึงจัดอยู่ในกลุ่มอาหารที่เป็นกรดต่ำ เนื่องจากใช้ปลาเป็นวัตถุดิบหลัก ได้แก่ ปลาซาร์ดีน และปลาแมกเคอเรล เป็นต้น โดยอาจจะบรรจุในน้ำเกลือ น้ำมัน ซอสมะเขือเทศ หรืออื่นๆ จึงต้องมีกรรมวิธีการผลิตที่เข้มงวดสามารถทำลายและยังยั้งการขยายพันธุ์ของเชื้อโรคได้ โดยการผลิตปลากระป๋องมีขั้นตอนการผลิต ดังนี้ 2.1) การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ ต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต โดยตรวจสอบความสดและขนาดของปลา 2.2) การตัดแต่ง นำปลาที่คุณภาพดีมาตัดแต่ง โดยตัดหัวปลา หางปลา ดึงไส้และเครื่องในอื่น ๆ ออก 2.3) การล้างทำความสะอาด การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะนำปลาที่ตัดแต่งแล้วมาล้างในเครื่องล้าง เพื่อล้างเอาเลือด เมือก และสิ่งสกปรกอื่นๆ ที่ปนเปื้อนมาออก 2.4) การบรรจุ นำปลาที่ล้างทำความสะอาดแล้ว มาบรรจุลงในกระป๋องที่เคลือบด้วยดีบุก เพื่อป้องกันสนิม 2.5) การเติมน้ำเกลือ น้ำมันหรือซอส หรืออื่นๆ ปลาที่บรรจุในกระป๋องจะถูกตรวจสอบสิ่งปลอมปน จากนั้นจะผ่านไปตามสายพาน เติมน้ำมันพืช ซอสมะเขือเทศ หรืออื่นๆ แล้วแต่ชนิดของผลิตภัณฑ์ 2.6) การไล่อากาศ นำกระป๋องที่บรรจุปลาและเติมส่วนผสมอื่นๆ แล้ว มาผ่านหน่วยไล่อากาศและปิดผนึกฝา โดยใช้ไอน้ำไต่และแทนที่อากาศในกระป๋อง โดยหลังจากไอน้ำเกิดการควบแน่นจะเกิดสภาพสุญญากาศภายในกระป๋อง แล้วนำมาปิดผนึกฝากระป๋อง 2.7) การฆ่าเชื้อ กระป๋องที่ปิดผนึกแล้ว จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง การฆ่าเชื้อจะเป็นแบบคอมเมอร์เชียล สเตอริไรเซชัน (Commercial sterilization) ซึ่งหมายถึง การใช้ความร้อนสูงเพื่อทำลาย จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเกือบทั้งหมดเพื่อให้อาหารนั้น สามารถบริโภคได้

โดยไม่เป็นอันตราย และสามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสียในสภาวะปกติ โดยใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อที่ขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์ ขนาดของปลาที่บรรจุและขนาดของกระป๋อง 2.8) การลดอุณหภูมิกระป๋อง หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ต้องลดอุณหภูมิของปลากระป๋องโดยเร็ว น้ำที่ใช้ในการลดอุณหภูมิต้องเป็นน้ำสะอาดที่มีการเติมคลอรีน เพื่อลดอุณหภูมิของกระป๋องให้เหลือราว 35-40 C° ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ความร้อนที่สะสมอยู่ที่ตัวกระป๋องจะทำให้กระป๋องแห้ง ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำกว่านี้ กระป๋องจะเป็นสนิมเพราะไอน้ำที่เกาะอยู่ที่กระป๋องระเหยไปไม่หมด 2.9) การปิดฉลากและบรรจุกล่อง เมื่อกระป๋องแห้งสนิทแล้ว จะนำมาปิดฉลาก บรรจุกล่อง เก็บรักษาและรอการขนส่งต่อไปตั้งนั้นในการเลือกซื้อปลากระป๋องหรืออาหารกระป๋องทุกครั้ง ควรให้เวลาในการพิจารณาข้อมูลและลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ให้ถี่ถ้วน เช่น เลือกซื้อที่ผลิตจากผู้ผลิตที่เชื่อถือได้ ลักษณะกระป๋องต้องอยู่ในสภาพที่ดี ไม่บุบ บวม รั่วซึม อย่าซื้ออาหารกระป๋องที่ฉลากไม่ถูกต้อง ไม่มีวันที่ผลิต หรือวันหมดอายุ เป็นต้น

2.1.3 ผลกระทบทางเศรษฐกิจ

2.1.3.1 มูลค่าการผลิต [11]

ภาพรวมด้านการผลิตของอุตสาหกรรมอาหาร ปี 2555 คาดว่าจะมีปริมาณการผลิตลดลงจากปีก่อนร้อยละ 5.71 ส่วนหนึ่งเป็นผลจากปริมาณวัตถุดิบลดลง ประกอบกับต้นทุนสินค้าอาหารโดยรวมได้รับผลกระทบจากราคาวัตถุดิบนำเข้าจากตลาดโลกที่ปรับตัวสูงขึ้นตามราคาน้ำมัน แม้ว่าค่าเงินบาทได้ปรับตัวอ่อนลงเมื่อเทียบกับปีก่อน ซึ่งจะส่งผลต่อภาคการส่งออก แต่จากสถานการณ์หนี้สาธารณะของหลายประเทศในสหภาพยุโรป เริ่มส่งผลกระทบต่อภาวะเศรษฐกิจโลกซบเซาลง โดยเฉพาะเศรษฐกิจของประเทศจีน ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา ส่งผลให้ภาคการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารไทยโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกกลับชะลอตัวลง กลุ่มอาหารแปรรูปประมง ปริมาณการผลิตคาดว่าจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 4.09 เมื่อเทียบกับปีก่อนเป็นผลจากวัตถุดิบมีปริมาณเพิ่มขึ้น หลังจากได้รับผลกระทบจากอุทกภัยในแหล่งเพาะเลี้ยงในช่วงปลายปีที่แล้วและต่อเนื่องถึงช่วงต้นปี ประกอบกับในภาวะเศรษฐกิจที่ชะลอตัว ทำให้ความต้องการปลากระป๋องในตลาดโลกมีเพิ่มขึ้น จากการเป็นโปรตีนคุณภาพดีแต่ราคาโดยเปรียบเทียบที่ต่ำกว่า

ด้านการค้าระหว่างประเทศ ในปี 2555 การส่งออกอุตสาหกรรมอาหาร คาดว่าจะมีมูลค่ารวม 913,665.56 ล้านบาท โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.61 จากปีก่อน โดยการส่งออกในแต่ละกลุ่มประมงคาดว่าจะมีมูลค่าการส่งออก 266,685.75 ล้านบาท ปรับตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 8.80 จากปีก่อน โดยเป็นการเพิ่มขึ้นของระดับราคาในทุกกลุ่มทั้งอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูปเนื่องจากราคาวัตถุดิบในตลาดโลกปรับตัวสูงขึ้น จากคำสั่งซื้อของสหภาพยุโรปที่ชะลอตัวลง ซึ่งเป็นผลจากการส่งออกสินค้าสำคัญในกลุ่ม คือ ปลาทูน่ากระป๋อง ทั้งปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากสหภาพยุโรปหันไปบริโภคปลาทูน่าแทนกึ่ง จากภาวะวิกฤตหนี้สาธารณะในหลายประเทศที่ทำให้ภาวะเศรษฐกิจ

ชะลอตัว ผู้บริโภคมีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมไปสู่การบริโภคสินค้าที่มีราคาต่ำกว่าทดแทน และการนำเข้าผลิตภัณฑ์อาหารของไทยคาดว่าจะมีมูลค่ารวม 364,810.88 ล้านบาทเพิ่มขึ้นร้อยละ 20.31 จากปีก่อน โดยเป็นการนำเข้าสินค้ากลุ่มวัตถุดิบ เช่น ปลาทูน่าแช่เย็นแช่แข็ง เพิ่มขึ้นร้อยละ 1.22 เป็นผลจากระดับราคาที่ปรับเพิ่มขึ้น ตามราคาโภคภัณฑ์ในตลาดโลกที่ปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง [11]

แนวโน้มอุตสาหกรรมอาหารไทยในปี 2557 ยังคงต้องเผชิญทั้งกับการแข่งขันทั้งภายในและภายนอกประเทศ อย่างไรก็ตาม แนวโน้มยังคงขยาย ตัวอย่างค้อยเป็นค้อยไปทั้ง กำลังการผลิต การบริโภคภายในประเทศ การนำเข้า และการส่งออก โดยแรงผลักดันเชิงบวก ที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น เปิดการนำเข้าไก่ไทย ส่วนปัจจัยเชิงลบที่สำคัญ คือ อาหารแปรรูปของไทย ถูกสหภาพยุโรปตัดสิทธิ GSP ทำให้การผลิตของอุตสาหกรรมอาหารในภาพรวมคาดว่าจะ การผลิตจะขยายตัวประมาณร้อยละ 1-2 เมื่อเทียบกับปีก่อน โดย ผลผลิตเชิงปริมาณที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลทราย น้ำมันปาล์ม แป้งมันสำปะหลัง เนื้อไก่แช่แข็งและแช่เย็น และปลาทูน่า [12]

จากตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณผลผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋องในปี 2550-2557 ในปี 2555 63,277.12 ตันและปี 2556 45,902.66 ตัน (ม.ค-พ.ย) คาดว่าทั้งปีน่าจะปรับตัวลดลงร้อยละ 0.1 [13]

ตารางที่ 2.1 ปริมาณผลผลิตปลาซาร์ดีนกระป๋องในปี 2550-2557 (ตัน) [13]

ผลิตภัณฑ์	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557*
ปลาซาร์ดีน กระป๋อง	37,384.27	29,150.72	34,169.43	36,759.87	52,473.24	63,277.12	49,318.02	43,997.79

หมายเหตุ : * ตัวเลขเบื้องต้น (ม.ค - พ.ย. 57)

2.1.3.2 มูลค่าการส่งออก - นำเข้ารายปี

อุตสาหกรรมการทำปลาซาร์ดีนกระป๋องนับเป็นกิจการที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศไทย และในปี 2554 กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศมีการส่งออกปลาซาร์ดีนกระป๋อง ปริมาณ 16909.69 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,153.39 ล้านบาท [13] และจากสถิติของกรมศุลกากร ปี 2557 รายงานว่า ประเทศไทยมีการส่งออก ปลาซาร์ดีน ปลาซาร์ดีนเนลล่า และปลาบรสิลิ่ง หรือปลาสแปรตที่บรรจุภาชนะที่อากาศผ่านเข้าออกไม่ได้ ซึ่งเป็นปลาทั้งตัวหรือเป็นชิ้นแต่ไม่บด จัดเป็นประเภทปลาที่ปรุงแต่งหรือทาไว้ไม่ให้เสียเป็นปริมาณ 1,136,748,478 กก. คิดเป็นมูลค่า 120,246,675,551 บาท [15] ในรายงานของสถานเอกอัครราชทูต ณ กรุงบราซิลเลีย

ปี 2010 รายงานว่า รายชื่อสินค้าไทยที่มีศักยภาพในบราซิลได้แก่ อาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูปเป็นอันดับที่ 1 ของโลก โดยเฉพาะอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป เช่น ปลาทูน่ากระป๋อง ปลาซาร์ดีนกระป๋อง ปลาทูน่าแช่แข็ง และปลาซาร์ดีนแช่แข็ง มูลค่าการค้าอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูปในปี 2012 ไทยส่งออกอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป มูลค่า 20.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ และในช่วง 5 เดือนแรกของปี 2012 (ม.ค.-พ.ค.) ไทยส่งออกอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป มูลค่า 13.0 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ขยายตัวเพิ่มขึ้น ร้อยละ 4.96 เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปี 2012 ในปี 55 นักวิเคราะห์คาดว่าไทยจะสามารถส่งออกอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูป มูลค่า 23 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 เนื่องจากเศรษฐกิจมีแนวโน้มที่จะขยายตัวเพิ่มขึ้น ร้อยละ 2.7- 3 และการเพิ่มจำนวนประชากรชนชั้นกลางที่เพิ่มขึ้นกว่า 30 ล้านคน ในช่วงสิบปีที่ผ่านมาทำให้มีความต้องการสินค้าอาหารทะเลกระป๋องและแปรรูปเพิ่มขึ้นในประเทศบราซิล [16]

จากตารางที่ 2.2 ปริมาณการจำหน่ายปลาซาร์ดีนกระป๋องภายในประเทศในปี 2552- 2558 (ม.ค.- ก.พ.)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณการจำหน่ายปลาซาร์ดีนกระป๋องภายในประเทศ ในปี 2552- 2558 (ม.ค.- ก.พ.) (ตัน) [17]

ผลิตภัณฑ์	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558 ม.ค.	2558 ก.พ.
ปลาซาร์ดีน กระป๋อง	23,330.37	23,328.40	31,800.09	19,419.24	14,883.02	1839.31	486.28	1,472.70

และจากสถิติปี 2543-2557 ปริมาณการผลิตภาคอุตสาหกรรม ปริมาณการผลิตมีผลต่อการนำเข้า ทิศทางการนำเข้าคาดว่ามีความแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เหมือนใน ช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา โดยมูลค่านำเข้าเฉลี่ยอยู่ที่ 4 แสนล้านบาทต่อปี โดยสินค้านำเข้าร้อยละ 60 เป็นวัตถุดิบในโรงงาน แปรรูป เช่น ปลาทูน่า ปลาทะเลแช่แข็ง ข้าวสาลี แป้งสาลี และ กากถั่วในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น และส่วนอีกร้อยละ 40 ที่นำเข้ามาใช้บริโภคโดยตรง ได้แก่ ผัก ผลไม้สด เนื้อสัตว์ ขนมขบเคี้ยว ช็อกโกแลต และอาหารสำเร็จรูปสำหรับผู้ป่วย เป็นต้น [13]

2.2 การตรวจวัดปริมาณฮิสตามีน [5]

1. หลักการ

ตัวอย่างถูกสกัดโดยใช้ 75%(v/v) Methanol นำสารละลายที่สกัดได้ไปผ่าน anion exchange resin column หลังจากนั้นจึงนำไปสร้างอนุพันธ์ฮิสตามีนกับสาร o-Phthalaldehyde (OPT) แล้ว

นำมาวิเคราะห์หาปริมาณของอนุพันธ์ Histamine ด้วยเครื่อง Fluorometer ที่ Excitation wavelength 360 nm และ Emission wavelength 450 nm และคำนวณกลับไปเป็นปริมาณ Histamine โดยวิธี External calibration curve

2. นิยามและคำจำกัดความ

2.1 Histamine: = ชื่อทางเคมี 2- (4-inidazoly) ethylamine เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดอะมิโน Histidine โดยมี L-histidine decarboxylase, enzyme เป็นตัว Catalyze อาหารหลายชนิดมีความเป็นพิษและเน่าเสีย เนื่องจาก Histamine มักจะนิยมใช้ปริมาณของ Histamine เป็นตัวบอกระดับความสด หรือการเน่าเสียของปลา

2.2 LOD หมายถึง Limit of Detection เป็นปริมาณที่ต่ำที่สุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้เชิงคุณภาพ

2.3 LOQ หมายถึง Limit of Quantification เป็นปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณได้

2.4 A/D READING หมายถึง ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์

2.5 A/D BLANK หมายถึง ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่หักค่าความเข้มแสงของ Blank ออก

2.6 กะ หมายถึง ช่วงเวลาการทำงานของพนักงานมี 2 ช่วงคือ

2.6.1 กะกลางวัน คือ ช่วงเวลา ตั้งแต่ 07.00 – 19.00 น.

2.6.2 กะกลางคืน คือ ช่วงเวลา ตั้งแต่ 19.00 – 07.00 น.

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 Electronic balance (readability 0.01 g)

3.2 Electronic balance (readability 0.0001 g)

3.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.4 เครื่อง Fluorometer ประกอบด้วย Filter ของ Excitation wavelength 360 nm และ Filter ของ Emission wavelength 450 nm

3.5 เครื่องปั่นตัวอย่าง (Blender)

3.6 Homogenizer

3.7 Dispenser ขนาด 5, 10, 25, และ 50 ml

3.8 ปิเปต ชนิด Auto pipette ขนาด 500-5000 μ l

3.9 ปิเปต ชนิด Auto pipette ขนาด 100-1000 μ l

3.10 คอลัมน์แก้ว (Column) ที่มีวาล์วปิด-เปิด ด้านล่างมี sintered glass

3.11 Erlenmeyer flask ขนาด 50 และ 250 ml

3.12 Cuvette ใส่สารสกัดเพื่อวัดกับเครื่อง (ขนาด 10x10 mm), (Round cuvettes, 1-5mL)

- 3.13 กระจกทรง No.1
- 3.14 บีกเกอร์พลาสติก หรือ ขวดปากกว้าง ขนาด 150 ml
- 3.15 Pipette ขนาด 1, 5, 10 และ 20 ml
- 3.16 Volumetric flask ขนาด 25, 50, 100, 200, 250, และ 1000 ml
- 3.17 กระจกวัด pH (ช่วงการวัด pH 0-14)
- 3.18 กระจกทึบ (สำหรับเช็ด cuvette ให้แห้งก่อนการเข้าวัดในเครื่อง)
- 3.19 กระจกตวง ขนาด 10, 50, 100 ml

4. สารเคมี

- 4.1 Sodium hydroxide (NaOH) AR. Grade
- 4.2 Hydrochloric acid (HCl) AR. Grade
- 4.3 Ortho-phosphoric acid (H_3PO_4) 85% AR. Grade
- 4.4 Histamine dihydrochloride ($C_5H_5N_3 \cdot 2HCl$) AR. Grade ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$
- 4.5 Anion exchange resin ชนิด Biorad AG-1x8,50-100 mesh
- 4.6 O-Phthaldiadehyde (OPT) AR. Grade
- 4.7 Methanol AR. Grade
- 4.8 น้ำกลั่น

5. การเตรียมสารเคมี

- 5.1 เมทานอล เข้มข้น 75% (v/v)
 - 1. ตวงเมทานอลเข้มข้น 100% ปริมาตร 750 ml ด้วยกระจกตวงขนาด 1000 ml
 - 2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml เขย่าให้เข้ากัน
 - 3. เทเก็บใส่ขวดพลาสติก ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมแล้วเก็บไว้ได้นาน 3 เดือน
- 5.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.00 M
 - 1. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80.00 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml
 - 2. ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 150 ml ทิ้งไว้ให้เย็น เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml
 - 3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน
 - 4. เทเก็บในขวดพลาสติก/ขวดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ได้นาน 3 เดือน
- 5.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.00 M
 - 1. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40.00 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml
 - 2. ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100 ml ทิ้งไว้ให้เย็น เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml
 - 3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

4. เทเก็บในขวดพลาสติก/ขวดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ได้นาน 3 เดือน

5.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1.00 M

1. ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 83 ml โดยใช้กระบอกลงขนาด 100 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 ml
2. ค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตร
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. เทเก็บในขวดสีชา เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง เก็บได้นาน 3 เดือน

ในกรณีที่มีการเตรียม HCl 1.00 M ปริมาตร 2000 ml ให้ทำการตวง HCl เข้มข้น 37% มา 166 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2000 ml เขย่าให้เข้ากัน เทเก็บในขวดสีชา เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง เก็บไว้ได้นาน 3 เดือน

5.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.10 M

1. ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.00 M (จากข้อ 5) ปริมาตร 200 ml โดยใช้กระบอกลงขนาด 250 ml ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 2000 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 ml
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2000 ml เขย่าให้เข้ากัน
3. เทเก็บในขวดสีชา เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง เก็บได้นาน 3 เดือน

5.6 สารละลายกรดอโรฟอสฟอริก (H_3PO_4) 3.57 N

1. ตวงกรดอโรฟอสฟอริกเข้มข้น 85% จำนวน 121.8 ml โดยใช้กระบอกลงขนาด 250 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 ml
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml
3. เทเก็บใส่ขวดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ได้นาน 3 เดือน

5.7 สารละลาย ออโร-พธาลัลดีไฮด์ (OPT) 0.1% (w/v)

1. ชั่ง OPT 0.10 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml
2. ละลายด้วยเมทานอล 100% ประมาณ 30 ml เทลงในขวดวัดปริมาตรสีชา ขนาด 100 ml
3. ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 100% ให้ได้ 100 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. เทเก็บใส่ขวดชา เก็บไว้ได้นาน 1 อาทิตย์

หมายเหตุ ในกรณีที่มีการเตรียมสาร OPT ในปริมาณมากกว่า 100 ml สามารถปรับเปลี่ยนปริมาตรที่ต้องการได้

6. การเตรียมเรซิน (Anion Exchange resin) :ก่อนใช้ต้องทำให้เรซินอยู่ในสภาพไฮดรอกไซด์ (-OH)

- 6.1 ชั่งเรซิน 5 g ต่อ 1 คอลัมน์ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml
- 6.2 เติม 2 M เมทานอล 75 ml ต่อเรซิน 5 g ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีเรซินอยู่

- 6.3 คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15-30 นาที
- 6.4 ค่อยๆเทส่วนใสๆทิ้ง (ระวังอย่าให้เรซินหกหล่น)
- 6.5 เติม 2 M NaOH 75 ml ต่อเรซิน 5 g ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีเรซินอยู่อีกครั้ง
- 6.6 คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15-30 นาที
- 6.7 ค่อยๆเทส่วนใสๆทิ้ง (ระวังอย่าให้เรซินหกหล่น)
- 6.8 ล้างเรซินด้วยน้ำกลั่น หลายๆครั้ง จนกระทั่งน้ำที่ใช้ล้างเรซินมีค่า pH เป็นกลาง ทดสอบด้วยกระดาษวัด pH (pH 6-8)
- 6.9 เก็บเรซินในน้ำกลั่น เก็บไว้ในตู้เย็น บันทึกวัน เดือน ปี ที่ล้างเรซิน
- 6.10 สามารถเก็บเรซินไว้ในตู้แช่เย็นได้นาน 7 วัน
- 6.11 หลังจากครบ 7 วันแล้ว ต้องทำเรซินให้อยู่ในสภาพไฮดรอกไซด์ (-OH) ใหม่
7. สารละลายมาตรฐานและการเตรียม

7.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน (Stock Histamine Solution)

เข้มข้น 1000 µg/ml

1. ชั่ง Histamine dihydrochloride ความบริสุทธิ์ 100% ปริมาณ 0.1657 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 ml หากความบริสุทธิ์ของสาร Histamine dihydrochloride ต่างจากนี้ ให้คำนวณปริมาณสาร เช่น Histamine dihydrochloride ความบริสุทธิ์ 98% ต้องชั่งสาร

$$= \frac{100 \times 0.1657}{98\%} = 0.1691 \text{ กรัม}$$

2. ละลายด้วย 0.1 N HCl เทใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml
3. เติม 0.1 N HCl จนถึงขีดวัดปริมาตร เขย่าให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน
4. เทใส่ในขวดใส่สารขนาด 100ml เก็บในตู้เย็น มีอายุการใช้งาน 1 สัปดาห์

7.2 สารละลายมาตรฐานฮีสตามีน (Intermediate standard solution) เข้มข้น 10 µg/ml

1. ปิเปิด Intermediate standard solution เข้มข้น 1000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในขวด วัด ปริมาตร ขนาด 100 ml
2. ปรับปริมาตรด้วย HCl 0.1M ให้ได้ 100ml เขย่าให้เข้ากัน
3. เทใส่ขวดใส่สารขนาด 100 ml เก็บในตู้แช่เย็น มีอายุการใช้งาน 3 วัน

7.3 สารละลายมาตรฐานฮีสตามีน (Working standard solution) 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 µg/5 ml หรือ 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, และ 200 mg/kg ต่อน้ำหนัก 5 กรัม

1. ปิเปิด (Intermediate standard solution) เข้มข้น 10 µg/ml ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 3, และ 4 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร

ขนาด 100 ml

2. ปรับปริมาตรด้วย HCl 0.1 M ให้ได้ 100 ml เขย่าให้เข้ากัน
3. เทใส่ขวดใส่สารขนาด 100 ml เก็บในตู้แช่เย็น เตรียมใหม่ทุกวัน
4. ก่อนการใช้งานให้นำสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน (Working standard solution) ที่ความเข้มข้นที่ 30 ppm มาอ่านค่าเทียบกับสารละลายมาตรฐานชุดเดิมก่อน โดยค่าที่ได้ต้องได้ในช่วงค่าแตกต่างไม่เกิน 10 % (27-33 ppm)

7.4 สารละลายมาตรฐาน (Spiked standard Histamine Solution) 100 µg/ml
(สำหรับทำ Recovery)

1. ปิเปต (Stock standard Histamine Solution) 25 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 ml
2. ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล 75% (v/v) ให้ได้ 250 ml เขย่าให้เข้ากัน
3. เทใส่ขวดใส่สารขนาด 100 ml เก็บในตู้แช่เย็น มีอายุการใช้งาน 3 วัน

7.5 สารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเรซิน 10 µg/ml

1. ปิเปต (Stock standard Histamine Solution) 1 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml
2. ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล 75% (v/v) ให้ได้ 100 ml เขย่าให้เข้ากัน
3. เทใส่ขวดใส่สารขนาด 100 ml เก็บในตู้แช่เย็น มีอายุการใช้งาน 3 วัน

8. การเตรียมคอลัมน์

8.1 การบรรจุคอลัมน์

1. ค่อยๆ เทเรซินที่ผสมกับน้ำ สำหรับวิเคราะห์แล้วลงคอลัมน์แก้วที่มีน้ำสำหรับวิเคราะห์อยู่ประมาณ 5 ml
2. เปิดวาล์วด้านล่าง ให้น้ำไหลออก เรซินจะค่อยๆ ลงมาเรียงตัวกันด้านล่างของคอลัมน์
3. ค่อยๆ เทเรซินลงในคอลัมน์ จนกระทั่งเรซินมีความสูงจากด้านล่างของคอลัมน์ประมาณ 8 cm
4. ระวังอย่าให้เรซินแห้ง และอย่าให้เกิดฟองอากาศในเรซิน
5. ใช้นิ้วมือค่อยๆ เคาะคอลัมน์ เพื่อให้เรซินเรียงกันแน่นขึ้น
6. ขณะที่บรรจุเรซินไว้ในคอลัมน์ ต้องระวังอย่าให้เรซินแห้ง
7. ต้องทำการเตรียมเรซิน (Regenerate) ใหม่/กะ โดยถ่ายเรซินออกจากคอลัมน์ ลงในบีกเกอร์แล้วทำการเตรียมเรซิน ห้ามเตรียมเรซินในคอลัมน์

8.2 การปรับสภาพเรซิน

ปรับสภาพของเรซิน ก่อนทำการผ่านตัวอย่าง โดยการปิเปต สารละลายมาตรฐานสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของเรซิน 10 µg/ml ใส่ลงในคอลัมน์เรซิน แล้วเปิดวาล์วให้สารละลายไหลออก โดยนำบีกเกอร์ขนาด 250 ml มารองด้านล่าง เติมน้ำกลั่นลงไปคอลัมน์ ประมาณ 10 ml ปล่อยให้

สารละลายไหลออกจากคอลัมน์ เติมน้ำตามลงไปอีกประมาณ 40-50 ml ไม่ต้องเก็บสารละลายที่ได้จากการผ่านคอลัมน์

8.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเรซิน

1. ก่อนการทดสอบประสิทธิภาพของเรซินจะต้องทำการปรับสภาพเรซินตามข้อ 7.2 ก่อนทุกครั้งจากนั้น ปิดเปิด สารละลายมาตรฐานสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของเรซิน 10 µg/ml ใส่ลงในคอลัมน์เรซินแล้วเปิดวาล์ว ให้สารละลายเริ่มไหลออก โดยรองรับสารละลายที่ออกมาด้วยขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 ml ที่มี 1.00 M HCl อยู่ 5 ml เมื่อความสูงของระดับของสารละลายเหนือเรซินประมาณ 2 mm ให้เติมน้ำกลั่นตามลงไปประมาณ 5 ml ค่อยๆ เติมน้ำกลั่น ลงไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสารละลายในขวดวัดปริมาตรที่รองรับ มีปริมาตรของสารละลายประมาณ 35-40 ml ให้ปิดวาล์วปรับปริมาตรของสารละลายในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 ml

2. เตรียมสารประกอบ Histamine derivative โดยปิดเปิดสารละลายที่ได้มา 5 ml แล้วเติมสารเคมีต่างๆ ตามข้อ 11.1.2-11.1.5 นำไปวัดค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยเครื่อง Fluorometer โดยกดปุ่ม Enter และผลจะปรากฏบนหน้าจอเครื่อง Fluorometer จากนั้นกดปุ่ม print เครื่องจะ print ผลโดยอัตโนมัตินำผลที่ print ได้จากเครื่องทำการถ่ายโอนข้อมูลที่อ่านได้ลงในแบบฟอร์ม F-10-B-204

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์เรซินโดยใช้สารละลายฮีสตามีนมาตรฐานในเมทานอล (Histamine Working Standard in Methanol) ค่า %Relative Accuracy เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 80 - 110% โดยทดสอบประสิทธิภาพของเรซิน ก่อนเป็นตัวอย่างแรก ก่อนเริ่มทดสอบตัวอย่างแต่ละกะ รวมถึงกรณีที่มีการบรรจุเรซินใน Column ใหม่

9. วิธีทดสอบตัวอย่าง

9.1 การสกัดตัวอย่าง

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5.00 ± 0.05 g โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 หรือ 150 ml
2. ตวงเมทานอล 75% (v/v) ประมาณ 25 ml ใส่ลงในบีกเกอร์
3. นำเข้าเครื่อง Homogenizer ประมาณ 30 วินาที
4. เทสารละลายในบีกเกอร์ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 ml
5. รินส์บีกเกอร์และเครื่องปั่นผสมด้วยเมทานอล 75% (v/v) เทใส่ลงในขวดวัดปริมาตร
6. นำขวดวัดปริมาตรที่ได้ ไปวางในอ่างน้ำด้วยอุณหภูมิ 60 ± 1 °C ทิ้งไว้ 15 นาที (ไม่ต้องปิดฝาขวดวัดปริมาตร)
7. นำขวดวัดปริมาตรออกมา ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 75% (v/v) ให้ได้ 50 ml เขย่าให้เข้ากัน
8. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

9. เก็บสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการกรอง (ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์ ต้องเก็บสารละลายตัวอย่างไว้ในตู้แช่เย็น โดยไม่ต้องปิดฝาให้สนิท เก็บได้นาน 1 วัน)

9.2 การผ่านคอลัมน์เรซิน

1. ปรับระดับของน้ำกลั่นเหนือเรซิน ให้อยู่สูงกว่าเรซิน ประมาณ 2 mm
2. นำขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml ที่มี 1.00 M HCl อยู่ 5 ml มารองใต้คอลัมน์เรซิน
3. เปิดสารละลายในข้อ 1.9 จำนวน 1 ml ใส่ลงในคอลัมน์เรซิน
4. ใส่น้ำกลั่นตามลงไปประมาณ 5 ml แล้วเปิดวาล์วให้น้ำไหลออกทันที
5. ปรับอัตราการไหลของคอลัมน์เรซิน ให้มีอัตราเร็วประมาณ 4-5 ml/นาที
6. ใส่น้ำกลั่นลงไปเป็นระยะๆ ประมาณ 5 ml ระวังอย่าให้เรซินแห้ง
7. เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เรซิน จนได้ปริมาตรประมาณ 35-40 ml จึงปิดวาล์ว
8. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 ml ปิดจุก เขย่าให้เข้ากัน
9. ปิดจุกให้สนิท เก็บสารละลายไว้ในตู้แช่เย็น ถ้ายังไม่ทำการทดสอบ เก็บได้นาน 1 วัน

9.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์

1. เปิดสารละลายตัวอย่าง ที่ผ่านคอลัมน์เรซิน 5 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 ml แต่ละใบ
2. เติม 0.1 M HCl 10.0 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่แต่ละใบ เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 1 M NaOH 3.0 ml เขย่าให้เข้ากัน
หมายเหตุ ต้องทำการเติม 0.1 M HCl และ 1 M NaOH ภายใน 5 นาที
4. เติม OPT 0.1% (w/v) 1.0 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที
5. เติม 3.57 H₃PO₄ 3.0 ml เขย่าอย่างแรงให้เข้ากันทันทีและให้อ่านตัวอย่างทันทีและต้องอ่านตัวอย่าง ไม่เกิน 1.5 ชั่วโมง

9.4 การวัดค่า Histamine

1. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3 มาเทใส่ลงใน Cuvette ให้สูงกว่าระดับช่องแสง Fluorescence
2. นำไปวัดค่า Histamine ด้วยเครื่อง Fluorometer จากนั้นกดปุ่ม Enter ค่าจะปรากฏบนหน้าจอเครื่อง Fluorometer จากนั้นกดปุ่ม print เครื่องจะ print ผลโดยอัตโนมัติ
3. บันทึกค่า Histamine ของตัวอย่างที่อ่านได้ลงในใบบันทึกผล

9.5 การเจือจางตัวอย่าง

ถ้าค่าที่อ่านได้จากเครื่องของสารละลายตัวอย่างมากกว่า ค่าที่อ่านได้จากเครื่องของสารมาตรฐานที่ใช้ทำ Calibration Curve ที่มีค่ามากที่สุด ให้ทำการเจือจางจากสารละลายตัวอย่างโดย

1. เปิดสารละลายที่ได้จากการผ่านคอลัมน์เรซินตามปริมาตรที่ต้องการ V1

2. ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาดที่ต้องการ V2 และเจือจางด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตรตามที่ต้องการ
3. ปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วมา 5 ml เติมสารละลายตามข้อ 2.2-2.5
4. วัดความเข้มข้นของ Histamine ด้วยเครื่อง Fluorometer

10. การคำนวณ

10.1 การคำนวณหาปริมาณ Histamine (mg/kg)

ที่อ่านได้จากเครื่อง Fluorometer จากสมการ $y = mx + b$

$$\text{Histamine (mg/kg)} = \frac{\text{Intensity-Intercept}}{\text{Slope}}$$

10.2 การคำนวณ % RPD

$$\% \text{ RPD} = \frac{\text{max} - \text{min}}{\text{Average}} \times 100$$

10.2 การคำนวณ % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Spike sample} - \text{Sample}}{\text{Spike value}} \times 100$$

10.3 การทดสอบประสิทธิภาพเรซิน

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้จากเครื่อง Fluometer}}{\text{ค่าจริงของสารมาตรฐาน}} \times 100$$

เมื่อ ค่าที่วัดได้ = ค่าที่อ่านได้จากเครื่องของ สารละลายมาตรฐานที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

ค่าจริง = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

11. การรายงานผลการทดสอบ

11.1 ถ้าความเข้มข้นของตัวอย่างต่ำกว่า LOD คือ 3.11 mg/kg (ppm)

ให้รายงาน Not Detected (ND)

11.2 ถ้าความเข้มข้นของตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ 3.11 แต่ต่ำกว่า LOQ คือ 6.00 mg/kg

ให้รายงานว่า < 6.00 mg/kg (ppm)

11.3 ถ้าความเข้มข้นของตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ LOQ คือ 6.00 mg/kg (ppm)

รายงานเป็นตัวเลขทศนิยม 2 ตำแหน่งและรายงานเป็นหน่วย mg/kg (ppm)

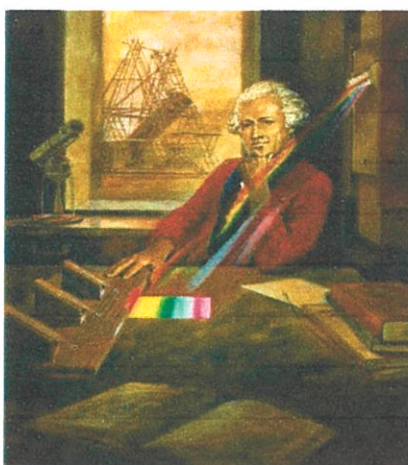
หมายเหตุ

1. กรณีที่ผลการควบคุมภายใน ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดให้หยุดทำการทดสอบ และแจ้งให้หัวหน้าแผนกหรือหัวหน้าฝ่ายที่รับผิดชอบทราบ เพื่อทำการวิเคราะห์หาสาเหตุ และทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ (Recheck) ย้อนไปถึงตัวอย่างแรกที่มีผลการควบคุมคุณภาพภายในที่เป็นไปตามข้อกำหนด ถ้าพบผลการทดสอบไม่เป็นไปตามข้อกำหนดให้แจ้งหัวหน้าฝ่ายที่รับผิดชอบทราบ เพื่อดำเนินตามขั้นตอน การควบคุมงานที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดตาม P-13-B-0018
2. เมื่อจบการทดสอบแต่ละกะ จะต้องมีการทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำและ % Recovery ปิดท้ายทุกครั้งโดยยึดเกณฑ์ยอมรับตามข้อ 16.2 และ 16.4
3. ในระหว่างการวัดค่า Histamine ด้วยเครื่อง Fluorometerให้อ่านสารมาตรฐานที่ 30 ppm เพื่อตรวจสอบสถานะของเครื่อง Fluorometer ทุก 20 ตัวอย่างและ/หรือทุก Batch ที่เกณฑ์การยอมรับ ความเข้มข้นที่ได้ต้องอยู่ในช่วง $\pm 10\%$ จากเข้มข้นของมาตรฐาน

2.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับ NIRS

2.3.1 หลักการพื้นฐานของ NIRS [18]

รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1800 โดย Sir William Herschel ซึ่งเป็นนักดาราศาสตร์ ท่านได้ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของความร้อน (Heating effect) ในช่วงความยาวคลื่นต่างๆของแถบสเปกตรัม ที่เกิดจากการแยกแสงด้วยแท่งปริซึม และพบว่า ผลกระทบของความร้อนที่เกิดขึ้นสูงสุดในแถบแสงที่อยู่ถัดไปจากแสงสีแดง (red end) แต่ไม่สามารถมองเห็นสเปกตรัม (Spectrum) ได้ จึงเรียกช่วงรังสีที่เขาค้นพบว่ารังสีอินฟราเรด (Infrared radiation) ดังรูปที่ 2.1 การค้นพบครั้งนี้ถือเป็นการค้นพบที่ยิ่งใหญ่ เพราะรังสีอินฟราเรดประกอบไปด้วยสามช่วงความยาวคลื่นที่สำคัญ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน หนึ่งในนั้นคือช่วงรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIR) นั่นเอง



รูปที่ 2.1 Sir William Herschel ผู้ค้นพบช่วงรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ [18]

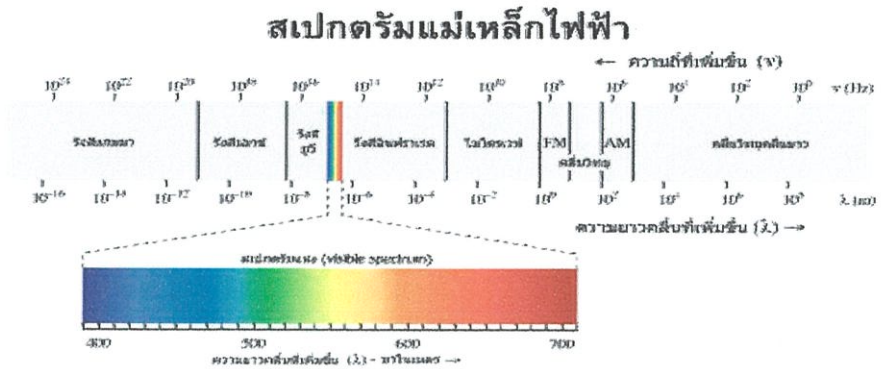
สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้หรือ NIR Spectroscopy เป็นการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ (Infrared radiation) กับสสาร สสารที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้คือ สสารที่มีโมเลกุลประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน (X - H) อะตอม X ได้แก่ C, O, N, S ฯลฯ อันตรกิริยาดังกล่าว คือการที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้เข้าไป ซึ่งจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ของสสารที่มีความยาวคลื่นต่างๆจะปรากฏในสเปกตรัม NIR ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบโดยไม่ทำลายตัวอย่าง (Non destructive testing)

รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ หมายถึง รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่จัดอยู่ในรังสีอินฟราเรด (IR radiation) โดยช่วงคลื่นอินฟราเรด (IR spectrum) สามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ อินฟราเรดย่านใกล้ (NIR) อินฟราเรดย่านกลาง (Mid IR) และอินฟราเรดย่านไกล (Far IR) ตามลำดับ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การแบ่งช่วงของอินฟราเรด [17]

ช่วง	ความยาวคลื่น (nm)	จำนวนคลื่น (cm^{-1})	ย่านอันตรกิริยา
ช่วงอินฟราเรดย่านใกล้ (Near IR, NIR)	800 - 2500	12500 - 4000	โอเวอร์โทน, คอมบิเนชัน
ช่วงอินฟราเรดย่านกลาง (Mid IR or fundamental IR)	2500-25000	4000-400	การสั่นแบบพื้นฐาน
ช่วงอินฟราเรดย่านไกล (Far IR)	25000-100000	400-100	การหมุน

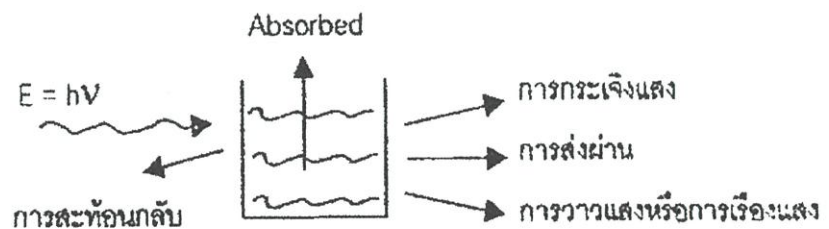
ตำแหน่งของรังสีอินฟราเรดในสเปกตรัมคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า อยู่ระหว่างรังสีวิสิเบิล (Visible radiation) และรังสีอินฟราเรดย่านกลาง (Mid infrared radiation) รังสีอินฟราเรดย่านใกล้มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 800-2,500 nm เป็นย่าน overtone region) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ตำแหน่งรังสีสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดย่านใกล้ในแถบสเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า [19]

2.3.2 หลักการของสเปกโทรสโกปีและการสั่นสะเทือน (Vibration) ของโมเลกุล

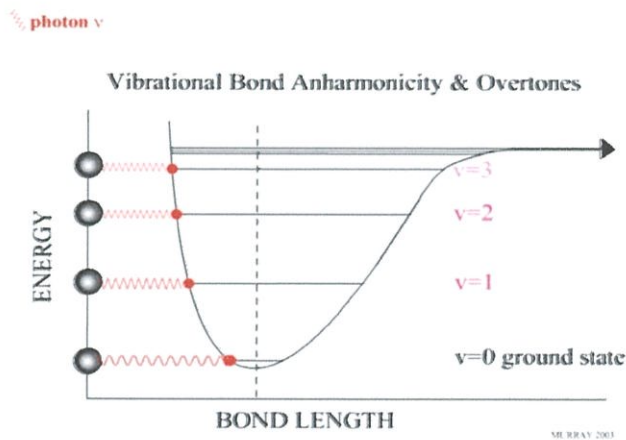
หลักการของสเปกโทรสโกปี คือ เมื่อลำแสงของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าผ่านเข้าไปยังสารละลาย หรือวัตถุ จะมีแสงบางส่วนที่จะถูกดูดกลืน (Absorbed) บางส่วนผ่านทะลุออกไป (Transmitted) บางส่วนเกิดการสะท้อนกลับ (Reflected) บางส่วนเกิดการวาวแสงหรือการเรืองแสง (Fluorescence or phosphorescence) และบางส่วนอาจเกิดการกระเจิงแสง (Scattered) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 [20]



รูปที่ 2.3 การกระทำของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ากับสารต่างๆ [20]

เมื่อฉายแสงใช้คลื่นแสงในช่วง NIR ส่งเข้าไปในตัวอย่าง ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างดูดกลืน (Absorb) พลังงาน แล้วเกิดการสั่นสะเทือน (Vibration) ของโมเลกุลใน Functional groups ต่างๆ

2 ลักษณะ คือ การยืดหด (Stretching) และ การงอหรือการเปลี่ยนแปลงมุม (Bending) ช่วงความถี่ Overtones และ Combination ของหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H, N-H และ O=H ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักของสารอินทรีย์ ในการตรวจวัดพลังงานทำได้หลายรูปแบบ เช่น แบบวัดการสะท้อน (Reflectance) แบบวัดการส่องผ่าน (Transmittance) เป็นต้นถ้าโครงสร้างโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ตรวจวัดมีความซับซ้อนสเปกตรัมที่ได้จะยังมีการซ้อนทับกันมากขึ้น ในการเกิด Overtone bands โดยปกติโมเลกุลจะมีระดับพลังงานการสั่นต่ำสุด $V=0$ (Ground state) เมื่อโมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดซึ่งมีพลังงานเท่ากับความแตกต่างของพลังงานระหว่างกัน (ΔE) ก็จะทำให้เกิด Vibrational transition ขึ้น โดยการเกิด Transition จะเกิดจาก ground state ($V=0$) ไปสู่ Excited state ($V=1$) จะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเรียกว่า Fundamental vibration หรือ Fundamental spectral band แต่ถ้าเป็น Vibration ที่เกิดจาก Ground state ($V=0$) ไปสู่ Excited state ($V=2$) ซึ่งเป็น Excited state ที่มีพลังงานสูงกว่า ($V=1$) จะให้ Overtone band ซึ่งเป็น Weak band จัดเป็น First overtone โดยจะเป็น band ที่มีความถี่เป็นสองเท่าของ Fundamental vibration สำหรับ Second overtone ก็จะทำให้ปรากฏให้เห็นเป็นเลขสามเท่าของ Fundamental vibration โดยจะเกิด Transition จาก Ground state ($V=0$) ไปสู่ Excited state ($V=3$) [21]



รูปที่ 2.4 การเกิด Overtone bands [21]

สเปกโทรสโคปีมีกฎของการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กฎ คือ [20]

1. กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's law) กล่าวว่า “เมื่อแสงสีเดียว (Monochromatic light) คือ แสงความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว (Homogeneous) เป็นสัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางดูดกลืนไว้ โดยไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มแสงเริ่มต้น และความเข้มของแสงจะถูกแต่ละชั้นของตัวกลางดูดกลืนไว้ในสัดส่วนที่เท่ากัน”

2. กฎของเบียร์ (Beer's law) กล่าวว่า “เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกตัวกลางดูดกลืนไว้จะแปรโดยตรงกับปริมาณของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงนั้น”

ในทางปฏิบัติปริมาณความเข้มข้นของแสงที่ถูกดูดกลืนจะขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่แสงส่องผ่าน จึงต้องรวมกฎทั้งสองเข้าด้วยกันเรียกว่า กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต เขียนในรูปสมการได้ดังนี้

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

เนื่องจาก T (Transmittance) เท่ากับ

$$T = \frac{I}{I_0}$$

เพราะฉะนั้น

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc = \log \frac{1}{T}$$

- เมื่อ
- I = ความเข้มของแสงความยาวคลื่นเดียวที่ส่งผ่านออกมา
 - ϵ = สัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง ปกติเปลี่ยนแปลงตามความยาวคลื่น และอุณหภูมิ
 - I_0 = ความเข้มของแสงก่อนผ่านตัวกลางเมื่อ $b=0$
 - b = ความหนาของตัวกลางในหน่วยเซนติเมตร
 - c = ความเข้มข้นของสารในหน่วย โมล/ลิตร
 - A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

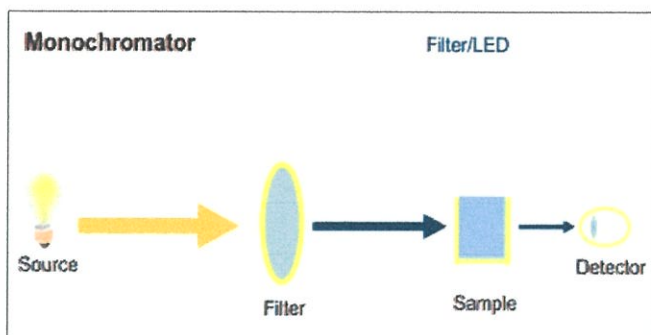
โมเลกุลของสารแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กับช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันเนื่องจากการจัดเรียงโครงสร้างของโมเลกุลต่างกัน นอกจากนี้ในแต่ละโมเลกุลจะสัมพันธ์กับความยาวคลื่นมากกว่า 1 ช่วง เช่นโมเลกุลของน้ำ (H_2O) ที่มีมากในผลิตภัณฑ์อาหาร มีความสัมพันธ์กับความยาวคลื่น 4 ช่วง คือ 760, 970, 1450 และ 1940 nm ดังนั้นถ้าทำการทดสอบที่ช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวจะสามารถหาความสัมพันธ์ของน้ำภายในตัวอย่างได้ [20]

2.3.3 ส่วนประกอบหลักของเครื่องสเปกโทรมิเตอร์

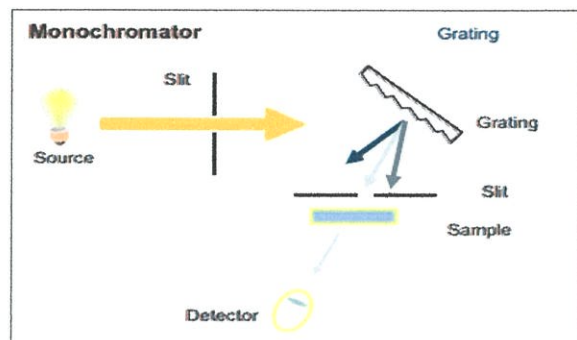
ส่วนประกอบของเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมีลักษณะการจัดการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้ในการออกแบบและความต้องการการใช้งาน โดยทั่วไปวิธีการจัดวางตัวอย่างเพื่อการสแกนด้วยสเปกโทรมิเตอร์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีสะท้อน (Reflectance) เป็นวิธีที่ง่ายต่อการจัดวางตัวอย่าง เมื่อแสงส่องไปยังวัตถุแล้วแพร่ลงไปในเนื้อวัตถุบางส่วนแล้วสะท้อนกลับขึ้นมาสู่ตัวตรวจวัด บางที่เรียกว่า การสะท้อนแบบแพร่ (Diffused reflectance) ในปัจจุบันเนื่องจากมีความสะดวกในการใช้สายไฟเบอร์ออปติก (Fiber optic) การวัดสะท้อนจากวัตถุจึงเป็นแบบ Interactance ซึ่งมีสาย Fiber optic ที่เป็นตัวนำคลื่นที่สะท้อนจากวัตถุกลับไปยังตัวตรวจวัด ซึ่งอยู่ใกล้กัน เรียกว่า Interactance-Reflectance ในงานวิจัยนี้จะศึกษา สเปกโทรมิเตอร์สามเครื่องได้แก่ FT-NIR Spectrometer (Matrix), Long wavelength diode array spectrometer และ Short wavelength diode array spectrometer ซึ่งมีส่วนประกอบหลักดังตารางที่ 2.4 [22]

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบหลักของเครื่องสเปกโทรมิเตอร์แบบต่างๆ [23]

รายละเอียด	FT-NIR spectrometer (Matrix)	Long wavelength diode array spectrometer	Short wavelength diode array spectrometer
ความยาวคลื่น (Wavelength), เลขคลื่น (Wavenumber)	700-2500 nm, 12500-3600 cm^{-1}	1150-2150 nm	600-1100 nm
แหล่งกำเนิดแสง (Light sources)	ทังสเทนฮาโลเจน (Tungsten halogen)	ทังสเทนฮาโลเจน (Tungsten halogen)	ทังสเทนฮาโลเจน (Tungsten halogen)
เครื่องวัดแสง (Detector)	PbS (Lead sulphide)	InGaAs (Indium Gallium Arsenide) photodiode array	Silicon diode array
ความละเอียดของคลื่น	ปรับได้ตามความต้องการ	7 nm	2 nm



รูปที่ 2.5 หลักการโดยทั่วๆ ไป (ผ่าน Filter) [24]



รูปที่ 2.6 หลักการโดยทั่วๆ ไป ผ่าน Grating [24]

2.3.3.1 FT-NIR spectrometer (Matrix) [25]

เครื่อง Fourier Transform Near Infrared Spectrophotometer, FT-NIR

Spectrophotometer พร้อมอุปกรณ์ประกอบ สำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวอย่างแบบต่างๆ เช่น อาหาร อาหารสัตว์ น้ำมันพืช น้ำมันปิโตรเลียม โพลีเมอร์ พลาสติก และสารไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น ตารางที่ 2.5 แสดงคุณลักษณะทางเทคนิค ของ FT-NIR Spectrometer (Matrix, Bruker, Germany)

คุณสมบัติที่สำคัญ

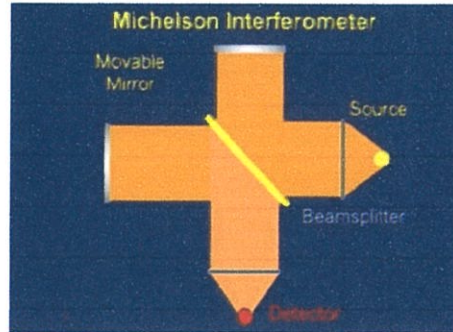
1. ตัวเครื่องต้องสามารถป้องกันการรบกวนจากภายนอก และมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อม ทั้งอุณหภูมิ ความชื้น แรงสั่นสะเทือน แรงกระแทก ฝุ่นละออง เสียง แสงรบกวน เพื่อรองรับการใช้งานในที่โล่งแจ้ง การติดตั้งในกระบวนการผลิต (Process control/ process monitoring)

2. เครื่องต้องมีความเสถียรสูง โดยไม่ต้องปรับตำแหน่งของอุปกรณ์ภายใน (alignment) เพื่อความแม่นยำในการอ่านค่า แม้ในขณะที่อุณหภูมิ ความชื้นเปลี่ยนแปลง หรือมีแรงสั่นสะเทือน เพื่อให้สะดวกต่อการทำงานบนรถ mobile lab หรือในระบบ process

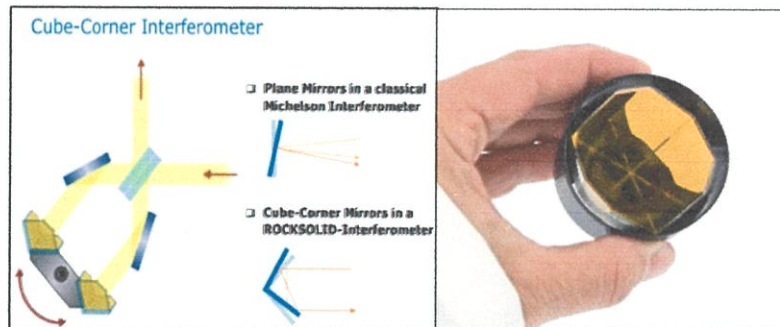
3. เครื่องควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ โปรแกรมควบคุมการทำงานบนระบบ Windows สามารถเชื่อมโยงและควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์เครื่องใดก็ได้ที่มีโปรแกรมการทำงานติดตั้งอยู่ผ่านทาง Ethernet หรือ LAN เพื่อให้ง่ายต่อการส่งผ่านข้อมูล spectrum รวมทั้งสามารถควบคุมด้วย industry standard communication protocols เช่น OPC Server, Modbus หรือ Profibus ฯลฯ

4. มีโปรแกรมสำหรับควบคุมการตรวจวัด (measurement) การสอบเทียบ (calibration) และการคำนวณผล (calculation)
5. มีโปรแกรมสำหรับตรวจสอบความสามารถการทำงานระบบต่างๆของเครื่องโดยอัตโนมัติ (System Diagnostic)
6. มีชุดคำสั่งสำหรับวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ ด้วยวิธีเชิงสถิติ Partial Least Square regression (PLS) โดยผู้ใช้สามารถสร้าง ปรับปรุง หรือเปลี่ยนแปลง calibration model ได้ สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ สามารถสร้าง library ของสารตัวอย่างเองได้ และจำแนกได้ว่า spectrum ของตัวอย่าง (unknown) ที่วิเคราะห์สอดคล้องกับข้อมูลใน database กลุ่มใด (cluster analysis) เพื่อที่จะสามารถเลือกใช้ model ในการประเมินผลที่เหมาะสม ให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ
7. มีชุดคำสั่ง Multi Evaluation สำหรับการเชื่อมต่อการทำงานของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ไปยังการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์ตัวอย่าง (unknown)
8. มีโปรแกรมสำหรับกำหนดระดับความสำคัญของผู้ใช้งาน (user management)
9. โปรแกรมการใช้งานได้รับมาตรฐาน GMP และ 21 CFR Part 11 หรือเทียบเท่า
10. โปรแกรมการทำงานต้องสามารถส่งและรับข้อมูล spectrum ผ่านทาง e-mail และต้องสามารถประมวลผล spectrum ที่รับมาทาง e-mail และแปรผลรายงานค่าได้
11. ใช้ไฟฟ้า 220-230 V ความถี่ 50-60 Hz
12. อุปกรณ์ประกอบ
 - คอมพิวเตอร์ ไม่ต่ำกว่า Intel Core i5 Processor, >3.0 GHz, 4 GB RAM, Monitor LCD 17", Hard Disk 160 GB, DVD-RW พร้อมโปรแกรมควบคุมการวิเคราะห์
13. ใช้ Michelson Interferometer (รูปที่ 2.7) โดยมี Movable mirror เป็นอุปกรณ์ที่ใช้การเลื่อนเข้าออก เพื่อให้แสงแทรกสอดกันแล้วตกมาที่ดีเทคเตอร์จะให้ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน [24]

- ข้อดี
1. ไม่มีช่องให้แสงรอด แสงสามารถส่องผ่านได้เต็มที่
 2. ความยาวคลื่นที่ได้มีความแม่นยำสูง
 3. มีแสงเลเซอร์เป็นตัวที่ใช้ในการเปรียบเทียบค่า
 4. สแกนได้อย่างรวดเร็ว
 5. แสงจะออกในแนวเส้นตรงเดิม (ไม่มีผลของการสั่นสะเทือน) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.7 Michelson Interferometer [24]



รูปที่ 2.8 Cube- Corner Interferometer [24]

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติทางเทคนิคของ FT-NIR Spectrometer (Matrix, Bruker, Germany)[25]

รายละเอียด	Matrix , Bruker, Germany
ช่วงการอ่าน (Spectral Range)	12,800 – 4,000 cm^{-1}
ความละเอียดสูงสุดในการวัด (Maximum Resolution)	2 cm^{-1} (0.3 nm @ 1,250 nm)
ความแม่นยำ (Wavenumber Reproducibility)	0.04 cm^{-1} (0.01 nm @ 1,390 nm)
ค่าความถูกต้องของคลื่นแสง (Wavenumber Accuracy)	0.1 cm^{-1} (0.02 nm @ 1,390 nm)
แหล่งกำเนิดแสง	Tungsten Halogen; อายุการใช้งานมากกว่า 9,000 ชม.
ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector)	High sensitivity, thermoelectric cooled and temperature-controlled InGaAs diode
ตัวแยกแสง (Beamsplitter)	Quartz substrate with proprietary coating
อุปกรณ์แทรกสอด (Interferometer)	Michelson Type โดยใช้เทคโนโลยี Cube corner ซึ่งสามารถป้องกันการสูญเสียของพลังงานแสง อันเกิดจากการเบี่ยงเบนของแสง เช่นการสั่นสะเทือน การเปลี่ยนอุณหภูมิ
ระบบตรวจสอบตัวเอง (Validation System)	มีระบบตรวจสอบความถูกต้องของการวัดภายในเครื่อง (IVU: Internal Validation Unit)
ช่องทางการวิเคราะห์ตัวอย่าง	- หัวอ่านตัวอย่างแบบไม่สัมผัสตัวอย่าง (Emission Head) สำหรับตัวอย่างของแข็ง พร้อมอุปกรณ์การวัด background อัตโนมัติ - ความยาวสายไฟเบอร์ 5 เมตร



รูปที่ 2.9 หัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) [26]

2.3.3.2 Long wavelength diode array spectrometer [27]

ด้วยการออกแบบขั้นสูงเคลือบฟิล์มบางและเทคโนโลยีการผลิต Linear Variable Filter (LVF), JDSU ได้สร้าง Micro NIR Spectrometer แบบพิเศษกะทัดรัดน้ำหนักเบาใช้ต้นทุนต่ำ โดย LVF คือการเคลือบตัวกรองของ Bandpass ที่แยกคลื่นในทิศทางหนึ่ง เนื่องจากความยาวคลื่นศูนย์กลางของ bandpass เปลี่ยนแปลงตามความหนาของการเคลือบ ความยาวคลื่นส่งผ่านตัวกรอง (Filter) จะแปรผันตรงแบบเชิงเส้นกับทิศทางการแยกคลื่น เซ็นเซอร์ของ JDSU ใช้ LVF คู่กับอาร์เรย์ของเครื่องตรวจจับเชิงเส้นเพื่อให้ข้อมูลสเปกตรัมสำหรับการใช้งานที่หลากหลายในเชิงพาณิชย์ อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์

คุณสมบัติที่สำคัญ

1. ขนาดกระทัดรัด: เส้นผ่านศูนย์กลาง 45 มม. x สูง 42 มม.
2. น้ำหนักเบา: <60 กรัม
3. เป็นการออกแบบที่แข็งแกร่ง; ไม่มีชิ้นส่วนที่เคลื่อนไหว
4. แหล่งกำเนิดแสงและตัวเก็บเชิงแสงแบบบูรณาการ
5. ช่วงความยาวคลื่น:
 - 1150-2150 nm
 - ช่วงที่กำหนดเองได้
6. สะท้อนแบบแพร่หรือการส่องผ่าน
7. สามารถปรับแต่งได้ง่าย
8. ขับเคลื่อนระบบ USB

ตารางที่ 2.6 Specification for Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) [27]

Parameter	Specification
Illumination source	Two integrated vacuum tungsten lamps
Bulb life	>18,000 hours
Illumination geometry	Flood Illumination/0 observer
Input aperture dimension	2.5*3.0 mm
Sample working plane	3 mm from window
Dispersing element	Linear variable filter
Detector	128-pixel uncooled InGaAs photodiode array
Pixel size/pitch	30*250 um/50 um
Spectral bandwidth (FWHM)	<1.25% of center wavelength. For example, at 1000 nm, the resolution is 12.5 nm
Analog to digital converter	16 bit

ตารางที่ 2.6 Specification for Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) (ต่อ) [27]

Parameter	Specification
Dynamic range (max)	1000:1
Measurement time (typical)	0.5 sec
Integration time	Minimum 10 us; maximum limited by dark signal
Interface	USB 2.0, high speed (480 Mbps)
Dimensions	45*42 mm
Weight	2.0 oz (<60g)
Operating environment	-20 to 40 °C, non – condensing
Storage environment	-40 to 70 ° C, non – condensing
Power requirement	USB powered (<500 mA @ 5 V)
CE Mark	Yes
Environmental qualification	
Shock and vibration	Mil-PRE-28800F Class 2
Temperature and humidity	Mil-PRE-28800F Class 3
Package drop test	ISTA 2A

2.3.3.3 Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR GUN, Fantec, Japan) [28]

ตัวตรวจวัดดีเทคเตอร์ในเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm ใช้ Si (Silicon) เป็นตัวตรวจรู้คลื่น มีการประยุกต์ใช้ Short wavelength diode array spectrometer ซึ่งปกติเป็นแบบสะท้อนแบบแพร่

คุณสมบัติที่สำคัญ

1. ขนาดกะทัดรัด: เส้นผ่านศูนย์กลาง 220x 225x85 มม.
2. น้ำหนักเบา: 750 กรัม
3. วิธีการวัด: แบบ Interactance

ตารางที่ 2.7 Specification for Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) [28]

Name	FQA-NIR Gun (Fruit Quality Analyzer)
Measurement method	Interactance mode
Detector	Silicon diode array
Wavelength region	600-1100 nm
Interval	2 nm
Lamp	Small size halogen lamp
Integral time	6-100 msec
Measurement time	Approximately 1 second (depending on integral time)
PC Interface	RS-232c Cable
Operating range	Temperature: 10-35 °C, Relative humidity: 25-80%
Battery	Built-in battery for AC 110 V electricity (connection to AC 220 V is available through adaptor), 2000 measurements per one charge
Dimension	220 (H) × 225 (L) × 85 (W)
Weight	750 g
Accessory	RS-232 Cable, Brief case, neck strap, battery charger (for 110 V), lens cleaner
Software	Software for controlling the hardware and to perform calibration (working in Windows98/2000/Me/XP)
Material to be measured	Fruit, fish, Vegetable
Material that could not be used	Liquid

2.3.4 การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์โดยวิธีทางคณิตศาสตร์

เป็นวิธีการจัดการข้อมูลเบื้องต้นเป็นพารามิเตอร์ของแบบจำลองที่สำคัญ ที่มีจุดประสงค์เพื่อสร้างแบบจำลองของสเปกตรัมในทางที่อัลกอริธึม Partial least squares (PLS) สามารถให้ความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างสเปกตรัมกับข้อมูลปริมาณฮิสตามีน

2.3.4.1 ไม่มีการจัดการข้อมูลเบื้องต้น: ไม่มีการจัดการข้อมูลเบื้องต้น

2.3.4.2 การลบโดยค่าคงที่ (Subtraction of a Constant Offset)

สเปกตรัมจะถูกปรับแบบเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่ต่ำสุดมีค่าเท่ากับศูนย์

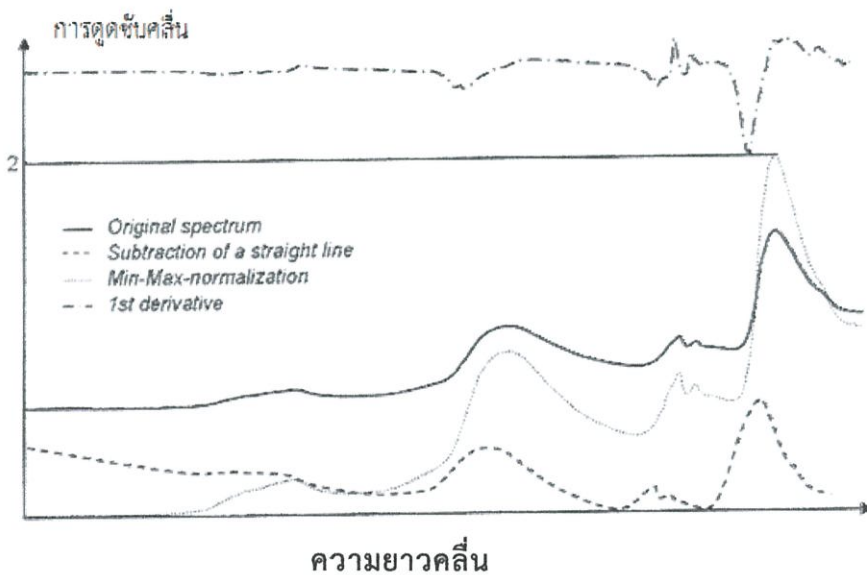
การใช้งาน: เป็นการกำจัดปัญหาการขยับขึ้นของเบสไลน์ (Baseline Shift) ซึ่งเส้น สิ่งเหล่านี้เกิดจากเช่น จากค่าที่แตกต่างกันของการขยายสัญญาณของดีเทคเตอร์ (Detector Amplification)

2.3.4.3 การลบโดยเส้นตรง (Subtraction of a Straight Line)

ในแต่ละช่วงความถี่ที่เลือกไว้ เส้นตรงเส้นหนึ่งจะถูกฟิตเส้นสเปกตรัมโดยใช้วิธี partial least squares (PLS) เส้นตรงเส้นนี้จะถูกลบออกจากสเปกตรัมดังกล่าว

การใช้งาน: กำจัดปัญหาความเอียงเชิงเส้นของการขยับขึ้นของเบสไลน์ (ดูรูปที่ 2.10)

[20]



รูปที่ 2.10 NIR สเปกตรัมของมือคน; วัตถุประสงค์การสะท้อนแบบแพร่ [20]

2.3.4.4 Smoothing [29]

การหาค่าเฉลี่ยโดยการสร้างสมการ Polynomail สำหรับจุดต่างๆ ในสเปกตรัม แล้วหาค่าเฉลี่ยของแต่ละช่วง โดยใช้สมการที่สร้างขึ้น

การใช้งาน : ใช้ในกรณีที่สเปกตรัมเกิดการรบกวน

2.3.4.5 Vector Normalization [20]

ขั้นแรกสเปกตรัมจะถูกหาค่ากลาง จากนั้นผลรวมของค่ายกกำลังสองของค่า Y ทั้งหมด จะถูกคำนวณ และสเปกตรัมใดๆจะถูกหารด้วยค่ารากที่สองของผลรวมนี้ สิ่งนี้เรียกว่า Vector norm ของสเปกตรัมที่ได้จะเท่ากับ 1 เสมอ

การใช้งาน : ในหลักการ สเปกตรัมจะประกอบด้วยสองส่วนของข้อมูล คือความสูงของแถบการดูดซับและโครงสร้าง หลังจากการนอร์มัลไลเซชัน (Normalization) ข้อมูลความสูงจะหายไป มีเพียงโครงสร้างข้อมูลยังคงอยู่ Normalization ถูกใช้เพื่อ เช่นการกำจัดผลกระทบของเส้นทางผ่านเชิงแสง (Optical Path Length) ที่แตกต่างกัน ในกรณีของการวัดแบบส่องผ่าน ความยาวของเส้นทางผ่านเชิงแสงทำให้ความสูงของสัญญาณเปลี่ยนแปลง แต่โครงสร้างยังเหมือนเดิม ในทำนองเดียวกันการวัดแบบสะท้อนแบบแพร่จะมีผลกระทบของการรบกวนเนื่องจากความหนาแน่นของวัสดุแตกต่างกันหรือขนาดอนุภาคแตกต่างกัน สิ่งเหล่านี้ก็จะลดลง

2.3.4.6 Multiple Scatter Correction (MSC): แบบ Full MSC [20]

เป็นการหาสเปกตรัมใหม่ที่ใช้แก้ปัญหาการเลื่อนขึ้น (Baseline shift) ของสเปกตรัม และปัญหามุมเอียงที่ไม่เท่ากันของสเปกตรัมที่เกิดขึ้น เนื่องจากการกระเจิงของแสง (Scatter effect) หรือความไม่เสถียรของเครื่องกำเนิดแสง (ปัญหาจากเครื่องมือ/อุปกรณ์ หรืออุณหภูมิห้อง)

$$X = \frac{x - a}{b}$$

เมื่อ	X	คือ ค่าจุดใหม่
	X	คือ ค่าจุดเดิม
	a	คือ ค่าคงที่ ที่ใช้การแก้ปัญหาการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม
	b	คือ ค่าคงที่ ที่ใช้แก้ปัญหามุมเอียงที่ไม่เท่ากันของสเปกตรัม

การใช้งาน: วิธีการนี้มักจะใช้สำหรับการวัดแบบการสะท้อนแบบแพร่ (Diffuse reflection)

2.3.4.7 Standard Normal Variate (SNV)

เป็นวิธีการกำจัดผลของการกระเจิงของแสง (Scatter effect) เหมือนวิธี MSC โดยใช้สมการ โดยแต่ละค่าในแถวของข้อมูลจะถูกแปลงดังสมการต่อไปนี้

$$X = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

เมื่อ	X	คือ ค่าจุดใหม่
	X	คือ ค่าจุดเดิม
	\bar{x}	คือ ค่าเฉลี่ย
	SD	คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.3.4.8 Derivative

เป็นการแก้ปัญหาการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมด้วยปัจจัยทางกายภาพ
เป็นการหาสเปกตรัมใหม่จากการหา Slope ของสเปกตรัมเดิม

- อนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง (First Derivative)

คำนวณอนุพันธ์ลำดับที่หนึ่งของสเปกตรัม (รูปที่ 2.10)

การใช้งาน: โดยการคำนวณอนุพันธ์ลำดับที่หนึ่ง สัญญาณที่มีความชันจะถูกเน้นมากกว่าสัญญาณที่ค่อนข้างแบนราบ วิธีนี้จะถูกใช้เน้นลักษณะที่ชัดเจน แต่มีค่าน้อย เมื่อเทียบกับโครงสร้างที่มีแถบการดูดซับคลื่นที่กว้าง การประยุกต์ใช้ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ การประเมินแถบการดูดซับคลื่นที่กว้างนี้มักจะทำในเทคโนโลยี NIR โดยการคำนวณอนุพันธ์ โครงสร้างเหล่านี้จะมีรูปร่างที่สูงชันขึ้น ซึ่งสามารถได้รับการประเมินได้ง่ายขึ้น

เมื่อใช้อนุพันธ์เป็นการจัดการข้อมูลเบื้องต้น จะต้องคำนึงถึงว่าสัญญาณรบกวนจะถูกจัดการเช่นกัน สิ่งนี้จะซ้อนทับบนสเปกตรัมเป็นสิ่งรบกวนเพิ่มเติม และสามารถทำให้สัญญาณของตัวอย่างเลวลง

- อนุพันธ์ที่สอง (Second Derivative)

คำนวณอนุพันธ์อันดับสองของสเปกตรัมนั้น

การใช้งาน: เมื่อเทียบกับอนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง แม้โครงสร้างที่ราบเรียบมากๆ สามารถประเมินได้ ผลการรบกวนของสัญญาณรบกวน ซึ่งโดยทั่วไปมีมากจนทำให้สเปกตรัมถูกวิเคราะห์ในช่วงสเปกตรัมที่จำกัดมากๆ

2.3.4.9 Normalization [29]

สเปกตรัมจะถูกขยับเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่ต่ำสุดมีค่าเท่ากับศูนย์ แล้วสเปกตรัมจะถูกขยายเพื่อให้ค่า Y สูงสุดเท่ากับสองหน่วยของการดูดซับคลื่น (รูปที่ 2.10)

คือการจัดการทางคณิตศาสตร์ด้วยค่าคงที่ ซึ่งมี 3 วิธี คือ

- Mean Normalization

$$X_{(i,k)} = \frac{X_{(i,k)}}{|\text{Mean}(X_{(i,*)})|}$$

- Max Normalization

$$X_{(i,k)} = \frac{X_{(i,k)}}{|\text{Max}(X_{(i,*)})|}$$

- Range Normalization

$$X_{(i,k)} = \frac{X_{(i,k)}}{|\text{Max}(X_{(i,*)}) - \text{Min}(X_{(i,*)})|}$$

เมื่อ	X	คือ ค่าตัวแปรที่ตำแหน่งใดๆ
	i	คือ หมายเลขตัวอย่าง
	k	คือ ความยาวคลื่น ณ ตำแหน่งนั้น
	*	คือ ความยาวคลื่นทุกๆความยาวคลื่นในสเปกตรัม

การใช้งาน: เทียบได้กับ Vector Normalization

2.3.4.10 Baseline offset [29]

เป็นการแก้ปัญหาการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม ซึ่งจะขยับสเปกตรัมให้เลื่อนมาอยู่ ณ จุดๆ หนึ่ง ซึ่งเป็นไปตามสมการดังนี้

$$f(x) = x - \text{Min}(x)$$

เมื่อ	x	คือ ค่าของตัวแปรใดๆ ในสเปกตรัม
	X	คือ ค่าของตัวแปรทั้งหมดในสเปกตรัม

จากรูปที่ 2.10 แสดงให้เห็นอิทธิพลของวิธีการจัดการข้อมูลเบื้องต้นแบบต่างๆ ต่อลักษณะของ NIR-สเปกตรัม (การวัดมือคนด้วยหัววัดไฟเบอร์ออปติก) สเปกตรัมเดิมแสดงให้เห็นการขจัด (Offset) เล็กน้อยของเบสไลน์ เช่นเดียวกับการขยับขึ้น (Drift) การขยับขึ้นนี้สามารถถูกกำจัดโดยการลบออกจากเส้นตรง (Subtraction of a Straight Line) (เส้นประ) และการขจัดถูกกำจัดโดยการ Min-Max Normalization (เส้นจุด) อนุพันธ์อันดับที่หนึ่งของเส้นสเปกตรัมเดิม (เส้นประ-จุด) ถูกขยายเพื่อแสดงให้ดูง่ายและขยับขึ้นสู่ตำแหน่งที่ค่าการดูดซับคลื่นสูง สามารถสังเกตเห็นโครงสร้างที่แหลมขึ้นมาได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมเดิม

วิธีที่เหมาะสมที่สุดขึ้นอยู่กับระบบที่จะวิเคราะห์ จากประสบการณ์แสดงให้เห็นว่าในหลายกรณีการลบด้วยเส้นตรง การนอร์มัลไรเซชันสเปกตรัมหรือการทำอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งได้ผลดีที่สุดในการ Calibration ในบางกรณีการใช้วิธีการจัดการข้อมูลเบื้องต้น 2 วิธีรวมกันก็ได้ผลดีที่สุดเช่นกัน บ่อยครั้งที่แบบจำลองแบบต่างๆ ให้ผลได้ดีเท่าเทียมกันซึ่งโดยทั่วไปควรทดสอบดูหลายวิธีเปรียบเทียบกัน [20]

2.3.5 การเลือกจำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสม [20]

ใน PLS regression ข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลความเข้มข้นจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นรูปแบบของเมทริกซ์และลดลงเป็นแฟคเตอร์จำนวนไม่มาก จำนวนแฟคเตอร์ ในแบบจำลองเคโมเมตริกจะถูกเรียกว่า “rank” การหาจำนวน rank มีความสำคัญกับคุณภาพในการวิเคราะห์

การเลือกจำนวนแฟคเตอร์ที่น้อยเกินไปจะนำไปสู่การอธิบายที่ไม่เพียงพอเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงในข้อมูลสเปกตรัมและความเข้มข้น (“under fitting”) มีเพียงความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อย ระหว่างสองชุดข้อมูลและผลจากการวิเคราะห์จากแบบจำลองนี้จะไม่เพียงพอ ถ้าเลือกแฟคเตอร์จำนวนมากเกินไปแบบจำลองจะพยายามที่จะคิดรวมแม้การเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดในชุดข้อมูล เช่นสัญญาณรบกวนในสเปกตรัม (“over fitting”) วิธีนี้ข้อมูลสเปกตรัมที่ไม่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างจะถูกรวมอยู่ในแบบจำลอง แบบจำลองเหล่านี้จะมีความผิดพลาดของผลการวิเคราะห์ ดังนั้นทุกๆ

แบบจำลอง PLS มีจำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสมซึ่งรับประกันว่ามีความผิดพลาดน้อยที่สุดที่เป็นไปได้ในการวิเคราะห์

มีแนวทางหลายอย่างนำไปสู่การหาจำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับแบบจำลอง บางอย่างเป็นค่าเฉลี่ยของความผิดพลาดของการทำนาย RMSECV ของการพิสูจน์แบบไขว้หรือ RMSEP ของการพิสูจน์แบบชุดทดสอบ) ต้องมีค่าต่ำสุดจึงจะได้จำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสม ในทางตรงข้ามค่าของสัมประสิทธิ์ของการพิจารณา R^2 มีค่าสูงสุด ดังนั้นจำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับแบบจำลองสามารถหาได้อย่างง่ายดาย: ขั้นที่ 1 คำนวณค่า R^2 และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยของการทำนาย จากนั้นพล็อตค่าเหล่านี้โดยให้แกนนอนเป็นจำนวนแฟคเตอร์ จำนวนแฟคเตอร์ที่เหมาะสมเมื่อมีค่าตามที่กล่าวมามีค่าที่เหมาะสม (น้อยสุด) และ / หรือจะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีจำนวนแฟคเตอร์สูงขึ้น ถ้ามีจำนวนแฟคเตอร์ที่มากและได้ผลการทำนายที่ดีเหมือนกับที่มีจำนวนแฟคเตอร์น้อย จะแนะนำให้เลือกแบบจำลองที่มีจำนวนแฟคเตอร์น้อยสุด

ข้อควรระวัง: การพิสูจน์วิธีการเป็นไปได้เฉพาะการใช้สเปกตรัมของชุดตัวอย่างที่เป็นอิสระ นั่นคือสเปกตรัมต้องไม่เป็นส่วนหนึ่งของชุดข้อมูลคาลิเบรชัน ซึ่งถ้าเป็นการพิสูจน์แบบไขว้ตัวอย่างทั้งหมดที่ถูกวัดแต่ละตัวอย่างจะถูกดึงออกจากชุดคาลิเบรชัน “leave-out spectra” ในกรณีของการพิสูจน์แบบชุดทดสอบตัวอย่างใหม่จะถูกวัดเพื่อเป็นชุดทดสอบ

2.3.5.1 การสร้างสมการโดยวิธี partial least square regression (PLS-Regression)

[20]

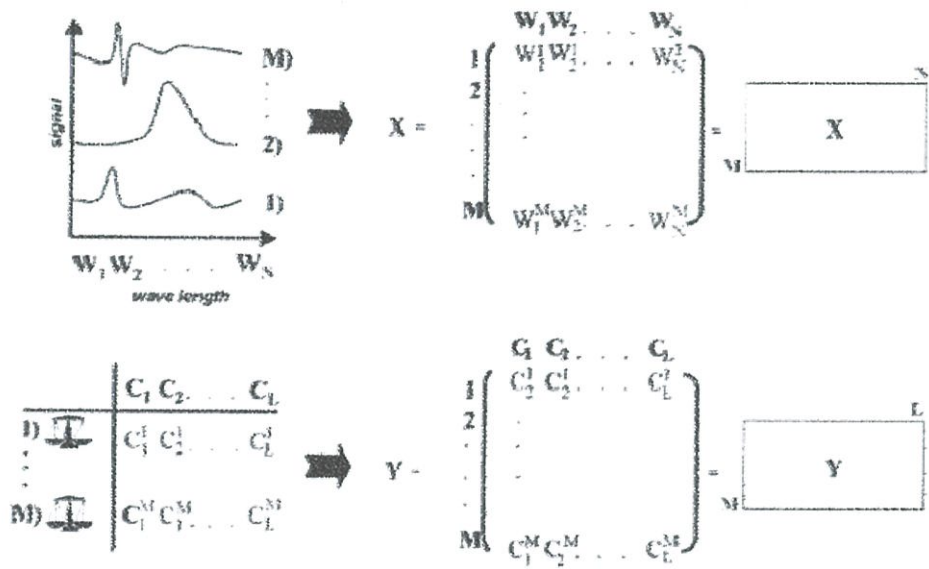
การเปรียบเทียบวิธีการทางเคโมเมทริกซ์ที่ใช้ในเคมีวิเคราะห์สามารถพบได้ในอัลกอริธึมของ PLS ถูกสร้างขึ้นเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้มากที่สุด ดังนั้นจะอธิบายวิธีนี้เท่านั้น เนื่องจากขอบเขตและความซับซ้อนทางคณิตศาสตร์ของคำอธิบายทั้งหมดจะไม่ได้แสดงไว้ให้อ่านเพิ่มเติมที่

เพื่อที่จะทำ PLS-Regression ของระบบใดๆ ข้อมูลของสเปกตรัมของสารต้องถูกเปรียบเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นของสารนั้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งในโครงสร้างข้อมูลทั้งสองต้องได้รับการยอมรับและมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน

สำหรับวัตถุประสงค์นี้จำเป็นต้องวัดตัวอย่างจำนวนมาก สำหรับการแสดงผลทางคณิตศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงทั้งในชุดข้อมูลทั้งสองจะต้องเขียนเมทริกซ์ของข้อมูล (ดูรูป 2.11) และ ไอเกนเวคเตอร์ ของข้อมูลเหล่านั้นจะถูกสร้างขึ้น ไอเกนเวคเตอร์เหล่านี้เรียกว่าแฟคเตอร์หรือองค์ประกอบเบื้องต้น ซึ่งสามารถใช้สำหรับการทำนายความเข้มข้นแทนสเปกตรัมดั้งเดิมเนื่องจากมันมีข้อมูลที่เกี่ยวข้องทั้งหมดของระบบที่ศึกษา

การลดตัวแปรนี้มีประโยชน์อย่างชัดเจน ข้อมูลที่เกี่ยวข้องเชิงการวิเคราะห์จากชุดข้อมูลขนาดใหญ่ได้ถูกบีบอัดเป็นแฟคเตอร์ซึ่งจะถูกใช้สำหรับการคาลิเบรชัน

ในกรณีของคาลิเบรชัน PLS ไอเกนเวกเตอร์จะถูกเก็บโดยเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย แพคเตอร์ แรกบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงหลักของสเปกตรัม มีความสำคัญที่มากที่สุดสำหรับแบบจำลองคาลิเบรชัน และเมื่อจำนวนแพคเตอร์เพิ่มขึ้นแม้แต่การเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในโครงสร้างข้อมูลก็จะถูกบ่งชี้ ซึ่งมีผลสำคัญที่ตามมาของการประเมินสเปกตรัม นั่นคือจำนวนแพคเตอร์ที่น้อยลงส่วนใหญ่จะบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของโครงสร้างของสเปกตรัม ขณะที่จำนวนแพคเตอร์ที่สูงขึ้นส่วนใหญ่จะแสดงถึงส่วนที่เป็นสัญญาณรบกวนของสเปกตรัม



รูปที่ 2.11 ข้อมูลสเปกตรัมและความเข้มข้นในรูปแบบเมทริกซ์ ในตัวอย่างนี้มีตัวอย่างคาลิเบรชัน M ตัวอย่างที่วัดและ - ในขั้นตอนที่สอง - N ความยาวคลื่นทั้งหมดของผลสเปกตรัมจะถูกเขียนในแถว (M, N) เมทริกซ์ เมทริกซ์นี้จะเทียบเท่ากับข้อมูลสเปกตรัมเมทริกซ์ X . ในทางเดียวกัน ค่าองค์ประกอบทั้งหมด L จะเขียนลงไปใน (M, L) เมทริกซ์ของข้อมูลความเข้มข้น [20]

การเลือกจำนวนแพคเตอร์ที่เหมาะสมเป็นความสำคัญกลางสำหรับคุณภาพของแบบจำลอง PLS ถ้ามีจำนวนแพคเตอร์น้อยเกินไปโครงสร้างสเปกตรัมจะไม่ถูกรับรู้เพียงพอ regression ที่เกี่ยวข้องจึงไม่สามารถนำไปสู่การผลการวิเคราะห์ที่น่าพอใจ นั่นคือแบบจำลอง “underfitting”

ถ้าจำนวนแพคเตอร์มีมาก การวิเคราะห์ก็จะมีปัญหา เนื่องจากมีสัญญาณรบกวนเชิงสเปกตรัมหลายส่วนมากเกินไป (Overfitting)

ใน PLS regression ข้อมูลสเปกตรัมเมทริกซ์ X และข้อมูลความเข้มข้นเมทริกซ์ Y ถูกลดเหลือเพียง 2-3 แพคเตอร์ เมทริกซ์ดั้งเดิมจึงแสดงเป็นผลรวมของ A ผลคูณของสิ่งที่เรียกว่า scores vector t_i กับ loading vector p_i หรือ q_i ตามลำดับ

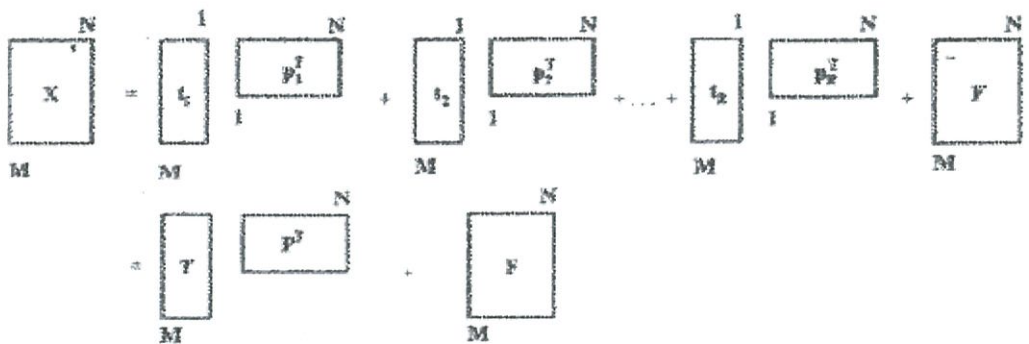
ข้อมูลสเปกตรัม:

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + t_3 p_3^T + \dots + t_R p_R^T + F$$

ข้อมูลความเข้มข้น:

$$Y = t_1 q_1^T + t_2 q_2^T + t_3 q_3^T + \dots + t_R q_R^T + G$$

ในทุกกรณี score และ loading จะแสดงเป็น vector ดูจากรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 Schematic diagram for the factorization of the spectral data matrix X [20]

ค่า R แสดงถึง จำนวน factor และ T หมายถึง Transpose ของแต่ละ loading vector F และ G คือ เมทริกซ์ของ error (Residual matrices) ของ ข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลความเข้มข้น ตามลำดับ ค่าเหล่านี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของข้อมูล ซึ่งไม่ได้คำนึงถึงในการสร้างแพคเตอร์ (Factorization)

โดยทั่วไป จำนวนสำหรับการดูซ้ำที่ได้จากการวัดจะมากกว่าตัวเลขขององค์ประกอบที่แสดงให้เห็น ดังนั้นระบบนี้คือ “over-determined” และจึงสามารถไม่เพียงแต่จะสร้างความสัมพันธ์กับจุดของข้อมูลสเปกตรัมจุดเดียว (เช่น จุดสูงสุดของการคาลิเบรชันแบบตัวแปรเดียว) แต่ยังมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมด ข้อมูลชุดคาลิเบรชันด้วยวิธีนี้จะมีค่า

ข้อมูลที่ได้มากกว่าการคาลิเบรชันด้วยวิธีตัวแปรเดียวมาก นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะหาตัวแปรที่ผิดปกติ ในระหว่างการวิเคราะห์และสามารถตัดสินใจได้ว่าองค์ประกอบของสิ่งรบกวนที่ไม่รู้จักค่า ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับชุดของข้อมูล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมตรงข้ามกับการคาลิเบรชันแบบตัวแปรเดียว เป็นไปได้ที่จะใช้ข้อมูลเชิงสเปกตรัมของด้านข้างของพีค ซึ่งสามารถวิเคราะห์สเปกตรัมได้โดยโครงสร้างของสเปกตรัมเอง ด้วยเหตุนี้แถบการดูดซับที่ซ้อนทับกัน (overlapping bands) สามารถที่จะแยกออกจากกันได้ ในสเปกตรัม トラบใดที่มีความแปรปรวนในรูปร่างของสเปกตรัมน้อย⁶ ในทำนองเดียวกันสามารถรับรู้ถึงโครงสร้างของสเปกตรัมบริเวณที่มีสัญญาณรบกวนมากได้ ซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงการทำนายความเข้มข้นสารให้แม่นยำ

ใน PLS regression เบื้องต้นข้อมูลจะถูกทำให้เป็นองค์ประกอบหลัก (Principal Components) แล้วจะคำนวณหา scores vectors จากข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลความเข้มข้น ซึ่งวิธีการจะครอบคลุม (Robust) ต่อความไม่ถูกต้องของค่าการวัดค่าอ้างอิงและการวัดค่าตัวอย่าง

ความสำคัญพิเศษของ PLS regression สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี เกิดจากการสร้างแฟกเตอร์ (Factorization) ของข้อมูล X และ Y โดยไม่เป็นอิสระต่อกันและเกิดขึ้นพร้อมกัน เมื่อประเมินสเปกตรัมของการดูดซับสามารถที่จะประมาณว่าการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสเปกตรัมมีต้นกำเนิดจากความแปรปรวนของความเข้มข้นที่สอดคล้องกัน นั่นหมายความว่า การเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสเปกตรัมควรจะไปสู่การเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกันของสเปกตรัม เพราะฉะนั้น scores vectors ของเมทริกซ์ของข้อมูลความเข้มข้นและข้อมูลสเปกตรัมควรจะเหมือนกัน อย่างไรก็ตามในกรณีของตัวอย่างจริง ถ้าเมทริกซ์นั้นถูกลดขนาดลงโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์อย่างบริสุทธิ์ (นั่นคือเป็นอิสระ) ค่าความผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่างและในวิธีอ้างอิงที่ใช้ในการวัดค่าความเข้มข้นและการเกิดดริฟท์ (Drift) ของเครื่องวัดและสัญญาณรบกวนในสเปกตรัมจะก่อให้เกิดความแตกต่างของ scores vectors ดังนั้นในวิธี PLS จะสมมุติว่า scores vectors ที่เหมือนกัน (Identical) สำหรับชุดข้อมูลทั้งสองที่จำนวนแฟกเตอร์ใดๆ ซึ่งจะถูกเลือกเมื่อค่าความคลาดเคลื่อนจากค่าเริ่มต้นมีค่าน้อยที่สุด เป็นการประนีประนอมระหว่างความเหมาะสมของแฟกเตอร์ที่ใช้ในการอธิบายตัวอย่างและความสัมพันธ์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างชุดข้อมูล

อัลกอริธึมที่มีชื่อว่า PLS1 เพียงแค่นำ ค่าความเข้มข้นของเพียงหนึ่งองค์ประกอบทางเคมีมาพิจารณา ข้อมูลอื่นๆ ทั้งหมดจะถูกตีความว่าเป็นสิ่งรบกวน นั่นคือ Y-เมทริกซ์ของข้อมูลความเข้มข้นเป็นเวกเตอร์เดียว ส่วนในอัลกอริธึม PLS2 ความเข้มข้นขององค์ประกอบทุกอย่างในระบบจะถูกนำมาพิจารณาในการคาลิเบรชัน สำหรับการทำนายตัวอย่างใหม่แบบจำลองนี้ไปสู่การวิเคราะห์องค์ประกอบทุกอย่างในเวลาเดียวกัน ตรงกันข้ามการคาลิเบรชันแบบ PLS1 ข้อมูลทั้งหมดของเมทริกซ์ความเข้มข้นจะถูกนำสัมพันธ์กันกับข้อมูลสเปกตรัมเมทริกซ์ โดยทั่วไปแล้ว การทำนายแบบ PLS2 จะให้ผลลัพธ์ที่เร็วกว่าการทำนายแบบ PLS1 จากเหตุผลดังกล่าวโดยทั่วไปจึงแนะนำให้ใช้อัลกอริธึม PLS1 ในการวิเคราะห์ระบบที่มีหลายองค์ประกอบ อัลกอริธึมแบบนี้ก็สามารถถูกนำมา

ประยุกต์ใช้อย่างประสบความสำเร็จในทุกองค์ประกอบ ดังนั้นแบบจำลองที่สำหรับทุกองค์ประกอบที่ต้องการจะถูกสร้างขึ้นเช่นเดียวกับแบบอัลกอริธึม PLS2

2.3.5.2 การทำ Validation แบบ Full cross validation [20]

Full cross validation เป็นการทดสอบภายในกลุ่มตัวอย่าง (internal validation) โดยตัวอย่างที่นำมาทดสอบสมการ คือ ตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้สร้างสมการทำนายค่าทางเคมี โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ ตัดตัวอย่างที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการทำนายค่าทางเคมี จากนั้นใช้ตัวอย่างที่เหลือทำการคำนวณหาสมการ เมื่อได้สมการแล้ว จึงนำตัวอย่างที่ 1 มาทดสอบสมการ ขั้นต่อไปใส่ตัวอย่างที่ 1 กลับคืน และตัดตัวอย่างที่ 2 ออกจากชุดตัวอย่าง แล้วจึงสร้างสมการทำนายค่าทางเคมี นำสมการที่ได้จากการทำนายของตัวอย่างที่ 2 ทำขั้นตอนข้างต้นซ้ำ

จนกระทั่งหาค่าทางเคมีของตัวอย่างครบทั้งชุด ดังนั้นตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นจะถูกตัดออกจากชุดตัวอย่าง 1 ครั้งเท่านั้น ทำการหาค่า RMSECV (root square error of cross validation)

2.3.6 สัมประสิทธิ์ที่ใช้ในการประเมินความแม่นยำและความถูกต้องของแบบจำลองการทำนาย [29]

2.3.6.1 ค่าเฉลี่ย (Mean)

ค่าเฉลี่ยเป็นค่าทางคณิตศาสตร์ของข้อมูลที่ใช้อ้างอิง หรือข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากการวัดสเปกตรัม

2.3.6.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงถึงความเปลี่ยนแปลง หรือความแปรปรวนในข้อมูล

2.3.6.3 ค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (Bias) [31]

เมื่อทำนายค่าตัวแปรที่ต้องการของข้อมูลในชุดตัวอย่างทดสอบแบบจำลอง (Prediction set) ค่า Bias หมายถึงความแตกต่างระหว่างค่าจากการวัดด้วยวิธีอ้างอิงและค่าที่ทำนายโดยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีและเป็นการวัดความแม่นยำโดยรวมของแบบจำลอง (Calibration model) ในโลกความเป็นจริงของทางการค้าและอุตสาหกรรม Bias เป็นหนึ่งในสิ่งที่

สำคัญมาก ในทางสถิติ Bias สามารถเกิดขึ้นได้แม้เมื่อค่าสถิติสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์และ SEP ที่แสดงว่าแบบจำลอง นั้นดีเยี่ยม

2.3.6.4 สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Coefficient of correlation, R)

สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R) แสดงระดับซึ่งข้อมูล 2 ชุด (ข้อมูลตัวเลข X และ Y ในที่นี้ ข้อมูล X คือข้อมูลจากการวัดด้วยวิธีอ้างอิง ข้อมูล Y คือข้อมูลจากการวัดด้วยวิธีเนียร์อินฟราเรด-สเปกโทรสโกปี) สอดคล้องซึ่งกันและกัน ความสอดคล้องที่สมบูรณ์จะไม่มี ความแตกต่างกันเลย ระหว่าง 2 ชุดข้อมูล ผลของค่า R จะเท่ากับ 1.00 ในทางปฏิบัติ นั้นเป็นไปได้ และ X และ Y อาจจะมี ความสัมพันธ์เป็นเชิงบวกหรือลบก็ได้

2.3.6.5 สัมประสิทธิ์การพิจารณา (Coefficient of determination, R²)

แสดงสัดส่วนของความแปรปรวนในข้อมูล X ที่สามารถอธิบายโดยความแปรปรวนใน ข้อมูล Y ค่าของ R² จะเป็นบวกเสมอ เช่น ถ้า R = 0.97 แล้ว R² = 0.941 หมายความว่า 94.1% ของความแปรปรวนในข้อมูล X และ 5.9% ของความแปรปรวนในข้อมูล X เกิดขึ้นจากตัวแปรอื่น เช่นการเตรียมตัวอย่าง วิธีการทดลองอ้างอิง และอื่นๆ ค่า R² เป็นบวกเสมอโดยไม่คำนึงถึง เครื่องหมายของ R ในทางปฏิบัติ R² ให้ข้อมูลมากกว่า R และใช้กันมากกว่า R การแปลความหมาย ของค่า R และ R² แสดงดังตารางที่ 2.7 R² คำนวณได้จาก

$$R^2 = \left[1 - \frac{\sum_1^n (Y_i^{\text{meas}} - Y_i^{\text{pred}})^2}{\sum_1^n (Y_i^{\text{meas}} - \bar{Y})^2} \right] \times 100$$

เมื่อ Y^{meas} คือ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมี
 Y^{pred} คือ ค่าที่ได้จากการทำนายด้วย NIRS
 n คือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางที่ 2.8 การแปลความหมายของค่า R^2 [30]

ค่าของ R^2	การแปลความหมาย
Up to +/- 0.25	ไม่สามารถใช้ได้ในเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
0.26 – 0.49	เป็นความสัมพันธ์ที่แย่ ควรหาเหตุผล
0.50 – 0.64	เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแบบหยาบๆ
0.66 – 0.81	เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกและการประมาณค่าอย่างหยาบๆ
0.83 – 0.90	ใช้ด้วยความระมัดระวังในการประยุกต์ใช้รวมถึงการวิจัย
0.92 – 0.96	ใช้ในการประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่ รวมถึงการประกันคุณภาพ
0.98+	ดีเยี่ยม ใช้ได้กับทุกการประยุกต์ใช้

3.6.6 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของแบบจำลอง (Standard error of calibration, SEC) [29]

SEC เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และค่าอ้างอิงในชุดข้อมูลแคลิเบรชัน [29]

2.3.6.7 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) [29]

SEP เป็นค่าที่แสดงสมรรถนะของการทำนาย ซึ่งเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และค่าอ้างอิงของชุดข้อมูลทดสอบแบบจำลอง

2.3.6.8 ค่ารากที่สองของความผิดพลาดเฉลี่ยยกกำลังสองของการพิสูจน์แบบไขว้ (root mean squared error of cross validation; RMSECV) Cross-validation สามารถใช้ตัวอย่างชุดเดียวกันกับที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อการทำการพิสูจน์แบบจำลอง (Validation) สิ่งนี้ทำโดยชักตัวอย่างออกหนึ่งตัวอย่างหรือกลุ่มของหลายตัวอย่างจากชุดสร้างแบบจำลองและสร้างแบบจำลองด้วยตัวอย่างที่เหลืออยู่ แล้วทำนายตัวอย่างที่ถูกกำจัดออกไปและบันทึกค่าความผิดพลาด แล้วนำตัวอย่างที่ถูกกำจัดออกไปนั้นกลับมาแล้วชักตัวอย่างอื่นออกไปและทำซ้ำกระบวนการจนกระทั่งตัวอย่างทั้งหมดถูกใช้ในการพัฒนาแบบจำลองและทำนาย จะไม่มีตัวอย่างที่ถูกทำนายถูกใช้ในการพัฒนาแบบจำลองซึ่งได้ใช้ในการทำนาย ถ้าเอาออกเพียงทีละ 1 ตัวอย่างจะเรียกว่า “Full” หรือ “One-out” cross-validation ถ้านำชุดตัวอย่าง (จำนวนหลายตัวอย่าง) ออกจะเรียกว่า “Segmented” cross-validation ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีและค่าจากการวัดด้วยวิธีอ้างอิงของชุดสร้างแบบจำลองคือ RMSECV วิธีพิสูจน์นี้เหมาะที่จะใช้กับข้อมูลที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยๆ เช่น น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง RMSECV คำนวณได้จากสมการ

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_1^n (Y_i^{\text{meas}} - Y_i^{\text{pred}})^2}$$

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในปลาหมึกหลากหลาย จาก Lin et al. (2003) ได้ศึกษาการทำนายปริมาณโซเดียมคลอไรด์ของชิ้นส่วนปลาแซลมอนรมควันในเชิงการค้า ซึ่งเป็นพันธุ์ king (*Oncorhynchus tshawytscha*) และ chum (*O. keta*) ร้อน โดยใช้เนียร์อินฟราเรดความยาวคลื่นสั้น (SW-NIR) (600-1100 nm) ในโหมดการสะท้อนแบบแพร่ ซึ่งใช้ Partial least square (PLS) สร้างแบบจำลอง ที่ถูกพัฒนา สเปกตรัมถูกเก็บไว้ ปริมาณเกลือทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.66 ถึง 5.95% w/w สำหรับ king และ 2.15 ถึง 5.69% w/w สำหรับ chum แบบจำลอง PLS ให้ค่า $R^2=0.83$, SEP=0.32% w/w สำหรับ king และ $R^2=0.82$, SEP=0.25% w/w สำหรับ chum [31]

Xiccato et al. (2004) ได้ศึกษาเรื่องการทำนายองค์ประกอบทางเคมีและแหล่งกำเนิดของปลา Sea bass (*Dicentrarchus labrax*L.) ในยุโรปโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ใช้ปลา Sea bass ในยุโรป 236 ตัวที่จับมาจาก 4 บ่อเลี้ยงปลาในอิตาลี (บ่อแบบธรรมชาติ, บ่อแบบกึ่งธรรมชาติ, บ่อเลี้ยงปลาแบบคอนกรีต, กะชังเลี้ยงปลาในทะเล) ตัวอย่างปลาที่ใช้จะถูกจับมาในช่วง 4 เดือนตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคมปลาจะถูกฆ่าด้วยการนำมาแช่ในเกลือ น้ำแข็งทันทีจากนั้นจะนำมาวิเคราะห์ในห้องแล็บในกล่องที่มีฉนวนหุ้มและก็ส่งมาแล็บภายในเวลา 4-5 ชั่วโมง ชิ้นเนื้อปลาจะถูกแยกเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ชิ้นเนื้อปลาจะถูกทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อหาปริมาณน้ำแล้วก็นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เเปอร์เซ็นต์น้ำ เเปอร์เซ็นต์โปรตีน เเปอร์เซ็นต์สารสกัด Ether และเปอร์เซ็นต์พลังงานรวม ตาม AOAC methods จำนวนครึ่งหนึ่งของตัวอย่างจะถูกเลือกตามแหล่งและน้ำหนักเพื่อมาวิเคราะห์ค่าพลังงาน gross energy โดยใช้ adiabatic bomb มีการเตรียมตัวอย่าง 3 ชนิด (ชิ้นเนื้อปลา, เนื้อปลาสดบด, เนื้อปลาบดทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง) ส่วนการวิเคราะห์เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีทำโดยใช้ monochromator spectrometer ช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 nm ความละเอียด 2 nm ผลการศึกษา พบว่า เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีให้ค่าความน่าเชื่อถือได้ดี ในการทำนายน้ำ ไขมัน และพลังงาน แต่ทำนายโปรตีนหยาบได้ไม่ดีในชิ้นเนื้อปลา sea bass การเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างแบบต่างๆ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีพิสูจน์ว่า จะใช้ได้ผลดีกับชิ้นเนื้อปลา

ส่วนต่างๆ และสามารถปรับปรุงการทำนายถ้าใช้เนื้อพลาสติก และมีการปรับปรุงการทำนายอีกเล็กน้อย ถ้าใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งไม่ควรทำเพราะต้องเตรียมตัวอย่างและเวลามากในการเตรียม [32]

Uddin et al. (2006) ได้ศึกษาการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ในการตรวจสอบอุณหภูมิที่ต่อเจลเนื้อปลาเมื่อผ่านกระบวนการความร้อนซึ่งมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนและปริมาณไขมัน โดยเจลเนื้อปลาที่เตรียมจากซูริมิของปลา walleye pollack และปลาทูน่า สเปกตรัมแสงที่มองเห็นได้และเนียร์อินฟราเรดของเจล (30–90 °C) ถูกเก็บรวบรวม โดยอุปกรณ์ surface interactance fibre optic ในช่วงความยาวคลื่น 650 - 1100 nm ซึ่งใช้ Partial least squares (PLS) และ multiple linear regression (MLR) เป็นเทคนิคที่ถูกใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลกระบวนการความร้อน มีความเกี่ยวข้องกันกับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงในสภาพของน้ำ พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างการทำนายอุณหภูมิโดยใช้เนียร์อินฟราเรดและค่าที่วัดจริงของอุณหภูมิ ($R = 0.98$) และความผิดพลาดในการทำนายเท่ากับ 1.85 °C [33]

Karlsdottir et al. (2014) ได้ศึกษาการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (NIR) ในการประมาณการองค์ประกอบของไขมันและการเสื่อมสภาพของกล้ามเนื้อไม่ติดมันของปลาแช่แข็งของพันธุ์ปลาสองสายพันธุ์คือ saithe (*Pollachius virens*) และ hoki (*Macruronus novaezelandiae*) ซึ่งจะวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด, องค์ประกอบกรดไขมันอิสระ (FFA) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และ fluorescent interaction compounds (OFR) แบบจำลองได้ถูกพัฒนาโดยใช้ partial least squares (PLS) regression โดยให้ค่า Coefficients of determination for calibration (R_{cv}^2) และ root-mean-square error of cross validation (RMSECV) ช่วง 0.82-0.99 และ 0.66-3.69 สำหรับ hoki และ 0.64-0.99 และ 0.06-2.65 สำหรับ saithe, ตามลำดับ NIR สามารถการประเมินองค์ประกอบของไขมัน และ FFA ของ hoki และ saithe ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และยังสามารถแยกกล้ามเนื้อปลาที่มี OFR และ TBARS ต่ำ, กลาง และสูง [34]

การศึกษาการวัดปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธีอื่นในตัวอย่างเนื้อปลา จาก Frattini และ Lionetti (1998) ได้ศึกษาฮิสตามีนและฮิสติดีนในตัวอย่างปลาซาร์ดีน โดยใช้ High performance liquid chromatography โดยใช้ขั้นตอนที่รวดเร็วและง่าย [35]

สำหรับงานวิจัยที่เคยศึกษามาแล้วเกี่ยวกับการวิเคราะห์ความสดของปลา สามารถประเมินความสดได้ด้วยการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี จาก Bøknæs et al. (2002) ได้ศึกษาการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการประเมินความสดของเนื้อปลา cod แช่เย็นและที่ถูกละลาย โดยพิจารณาตามอุณหภูมิในการแช่เยือกแข็ง ระยะเวลาในการแช่เยือกแข็ง และระยะเวลาใน

การแช่เย็นในบรรจุภัณฑ์แบบ Modified atmosphere (ไม่ได้พิจารณาตามค่าฮิสตามีน) โดยสแกนเนื้อปลาสด ทั้งนี้โดยใช้วิธีการสร้างแบบจำลองแบบ partial least-squares regression (PLSR) และวิธี discriminant partial least-squares regression (DPLSR) ผลของการทำนายจำนวนวันในการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.90 root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) เท่ากับ 3.4 วัน ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส [36]

มีการศึกษาของ El Barbri et al. (2007) ใช้ electronic nose ในการประเมินความสดของปลาซาร์ดีนที่เก็บในห้องเย็น พบว่าเทคนิคที่ใช้สามารถจำแนกความสดของปลาเป็น 3 ระดับ คือ สดปานกลาง และเก่า โดยจำแนกได้ถูกต้องเท่ากับ 96.88 % โดยใช้วิธีโครมมาโตกราฟีแบบแก๊ส แต่วิธีนี้ไม่ใช่วิธีที่ยอมรับในการซื้อขายและการส่งออกในอุตสาหกรรม (อุตสาหกรรมการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลายอมรับวิธีการตรวจสอบฮิสตามีน) [37]

เวลาในการเก็บรักษาปลาและปัจจัยอื่นๆ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความสดและคุณภาพของเนื้อปลา ซึ่งจาก Guizani et al. (2005) ได้ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิการเก็บรักษาปลาทูน่าต่ออายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของปลาทูน่าพบว่า ปลาทูน่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8-20 องศาเซลเซียสไม่ปลอดภัยสำหรับการบริโภคของมนุษย์ โดยมีค่าฮิสตามีนที่ยอมรับไม่ได้หลังจากการเก็บ 4 และ 1 วันตามลำดับ [38]

Sivertsen et al. (2011) การประเมินความสดของปลา cod โดยใช้สเปกโทรสโกปีของแสงที่มองเห็นได้และเนียร์อินฟราเรดโดยสแกนเนื้อปลาสดและชิ้นเนื้อปลาแช่แข็งที่นำมาละลาย โดยใช้ handheld interactance probe สำหรับการวัดเนื้อปลาชิ้นเดียวอย่างรวดเร็วและ สเปกโตรมิเตอร์แบบถ่ายภาพสำหรับการทำวิเคราะห์ออนไลน์ที่โรงงานจะใช้ความเร็ว 2 วินาทีต่อชิ้นเนื้อปลา 1 ชิ้น ผลปรากฏว่าเนื้อปลาสดและชิ้นเนื้อปลาแช่แข็งที่นำมาละลาย สามารถแยกออกจากกันได้ โดยใช้ความยาวคลื่นในช่วงที่สามารถมองเห็นได้ ความสดใหม่ของเนื้อปลาแต่ละชิ้นที่วัดเป็นจำนวนวันที่อยู่บนน้ำแข็งสามารถกำหนดด้วยความถูกต้องเท่ากับ 1.6 วัน ผลการศึกษาพบว่าเกิดการเกิด oxidation ของ hemoglobin และ myoglobin ระหว่างการเก็บบนน้ำแข็งและการละลายจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมในช่วงที่มองเห็นได้ [39]

Kimiya et al. (2013) ได้ศึกษาการใช้สเปกโทรสโกปีของแสงที่มองเห็นได้และเนียร์อินฟราเรด สำหรับการประเมินความสดแบบไม่ทำลายของชิ้นเนื้อปลาแซลมอนแอตแลนติก (*Salmo salar* L.) และการจำแนกชิ้นเนื้อปลาแซลมอนแอตแลนติกแช่แข็งที่ละลาย เมื่อตัวอย่างสดถูกเก็บไว้ในน้ำแข็ง โดยใช้ handheld interactance probe สำหรับการวัดอย่างรวดเร็วของชิ้นเนื้อชิ้นเดียวและโดยใช้

สเปกโทรมิเตอร์แบบถ่ายภาพสำหรับการวิเคราะห์ออนไลน์ โดยหนึ่งชิ้นใช้เวลา 2 วินาที สามารถประเมินความสดในการเก็บรักษาในน้ำแข็งที่มีความแม่นยำ 2.4 วัน สำหรับชิ้นเนื้อของแต่ละชิ้น ในขณะที่ชิ้นเนื้อปลาแชลมนอนแช่แข็งที่ละลายจะถูกแยกออกมาจากชิ้นเนื้อปลาสด ผลการทำนายที่ได้สามารถเปรียบเทียบกับผลก่อนหน้านี้โดยใช้วิธีวัดดัชนีคุณภาพเชิงประสาทสัมผัส ช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 605 และ 735 nm ซึ่งตัดการแทรกแซงของ carotenoids และน้ำ มีความเหมาะสมสำหรับการจำแนกทั้งปลาที่แช่แข็งละลายและการทำนายความสดของชิ้นเนื้อปลา ผลการศึกษา พบว่า การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมส่วนใหญ่เกิดจากการออกซิเดชันของ โปรตีนในระหว่างรอบของการแช่แข็งและการละลายและระหว่างการแช่เย็นในน้ำแข็ง [40]

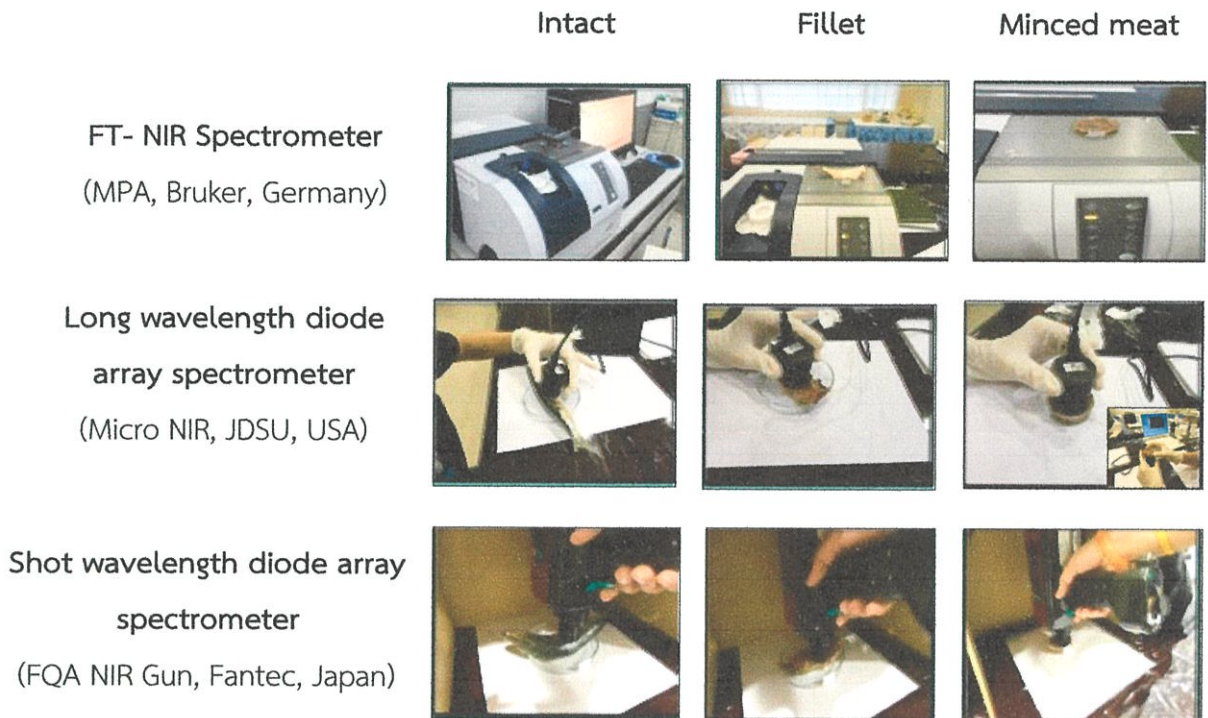
Alamprese และ Casiraghi (2015) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ FT-NIR และ FT-IR spectroscopy ในการพิสูจน์ชิ้นเนื้อปลาที่แท้ ซึ่งการทุจริตที่พบมากที่สุดในช่วงโซ่อุปทานของผลิตภัณฑ์ปลา จุดมุ่งหมายของงานนี้คือการตรวจสอบความเป็นไปได้ของการใช้อินฟราเรดเป็นเครื่องมือซึ่งรวดเร็วและง่ายสำหรับการระบุสายพันธุ์ที่มีคุณค่า (เช่น ปลากระบอกสีแดงและปลาพลเลข) เทียบกับสายพันธุ์ปลาที่ถูกกว่า (เช่น ปลากระบอกมหาสมุทรแอตแลนติกและปลากระเบน) โดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น Linear Discriminant Analysis (LDA), Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) ซึ่งสามารถจำแนกให้เห็นความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด ในเนื้อปลากระบอกมหาสมุทรแอตแลนติกจากปลากระบอกสีแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LDA ให้ความถูกต้อง 100% และ SIMCA ให้ความไวสูงกว่า 70% และความจำเพาะ 100% ซึ่ง ชิ้นเนื้อปลาพลเลขกับชิ้นเนื้อปลากระเบนแบ่งแยกได้ดี ตลอดจนการแบ่งแยกของชิ้นเนื้อปลากระบอกมหาสมุทรแอตแลนติกสดจากปลาที่ถูกแช่แข็งที่ถูกละลายได้ผลที่ดี แม้ว่า SIMCA มีความผิดพลาดบ้าง [41]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การปรับวิธีการสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

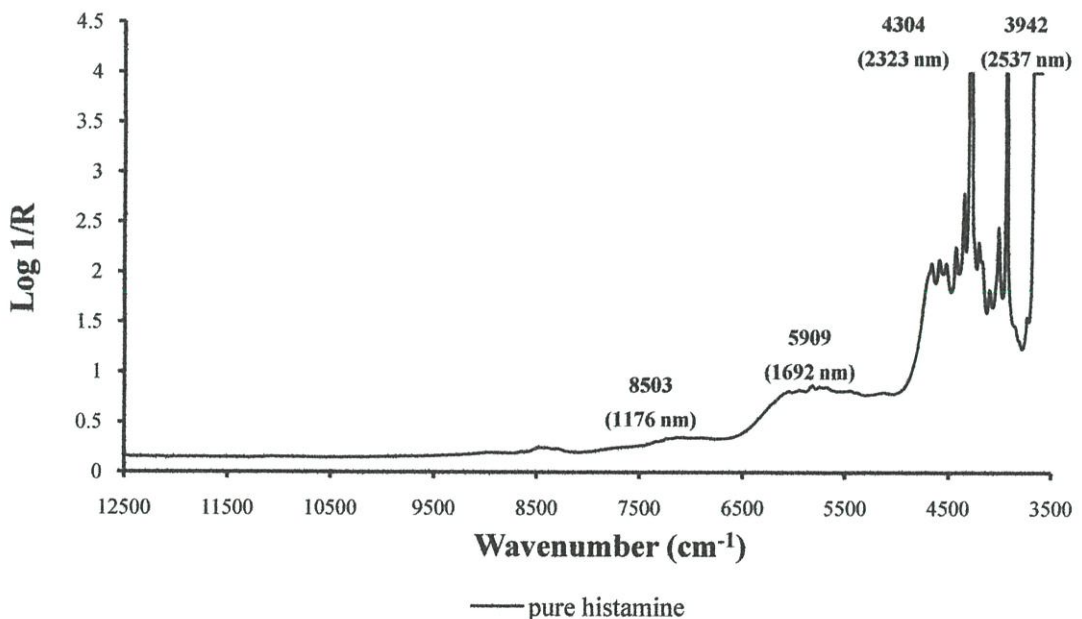
การทดลองเมื่อปี พ.ศ. 2555 [4] การทดลองจะใช้ปลาซาร์ดีนสด *sardinell longiceps* จากประเทศจีน จำนวน 200 ตัว โดยแบ่งออกเป็นสองชุด คือชุดแรก 150 ตัว จะถูกสุ่มมาจากบล็อกที่แช่เยือกแข็งไว้ในห้องเย็นของโรงงานปลาที่ถูกแช่เยือกแข็งจะถูกนำมาละลายด้วยกรรมวิธีของโรงงาน การสุ่มจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 25 ตัวจำนวน 6 บล็อกและชุดที่สองอีก 50 ตัว จะสุ่มจากปลาซาร์ดีนสดที่เข้าสู่โรงงาน ในชุดที่สองจะเป็นการปรับระดับฮิสตามีน โดยจะเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ที่เวลาที่แตกต่างกัน 5 ช่วงเวลา คือ 4, 10, 15, 20 และ 24 hr ช่วงเวลาละ 10 ตัวปลาที่ละลายแล้วจะแช่น้ำแข็งไว้ รักษาอุณหภูมิประมาณ 0 °C ก่อนนำออกมาทดลองในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 22-25 °C ลักษณะปลาที่ใช้ในการสแกนมีดังต่อไปนี้ ปลาเต็มตัว (Intact) ปลาผ่าครึ่งเอาก้างออก (Fillet) และเนื้อปลาสับละเอียด (Minced meat) ปลาจะถูกนำออกมาและใช้ผ้าซับน้ำออก แล้ววางลงบนจานแก้วกลมแล้วสแกนบริเวณกลางลำตัวปลา ด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ช่วงเลขคลื่น (wavenumber) $12500-3600\text{ cm}^{-1}$ หรือความยาวคลื่น (wavelength) 700-2500 nm โดยตั้งค่าเครื่องดังนี้ Resolution 16 cm^{-1} Sample scan time 64 scans และ Background scan time 64 scans ตามด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm โดยตั้งค่าเครื่องดังนี้ Integrating time (μs) 100 μs และจำนวนครั้งในการสแกนเพื่อหาสเปกตรัมเฉลี่ยเท่ากับ 5000 และเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm โดยตั้งค่าเครื่องดังนี้ Integrating time 15 ms จากนั้นนำปลามาผ่าครึ่งนำด้านที่ไม่มีก้างมาสแกนเนื้อปลาด้านในโดยวางบนจานแก้วกลมขนาดเดิมด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชุดเดิมตามลำดับ จากนั้นนำชิ้นเนื้อปลามาตัดเฉพาะส่วนที่ผ่านการสแกนมาสับด้วยมีดให้ละเอียดแล้วนำเนื้อปลาสับไปใส่ในจานแก้วกลมด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชุดเดิมตามลำดับซึ่งการสแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer จะคลุมเครื่องด้วยกล่องและผ้าสีดำเพื่อป้องกันแสงจากภายนอกบริเวณ และการสแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer มีการสแกนเนื้อปลาสับผ่านกันจานแก้วด้วยดังรูปที่ 3.1



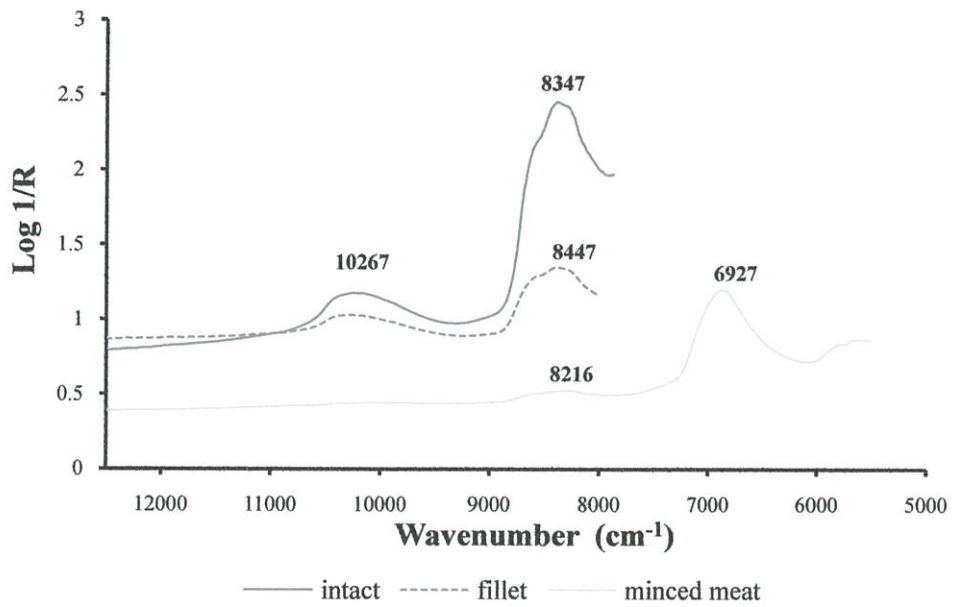
รูปที่ 3.1 การสแกนตัวอย่างปลาด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบต่างๆ [4]

จากการตรวจวัดสเปกตรัมของฮิสตามีนบริสุทธิ์ พบว่ามีพีคเกิดขึ้นที่เลขคลื่น 3942, 4304 5909 และ 8503 cm^{-1} (2537, 2323 1692 และ 1176 nm) (รูปที่ 3.2) จากการตรวจวัดสเปกตรัมด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้งสามเครื่องคือ FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ซึ่งแกน x คือค่าช่วงเลขคลื่น ตั้งแต่ $12500\text{-}5000 \text{ cm}^{-1}$ และแกน y คือค่าการดูดซับคลื่น (Absorbance) ของตัวอย่างปลาเต็มตัว, ชิ้นเนื้อปลาและเนื้อปลาบด พบว่าพีคเด่นชัดเกิดที่เลขคลื่น 10191 และ 8347, 8447, 8216 และ 6927 cm^{-1} (981, 1198, 1184, 1217, 1444 nm) ตามลำดับ (รูปที่ 3.3) จากการตรวจวัดสเปกตรัมของเครื่อง long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) ซึ่งแกน x คือช่วงความยาวคลื่น ตั้งแต่ 1150-2150 nm และแกน y คือค่าการสะท้อนกลับของคลื่น (Reflectance) ของปลาชนิดต่างๆ ดังกล่าว พบว่าพีคเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1284 และ 1595, ไม่พบพีค, 1578 nm, 1292 และ 1646 nm ตามลำดับ ในกรณีของชิ้นเนื้อปลาและเนื้อปลาบดจะเกิด over absorption ของคลื่นในช่วงเลขคลื่น $8000\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ (1250-2778 nm) จึงต้องมีการแก้ไขไม่ให้เกิด over absorption ที่ช่วงคลื่นนี้

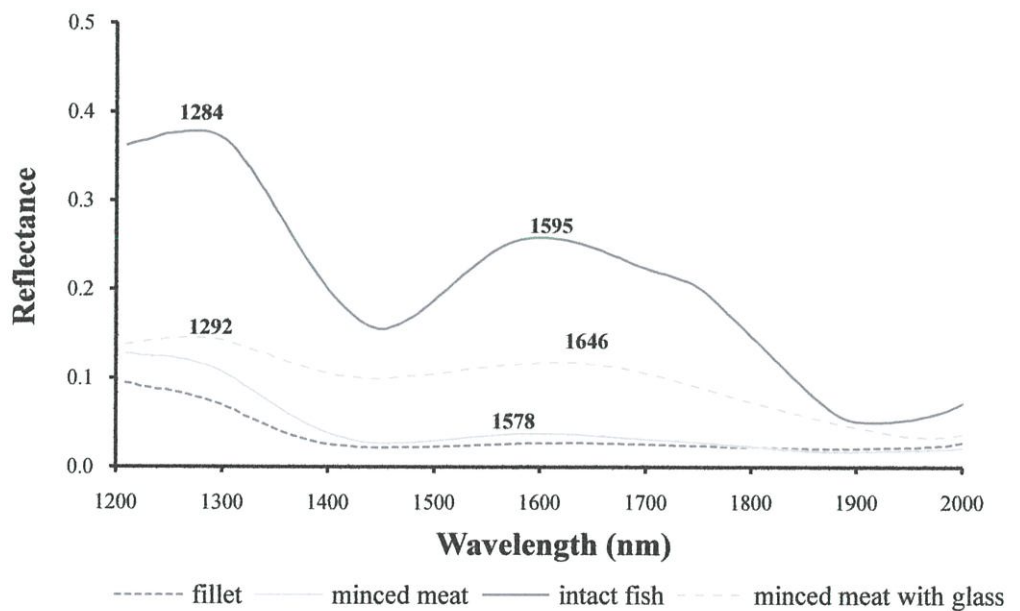
(รูปที่ 3.4) และจากการตรวจวัดสเปกตรัมของเครื่อง short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) ซึ่งแกน x คือช่วงความยาวคลื่น ตั้งแต่ 600-1100 nm และแกน y คือค่าการดูดซับคลื่นของปลาชนิดต่างๆ ดังกล่าว พบว่าพิกัดเด่นชัดเกิดความยาวคลื่น 991, 969, 993 nm ตามลำดับ ซึ่งการสแกนสามารถสแกนได้ตลอดช่วงความยาวคลื่น แต่ค่าการสะท้อนกลับของคลื่นมีค่าน้อย จึงต้องมีการปรับการตั้งค่าเครื่องใหม่ โดยการตั้งค่า Integrating time (μs) 100 μs อาจต้องเพิ่มขึ้นเป็น 1000 μs และใช้จำนวนครั้งในการสแกนเพื่อหาสเปกตรัมเฉลี่ย 5000 เท่าเดิม (รูปที่ 3.5) เนื่องจากปลาที่มีปริมาณน้ำมากจึงปรากฏพิกัดของน้ำที่ความยาวคลื่น 969, 981, 991, 993 และ 1444 nm โดยเป็นพิกัดที่ขยับจาก 970 และ 1450 nm ซึ่งเป็นการดูดซับของ O-H str. Second overtone และ O-H str. First overtone พิกัดที่ขยับจาก 1160 nm (8621 cm^{-1}) เป็นการดูดซับของ C=O stretch 4th overtone Amino acid (เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน) และพิกัดที่ขยับจาก 1170 nm (8547 cm^{-1}) เป็นการดูดซับของ HC=CH ในการสแกนเป็นเช่นเดียวกับการสแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer จึงต้องมีการปรับค่า Integrating time ใหม่



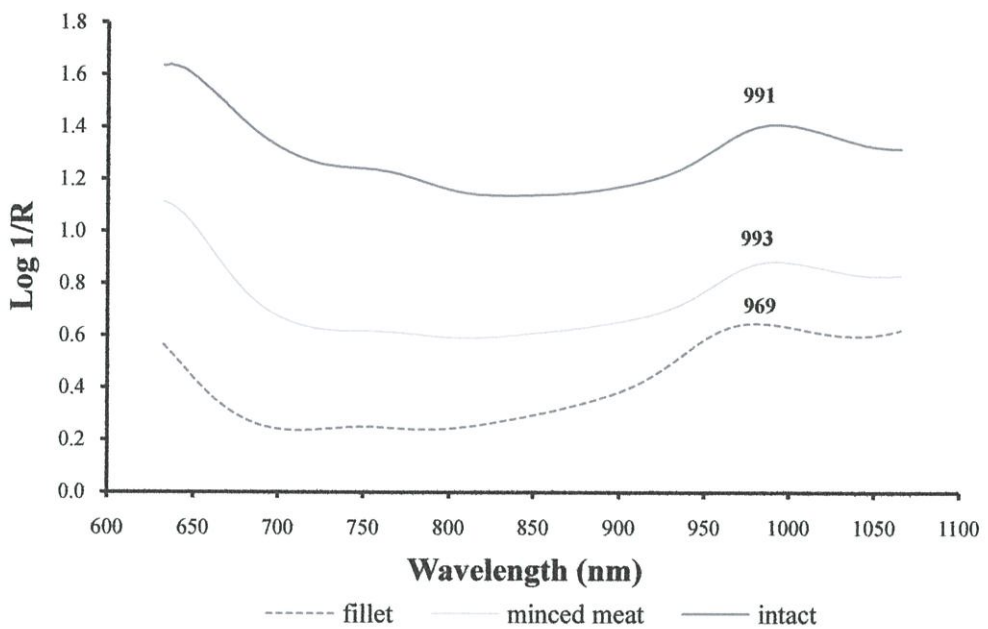
รูปที่ 3.2 สเปกตรัมของฮิสตามีนบริสุทธิ์ในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) 12500 – 3600 cm^{-1} ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) [4]



รูปที่ 3.3 สเปกตรัมเฉื่อยของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และ เนื้อปลาสับ (minced meat) ที่สแกนด้วย เครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) [4]



รูปที่ 3.4 สเปกตรัมเฉื่อยของปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet), เนื้อปลาสับ (minced meat) และ เนื้อปลาสับที่สแกนผ่านแก้ว (minced meat with glass) ที่สแกนด้วย เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) [4]



รูปที่ 3.5 สเปกตรัมเฉื่อยของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และ เนื้อปลาบด (minced meat) ที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) [4]

จากการวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองในการทำนายความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับแสงกับ ปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน จากการตรวจวัดสเปกตรัมด้วยสเปกโทรมิเตอร์ทั้งสามเครื่องคือ เครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany), Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) และ Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) พบว่าแบบจำลองในการทำนายฮิสตามีนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm สามารถให้การทำนายได้ดีกว่าเครื่องอื่น สำหรับลักษณะตัวอย่างปลาสำหรับการสแกนพบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา ได้ผลดีที่สุด โดยแบบจำลองได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Smoothing (19 points) + Baseline offset โดยมีค่า R^2 , SEP และ Bias คือ 0.601, 0.990 ppm และ -0.008 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 14 อย่างไรก็ตามจาก Williams (2007) ค่า R^2 ระหว่าง 0.50-0.64 นั้นสามารถนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดไปใช้สำหรับการแบ่งกลุ่มอย่างหยาบ (Rough screening) ยังไม่สามารถนำไปใช้ระบุค่าหรือในการควบคุมกระบวนการในโรงงานได้ [42] อย่างไรก็ตาม จากผลที่ได้

ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนโดยใช้เทคนิคนี้ แต่ต้องการการปรับปรุงวิธีการเช่น เวลาในการสแกนและเพิ่มช่วงตัวอย่างปลาที่มีปริมาณฮิสตามีนที่กว้างขึ้น

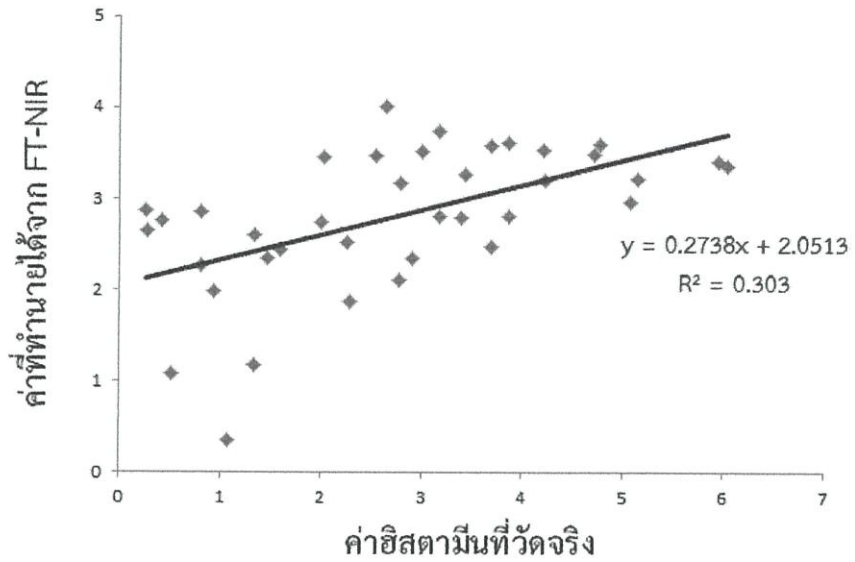
จากรูปที่ 3.6 แสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer พบว่าถ้าปริมาณฮิสตามีนมีค่าน้อยมาก คือประมาณ น้อยกว่า 1.5 ppm จะทำนายได้ไม่ดี โดยมีค่าสูงกว่าความเป็นจริง สาเหตุอาจจะเป็นเพราะรูปแบบในการวัดอาจไม่เหมาะสมกับตัวอย่าง จึงต้องปรับปรุงวิธีการวัด และเป็นการแก้ปัญหาที่อาจทำให้ทำนายได้ถูกต้องมากขึ้น จากตารางที่ 3.1 และจากรูปที่ 3.7 แสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer พบว่า สามารถทำนายได้ดีกว่าสเปกโตรมิเตอร์เครื่องอื่น แต่ความถูกต้องยังมีค่าน้อย และจากรูปที่ 3.8 แสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer พบว่า ถ้าปริมาณฮิสตามีนมีค่าน้อยมากคือประมาณ น้อยกว่า 1 ppm จะทำนายได้ไม่ดี โดยมีค่าสูงกว่าความเป็นจริงและการทำนายมีค่าทำนายค่อนข้างคงที่เมื่อปริมาณฮิสตามีนที่วัดจริงมากขึ้น ซึ่งเดิมทั้ง Long wavelength diode array spectrometer และ Short wavelength diode array spectrometer สามารถสแกนได้ตลอดช่วงความยาวคลื่น แต่ค่าการดูดซับคลื่น (Absorbance) มีค่าน้อย จึงต้องมีการปรับการตั้งค่า Integrating time ใหม่

ตารางที่ 3.1 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนด้วยเครื่องสเปกโทรเมตรีแบบต่างๆ ในการทดลองเมื่อปี พ.ศ. 2555 [4]

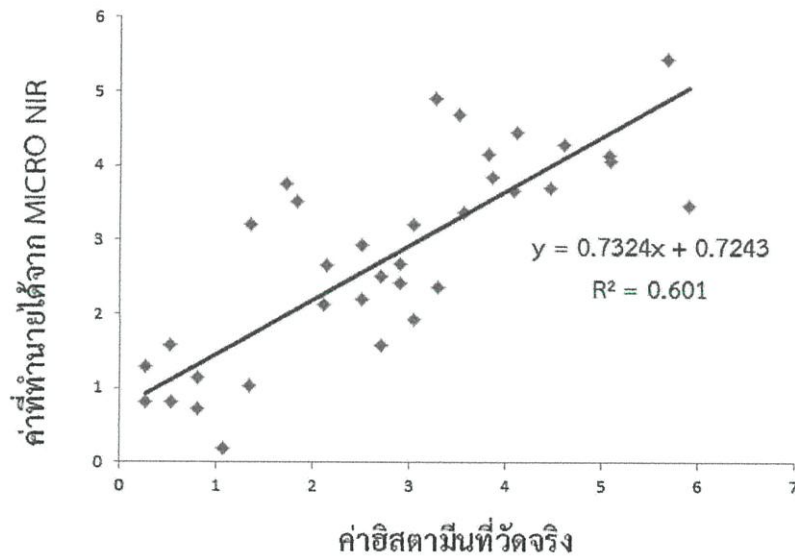
Spectrometer (Frequency Range)	Sample	Pre treatment	PC	Calibration set			Prediction set		
				RMSEE /SEC (ppm)	Bias (ppm)	R ²	RMSEP /SEP (ppm)	Bias (ppm)	R ²
FT-NIR spectrometer (12500- 3600 cm ⁻¹)	intact	MSC	7	0.303	1.520	-	0.163	1.620	0.018
	fillet	2 nd derivative	1	0.037	1.740	-	0.012	1.470	-0.001
	minced meat	Constant offset elimination	1	0.015	1.770	-	-0.011	1.740	0.043
Long wavelength diode array spectrometer (1150-2150 nm)	intact	Sm (19 points) + 2 nd derivative (11 point)	16	0.471	1.293	-2.23E-07	0.364	1.247	-0.290
	fillet	Sm (19 points) + Baseline offset *	14	0.694	0.977	-9.95E-07	0.601	0.990	-0.008
	minced meat	Sm (19 points) + Baseline offset	17	0.688	0.966	-6.21E-06	0.481	1.245	-0.042
Short wavelength diode array spectrometer (600-1100 nm)	intact	Sm (19 points) + MSC	12	0.510	1.232	-3.55E-05	0.459	1.158	0.140
	fillet	Baseline offset	1	0.025	1.753	1.09E-07	0.023	1.560	0.043
	minced meat	De-trending	1	0.093	1.691	9.55E-08	0.171	1.459	0.040
		Multiplicative Scatter Correction	1	0.009	1.770	-3.69E-07	0.014	1.576	-0.004

หมายเหตุ : * แบบจำลองที่ดีที่สุด, PC= PLS factor, MSC= Multiplicative Scatter Correction, Sm= Smoothing, R² = Coefficient of determination, SEC= Standard error of

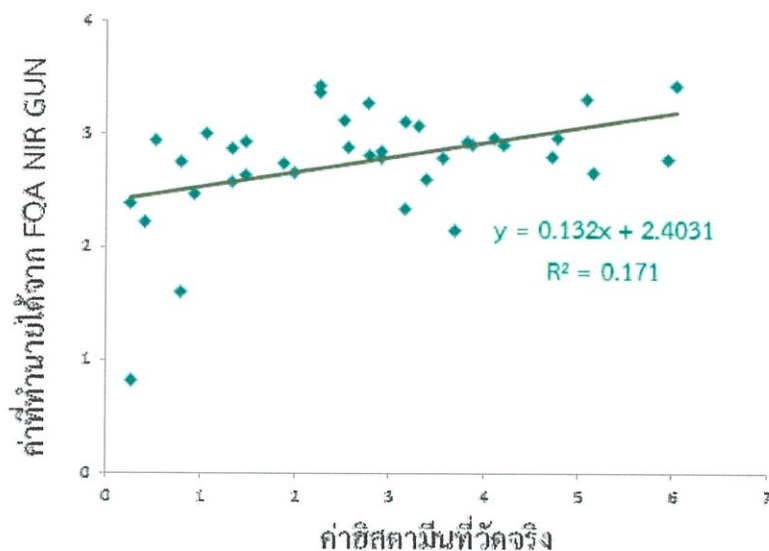
calibration, Bias= error, SEP= Standard error of prediction, RMSEE= Root mean square error of cross Calibration, Bias= error, RMSEP= Root mean square error of cross prediction



รูปที่ 3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าอิสตามีนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) (หน่วย ppm) [4]



รูปที่ 3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าอิสตามีนด้วย Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) โดยสแกนตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (fillet) (หน่วย ppm) [4]



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ในการทำนายค่าฮิสตามีนด้วย Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) โดยสแกนตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (fillet) (หน่วย ppm) [4]

3.2 วิธีการปรับปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน

ข้อมูลจากตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาชาร์ดินในการทดลองเดิมปี พ.ศ. 2555 จากการวิเคราะห์ข้อมูลของปริมาณฮิสตามีนในปลาตระกูล *scombrotoxic* มีค่าประมาณ 10-200 ppm ซึ่งกำหนดในสหรัฐอเมริกา (Federal Register, 1995 อ้างโดย Köse et al. (2011)) [1 อ้างโดย 2] ดังนั้นในการปรับปรุงแบบจำลองจึงจำเป็นต้องมีช่วงปริมาณฮิสตามีนตั้งแต่ 0-200 ppm จึงนำข้อมูลของฮิสตามีนมาทำการวิเคราะห์ โดยการนำข้อมูลของตัวอย่างปลาจากงานวิจัยเดิมปี พ.ศ. 2555 วิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาชาร์ดิน แล้ววิเคราะห์ผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิห้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีน โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance ANOVA) ซึ่งใช้รูปแบบการวิเคราะห์แบบทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้ข้อตกลงเบื้องต้น คือ 1.) กลุ่มตัวอย่างปลาแต่ละกลุ่มที่สุ่มมาจากประชากรปลาที่มีการแจกแจงความถี่ปกติ 2.) กลุ่มตัวอย่างปลาแต่ละกลุ่มที่สุ่มมาจากประชากรปลาที่มีความแปรปรวนเท่ากัน 3.) สุ่มตัวอย่างปลามาอย่างอิสระ และ 4.) ตัวอย่างปลาแต่ละกลุ่มเป็นอิสระต่อกัน จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยฮิสตามีนที่

เปรียบเทียบ ด้วยวิธีของ Duncan's multiple range test (DMRT) จากการนำค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้องมาพล็อตค่าปริมาณฮิสตามีน (แกน y) กับเวลาที่วางทิ้งไว้ในอุณหภูมิต้อง (แกน x) ในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อหาความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรงและสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล เพื่อทำนายจำนวนวันในการวางตัวอย่างปลาที่อุณหภูมิต้อง เพื่อให้มีปริมาณฮิสตามีนตามต้องการ

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลทางสถิติของค่าฮิสตามิของปลาซาร์ดีน ในการทดลองเมื่อปี พ.ศ. 2555 [4]

Spectrometer	Sample	Calibration set					Prediction set				
		N	Mean	Max	Min	SD	N	Mean	Max	Min	SD
FT-NIR (MPA)	intact	160	2.79	8.02	0.12	1.77	38	2.75	6.04	0.25	1.60
	fillet	160	2.81	8.02	0.12	1.77	38	2.71	5.95	0.25	1.59
	minced meat	153	2.76	8.02	0.12	1.77	37	2.82	7.61	0.25	1.75
Long wavelength diode array spectrometer	intact	152	2.80	8.02	0.12	1.78	36	2.72	6.04	0.25	1.61
	fillet	152	2.80	8.02*	0.12	1.78	36	2.74	5.91	0.25**	1.57
	minced meat	157	2.71	8.02	0.12	1.78	39	2.82	7.61	0.25	1.73
Short wavelength diode array spectrometer	minced meat with glass	160	2.78	8.02	0.12	1.78	38	2.74	5.95	0.25	1.59
	intact	161	2.81	8.02	0.12	1.78	38	2.74	5.95	0.25	1.58
	fillet	160	2.78	8.02	0.12	1.78	38	2.72	5.95	0.25	1.60
	minced meat	161	2.80	8.02	0.12	1.78	38	2.71	5.95	0.25	1.59

หมายเหตุ : * ปริมาณฮิสตามิมากที่สุด, ** ปริมาณฮิสตามิน้อยที่สุด, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาคูต, minced meat with glass= เนื้อปลาบดที่ใส่แผ่นแก้ว, N= Number of scanning, Mean= Average (หน่วย ppm), Max= Maximum (หน่วย ppm), Min= Minimum (หน่วย ppm), and SD= Standard Deviation

3.3 ตัวอย่างปลาที่ใช้ในการทดลองสำหรับสร้างแบบจำลอง

ปลาที่ใช้ในโครงการวิจัยคือซาร์ดีนสด *sardinella longiceps* จากประเทศจีนซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาจากบริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่น โปรดักส์ จำกัด มหาชน จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 149 ตัว จะแบ่งออกเป็นสองชุด คือชุดแรก 100 ตัวจะถูกสุ่มมาจากบล็อกที่แช่เยือกแข็งไว้ในห้องเย็นของโรงงาน อุณหภูมิประมาณ -20°C โดยการสุ่มจะสุ่มตามกรรมวิธีของโรงงาน คือจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 25 ตัวจำนวน 4 บล็อก ปลาที่ถูกแช่เยือกแข็งจะถูกนำมาแช่น้ำประมาณ 5-10 นาที จนกว่าอุณหภูมิตัวปลาจะเป็น 0°C แล้วนำขึ้น และชุดที่สองอีก 49 ตัว จะสุ่มตามกรรมวิธีของโรงงานเช่นกัน คือจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 7 ตัว จำนวน 7 บล็อก แล้วนำมาแช่น้ำประมาณ 5-10 นาที แล้วนำขึ้น โดยในชุดที่สองจะเป็นการปรับระดับฮิสตามีน

ลักษณะตัวอย่างปลาที่ใช้ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.9 ปลาเต็มตัว (Intact) ปลาผ่าครึ่งเอาก้างออก (Fillet) และ เนื้อปลาบด (Minced meat) ในกรณีที่สแกนผ่านเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) (ของเนื้อปลาบดจะสแกนผ่านแก้ว (Minced meat with glass) ด้วย



รูปที่ 3.9 ลักษณะตัวอย่างปลาที่ใช้ในการสแกน

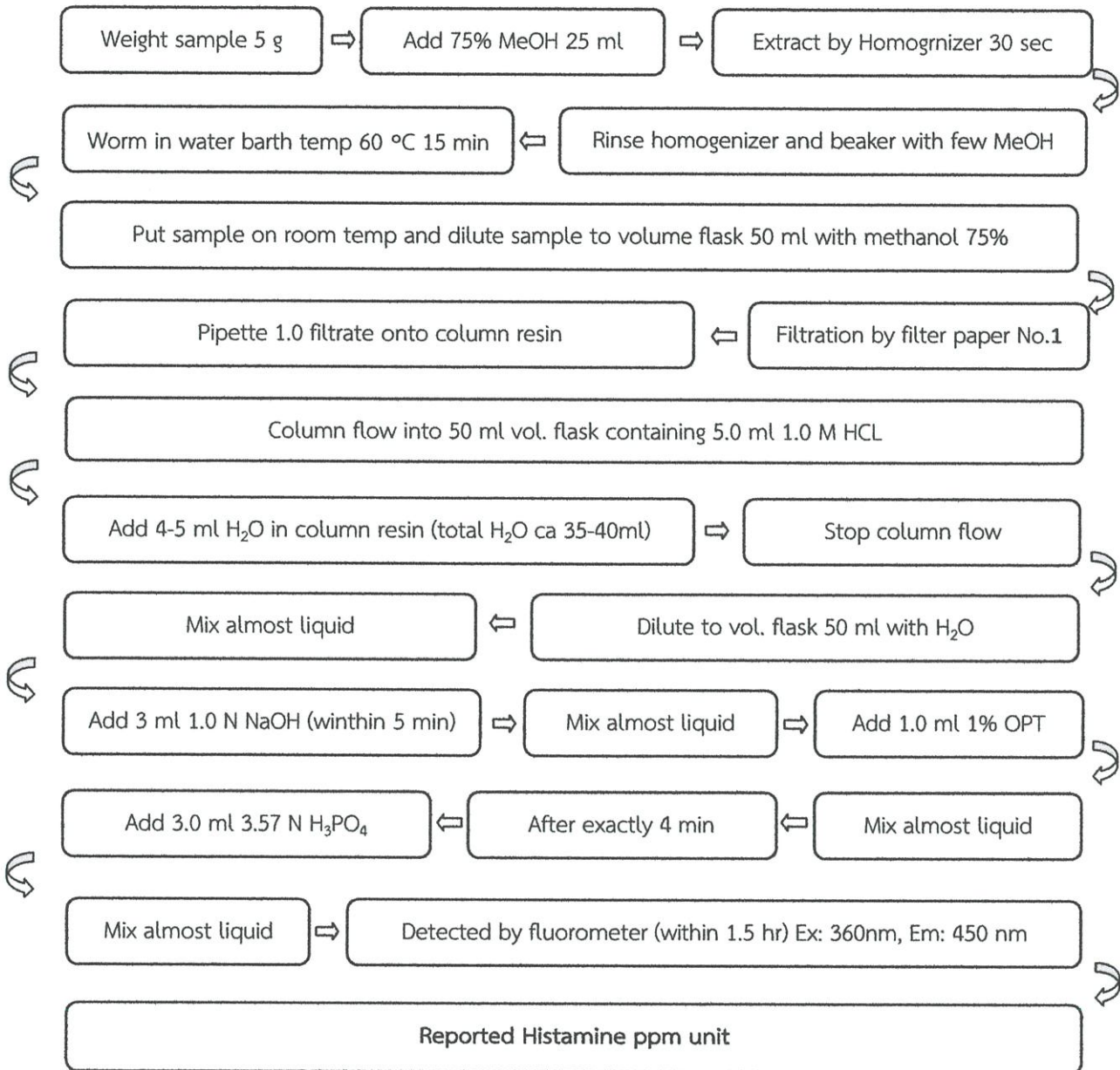
3.4 การสแกนปลาซาร์ดีนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

ในการทดลองเพื่อสร้างแบบจำลองของการสแกนปลาซาร์ดีนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด ดูหัวข้อ

4.1

3.5 วิธีการวิเคราะห์ฮิสตามีนโดยวิธีมาตรฐาน

นำเนื้อปลาสับละเอียดที่ผ่านการสแกนไปวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธีทางเคมีดั้งเดิมตามมาตรฐานของโรงงานซึ่งประยุกต์มาจากมาตรฐานสากล AOAC Official Method 977.13 และ AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood [4] ด้วยเครื่อง Fluorometer (Quantech, USA) ทั้งนี้วัดโดยพนักงานของโรงงาน เพื่อไม่ให้เกิดความคลาดเคลื่อนหรือคลาดเคลื่อนน้อยที่สุดของข้อมูล โดยมีหลักการคือ ตัวอย่างจะถูกสกัดโดยใช้ 75%(v/v) Methanol นำสารละลายที่สกัดได้ไปผ่าน anion exchange resin column หลังจากนั้นจึงนำไปสร้างอนุพันธ์ฮิสตามีนกับสาร o-Phthalaldehyde (OPT) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของอนุพันธ์ Histamine ด้วยเครื่อง Fluorometer ที่ Excitation wavelength 360 และ Emission wavelength 450 nm และคำนวณกลับไปเป็นปริมาณ Histamine โดยวิธี External calibration curve รูปที่ 3.10 แสดงแผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดินตามมาตรฐานของโรงงาน แล้วนำข้อมูลของฮิสตามีนของตัวอย่างปลา มาวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาชาร์ดิน โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance ANOVA) ซึ่งใช้รูปแบบการวิเคราะห์แบบทางเดียว (One-way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยฮิสตามีนที่เปรียบเทียบ ด้วยวิธีของ Duncan's multiple range test (DMRT)



รูปที่ 3.10 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ทิน [5]

3.6 วิธีการสร้างแบบจำลองและการพิสูจน์แบบจำลอง

3.6.1 การวิเคราะห์ค่าผิดปกติ (Outlier)

จากการทดลองจำเป็นต้องตัดค่าบางส่วนที่มีค่าผิดปกติ (Outlier) ออกจากผลการทดลอง ซึ่งอาจเกิดจากตัวอย่างไม่สม่ำเสมอ หรือเกิดจากความผิดพลาดในกระบวนการทดลอง ซึ่งตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบค่าแล้วนั้นจะต้องมีค่าอยู่ในช่วง ± 3 หากมีค่าอยู่นอกช่วงดังกล่าวนี้ต้องตัดออกจากกลุ่ม เพราะเกิดจากตัวอย่างผิดปกติ หรือเกิดจากความผิดพลาดในกระบวนการทดลอง ใช้สมการดังต่อไปนี้

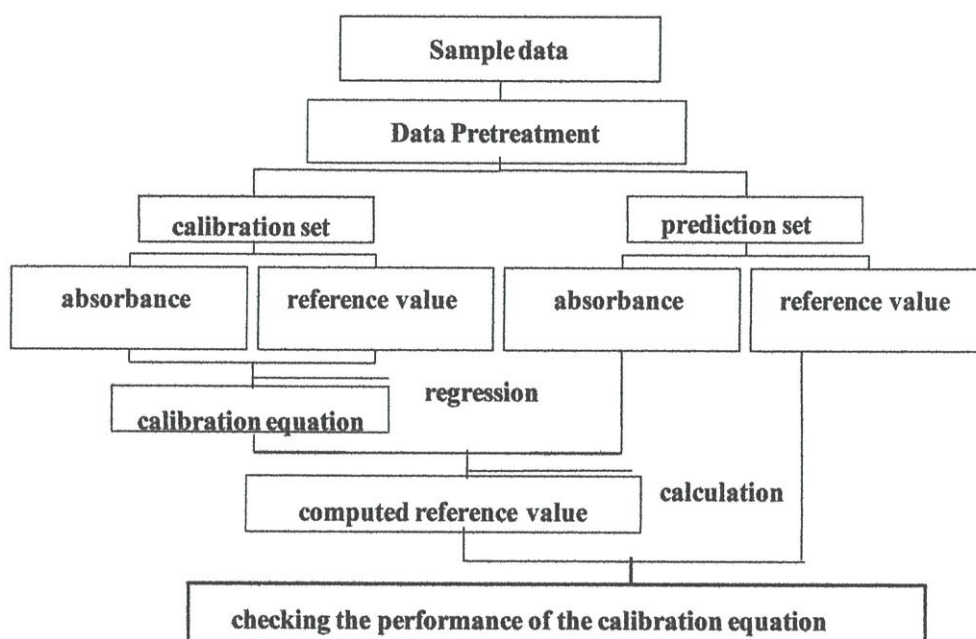
$$\frac{X - \bar{X}}{SD} > 3$$

โดยที่ X คือ ค่าฮิสตามีนที่วัดจากวิธีทางเคมี \bar{X} คือค่าเฉลี่ยของฮิสตามีน และ SD คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและนำข้อมูลของสเปกตรัมที่ได้มาตรวจสอบค่าผิดปกติด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA)

3.6.2 การสร้างสมการในการทำนาย

จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮิสตามีนของปลาชาร์ดินกับ Optical data โดยวิธีทาง Chemometric แบบ Partial least squares regression โดยแบ่งข้อมูลเป็นสองชุดคือ ชุดสร้างแบบจำลองและชุดพิสูจน์แบบจำลองโดยมีอัตราส่วนข้อมูล 8:2 ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้แต่ละเครื่องสเปกโตรมิเตอร์จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยโปรแกรม OPUS 7.0 (Bruker, Germany) โดยมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธี Constant offset elimination, Straight line subtraction, Vector normalization (VN), Min-max normalization, Multiplicative scattering correction (MSC), First derivative, Second derivative, First derivative+ Straight line subtraction, First derivative+ VN และ First derivative+ MSC หรือใช้สเปกตรัมดั้งเดิม และวิเคราะห์โดยโปรแกรม Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) โดยมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธี Smoothing S. Golay, Normalization (Mean, Maximum, Range), Multiplicative scattering correction (MSC), First derivative (5 and 11 points),

Second derivative (5 and 11 points), Baseline offset, De-trending และ Standard normal variate+De-trending หรือใช้สเปกตรัมดั้งเดิม ซึ่งวิธีการพื้นฐานในการสร้างแบบจำลองและการพิสูจน์แบบจำลองแสดงดังรูปที่ 3.11 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี



รูปที่ 3.11 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี [30]

3.7 วิธีการวิเคราะห์สมรรถนะของแบบจำลอง

การคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดจะพิจารณาจากค่า ค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณา Coefficient of determination (R^2) คือ ค่า R^2 เป็นค่าที่แสดงระดับของข้อมูลสองเซตที่สอดคล้องซึ่งกันและกัน ความสอดคล้องที่สมบูรณ์จะไม่มี ความแตกต่างกันเลยระหว่างข้อมูลสองเซต ซึ่งจะมีค่า R^2 เท่ากับ 1.00, ความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย Standard error of prediction (SEP) เป็นค่าที่แสดงสมรรถนะของการทำนาย ซึ่งเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และค่าอ้างอิงของชุดข้อมูลพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction) ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Unscrambler 9.8 หรือรากที่สองของความผิดพลาดของการทำนาย กำลังสองเฉลี่ยในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Root mean square error of prediction (RMSEE)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OPUS 7.0 จะแสดงนี้, ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของแบบจำลอง

(Standard error of calibration, SEC) SEC เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และค่าอ้างอิงในชุดข้อมูลสร้างแบบจำลอง (Calibration) ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Unscrambler 9.8 หรือ รากที่สองของความผิดพลาดของการทำนายกำลังสองเฉลี่ยในชุดแบบจำลอง (Root mean square error of calibration (RMSEC)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OPUS 7.0 จะแสดงนี้ และความผิดพลาดเฉลี่ย Bias ความแตกต่างระหว่างค่าอ้างอิงและค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และเป็นการวัดความแม่นยำโดยรวมของชุดสร้างแบบจำลองต่ำที่สุด

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1. ผลการปรับการสแกนด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด

ผลการปรับการสแกนด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด ได้แนวทางดังต่อไปนี้

4.1.1. FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany)

FT-NIR spectrometer โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) แทนการวัดแบบ Diffuse reflectance ช่วงเลขคลื่น (wavenumber) $12,500-3,600\text{ cm}^{-1}$ (ช่วงความยาวคลื่น (wavelength) $800-2778\text{ nm}$)

โดยตั้งค่า Resolution 16 cm^{-1} Sample scan time 64 scans และ Background scan time 64 scans ร่วมกับการปรับ gain (Gain adjustment) เพื่อปรับแสงที่เข้าสู่ Detector ให้เหมาะสม ค่า Ref หมายถึง ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัมใดๆ ส่วน A B และ C preamp gain หมายถึง การขยายสัญญาณ (amplify) โดยการ x3, x30 และ x300 ตามลำดับ ในตัวอย่างปลาเต็มตัว มีการตั้งค่า preamp gain ของตัวอย่างเป็น A และ preamp gain ของ background เป็น A ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาและในตัวอย่างเนื้อปลาบด มีการตั้งค่า preamp gain ของตัวอย่าง เป็น C และ preamp gain ของ background เป็น A แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany)

4.1.2. Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA)

ช่วงความยาวคลื่น (wavelength) 1150-2150 nm

โดยตั้งค่า Integrating time (μ s) 100 μ s และจำนวนตัวอย่างเพื่อหาสเปกตรัมเฉลี่ยเท่ากับ 5000 แสดงดังรูปที่ 4.2

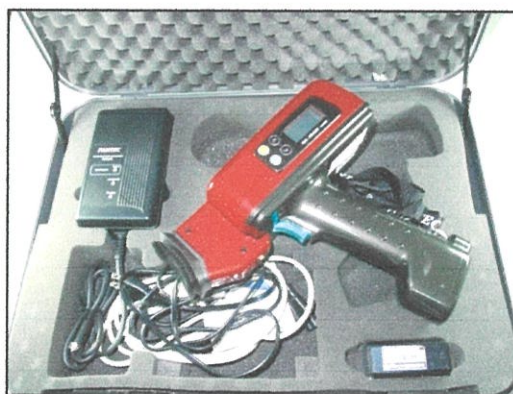


รูปที่ 4.2 Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA)

4.1.3 Short wavelength diode array spectrometer (Fantec, Japan)

ช่วงความยาวคลื่น (wavelength) 600-1100 nm

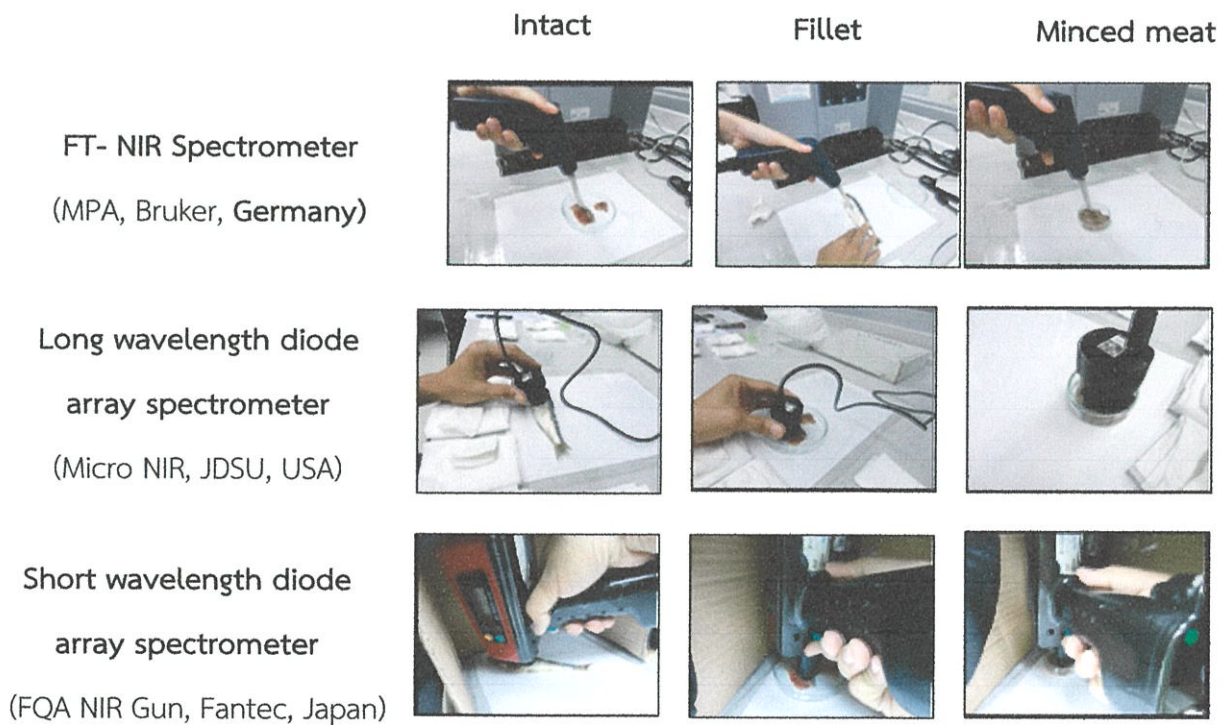
โดยตั้งค่า Integrating time 150 ms ในตัวอย่างปลาเต็มตัวและเนื้อปลาสดและ Integrating time 25ms ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan)

การสแกนเริ่มต้นจากนำตัวอย่างปลาเต็มตัววางบนผ้าแล้วใช้ผ้าซับน้ำ ตัวอย่างปลาที่นำออกมาจากถังน้ำแข็ง วางลงบนจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm สูง 20 mm แล้วสแกนด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้ง 3 แบบ ดังรูปที่ 4.4

บันทึกข้อมูลการดูดกลืนสเปกตรัมของแสง (Absorbance) หรือค่าการสะท้อนกลับของแสง (Reflectance) จากนั้นนำปลามาผ่าครึ่ง นำด้านที่ไม่มีก้างมาสแกนเนื้อปลาด้านในโดยวางบนจานแก้วกลมขนาดเดิมด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชุดเดิม ตามลำดับและบันทึกข้อมูล จากนั้นนำชิ้นเนื้อปลามาชั่งน้ำหนักประมาณ 80 g (ตัดบริเวณส่วนที่ผ่านการสแกน) นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่น (OKU SAN NO, Thailand) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเนื้อปลาที่ปั่นได้ใส่ในจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm สูง 15 mm แล้วสแกนด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชุดเดิม ตามลำดับและบันทึกข้อมูล โดยจะสแกนบริเวณด้านหน้าเนื้อปลาสด ในการสแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer จะมีการสแกนเนื้อปลาสดผ่านก้นจานแก้วด้วย และการสแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer จะคลุมเครื่องด้วยกล่องและผ้าสีดำเพื่อป้องกันแสงจากภายนอกบริเวณ และการทดลองนี้ทำในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 °C



รูปที่ 4.4 วิธีการสแกนด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด

จากตารางที่ 4.1 แสดงผลสรุปการตั้งค่าปรับปรุงเครื่องสเปกโทรมิเตอร์เพื่อสร้างแบบจำลองในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เพื่อการวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาจารดินเปรียบเทียบกับระหว่างงานวิจัยเดิมเมื่อปีพ.ศ. 2555 และงานวิจัยที่ปรับปรุง

ตารางที่ 4.1 การตั้งค่าปรับปรุงเครื่องสเปกโทรมิเตอร์เพื่อสร้างแบบจำลองที่ดีที่สุด

Spectrometer	Sample	การตั้งค่า		งานวิจัยเดิม	งานวิจัยที่ปรับปรุง
FT-NIR spectrometer or FT-NIR spectrometer (Matrix) *	intact	Preamp gain	ของตัวอย่าง	A	A
			ของ background	B	A
	fillet, minced meat		ของ ตัวอย่าง	A	C
			ของ background	B	A
intact, fillet, minced meat	Resolution		16 cm ⁻¹	16 cm ⁻¹	
	Sample scan time		64 scans	64 scans	
	Background scan time		64 scans	64 scans	
Long wavelength diode array spectrometer	intact, fillet, minced meat, minced meat with glass	Integrating time (μs)		100 μs	1000 μs
		No. Sample		5000 samples	5000 samples
Short wavelength diode array spectrometer	intact	Integrating time		15 μs	150 μs
	fillet				25 μs
	minced meat				150 μs
	intact, fillet, minced meat	No. Sample		1000 samples	1000 samples

หมายเหตุ : *เปลี่ยนหัววัดของเครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA) เป็นแบบ (FT-NIR spectrometer (Metrix) โดยเป็นหัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) แทนการวัดแบบ Diffuse Reflectance ซึ่งจะช่วยขยายช่วงฮิสตามีนให้สูงขึ้นและเป็นการแก้ปัญหาทำให้ทำนายได้ถูกต้องมากขึ้น, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาคุด, minced meat with glass= เนื้อปลาคุดที่สแกนผ่านแก้ว, No. Sample = จำนวนตัวอย่างเพื่อหาสเปกตรัมเฉลี่ย, มีการปรับ gain (Gain adjustment) เพื่อปรับแสงที่เข้าสู่ Detector ให้เหมาะสม ค่า Ref หมายถึง ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัมใดๆ ส่วน A B และ C preamp gain หมายถึง การขยายสัญญาณ (amplify) โดยการ x3, x30 และ x300 ตามลำดับ

4.2 ผลการศึกษาวิธีการปรับปริมาณฮิสตามีน

4.2.1 ผลการวิเคราะห์การขยายช่วงฮิสตามีนให้สูงขึ้น

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาซาร์ดีนในการทดลองเดิมปี พ.ศ. 2555 จะเห็นว่ากลุ่มปลาซาร์ดีนที่รักษาอุณหภูมิที่ 0 °C มีปริมาณฮิสตามีนสูงสุดและต่ำสุด คือ 0.12 ppm และ 8.02 ppm ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (22-25 °C) 24 hr มีปริมาณฮิสตามีนสูงสุดเพียง 5.68 ppm

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาซาร์ดีนในงานวิจัยเมื่อปี พ.ศ. 2555 (หน่วย ppm)

กลุ่มตัวอย่างปลา	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
กลุ่มที่รักษาอุณหภูมิที่ 0 °C	150	2.9841	1.69434	0.12	8.02
กลุ่มที่วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (22-25 °C)					
4 hr	10	0.8950	0.20813	0.54	1.20
10 hr	10	0.4700	0.40931	0.27	1.59
15 hr	10	2.2520	0.92388	1.07	3.70
20 hr	10	2.6080	1.61619	0.67	5.95
24 hr	10	4.6770	0.76674	3.44	5.68
Total	200	2.7832	1.73688	0.12	8.02

หมายเหตุ: N= Number of sample Mean= Average , Std. Deviation= Standard Deviation

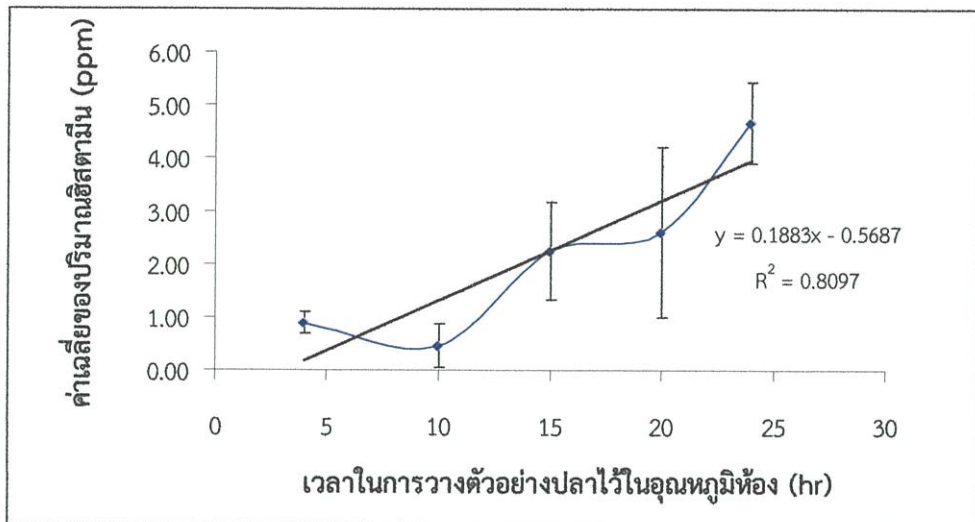
4.2.2 ผลการปรับระดับปริมาณฮิสตามีน

จากตารางที่ 4.3 แสดงผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีน จะเห็นได้ว่าที่เวลา 4 hr และ 10 hr อยู่ในกลุ่มเดียวกัน 15 hr และ 20 hr อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และ 24 hr อยู่อีกกลุ่มหนึ่ง ดังนั้นในการวางแผนการทดลองต่อไปจึงควรจะวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้องที่มากกว่า 10 hr ขึ้นไป จากการวิเคราะห์ทางสถิติ รูปที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้องที่แสดงเป็นสมการเส้นตรง แนวโน้มที่จะวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้อง เพื่อให้ได้ปริมาณฮิสตามีน 200 ppm จะต้องใช้เวลา 1065 hr หรือ 45 วัน และรูปที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้องที่แสดงเป็นสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล จะต้องใช้เวลา 64 hr หรือ 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่า เวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้องเป็นเวลา 45 วันไม่มีความเป็นไปได้ เนื่องจากจะเน่าเสียก่อน จึงวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิต้อง เป็นเวลา 3 วัน จึงวางแผนการทดลองใหม่โดยการวางปลาที่อุณหภูมิต้องโดยแบ่งเป็น 10 20 30 40 50 60 และ 70 hr ใช้ตัวอย่างปลาชุดละ 5 ตัว รวม 35 ตัว ซึ่งปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาซาร์ดีนในงานวิจัยที่มีการปรับปรุง แสดงดังตารางที่ 4.4 และจากตารางที่ 4.5 แสดงผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิต้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีนของงานวิจัยที่ปรับปรุง จะเห็นได้ว่า ข้อมูลมีความแปรปรวนมาก การแบ่งกลุ่มของข้อมูลไม่ชัดเจน คือที่เวลา 10, 50 และ 60 hr อยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 20, 40, 30 hr อยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ส่วน 70 hr อยู่กลุ่มที่ 3

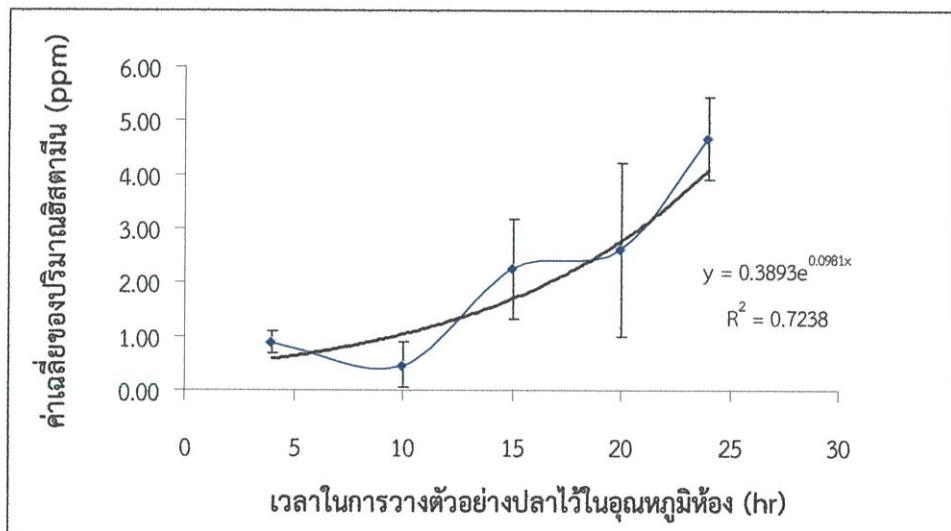
ตารางที่ 4.3 ผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิห้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีน (หน่วย ppm)

Histamine				
Time (hr)	N	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
10	10	0.4700	-	-
4	10	0.8950	-	-
15	10	-	2.2520	-
20	10	-	2.6080	-
24	10	-	-	4.6770
Sig.		0.309	0.3930	1.0000

หมายเหตุ: การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, Time= ระยะเวลาในการวางตัวอย่างปลา (ชั่วโมง) และ N= จำนวนตัวอย่างปลาซาร์ดีนสด, sig. = ระดับความแตกต่างหรือระดับนัยสำคัญ (significance level) ถ้าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของกลุ่มเท่ากัน



รูปที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิห้อง
(สมการเส้นตรง)



รูปที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฮิสตามีนตามเวลาในการวางตัวอย่างปลาไว้ในอุณหภูมิห้อง
(สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล)

ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาซาร์ดินที่วางไว้ในอุณหภูมิต่างๆ (หน่วย ppm)

กลุ่มตัวอย่างปลา	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
กลุ่มที่รักษาอุณหภูมิที่ 0 °C	100	4.7333	8.7156	-1.45	49.09
กลุ่มที่วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (22-25 °C)					
10 hr	7	33.8700	39.0887	-0.44	118.04
20 hr	7	64.6600	73.7527	8.66	188.19
30 hr	7	83.4286	34.5832	37.79	139.17
40 hr	7	68.0157	42.8486	36.40	154.97
50 hr	7	49.2371	17.1641	25.79	83.34
60 hr	7	49.8271	28.8191	20.92	102.98
70 hr	7	1.4821E2	174.4651	68.73	543.00
Total	49	71.0351	80.1861	-0.44	543.00

หมายเหตุ: N= Number of sample Mean= Average, Std. Deviation= Standard Deviation

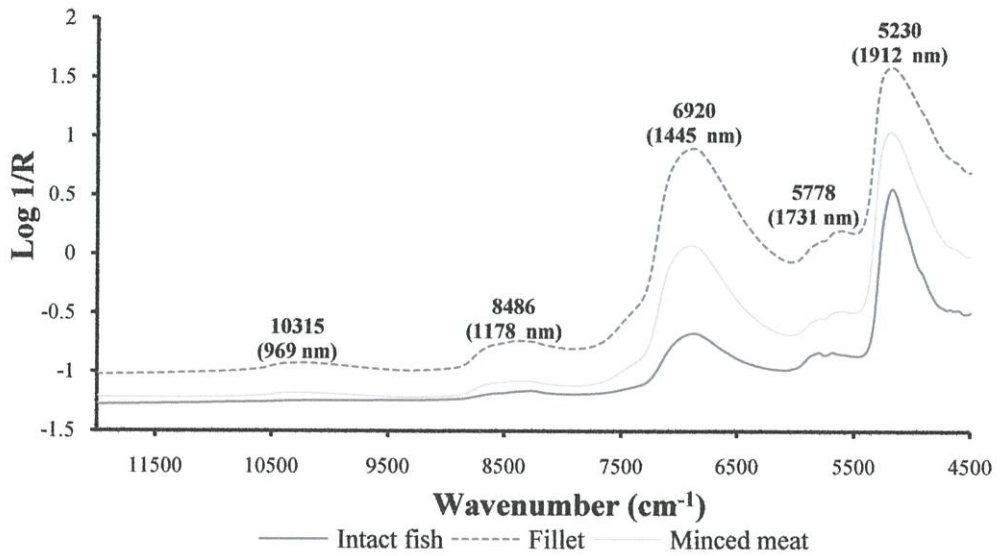
ตารางที่ 4.5 ผลของระยะเวลาที่วางตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิห้องต่อการแบ่งกลุ่มของปริมาณฮิสตามีนที่วางไว้ที่เวลาต่างๆ(หน่วย ppm)

Histamine			
Time	N	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2
10 hr	7	33.8700	
50 hr	7	49.2371	
60 hr	7	49.8271	
20 hr	7	64.6600	64.6600
40 hr	7	68.0157	68.0157
30 hr	7	83.4286	83.4286
70 hr	7		148.2071
Sig.		.301	.069

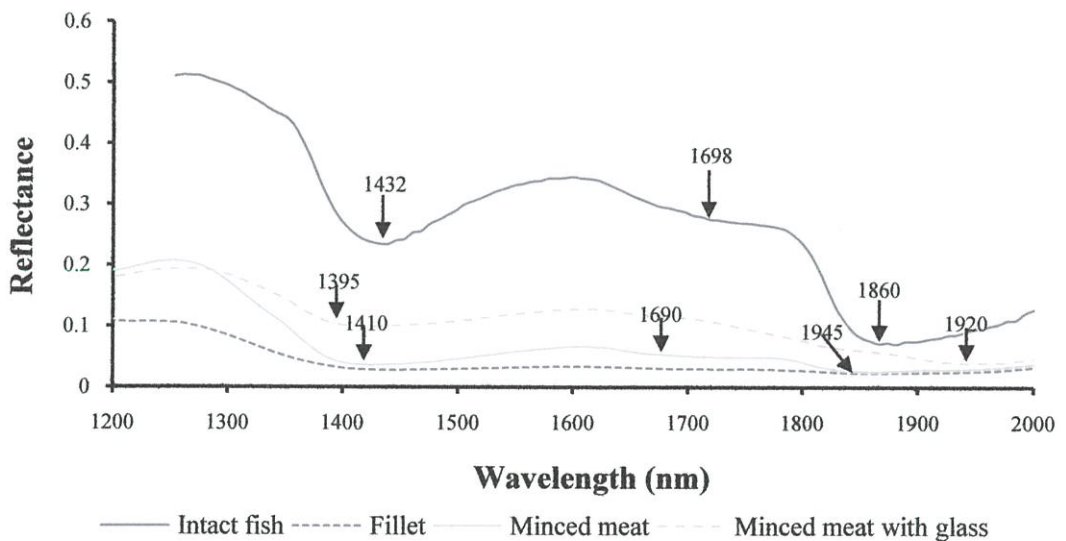
หมายเหตุ: การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, Time= ระยะเวลาในการวางตัวอย่างปลา (ชั่วโมง) และ N= จำนวนตัวอย่างปลาซาร์ดีนสด, sig. = ระดับความแตกต่างหรือระดับนัยสำคัญ (significance level) ถ้าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของกลุ่มเท่ากัน

4.3 สเปกตรัมของปลาซาร์คิน

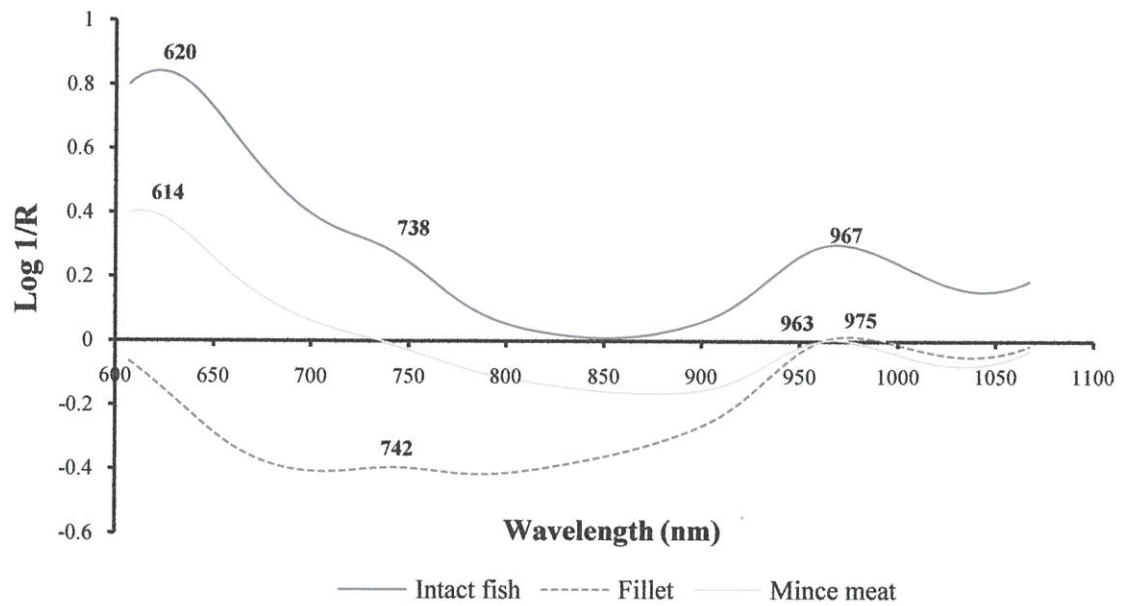
จากรูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 และตารางที่ 4.6 สเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดคือ ปลาเต็มตัว (intact) ชิ้นเนื้อปลา (fillet) เนื้อปลาบด (minced meat) และ เนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว (minced meat with glass) ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany), Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) และ Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) และพิกซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองของตัวอย่างปลาซาร์คิน ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่าสูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าเครื่อง FT-NIR spectrometer ในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิด โดยส่วนมากจะเป็นการดูดซับคลื่นของน้ำ และการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 1178 nm เป็นพิกของฮิสตามีนที่ขยับจาก ความยาวคลื่น 1176 nm ซึ่งมีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์คิน ส่วนตัวอย่างที่สแกนโดยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer พบว่าในตัวอย่างปลาเต็มตัว มีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 1432 และ 1698 nm [6] ในตัวอย่างปลาชิ้นเนื้อปลาเกิด over absorption (ดูดกลืนคลื่นมาก) คือสัญญาณการสะท้อนกลับของคลื่นต่ำมาก ทำให้พบพิกเล็กๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์น้อยกับแบบจำลอง และในตัวอย่างเนื้อปลาบดพบพิกชัดเจนขึ้น อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำบางส่วนหายไปในขณะที่ปั่นชิ้นเนื้อปลา และตัวอย่างที่สแกนโดยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer พบว่า การดูดกลืนคลื่นแสงมีค่าต่ำเป็นช่วงของแสงที่ตามองเห็นได้ จึงไม่พบพิกที่สำคัญที่มีความสัมพันธ์กับแบบจำลอง



รูปที่ 4.8 สเปกตรัมของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และเนื้อปลาบด (minced meat) ที่ช่วงเลขคลื่น $11500\text{-}4500 \text{ cm}^{-1}$ ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany)



รูปที่ 4.9 สเปกตรัมของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet), เนื้อปลาบด (minced meat) และเนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว (minced meat with glass) ที่ช่วงความยาวคลื่น $1200\text{-}2000 \text{ nm}$ ที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA)



รูปที่ 4.10 สเปกตรัมของตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact), ชิ้นเนื้อปลา (fillet) และเนื้อปลาบด (minced meat) ที่ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm ที่สแกนด้วย

เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan)

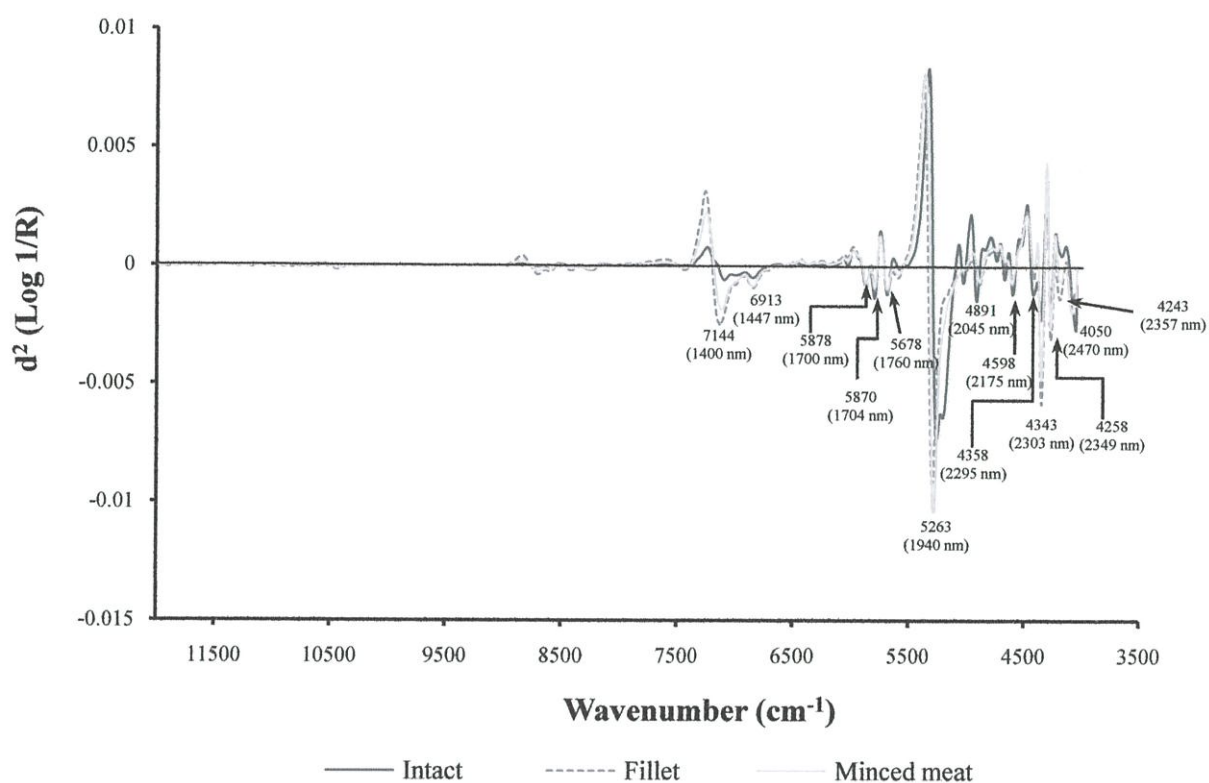
ตารางที่ 4.6 การดูดซับคลื่นในสเปกตรัมเฉื่อยของตัวอย่างปลา ปรากฏพิคซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะในโมเลกุลของตัวอย่างปลาชาร์ดินที่สแกนด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้งสาม 3 ชนิด [7, 42]

Spectrometer	Sample	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure
FT-NIR spectrometer (Matrix)	intact, fillet, minced meat	1912 (5323 cm ⁻¹)	1940	O-H str. + O-H def.	H ₂ O
		1445 (6920 cm ⁻¹)	1450	O-H str. First overtone	H ₂ O
		1731 (5778 cm ⁻¹)	1735 [42]	C-H methyl C-H, aromatic associatrd (NH ₂ CH ₃)	Amines
		1178 (8486 cm ⁻¹)	1176	Histamine	
		969 (10351 cm ⁻¹)	970	O-H str. second overtone	ROH+H ₂ O
Long wavelength diode array spectrometer	intact	1860	1900	C=O str. Second overtone	-CO ₂ H
		1432	1450	O-H str. First overtone	H ₂ O
		1698	1695	C-H str. first overtone	CH ₃
		1945	1940	O-H str. + O-H def.	H ₂ O
	Fillet, minced meat	1690	1690 [42]	CONH ₂ specifically due to peptide N-H and C=O group at right angle to the line of the peptide backbone referred to as the β-sheet structure	Proteins
Short wavelength diode array spectrometer	intact	620	none		
		738	738	O-H str. third overtone	ROH
		967	970	O-H str. second overtone	H ₂ O
	minced meat	742	740	C-H str. fourth overtone	CH ₃
		967	970	O-H str. second overtone	H ₂ O
minced meat with glass	1395	1395	2x C-H str. + C-H def.	CH ₂	
minced meat	614	none			
		963	970	O-H str. second overtone	H ₂ O

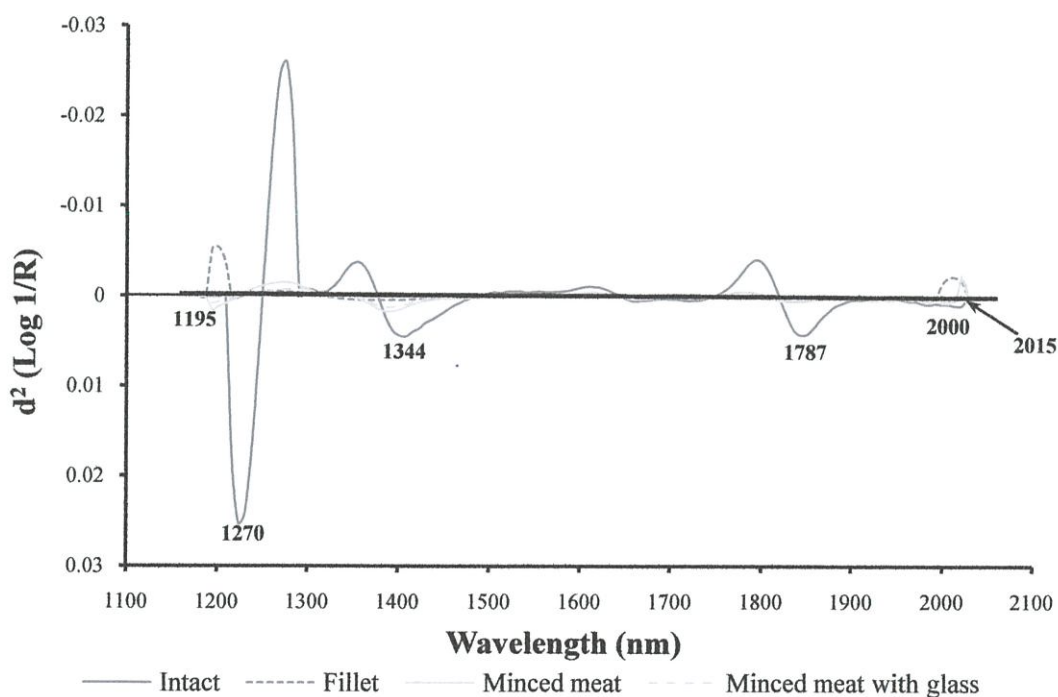
หมายเหตุ: การเรียงลำดับพิค จะเรียงจากพิคที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพิคที่ต่ำสุด

4.4 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสอง

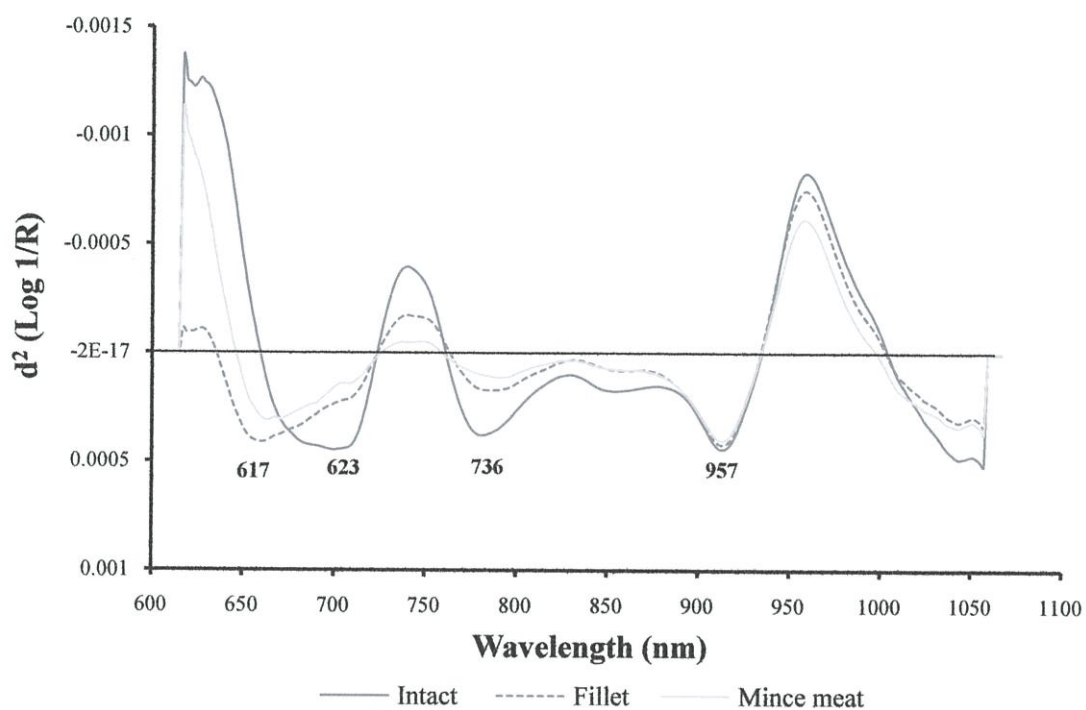
จากรูปที่ 4.11, 4.12 และ 4.13 สเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดคือ ปลาเต็มตัว (intact) ชิ้นเนื้อปลา (fillet) เนื้อปลาบด (minced meat) และ เนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว (minced meat with glass) ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany), Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) และ Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) และพีคซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองของตัวอย่างปลาชาร์ดิน ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่าสูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าเครื่อง FT-NIR spectrometer ในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิด โดยส่วนมากจะเป็นการดูดซับคลื่นของน้ำและโปรตีนเป็นส่วนมาก และการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 2470 nm [42] เป็นการสั่นสะเทือนของ C-H Combination เป็นองค์ประกอบของปลาจำพวกไขมัน ส่วนตัวอย่างที่สแกนโดยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer และเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer พบว่าในตัวอย่างปลาทั้งสามชนิดมีปริมาณน้ำมาก จะพบพีคของน้ำในสเปกตรัมทั้งหมด



รูปที่ 4.11 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองที่สแกนด้วย
เครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany)



รูปที่ 4.12 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองที่สแกนด้วย
เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA)



รูปที่ 4.13 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองที่สแกนด้วย

เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan)

ตารางที่ 4.7 พิกสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองในตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้งสามชนิด ซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะในโมเลกุลของตัวอย่างปลาชาร์ดิน [7, 42]

Spectrometer	Sample	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure
FT-NIR spectrometer (Matrix)	intact, fillet, minced meat	1900 (5263 cm ⁻¹)	1940	O—H str. + O—H def.	H ₂ O
		2303 (4343 cm ⁻¹)	2310	C—H str. + C—H def.	CH ₂
		2349 (4258 cm ⁻¹)	2347	CH ₂ sym. str.+ =CH ₂ def.	HC=CHCH ₂
		1400 (7144 cm ⁻¹)	1450	O—H str. First overtone	H ₂ O
		2470 (4050 cm ⁻¹)	2470 [42]	C—H Combination	Lipids, aliphatic compounds
		2175 (4598 cm ⁻¹)	2180	2 x amide I + amide III	protein
		1704 (5870 cm ⁻¹)	1705	C—H str. First overtone	CH ₃
		1700 (5878 cm ⁻¹)	1695	C—H str. First overtone	CH ₃
		2045 (4891 cm ⁻¹)	2050	N—H sym. str.+ amide II	protein
			2050	N—H asym. str. + amide III	CONH ₂
		2357 (4243 cm ⁻¹)	2352 [42]	C—H aromatic C—H (arly)	C—H (arly)
		1760 (5678 cm ⁻¹)	1765	C—H str. First overtone	CH ₂
		2295 (4358 cm ⁻¹)	2294	N—H str. + C=O str.	Amino acid
Long wavelength diode array spectrometer	intact	1270	1225 [42]	C—H secondary or tertiary carbon (.CH)	Hydrocarbons, aliphatic
		1344	1360 [42]	C—H combination, (.C—H ₃)	
		1787	1790	O—H combination	H ₂ O

หมายเหตุ: การเรียงลำดับพิก จะเรียงจากพิกที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพิกที่ต่ำสุด

ตารางที่ 4.7 พิกสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองในตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้งสามชนิด ซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะในโมเลกุลของตัวอย่างปลาชาร์ดิน (ต่อ)

Spectrometer	Sample	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure
Long wavelength diode array spectrometer	fillet	1195	1195	C=O str. Second overtone	—CO ₂ H
		2000	2000	N-H sym. str + amide II	CONH ₂ , CONHR
		1344	1360 [42]	C-H combination, (.C-H ₃)	Hydrocarbons, aliphatic
	minced meat	1195	1195	C=O str. Second overtone	—CO ₂ H
		2000	2000	N-H sym. str + amide II	CONH ₂ , CONHR
		2015	2012 [42]	N-H/C=O [bonded NH stretching and amide I (2νC=O stretching)]	Polyamide 11
		1195	1195	C=O str. Second overtone	—CO ₂ H
	minced meat with glass	1344	1360 [42]	C-H combination, (.C-H ₃)	Hydrocarbons, aliphatic
	Short wavelength diode array spectrometer	Intact	623	none	
736			738	O-H str. third overtone	ROH
957			970	O-H str. second overtone	H ₂ O
Fillet, Minced meat		617	none		
		736	738	O-H str. third overtone	ROH
		957	970	O-H str. second overtone	H ₂ O

หมายเหตุ: การเรียงลำดับพิก จะเรียงจากพิกที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพิกที่ต่ำสุด

4.5 สมรรถนะของแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ปรับปรุงแล้ว

4.5.1 ผลการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนของเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany)

ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนแต่ละชนิดที่ใช้สร้างสมการทำนายโดยใช้วิธี Partial Least Square Regression จากการตรวจวัดปริมาณฮิสตามีนตามกรรมวิธีของโรงงาน ที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลาทุกชนิดที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix) แสดงดังตารางที่ 4.8 ซึ่งผลการสร้างสมการทำนายค่าความสัมพันธ์ มีรายละเอียดดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีน (ppm) ที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลาที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix)

Spectrometer	Sample	Calibration set						Prediction set			
		N	Mean	Max	Min	SD	N	Mean	Max	Min	SD
FT-NIR spectrometer (Matrix) (12500-3600 cm ⁻¹)	Intact	119	23.786	188.190	-1.450	37.695	28	20.701	102.980	-1.050	29.69
	Intact (outlier)	113	17.368	102.980	-1.450*	25.289	28	20.723	102.980**	-1.050	29.69
	Fillet	119	24.428	188.190	-1.450	38.103	27	18.664	102.980	-1.050	27.074
	Fillet (outlier)	115	19.753	118.040	-1.450	28.905	27	18.664	102.980	-1.050	27.074
	Minced meat	118	23.751	118.040	-1.450	37.571	28	21.669	102.980	-1.050	30.985
	Minced meat (outlier)	113	18.135	114.600	-1.450	26.460	28	21.669	102.980	-1.050	30.985

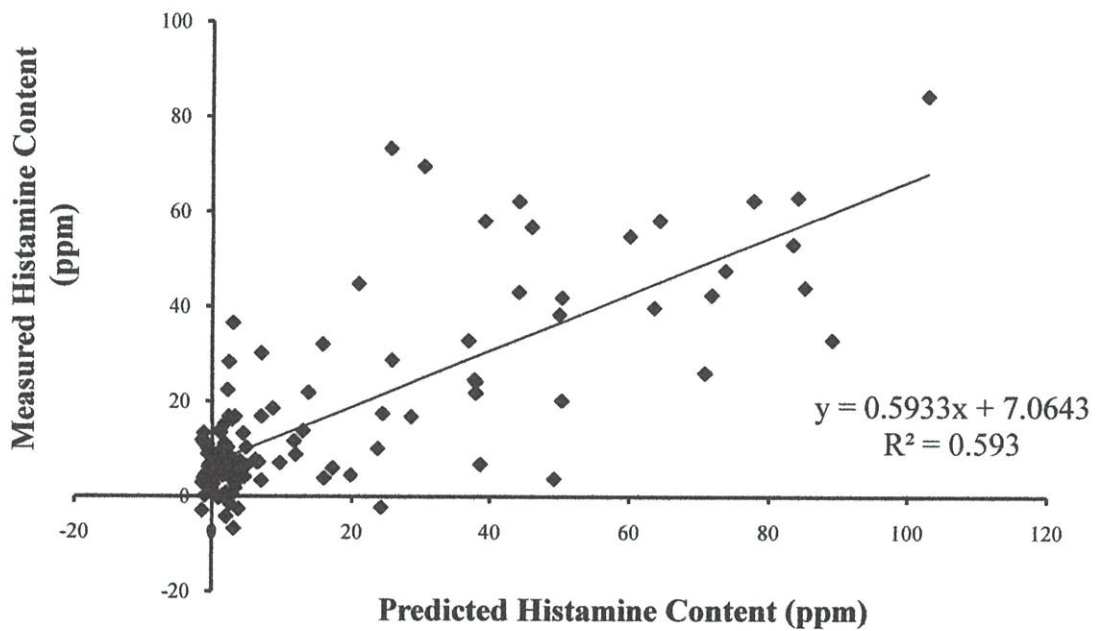
หมายเหตุ : * ปริมาณฮิสตามีนต่ำที่สุด, ** ปริมาณฮิสตามีนสูงที่สุด, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาคู, minced meat with glass= เนื้อปลาคูที่สแกนผ่านแก้ว, N= Number of scanning or Number of Sample, Mean= Average, Max= Maximum, Min= Minimum, SD= Standard Deviation และ (outlier) หมายถึงข้อมูลที่ผ่านการคัดเอาค่าอันออกกลุ่มออกแล้ว (PCA)

ตารางที่ 4.9 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดปริมาณของปลาจารกรังในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดด้วย FT-NIR spectrometer (Matrix)

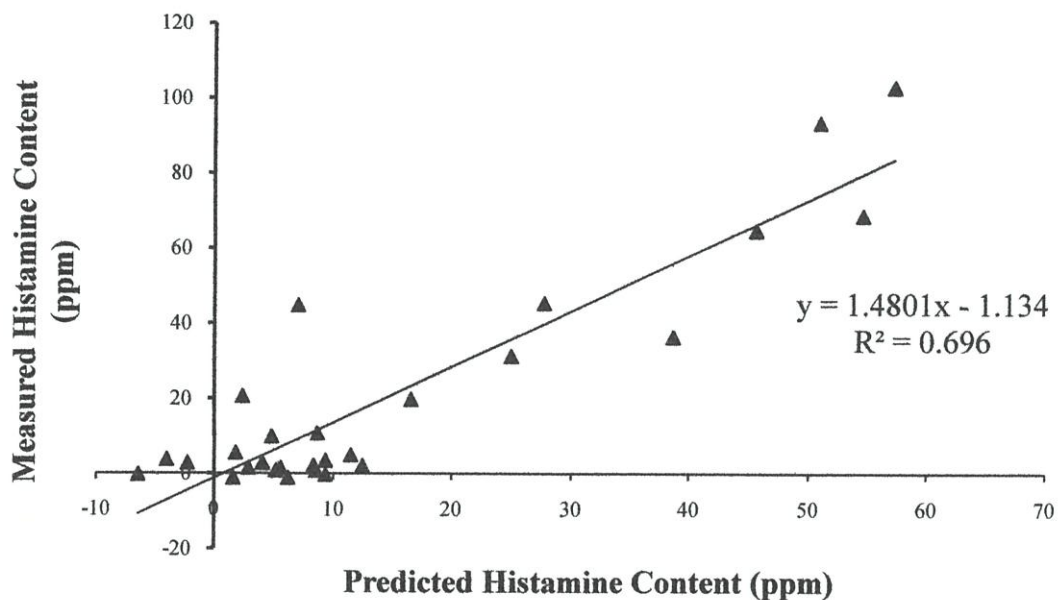
Spectrometer (Frequency Range)	Sample	Wavelength/ Wavenumber Range (nm, cm ⁻¹)	Pre-processing	PC/ Rank	Calibration set			Prediction set		
					R ² (ppm)	Bias (ppm)	R ²	RMSEP (ppm)	Bias (ppm)	R ²
FT-NIR spectrometer (Matrix) (12500-3600 cm ⁻¹)	Intact	9404-7499 cm ⁻¹ , 5454-4598 cm ⁻¹	SNV	7	0.429	29.400	-	0.823	12.300	1.02
	Intact (outlier)*	9404-7499 cm ⁻¹ , 5454-4599 cm ⁻¹	SNV	7	0.593	16.700	-	0.696	16.100	5.95
	Fillet	9404-5447 cm ⁻¹ , 4606-4243 cm ⁻¹	No spectral data preprocessing	6	0.411	30.000	-	0.565	17.500	-1.24
	Fillet (outlier)	9404-5447 cm ⁻¹ , 4606-4244 cm ⁻¹	No spectral data preprocessing	3	0.308	24.400	-	0.452	19.700	2.16
	Minced meat	6102-5447 cm ⁻¹	First derivative (17 Pts)	3	0.426	28.800	-	0.300	25.500	-1.11
	Minced meat (outlier)	6102-5448 cm ⁻¹	First derivative (17 Pts)	3	0.556	17.900	-	0.370	24.200	3.24

หมายเหตุ : * แบบจำลองที่ดีที่สุด, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นปลา, minced meat= เนื้อปลาบด, minced meat with glass= เนื้อปลาบดที่ใส่แกนแก้ว, (outlier) หมายถึงข้อมูลที่ผ่านการคัดเอาค่าผิดปกติออกแล้ว (PCA), Rank= PLS factor, SNV= Vector normalization, R²= Coefficient of determination, RMSEE= Root mean square error of cross Calibration, RMSEP= Root mean square error of cross prediction, Bias= error

จากตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.15 แบบจำลองที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดินที่สเปกตรัมได้จากการสแกนที่เครื่อง FT-NIR spectrometer พบว่า ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ที่มีการกำจัดค่าผิดปกติ (outlier) ในตัวอย่างปลาตัวที่ 25 (40 hr), 31 (30 hr), 35 (30 hr), 91 (10 hr), 94 (20 hr) และ 95 (20 hr) ออก และมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นแบบ SNV มีค่า R^2 ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction) เท่ากับ 0.696, RMSEP เท่ากับ 16.100 (ppm) และ bias เท่ากับ 5.950 (ppm) ซึ่งผลการสร้างแบบจำลองการทำนายปริมาณฮิสตามีนของตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาและเนื้อปลาสับทำนายได้ไม่ดี

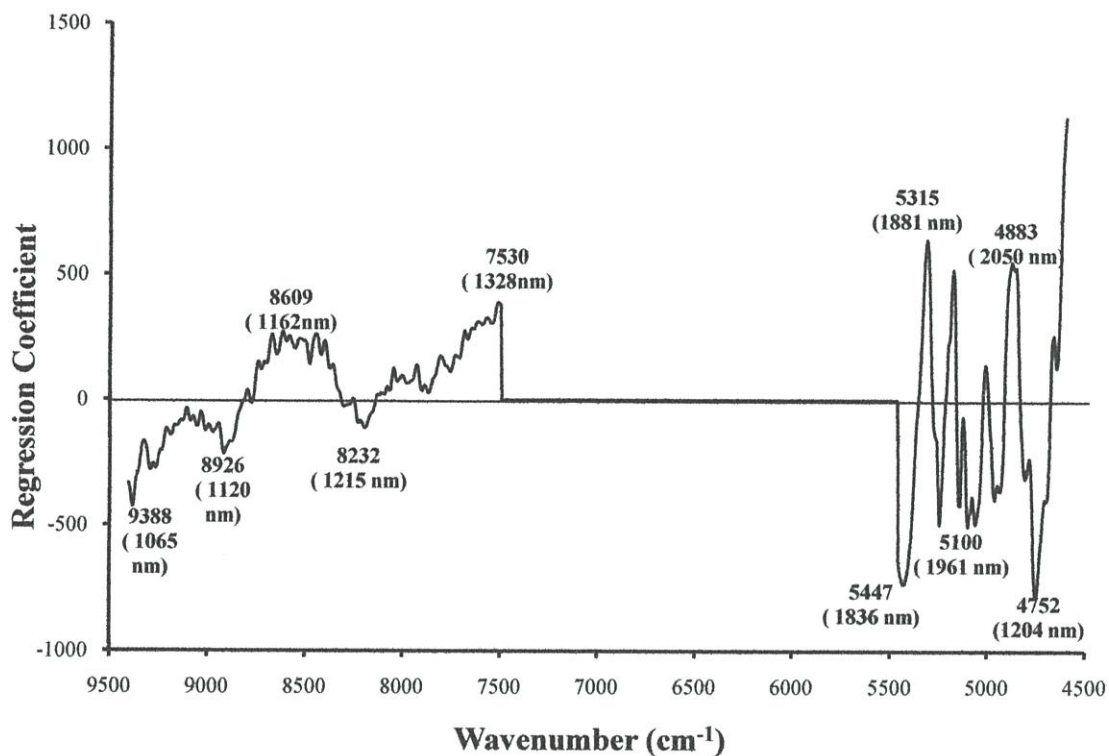


รูปที่ 4.14 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany) ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่าผิดปกติออก ในชุดสร้างแบบจำลอง (Calibration set)

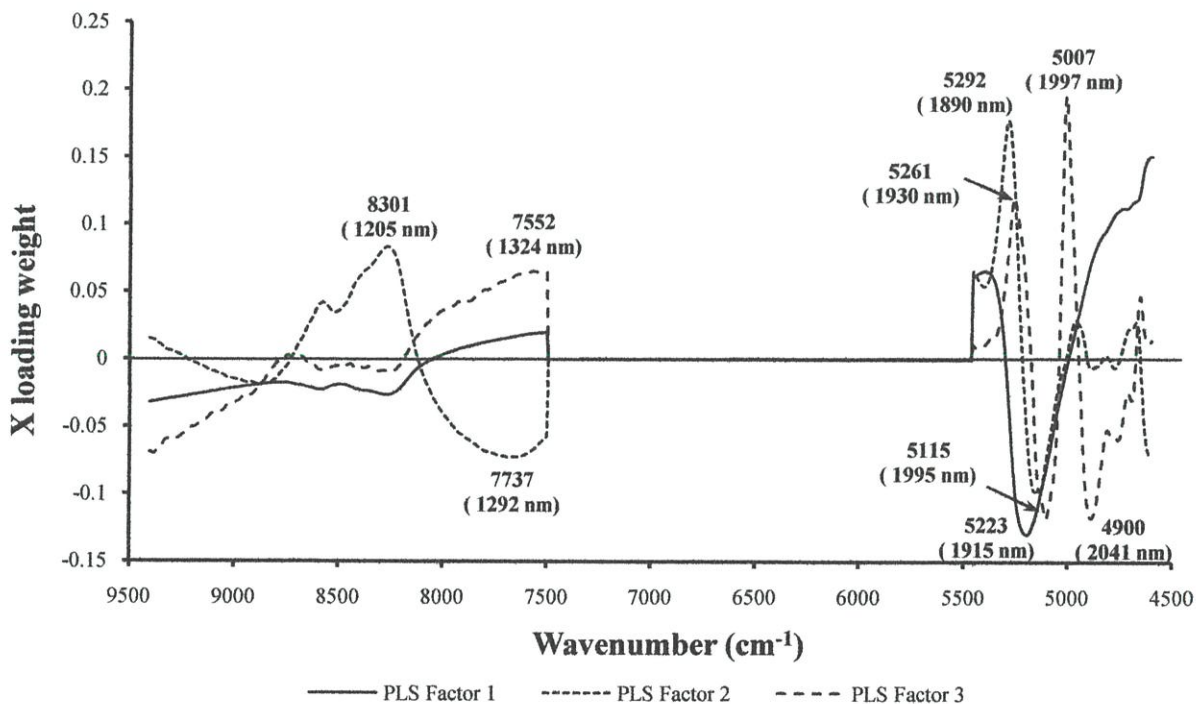


รูปที่ 4.15 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix, Bruker, Germany) ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set)

จากรูปภาพที่ 4.16 แสดงค่า Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก (Intact (outlier)) โดยใช้เครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix) พบพิกซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.10 ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่า Regression coefficient สูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า พบว่าการสั่นสะเทือนของ protein (N-H sym. str.+ amide II) และ CONH_2 (N-H asym. str. + amide III) [7] มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน และรูปที่ 4.17 แสดงค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก ซึ่งมี 3 factor (rank) สำหรับการทำนายผล พบพิกซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.10 ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่า ค่า X-loading weight สูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า พบว่าการสั่นสะเทือนของ CONH (C=O str. Second overtone) [7] มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน



รูปที่ 4.16 Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีน
ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่าออกกลุ่มออก (Intact (outlier))



รูปที่ 4.17 ค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีน
ในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่าออกกลุ่มออก (Intact (outlier))

ตารางที่ 4.10 พิกที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการ ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการนำค่านอกกลุ่มออก (Intact (outlier)) ที่สแกนด้วยเครื่อง FT-NIR Spectrometer [7, 42]

Graph	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure	
Regression coefficient plot	2050 (4883 cm^{-1})	2050	N-H sym. str.+ amide II	protein	
		2050	N-H asym. str. + amide III	CONH ₂	
	1836 (5447 cm^{-1})	none			
	1204 (4752 cm^{-1})	1211 [42]	C-H methylene (.C-H ₂)	Hydrocarbons, aliphatic	
	1961 (5100 cm^{-1})	1960	N-H asym. str. + amide III	CONH ₂	
	1328 (7530 cm^{-1})	1360 [42]	C-H combination, (.C-H ₃)	Hydrocarbons, aliphatic	
	1162 (8609 cm^{-1})	1160 [42]	C=O (carbonyl >C=O)	ns, aliphatic	
	1065 (9388 cm^{-1})	1060	N-H str. Second overtone	RNH ₂	
	1120 (8926 cm^{-1})	1143 [42]	C-H (aromatic C-H)	Hydrocarbons, aliphatic	
	1215 (8232 cm^{-1})	1215	C-H str. Second overtone	CH ₂	
X-loading weight	PLS Factor 1	1915 (5223 cm^{-1})	1920	C=O str. Second overtone	CONH
		PLS Factor 2	1890 (5292 cm^{-1})	1892 [42]	O-H hydrogen bonding between water and exposed polyvinyl alcohol OH
	1995 (5115 cm^{-1})		2000	N-H sym. str + amide II	CONH ₂ , CONHR
	1292 (7737 cm^{-1})		none		
	PLS Factor 3	1205 (8301 cm^{-1})	1195	C-H str. second overtone	CH ₃
			1215	C-H str. second overtone	CH ₂
		1997 (5007 cm^{-1})	2000	N-H sym. str + amide II	CONH ₂ , CONHR
		1995 (5115 cm^{-1})	2000	N-H sym. str + amide II	CONH ₂ , CONHR
		1930 (5261 cm^{-1})	1930 [42]	O-H stretching and HOH bending combination	Polysaccharides
	1324 (7552 cm^{-1})	1360 [42]	C-H combination, (.C-H ₃)	Hydrocarbons, aliphatic	

หมายเหตุ: การเรียงลำดับพิก จะเรียงจากพิกที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพิกที่ต่ำสุด

4.5.2 ผลการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนของเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA)

ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนของปลาชาร์ดินแต่ละชนิดที่ใช้สร้างสมการทำนายโดยใช้วิธี Partial Least Square Regression จากการตรวจวัดปริมาณฮิสตามีนตามกรรมวิธีของโรงงาน ที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลาทุกชนิดที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer แสดงดังตารางที่ 4.11 ซึ่งผลการสร้างสมการทำนายค่าความสัมพันธ์ มีรายละเอียดดังตารางที่ 4.12

จากตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.19 แบบจำลองที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดินที่สเปกตรัมได้จากการสแกนที่เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer พบว่า ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact) และมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นแบบ De-trending โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.515, RMSEP เท่ากับ 27.485 และ bias เท่ากับ -8.231

ตารางที่ 4.11 ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลา

ที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (หน่วย ppm)

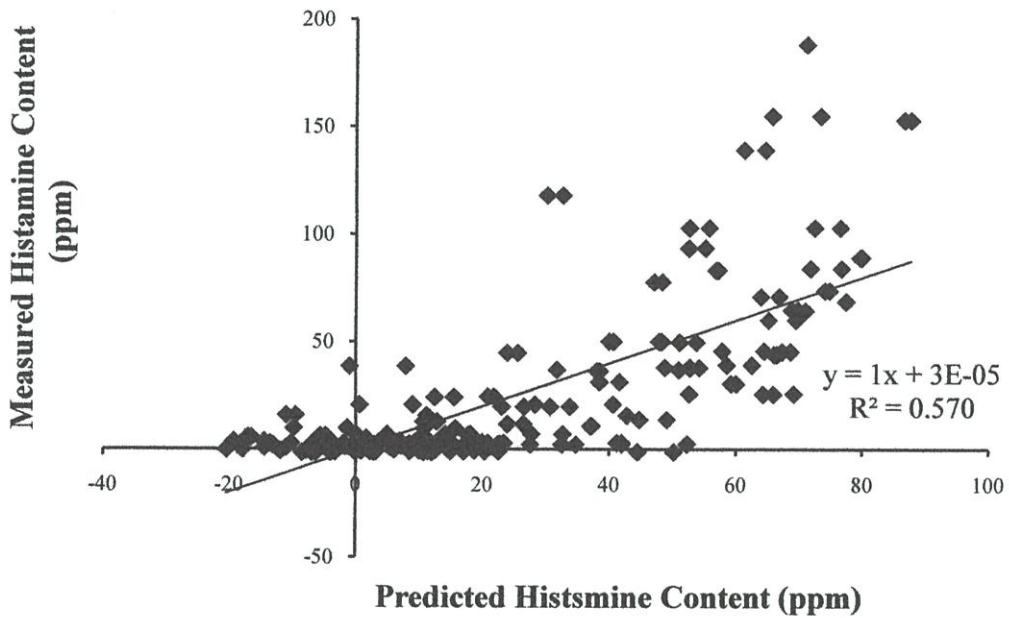
Spectrometer	Sample	Calibration set						Prediction set			
		N	Mean	Max	Min	SD	N	Mean	Max	Min	
Long wavelength diode array spectrometer	Intact	233 (120)	23.364	188.190*	-1.450	36.207	57 (29)	23.826	188.190	-1.250**	3
	Fillet	237 (118)	23.101	188.190	-1.450	36.075	58 (29)	24.006	154.970	-1.250	3
(1150-2150 nm)	Minced meat	236 (120)	27.454	188.190	-1.450	36.052	58 (29)	24.305	154.970	-1.250	3
	Minced meat with glass	236 (120)	23.085	188.190	-1.450	36.112	58 (29)	23.663	153.010	-1.250	3

หมายเหตุ : * ปริมาณฮิสตามีนต่ำที่สุด, ** ปริมาณฮิสตามีนสูงที่สุด, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาบด, minced meat with glass= เนื้อปลาบดที่สแกนผ่านแก้ว, N= Number of scanning (Number of sample), Mean= Average, Max= Maximum, Min= Minimum, SD= Standard Deviation

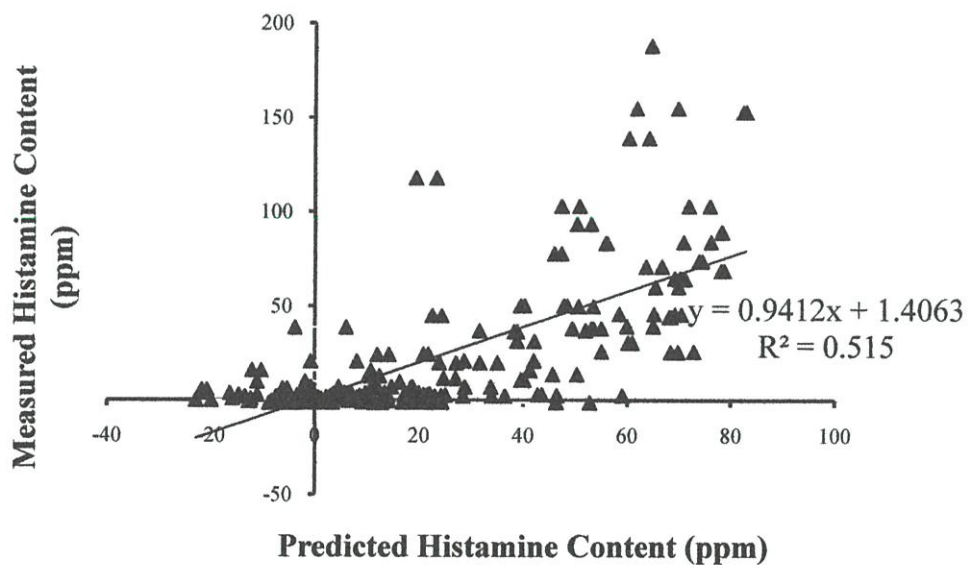
ตารางที่ 4.12 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดอิสตามีนของปลาซาร์ดีนในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดด้วย Long wavelength diode array spectrometer

Spectrometer (Frequency Range)	Sample	Wavelength (nm)	Pre-processing	PC/ Rank	Calibration set			Prediction set		
					R ²	SEC (ppm)	Bias (ppm)	R ²	SEP (ppm)	Bias (ppm)
			De-trending *	8	0.570	23.750	-1.69E-05	0.515	27.485	-8.231
	Intact	1255-2060 nm	Raw spectrum	13	0.609	22.582	-2.33E-05	0.307	30.069	-7.622
			SNV+ De-trending	10	0.609	22.640	2.23E-06	0.253	30.727	-9.587
Long wavelength diode array spectrometer (1150-2150 nm)			SM 11 points+ Normalize Range	8	0.354	28.994	2.22E-05	0.389	30.764	-1.612
		1181-2030 nm	SM 11 pointst + Derivative S.Golay 2nd 5 points	6	0.358	28.908	-4.23E-06	0.318	30.289	-4.204
			SM 5 points+ Derivative S.Golay 2nd 11 points	7	0.335	27.726	7.76E-08	0.312	27.209	1.094
		Minced meat	1159-2053 nm	SM 5 point+ Max Normalize	5	0.340	29.280	4.41E-06	0.376	29.516
	Minced meat		SM 5 points+ Derivative * S.Golay 2nd 11 points	7	0.409	27.726	7.76E-08	0.337	27.209	1.094
	Minced meat ith glass	1158-2053 nm	SM 5 points	19	0.608	22.590	-0.0002	0.136	33.954	-3.433

หมายเหตุ : * แบบจำลองที่ดีที่สุด, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาบด, minced meat with glass= เนื้อปลาบดที่ใส่แก้วผ่านแก้ว, PC= PLS factor, SM= Smoothing, SNV= Vector normalization, R² = Coefficient of determination, SEC= Standard error of determination, Bias= Standard error of calibration , Bias= Standard error of prediction

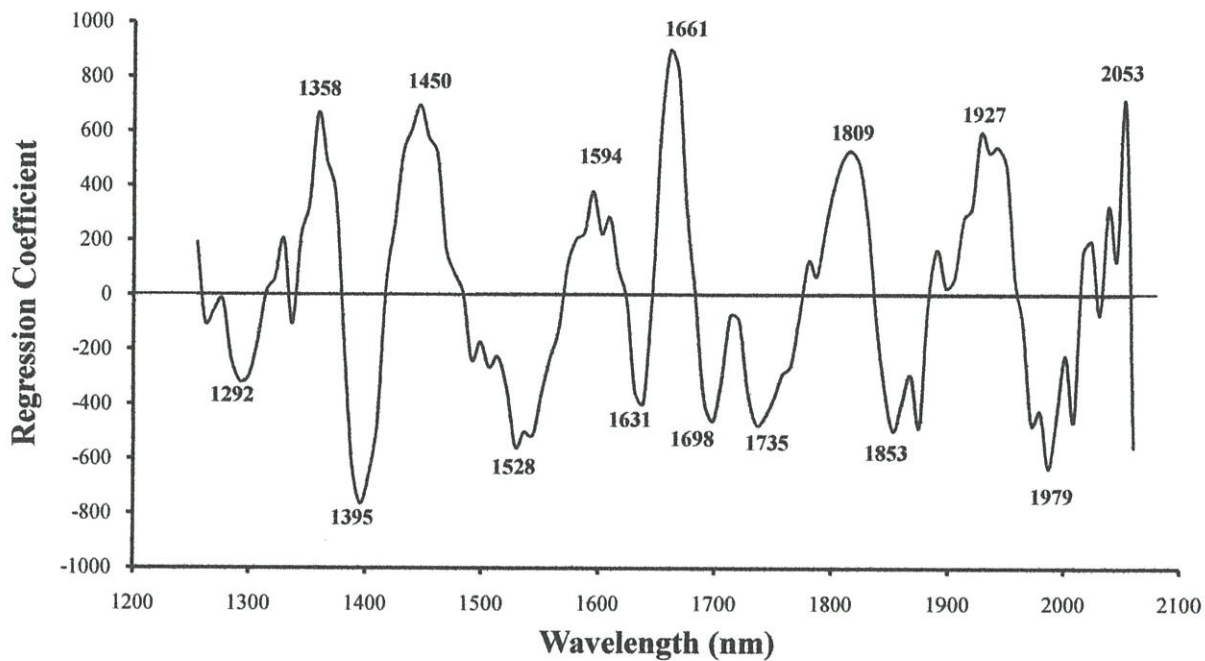


รูปที่ 4.18 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ในชุดสร้างแบบจำลอง (Calibration set)

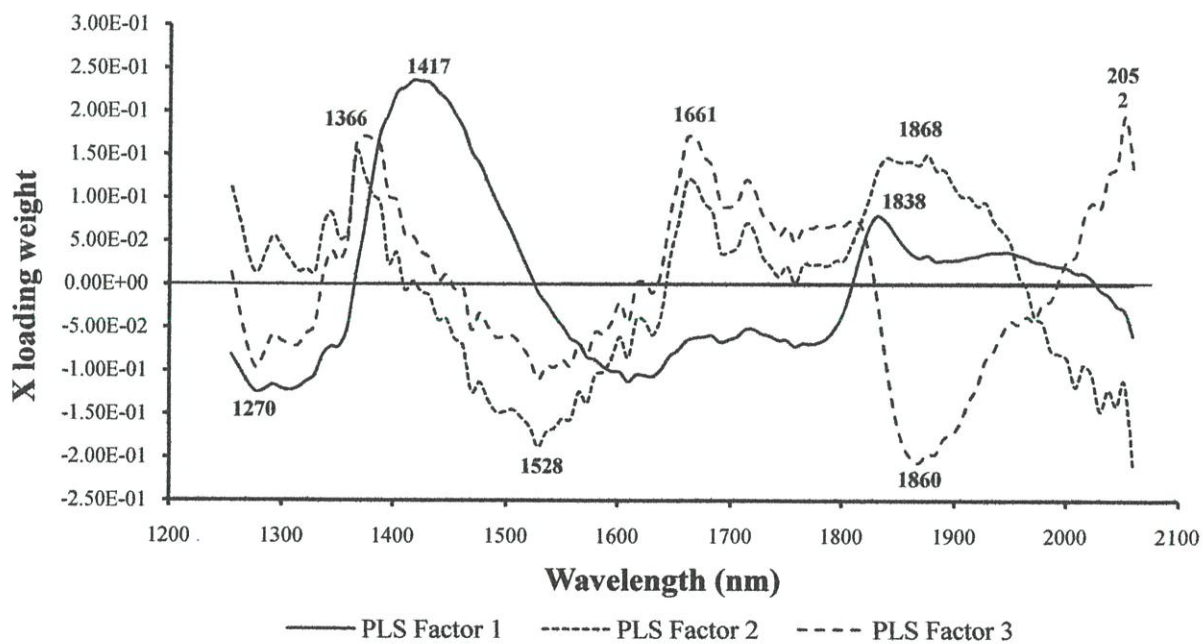


รูปที่ 4.19 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set)

จากรูปที่ 4.20 แสดงค่า Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาเต็มตัว โดยใช้เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer พบพีคซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.13 ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่า Regression coefficient สูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า พบว่าการสั่นสะเทือนของ *cis*-RCH=CHR¹ (C-H str. first overtone) [42] มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน และรูปที่ 4.21 แสดงค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างตัวอย่างปลาเต็มตัวที่มีการตัดค่านอกกลุ่มออก ซึ่งมี 3 factor (rank) สำหรับการทำนายผล พบพีคซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.13 ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่า ค่า X-loading weight สูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า พบว่าการสั่นสะเทือนของ aromatic (2 X C-H str. + C-H def.) [42] มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน



รูปที่ 4.20 Regression coefficient plot ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact)



รูปที่ 4.21 ค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact)

ตารางที่ 4.13 พีคที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการ ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer [7, 42]

Graph	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure	
Regression coefficient plot	1661	1660 [42]	C-H str. first overtone	<i>cis</i> - RCH=CHR ¹	
	1395	1395	2 X C-H str. + C-H def.	CH ₂	
	1358	1360	2 X C-H str. + C-H def.	CH ₃	
	1450	1450	O-H str. first overtone	H ₂ O	
	2053	2050	N-H sym. str.+ amide II	protein	
		2050	N-H asym. str. + amide III	CONH ₂	
	1594	1598 [42]	C=H/N-H combination from polyamide 11	Polyamide 11	
	1528	1530	N-H amide .NH or NH ₂	Amide/protein	
	1979	1980	N-H asym. str.+ amide II	protein	
	1853	none			
	1698	1695	C-H str. first overtone	CH ₃	
	1631	1631 [42]	C-H vinylidene C-H, associate with (CH ₂ =C<)	Hydrocarbons, aliphatic	
	1292	none			
X-loading weight	PLS Factor 1	1417	1417	2 X C-H str. + C-H def.	aromatic
		1270	none		
		1838	none		
	PLS Factor 2	1366	1370 [42]	C-H methyl C-H, associated with aromatic (ArCH ₃)	Hydrocarbons, aliphatic
		1528	1530 [42]	N-H amide .NH or NH ₂	Amide/protein
		1860	none		
		1661	1660 [42]	C-H str. first overtone	<i>cis</i> - RCH=CHR ¹
		1868	none		

หมายเหตุ: การเรียงลำดับพีค จะเรียงจากพีคที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพีคที่ต่ำสุด

ตารางที่ 4.13 พิกที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการ ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างปลาเต็มตัว (intact) ที่สแกนด้วยเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (ต่อ)

Graph	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure
X-loading weight PLS Factor 3	1860	none		
	2052	2050	N-H sym. str.+ amide II	protein
		2050	N-H asym. str. + amide III	CONH ₂
	1661	1660 [42]	C-H str. first overtone	<i>cis</i> - RCH=CHR ¹
	1366	1360 [42]	C-H combination, (.C-H ₃)	Hydrocarbons, aliphatic
	1528	1530 [42]	N-H amide .NH or NH ₂	Amide/protein

หมายเหตุ: การเรียงลำดับพิก จะเรียงจากพิกที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพิกที่ต่ำสุด

4.5.3 ผลการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนของเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer

ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนของปลาชาร์ดินแต่ละชนิดที่ใช้สร้างสมการทำนายโดยใช้วิธี Partial Least Square Regression จากการตรวจวัดปริมาณฮิสตามีนตามกรรมวิธีของโรงงานที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลาทุกชนิดที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer แสดงดังตารางที่ 4.14 ซึ่งผลการสร้างสมการทำนายซึ่งแสดงความถูกต้องและแม่นยำ มีรายละเอียดดังตารางที่ 4.15

จากตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.19 แบบจำลองที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดินสเปกตรัมได้จากการสแกนที่เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer พบว่า ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) และมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นแบบ Range Normalize โดยมีค่า R² ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set) เท่ากับ 0.533, RMSEP เท่ากับ 25.956 และ bias เท่ากับ -1.166

ตารางที่ 4.14 ค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน (ppm) ที่ใช้สร้างสมการทำนายสำหรับตัวอย่างปลาที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (ppm)

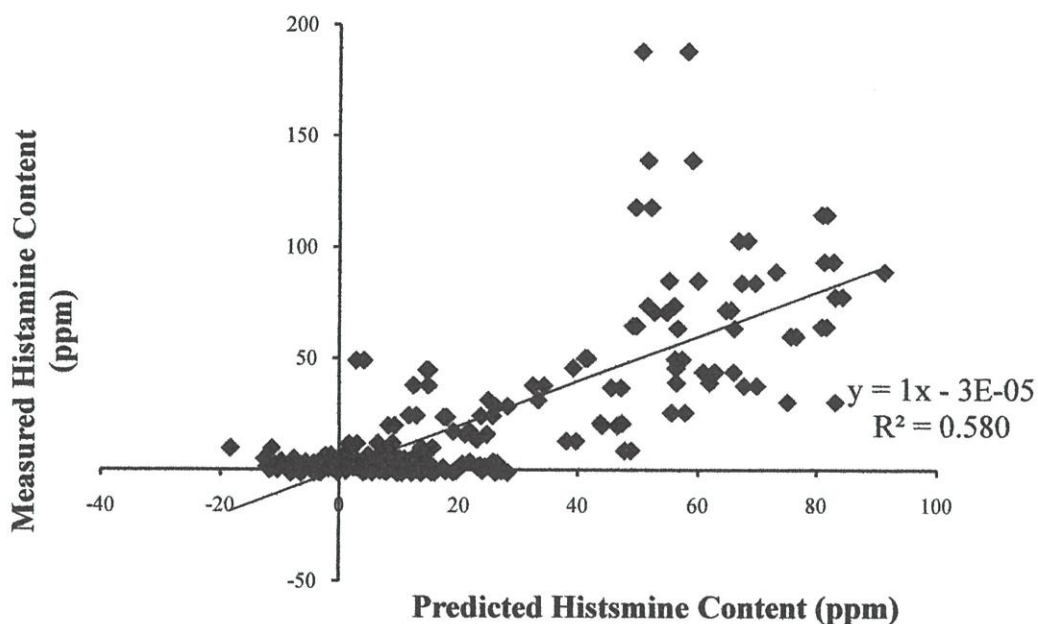
Spectrometer	Sample	Calibration set					Prediction set				
		N	Mean	Max	Min	SD	N	Mean	Max	Min	SD
Short wavelength diode array spectrometer (600-1100 nm)	Intact	235 (117)	22.373	188.190	-1.450	35.531	57 (29)	22.868	188.190	-1.250	36.898
	Fillet	236 (118)	21.958	188.190	-1.450	34.127	58 (29)	23.663	153.010	-1.250	36.729
	Minced meat	235 (117)	22.593	188.190	-1.450	35.372	58 (29)	25.229	188.190	-1.250	40.240

หมายเหตุ : intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาคุด, minced meat with glass= เนื้อปลาคุดที่สแกนผ่านแก้ว, N= Number of scanning (Number of sample), Mean= Average, Max= Maximum, Min= Minimum, SD= Standard Deviation

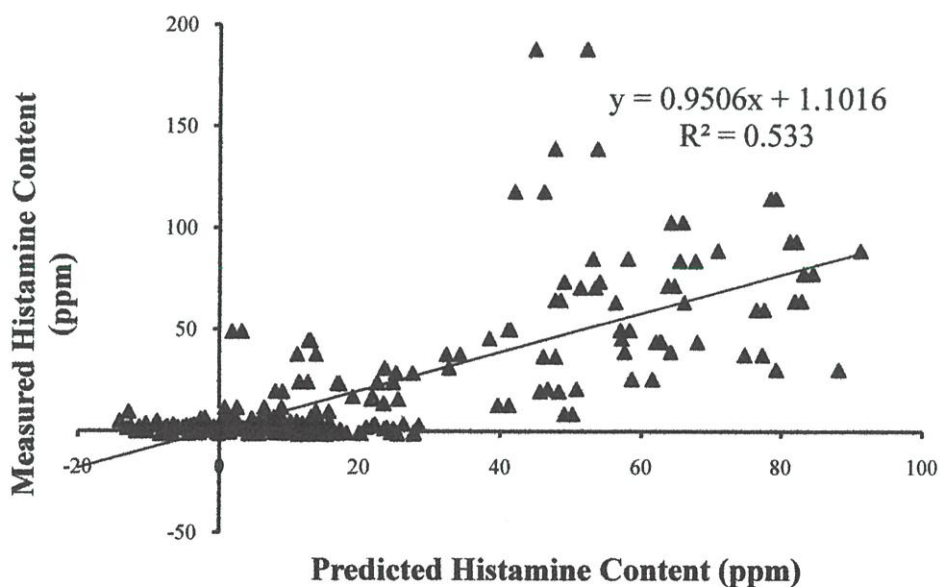
ตารางที่ 4.15 แบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดปริมาณของปลาซาร์ดีนในตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดด้วย Short wavelength diode array spectrometer

Spectrometer (Frequency Range)	Sample	Wavelength (nm)	Pre-processing	Calibration set				Prediction set		
				PC/ Rank	R ²	SEC/ RMSEE (ppm)	Bias (ppm)	R ²	SEP/ RMSEP (ppm)	Bias (ppm)
Short wavelength diode array spectrometer (600-1100 nm)	Intact	608-1068 nm	Derivative S.Golay 1st 5 points	5	0.320	25.511	6.41E-07	0.313	23.120	-4.511
			Derivative S.Golay 2nd 11 points	12	0.558	23.619	6.65E-07	0.357	29.009	-5.816
	Baseline offset	10	0.578	22.178	-1.07E-06	0.475	26.545	-1.790		
Short wavelength diode array spectrometer (600-1100 nm)	Fillet	608-1069 nm	Range Normalize *	10	0.581	22.083	1.20E-05	0.533	25.956	-1.166
			Derivative S.Golay 2nd 11 points	5	0.581	22.102	8.38E-07	0.509	29.573	-1.397
	Minced meat	608-1070 nm	SNV	7	0.515	24.626	3.99E-06	0.311	33.321	2.333

หมายเหตุ : * แบบจำลองที่ดีที่สุด, intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, minced meat= เนื้อปลาบด, minced meat with glass= เนื้อปลาบดที่ผสมผ่านแก้ว, PC= PLS factor, SM= Smoothing, SNV= Vector normalization, R²= Coefficient of determination, SEC= Standard error of determination, Bias= error of calibration, SEP= Standard error of prediction



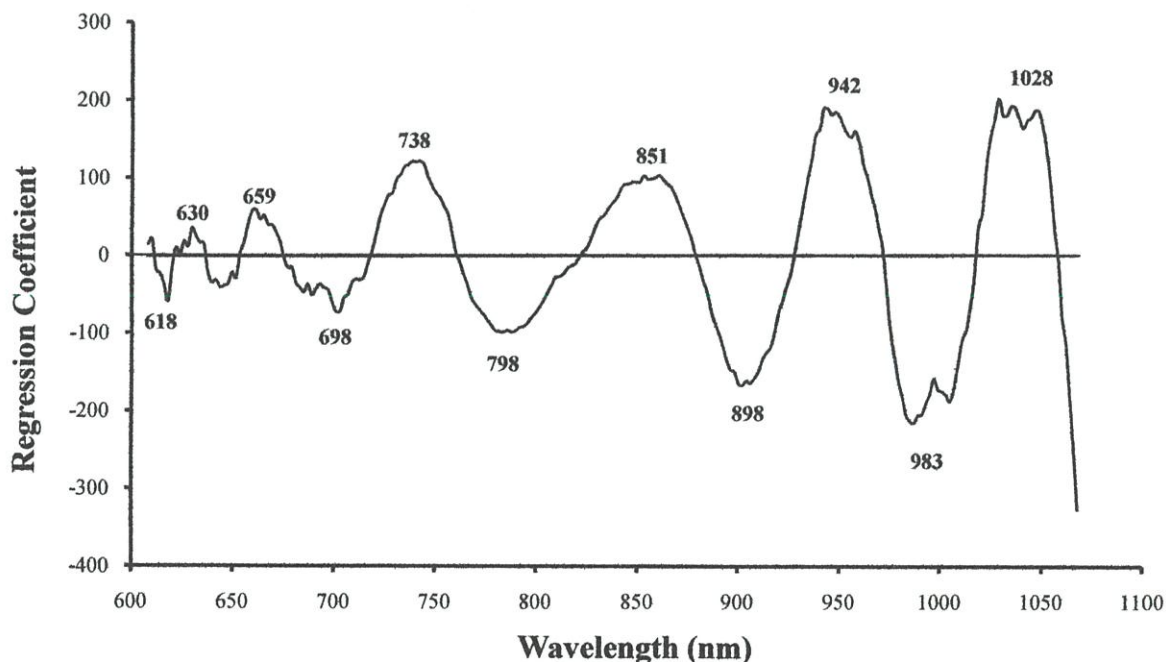
รูปที่ 4.22 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ในชุดสร้างแบบจำลอง (Calibration set)



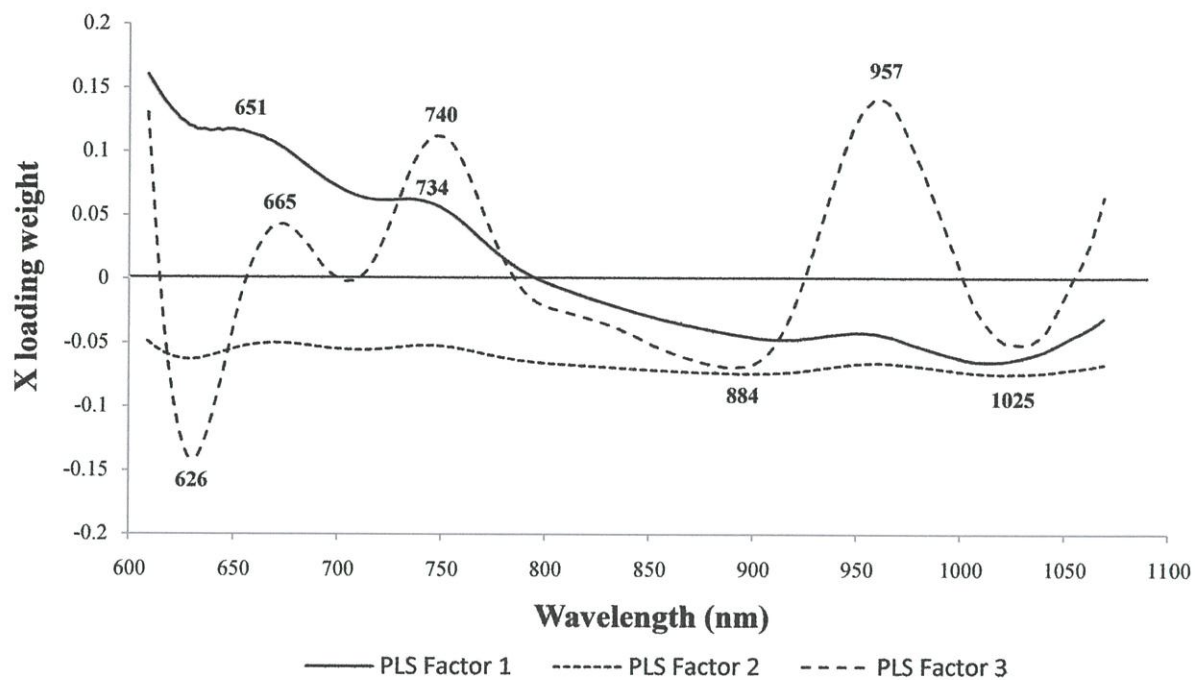
รูปที่ 4.23 การเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนที่วัดจากวิธีมาตรฐานของโรงงานกับค่าที่ทำนายโดยวิธีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set)

จากรูปที่ 4.20 แสดงค่า Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา โดยใช้เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer พบพิกซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.16 ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่า Regression coefficient สูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า พบว่าการสั่นสะเทือนของ RNH_2 (N-H str. second overtone) [7] มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน

รูปที่ 4.21 แสดงค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างตัวอย่างปลา เต็มตัวที่มีการตัดค่าออกกลุ่มออก ซึ่งมี 3 factor (rank) สำหรับการทำนายผล พบพิกซึ่งมีความสำคัญต่อแบบจำลองแสดงในตารางที่ 4.16 ซึ่งเรียงลำดับจากช่วงเลขคลื่นที่มีค่า X-loading weight สูงสุดไปยังค่าที่น้อยกว่า พบว่าการสั่นสะเทือนของ protein ($2 \times \text{N-H str.} + 2 \times \text{amide I}$) และ ArNH_2 N-H str. second overtone [42] มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ดิน



รูปที่ 4.24 Regression coefficient plot ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet)



รูปที่ 4.25 ค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet)

ตารางที่ 4.16 พิกที่ปรากฏใน Regression coefficient plot และ X-loading weight ของสมการ ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างปลาในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ที่สแกนด้วยเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer [7, 42]

Graph	Appeared wavelength (nm)	Cited wavelength (nm) [7]	Bond vibration	Structure	
Regression coefficient plot	1028	1030	N-H str. second overtone	RNH ₂	
	983	970	O-H str. second overtone	H ₂ O	
	942	938	C-H str. third overtone	CH ₂	
	898	900	C-H str. Third overtone	CH ₃	
	851	none			
	798	796 [42]	C-H methyl C-H, associated with linear aliphatic CH ₃ (CH ₂) _N CH ₃	Hydrocarbons, aliphatic	
	738	738	O-H str. third overtone	ROH	
	698	none			
	659	none			
	630	none			
	618	none			
X-loading weight	PLS Factor 1	651	none		
		734	738	O-H str. third overtone	ROH
	PLS Factor 2	626	none		
		PLS Factor 3	957	none	
	626		none		
	740		740 [42]	C-H str. fourth overtone	CH ₃
	665		none		
	1025	1020 [42]	2 x N-H str. + 2 x amide I	protein	
		1020 [42]	N-H str. second overtone	ArNH ₂	

หมายเหตุ: การเรียงลำดับพิก จะเรียงจากพิกที่เห็นเด่นชัดสูงที่สุดไปยังพิกที่ต่ำสุด

4.6 การเปรียบเทียบสมรรถนะแบบจำลองเดิมกับแบบจำลองที่ได้จากวิธีการปรับปรุงแล้ว

จากตารางที่ 4.17 แสดงการเปรียบเทียบค่าทางสถิติของปริมาณฮิสตามีนในปลาชารดินของงานวิจัยเดิมกับงานวิจัยที่มีการปรับปรุงแล้วสำหรับตัวอย่างปลาที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด (ppm) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ดีที่ดีที่สุดที่ใช้ในการสร้างสมการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชารดิน พบว่า ช่วงของฮิสตามีนกว้างขึ้น จากเดิมอยู่ในช่วง 0.250-8.020 ppm เมื่อมีการปรับปรุงแบบจำลองสามารถเพิ่มช่วงได้ครอบคลุมถึง -1.050 – 188.190 ppm และจาก ตารางที่ 4.16 แสดงการเปรียบเทียบแบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาชารดินสำหรับตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิดของการทดลองเดิมและปรับปรุงแล้ว พบว่าสำหรับการใช้สเปกโทรมิเตอร์แบบ FT-NIR spectrometer ที่ช่วงเลขคลื่น 9404-7499 และ 5454-4599 cm^{-1} หรือ 1063-1334 และ 1834-2174 nm และ Short wavelength diode array spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 608-1069 nm สามารถปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้นได้ ส่วน Long wavelength diode array spectrometer ช่วงความยาวคลื่น 1255-2060 nm ไม่สามารถปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้นได้

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบค่าทางสถิติของปริมาณฮีสตามีนในปลาซาร์ดีนของการทดลองเดิมกับการทดลองที่มีการปรับปรุงแล้วสำหรับตัวอย่างปลาที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด (ppm) ของการทดลองเดิมและการทดลองที่ปรับปรุงแล้ว

Spectrometer (Frequency Range)	การทดลองเดิม/ การ ทดลองที่ปรับปรุง	Sample	Calibration set					Prediction set				
			N	Mean	Max	Min	SD	N	Mean	Max	Min	SD
FT-NIR spectrometer (MPA) (12500-3600 cm ⁻¹)	การทดลองเดิม	Intact	160 (160)	2.790	8.020	0.120	1.770	38 (38)	2.750	6.040	0.250	1.600
	การทดลองที่ปรับปรุง	Intact	113 (113)	17.368	102.980	-1.450	25.289	28 (28)	20.723	102.980	-1.050	29.690
Long wavelength diode array spectrometer (1150-2150 nm)	การทดลองเดิม	Fillet	152 (152)	2.800	8.020	0.120	1.780	36 (36)	2.740	5.910	0.270	1.570
	การทดลองที่ปรับปรุง	Intact	233 (120)	23.364	188.190	-1.450	36.207	57 (29)	23.836	188.190	-1.250	37.276
Short wavelength diode array spectrometer FOA NIR GUN (600-1100 nm)	การทดลองเดิม	Fillet	160 (160)	2.780	8.020	0.120	1.780	38 (38)	2.720	5.950	0.250	1.600
	การทดลองที่ปรับปรุง	Fillet	236 (118)	21.958	188.190	-1.450	34.127	58 (29)	23.663	153.010	-1.250	36.729

หมายเหตุ : intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, N= Number of scanning (Number of sample), Mean= Average, Max= Maximum, Min= Minimum, SD= Standard Deviation

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบแบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนสำหรับตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิดของการทดลองเดิมและการทดลองที่ปรับปรุงแล้ว

Spectrometer (Frequency Range)	Sample	Wavenumber/ Wavelength Range (nm, cm ⁻¹)	Pre-processing/ Pretreatment	Rank / PC	Calibration set			Prediction set		
					R ²	RMSEE/ SEC (ppm)	Bias (ppm)	R ²	RMSECV / SEP (ppm)	Bias (ppm)
FT-NIR spectrometer (MPA) (12500-3600 cm ⁻¹)	Intact	12500-3600 cm ⁻¹ (700-2500 nm)	Multiplicative	7	0.303	1.520	-	0.163	1.620	0.018
			Scatter Correction (MSC)							
FT-NIR spectrometer (Matrix) (12500-3600 cm ⁻¹)	Intact	9404-7499, 5454-4599 cm ⁻¹ (1063-1334, 1834-2174 nm)	Vecternormalization (SNV)	7	0.593	16.700	-	0.696	16.100	5.950
Long wavelength diode array spectrometer	Fillet	1150-2150 nm	Smoothing 19 points+ Baseline offset	14	0.694	0.977	9.95E-07	0.601	0.990	-0.008
Micro NIR (1150-2150 nm)	Intact	1255-2060 nm	De-trending	8	0.570	23.750	-1.69E-05	0.515	27.485	-8.231

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบแบบจำลอง PLS ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนสำหรับตัวอย่างที่สแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 3 ชนิด ของการทดลองเดิมและการทดลองที่ปรับปรุงแล้ว (ต่อ)

Spectrometer (Frequency Range)	Sample	Wavenumber/ Wavelength Range (nm, cm ⁻¹)	Pre-processing/ Pretreatment	Rank / PC	Calibration set			Prediction set		
					R ²	RMSEE/ SEC (ppm)	Bias (ppm)	R ²	RMSECV / SEP (ppm)	Bias (ppm)
Short wavelength diode array spectrometer FOA NIR GUN (600-1100 nm)	Fillet	600-1100 nm	De-trending	1	0.093	1.691	9.55E-08	0.171	1.459	0.04
	Fillet	608-1069 nm	Range Normalization	10	0.581	22.083	1.20E-05	0.500	25.956	-1.166

หมายเหตุ : intact= ปลาเต็มตัว, fillet= ชิ้นเนื้อปลา, Rank or PC= PLS factor, R² = Coefficient of determination, RMSEE= Root mean square error of cross Calibration, SEC= Standard error of calibration , RMSEP= Root mean square error of cross prediction, SEP= Standard error of prediction, Bias= error

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 ผลการเปรียบเทียบสมรรถนะแบบจำลองเดิมกับแบบจำลองที่ปรับปรุง

การวิเคราะห์ผลและปรับปรุงแบบจำลองในการทำนายความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนคลื่นแสงกับปริมาณฮีสตามีนในปลาซาร์ดีน ด้วยการตรวจวัดสเปกตรัมด้วยสเปกโตรมิเตอร์ทั้งสามเครื่อง คือ การทดลองเดิมใช้เครื่อง FT-NIR spectrometer (MPA, Bruker, Germany) เปลี่ยนเป็นเครื่อง FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany) ช่วงเลขคลื่น (wavenumber) 12500-3600 cm^{-1} หรือความยาวคลื่น (wavelength) 700- 2500 nm โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) แทนการวัดแบบ Diffuse Reflectance เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer (Micro NIR, JDSU, USA) ช่วงความยาวคลื่น 1150-2150 nm และเครื่อง Short wavelength diode array spectrometer (FQA NIR Gun, Fantec, Japan) ช่วงความยาวคลื่น 600-1100 nm พบว่า สามารถสแกนได้ตลอดช่วงความยาวคลื่น พบว่า แบบจำลองในการทำนายฮีสตามีนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer (Matrix) สามารถให้การทำนายได้ดีกว่าเครื่องอื่น ช่วงเลขคลื่น 9404-7499, 5454-4599 cm^{-1} หรือความยาวคลื่น 1063-1334, 1834-2174 nm ในลักษณะตัวอย่างปลาเต็มตัว (Intact) ได้ผลการทำนายที่ดีที่สุด โดยได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Vector normalization (VN) โดยมีค่า R^2 ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง (Prediction set) SEP และ Bias คือ 0.696, 16.100 ppm และ 5.950 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 7 ส่วนเครื่อง Long wavelength diode array spectrometer ช่วงความยาวคลื่น 1255-2060 nm ได้ผลการทำนายรองลงมา ในลักษณะตัวอย่างปลาเต็มตัว ได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี De-trending โดยมีค่า R^2 ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง SEP และ Bias คือ 0.515, 27.485 ppm และ -8.231 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 8 และ Short wavelength diode array spectrometer ได้ผลการทำนายดีน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสเปกโตรมิเตอร์อีก 2 ชนิด ช่วงความยาวคลื่น 608-1069 nm ในลักษณะตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Fillet) ได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Normalization Range โดยมีค่า R^2 ในชุดพิสูจน์แบบจำลอง SEP และ Bias คือ 0.500, 25.956 ppm และ -1.166 ppm ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 10

เมื่อเปรียบเทียบสมรรถนะกับแบบจำลองเดิม FT-NIR spectrometer และ Short wavelength diode array spectrometer สามารถปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้นได้ ส่วน Long wavelength diode array spectrometer ไม่สามารถปรับปรุงแบบจำลองให้ดีขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม ผลการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนที่ดีที่สุดที่มีการปรับปรุงแบบจำลองจาก Williams (2007) ระบุว่าค่า R^2 ระหว่าง 0.66-0.81 นั้นแสดงว่าสามารถนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดไปใช้สำหรับการแบ่งกลุ่มและประมาณค่าอย่างหยาบๆ ได้ แต่ยังไม่สามารถนำไปใช้ระบุค่าอย่างละเอียดได้ [43] อย่างไรก็ตามหากโรงงานเพียงต้องการทราบค่าอย่างประมาณก็สามารถทำได้โดยวัดที่ปลาทั้งตัวโดยใช้ FT-NIR spectrometer (Metrix, Bruker, Germany) โดยใช้ร่วมกับหัววัดใยแก้วนำแสง (Fiber Optic Probes) แทนการวัดแบบ Diffuse Reflectance หากโรงงานยอมรับได้ก็สามารถนำมาใช้ได้

5.2 ผลจาก Regression coefficient plot และ x- loading weight

5.2.1 ผลจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง FT-NIR Spectrometer (Matrix)

จาก Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีนที่ดีที่สุด ในตัวอย่างปลา เต็มตัวที่มีการตัดค่าออกกลุ่มออก (Intact (outlier)) พบว่าการสั่นสะเทือนของ protein (N-H sym. str.+ amide II) และ CONH₂ (N-H asym. str. + amide III) ที่มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนและ ค่า X-loading weight ได้พบว่าการสั่นสะเทือนของ CONH (C=O str. Second overtone) ที่มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีน

5.2.2 ผลจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง เครื่อง Long wavelength diode array spectrometer

จาก Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีนที่ดีที่สุด ในตัวอย่างปลา เต็มตัว พบว่าการสั่นสะเทือนของ *cis*- RCH=CHR¹ (C-H str. first overtone) มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนและค่า X-loading ได้พบว่าการสั่นสะเทือนของ aromatic (2 X C-H str. + C-H def.) มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีน

5.2.3 ผลจากแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง เครื่อง Short wavelength diode array spectrometer

จาก Regression coefficient plot ของแบบจำลองปริมาณฮิสตามีนที่ดีที่สุด ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา โดย พบว่าการสั่นสะเทือนของ RNH_2 (N-H str. second overtone) มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ตัน

และค่า X-loading weight ของสมการปริมาณฮิสตามีนที่ดีที่สุด ได้พบว่าการสั่นสะเทือนของ protein ($2 \times \text{N-H str.} + 2 \times \text{amide I}$) และ ArNH_2 N-H str. second overtone มีผลสูงสุดต่อการทำนายปริมาณฮิสตามีนในปลาชาร์ตัน

เอกสารอ้างอิง

- [1] กรมศุลกากร. 2014. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
[http://internet1.customs.go.th/ext/Statistic/StatisticResult2550.jsp?page=1&statType=export&month=12&year=2011&productCodeCheck=Y&productCode=16041311000&countryCheck=null&country=.](http://internet1.customs.go.th/ext/Statistic/StatisticResult2550.jsp?page=1&statType=export&month=12&year=2011&productCodeCheck=Y&productCode=16041311000&countryCheck=null&country=)
- [2] Köse S., Kaklıkkaya N., Koral S., Tufan B., Buruk K. C, Aydın F. 2011. "Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method." *Food Chemistry*. 125(4) : 1490-1497.
- [3] Federal Register. 1995. "Decomposition and histamine-raw, frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related." *Species*. 60(149) : 39754-30956
- [4] กรนรรณ แก่นภิรมย์, กิ่งดาว ชนะโชติ, ภคินี แสนพินิจ. 2556. "ความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี" สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล หลักสูตรวิศวกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- [5] AOAC international. 2005. "AOAC Official Method 977.13." and "AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood."
- [6] Food Wiki. 2012. Scombrottox. [Online]. Available : URL: <http://www.foodnetworksolution.com/vocab/word/2039>.
- [7] Osborne, B.G. and Fearn T. 1986. *Near infrared spectroscopy in food*. The Bath Press : Great Britain.
- [8] บัด. 2558. *เรื่องรู้ไลฟ์สไตล์ ผู้สร้างอาหารปกป้องขึ้นมาคนแรก*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.dek-d.com/content/view.php?id=22995#ixzz17KEfRHK1/>.
- [9] แอดมิน. 2010. *ปลาซาร์ดีนมีจริงหรือไม่*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.dumbpa.com/2012/10/22.2012>.
- [10] วิชมนิ ยืนยงพุทธกาล. 2012. *เรื่องทั่วไปปลากระป๋อง*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.numesai.com.2010c>.

- [11] สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2556. *สรุปภาวะเศรษฐกิจอุตสาหกรรมปี 2555 และแนวโน้มปี 2556 (อุตสาหกรรมอาหาร)*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.ryt9.com/s/oie/1572904.2556>.
- [12] กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2555. *แนวโน้มอุตสาหกรรมอาหารไทย ปี 2557*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://e-journal.dip.go.th/LinkClick.aspx?fileticket=Za1YoTQLBUo%3D>
- [13] ปริมาณการผลิตภาคอุตสาหกรรม. 2550. *ปริมาณการผลิต*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.oie.go.th/academic/index>.
- [14] กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. 2555. *กองประมงต่างประเทศ กรมประมงประมวลข้อมูลจากกรมศุลกากร*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/v06254.pdf>. 2555.
- [15] กรมศุลกากร . 2555. *สถิติการนำเข้า-ส่งออก*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
<http://internet1.customs.go.th/ext/Statistic/StatisticResult2550.jsp?page=1&statType=export&month=12&year=2011&productCodeCheck=Y&productCode=16041311000&countryCheck=null&country=>. 2012.
- [16] สถานเอกอัครราชทูต ณ กรุงบราซิลเลีย. 2550. *รายชื่อสินค้าไทยที่มีศักยภาพในบราซิล*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.thaiembassybrazil.com>.
- [17] วิชัย หุตทัยธนาสันต์. 2555. *เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: กรุงเทพฯ.
- [18] NASA. 2000. *Discovery of Infrared*. [Online]. Available :
http://coolcosmos.ipac.caltech.edu/cosmic_classroom/ir_tutorial/discovery.html, access on 04/02/2013.
- [19] สำนักกิจการอวกาศแห่งชาติ. 2552). *สเปกโทรสโกปี: จากสายรุ้งสู่เอกภพ ตอนที่ 1*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.space.mict.go.th/knowledge.php?id=spectroscopy>.
- [20] เจษฎา โปธิสม. 2555. “การใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ช่วงคลื่นสั้นในการตรวจ สอบหาปริมาณเนื้องอกและปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำยางพารา.” สาขาวิชา วิศวกรรมเครื่องกล หลักสูตรวิศวกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

- [21] วีรชัย พุทธวงศ์. 2012). อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (*Infrared spectroscopy*). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:<http://www.coursewares.mju.ac.th:81/elearning47/section2/ch351/.../ir.pdf>.
- [22] Sirisomboon P. 2012. *NIR Spectroscopy and its application*. [Power point]: Panmanas Sirisomboon.
- [23] ปานมนัส ศิริสมบุรณ์. 2012. เทคโนโลยีเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสำหรับผลผลิตเกษตรและอาหาร (ตอนที่ 1). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:<http://www.nirsresearch.com>.
- [24] Brukercompany. 2013. *Introduction to quantitative NIR analysis using chemometrics*. [Online]. Available : https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FTNIR/MPA/Brochures/Dairy_NIR_Brochure_EN.pdf
- [25] Bruker. 2009. *Bruker Optics MATRIX-F FT-NIR Spectrometer*. [Online]. Available : www.brukeroptics.com
- [26] Bruker. 2009. *Fiber Optic Probes*. [Online]. Available : <https://www.bruker.com/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ft-nir/matrix-f/overview.html>
- [27] JDSU. 2013. *MicroNIR Spectrometer*. [Online]. Available : <http://www.jdsu.com/en-us/Custom-Optics/Products/a-z-product-list/Pages/miniature-near-infrared-Spectrometer.aspx>.
- [28] ศูนย์วิจัยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. (2013). *FQA-NIR GUN*. [Online]. Available : http://www.nirsresearch.com/NP-15967-fqa_nir_gun.html, access on 09/04/2013.
- [29] เมธี ดีพร้อมมิตร, วรเดช สุขชัยบุญศิริ, วิภาศิริ เลิศศรี. 2554. “การใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ช่วงคลื่นสั้นในการตรวจหาปริมาณเนื้อเยื่อและปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำยางพารา.” สาขาวิชา วิศวกรรมเครื่องกล หลักสูตรวิศวกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- [30] Sirisomboon P. 2012. *NIR Spectroscopy*. [Power point]: Panmanas Sirisomboon.
- [31] Lina M., Cavinatob A. G., Huanga Y., Rascoa B. A. 2003. "Predicting sodium chloride content in commercial king (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum (*O. keta*) hot smoked salmon fillet portions by short-wavelength near-infrared (SW-NIR) spectroscopy." **Food Research International**. 36 (6) : 761-766.
- [32] Xiccato G., Trocino A., Tulli F., Tibaldi E. 2004. "Prediction of chemical composition and origin identification of european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)." **Food Chemistry**. 86(7) : 275-281.
- [33] Uddin M., Okazaki E., Ahmad M. U., Fukuda Y., Tanaka M. 2006. "NIR spectroscopy: A non-destructive fast technique to verify heat treatment of fish-meat gel." **Food Control**. 17(5) : 660-664.
- [34] Karlsdottir M. G., Araso S., Kristinsson H. G., Sveinsdottir K. 2014. "The application of near infrared spectroscopy to study lipid characteristics and deterioration of frozen lean fish muscle." **Food Chemistry**. 159(8) : 420-427.
- [35] Frattini V., Lionetti C. 1998. "Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography Derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of "free" species." **Chromatography A**. 809(5) : 241-245.
- [36] Bøknæs N., Jensen K. N., Andersen C. M., Martens H. 2002. "Freshness Assessment of Thawed and Chilled Cod Fillets Packed in Modified Atmosphere Using Near-infrared Spectroscopy." **Food Science and Technology**. 35(7) : 628-634.
- [37] El Barbri N., Amari A., Vinaixa M., Bouchikhi B., Correig X., Llobet E. 2007. "Building of a metal oxide gas sensor-based electronic nose to assess the freshness of sardines under cold storage." **Sensors and Actuators B: Chemical**. 128(1) : 235-244.
- [38] Guizani N., Al-Busaidy M. A., Al-Belushi I. M., Mothershaw A., Rahman M. S. 2005. "The effect of storage temperature on histamine production and the

- freshness of yellow fin tuna (Thunnusalbacares).*” **Food Research International**. 38(2) : 215-222.
- [39] Sivertsen A. H., Kimiya T., Heia K. 2011. “*Automatic freshness assessment of cod (Gadus morhua) fillets by Vis/Nir spectroscopy.*” **Food Engineering**. 103(7) : 317-323.
- [40] Kimiya T., Sivertsen A. H., Heia K. 2013. “*VIS/NIR spectroscopy for non-destructive freshness assessment of Atlantic salmon (Salmo salar L.) fillets.*” **Food Engineering**. 116(7) : 758–764.
- [41] Alamprese C., Casiraghi E. 2015. “*Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to fish fillet authentication.*” **Food Science and Technology** : 1-6.
- [42] Workman J. and Weyer L. 2007. *Practical Guide to Interpretive Near- Infrared Spectroscopy*, London: New York.
- [43] Williams, P. 2007. *Near-infrared Technology-Getting the Best out of Light*, Canada: PDK Grain.

ภาคผนวก

ค่าปริมาณฮิสตามีนในปลาซาร์ดิน (วัดโดยวิธีของโรงงาน)

ตัวอย่างปลาซาร์ดิน	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	ตัวอย่างปลาซาร์ดิน	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)
EX1	543	EX26	49.78
EX2	89.08	EX27	36.92
EX3	77.77	EX28	36.4
EX4	84.03	EX29	63.63
EX5	102.98	EX30	70.94
EX6	71.86	EX31	139.17
EX7	68.73	EX32	64.34
EX8	64.74	EX33	93.53
EX9	102.98	EX34	37.79
EX10	60.04	EX35	114.6
EX11	30.49	EX36	-0.04
EX12	25.57	EX37	11.69
EX13	44.05	EX38	-0.64
EX14	20.92	EX39	6.23
EX15	44.05	EX40	9.67
EX16	45.44	EX41	5.62
EX17	45.78	EX42	-1.25
EX18	83.34	EX43	2.99
EX19	50.13	EX44	-1.05
EX20	25.79	EX45	2.99
EX21	50.13	EX46	1.78
EX22	85.08	EX47	7.04
EX23	73.78	EX48	24.43
EX24	39.18	EX49	0.77
EX25	154.97	EX50	1.58

ตัวอย่างปลาซาร์ดีน	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	ตัวอย่างปลาซาร์ดีน	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)
EX51	2.19	EX76	7.04
EX52	1.18	EX77	3.8
EX53	-0.44	EX78	-1.45
EX54	-0.64	EX79	-1.05
EX55	-1.05	EX80	-1.05
EX56	-1.25	EX81	5.02
EX57	44.85	EX82	0.37
EX58	19.78	EX83	-0.64
EX59	2.59	EX84	49.09
EX60	6.63	EX85	17.15
EX61	0.57	EX86	37.97
EX62	3.8	EX87	12.9
EX63	-0.24	EX88	15.73
EX64	15.93	EX89	-0.44
EX65	0.16	EX90	28.67
EX66	-0.24	EX91	118.04
EX67	-0.64	EX92	24.22
EX68	1.58	EX93	31.3
EX69	-1.45	EX94	153.01
EX70	-1.25	EX95	188.19
EX71	-1.05	EX96	13.71
EX72	-1.45	EX97	37.97
EX73	-1.25	EX98	8.66
EX74	11.89	EX99	19.78
EX75	0.16	EX100	0.77

ตัวอย่างปลาชาร์ทิน	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	ตัวอย่างปลาชาร์ทิน	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)
EX101	4.43	EX126	2.45
EX102	3.33	EX127	4.87
EX103	10.79	EX128	2.45
EX104	2.45	EX129	3.99
EX105	23.74	EX130	1.79
EX106	2.01	EX131	3.33
EX107	3.33	EX132	2.89
EX108	2.89	EX133	2.01
EX109	9.91	EX134	6.4
EX110	3.99	EX135	1.57
EX111	7.06	EX136	2.45
EX112	2.23	EX137	1.35
EX113	4.87	EX138	1.13
EX114	2.23	EX139	0.91
EX115	2.01	EX140	0.91
EX116	2.89	EX141	1.57
EX117	2.45	EX142	0.91
EX118	2.23	EX143	0.91
EX119	1.79	EX144	20.67
EX120	2.01	EX145	1.35
EX121	3.77	EX146	2.89
EX122	2.01	EX147	3.11
EX123	3.55	EX148	38.66
EX124	1.57	EX149	4.65
EX125	1.35		

ภาคผนวก ข

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Kingdow Chanachot. 2014, in “Evaluation of Histamine in Sardine Fish by Long Wave Near Infrared Spectroscopy, Thai society of Agricultural Engineering journal, vol 20 (1), 20-31.



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

ปานมนัส สิริสมบุญ¹, กิ่งดาว ชนะโชติ^{1*}

Panmanas Sirisomboon¹, Kingdow Chanachot^{1*}

¹หลักสูตรวิศวกรรมเกษตร สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

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

*Corresponding author: Tel: 082-777-5688, E-mail: al_kingdow_63@hotmail.com

บทคัดย่อ

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

คำสำคัญ: ฮิสตามีน, เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, การดูดกลืนแสง, การสะท้อนแสง

Abstract

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

because fish contained a lot of water and the water absorbance band covered the peak of the histamine content which was very low in ppm level.

Keywords: Histamine, Near Infrared Spectroscopy, Absorbance, Reflectance

1 บทนำ

อุตสาหกรรมการทำปลาซาร์ดีนกระป๋องนับเป็นกิจการที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศไทย จากสถิติของกรมศุลกากร รายงานว่า ประเทศไทยมีการส่งออกปลาซาร์ดีนกระป๋อง ปี 2554 (ม.ค.-มี.ค.) ปริมาณ 16,909.69 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,153.39 ล้านบาท และปี 2555 (ม.ค.-มี.ค.) ปริมาณ 24,444.99 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,919.96 ล้านบาท อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 44.56 ตัน คิดเป็นมูลค่า 66.46 ล้านบาท การตรวจรับปลาซาร์ดีนเข้าสู่โรงงาน จำเป็นต้องตรวจความสดของปลาโดยวัดปริมาณฮิสตามีน (histamine) เนื่องจากในเนื้อปลามีสารฮิสติดีน (histidine) ที่เป็นการสะสมในเนื้อปลาเป็นต่อร่างกายและสารฮิสติดีนเป็นสารตั้งต้นของสารฮิสตามีน (histamine) ที่เกิดจากการเก็บรักษาปลาไว้เป็นเวลานาน ในอุณหภูมิสูงเกินไปทำให้แบคทีเรียที่เป็นตัวสร้างเอนไซม์ histidinedecarboxylase ทำการย่อยสลายกรดอะมิโนฮิสติดีนให้กลายเป็นสารฮิสตามีนซึ่งเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ ฉะนั้น ระดับฮิสตามีนในเนื้อปลาเป็นดัชนีหนึ่งในการบ่งบอกความสดของปลา และการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในเนื้อปลาจึงเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภค และอายุการเก็บรักษาเนื้อปลา การทดสอบฮิสตามีนจึงเป็นกลยุทธ์ในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยซึ่งสามารถใช้โดยผู้ประกอบการอาหารทะเล จากรายงานของ Köse et al. (2011) กล่าวว่า ระดับการควบคุมปริมาณฮิสตามีนในปลาตระกูล scombrotoxic มีค่าประมาณ 10-200 ppm ระดับที่ผิดปกติของฮิสตามีน คือสูงกว่า 50 ppm ซึ่งกำหนดในสหรัฐอเมริกา ตามที่กล่าวถึงโดย Köse et al. (2011) ซึ่งได้อ้างอิงผลการวิจัยของ Federal Register (1995)

การวัดปริมาณฮิสตามีนโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลาและขั้นตอนที่ซับซ้อนด้วยวิธีการที่มีราคาแพงใช้สารเคมีจำนวนมาก ซึ่งวิธีการที่ยอมรับในการนำเข้าและส่งออกในอุตสาหกรรมปลากระป๋อง คือ วิธีตามมาตรฐานของโรงงานซึ่งประยุกต์มาจากมาตรฐานสากล AOAC official method 977.13 และ AOAC official method 957.07 Histamine in seafood โดยวิธี Fluorometric method ด้วยเครื่อง Fluorometer ซึ่งต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก เช่น Histamine dichloride, o-Phthaldialdehyde (OPT), Phosphoric acid และ lon-exchange resin เป็นต้น

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่รวดเร็ว แม่นยำ ไม่ต้องใช้สารเคมี เป็นมิตร

กับสิ่งแวดล้อม ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง แต่การนำเทคโนโลยีนี้มาใช้จำเป็นต้องมีการสร้างแบบจำลองเพื่อใช้ในการทำนาย (Calibration model) ก่อนการนำไปใช้งานเพื่อเปรียบเทียบความแม่นยำกับวิธีอ้างอิงที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน หากพิสูจน์ได้ว่ามีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้จะใช้เวลาเพียง 2-3 s ในการวิเคราะห์ ทำให้ลดต้นทุนในการตรวจรับปลาซาร์ดีนเข้าสู่โรงงาน ดังนั้นด้วยเหตุผลและความสำคัญดังกล่าวมาจึงทำการวิจัย เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการวิเคราะห์ฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนที่ตัวปลาโดยตรง เป็นวิธีที่ไม่ทำลายซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

2 อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่างปลา

ปลาที่ใช้ในโครงการวิจัยคือซาร์ดีนสด *sardinella longiceps* จากประเทศจีน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาจากบริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซน โปรดักส์ จำกัด มหาชน จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 149 ตัว จะแบ่งออกเป็นสองชุด คือ ชุดแรก 100 ตัว จะถูกสุ่มมาจากบล็อกที่แช่เยือกแข็งไว้ในห้องเย็นของโรงงาน อุณหภูมิประมาณ -20°C โดยการสุ่มจะสุ่มตามกรรมวิธีของโรงงาน คือจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 25 ตัว จำนวน 4 บล็อก ปลาที่ถูกแช่เยือกแข็งจะถูกนำมาแช่น้ำประมาณ 5-10 min จนกว่าอุณหภูมิตัวปลาจะเป็น 0°C แล้วนำขึ้น และชุดที่สองอีก 49 ตัว จะสุ่มตามกรรมวิธีของโรงงานเช่นกัน คือจะสุ่มมาจากบล็อกๆ ละ 7 ตัว จำนวน 7 บล็อก แล้วนำมาแช่น้ำประมาณ 5-10 min แล้วนำขึ้น โดยในชุดที่สองจะเป็นการปรับระดับฮิสตามีน โดยจะเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ที่เวลาที่แตกต่างกัน 7 ช่วงเวลา คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 h ช่วงเวลาละ 7 ตัว ปลาที่ละลายแล้วจะแช่น้ำแข็งไว้ รักษาอุณหภูมิประมาณ 0°C ก่อนนำออกมาทดลองในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25°C ลักษณะปลาที่ใช้ในการสแกนมีดังต่อไปนี้ ปลาเต็มตัว (Intact fish) ปลาผ่าครึ่งเอาก้างออก (Fillet) และเนื้อปลาบด (Minced meat)

2.2 การสแกนคลื่นแสงที่มองเห็นได้และหรือคลื่นเนียร์อินฟราเรด

ปลาที่นำออกมาใช้ผ้าซับน้ำออก แล้วสแกนบริเวณกลางลำตัวปลาด้วยเครื่อง MICRO NIR (JDSU, USA) ช่วงความยาวคลื่น 1,150-2,150 nm จากนั้นนำปลามาผ่าครึ่ง นำด้านที่ไม่มีก้างมา

สแกนเนื้อปลาสดในโดยวางบนจานแก้วกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm สูง 20 mm ด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ จากนั้นนำชิ้นเนื้อปลามาชั่งน้ำหนักประมาณ 80 g (ตัดบริเวณส่วนที่ผ่านการสแกน) นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่น (OKU SAN NO, Thailand) เป็นเวลา 1 min แล้วนำเนื้อปลาที่ปั่นได้ใส่ในจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm สูง 15 mm จากนั้นจะนำปลาต้มมาสแกนด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์บริเวณด้านหน้าเนื้อปลาสดและผ่านกันจานแก้ว การสแกนทุกแบบทำ 2 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีน

นำเนื้อปลาสดที่ผ่านการสแกนไปวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนด้วยวิธีทางเคมีดั้งเดิมตามมาตรฐานของโรงงานซึ่งประยุกต์มาจากมาตรฐานสากล AOAC official method 977.13 และ AOAC official method 957.07 Histamine in seafood ด้วยเครื่อง Fluorometer (Quantech, USA)

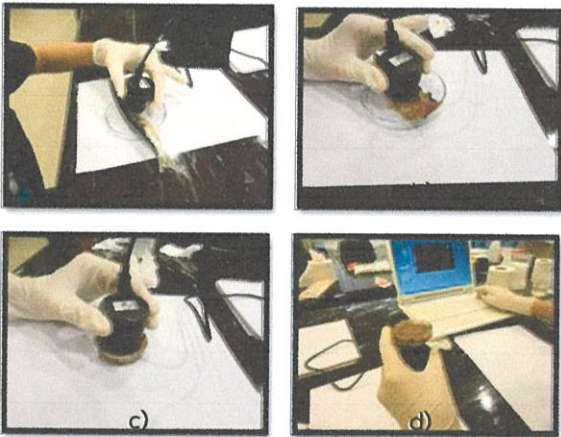


Figure 1 Fish sample presentation for MICRO NIR spectrometer a) Intact fish, b) Fillet, c) Minced meat and d) Minced meat through glass.

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและสร้างแบบจำลอง

ก่อนทำการวิเคราะห์ต้องทำการตรวจสอบค่าออกกลุ่ม (Outlier) ของข้อมูลฮิสตามีนโดยใช้สมการดังต่อไปนี้

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

โดยที่ X คือ ค่าฮิสตามีนที่วัดจากวิธีทางเคมี \bar{X} คือ ค่าเฉลี่ยของฮิสตามีน และ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำข้อมูลของสเปกตรัมที่ได้มาตรวจสอบค่าออกกลุ่มด้วยวิธี Principal component analysis (PCA) จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้าง

แบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮิสตามีนของปลาสดกับการดูดกลืนคลื่นที่มีความยาวคลื่นต่างๆ ตั้งแต่ 1,255-2,067 nm สำหรับตัวอย่างปลาเต็มตัว, 1,181-2,030 nm สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา และ 1,159-2,036 nm สำหรับตัวอย่างเนื้อปลาสดและเนื้อปลาสดที่สแกนผ่านแก้ว โดยวิธีทาง Chemometric แบบ Partial least squares regression โดยแบ่งข้อมูลเป็นสองชุด คือ ชุดสร้างแบบจำลองและชุดพิสูจน์แบบจำลองโดยมีอัตราส่วนข้อมูล 8:2 ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากเครื่องสเปกโทรมิเตอร์วิเคราะห์โดยโปรแกรม Unscrambler 9.8 (Camo, Norway) โดยมีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้นโดยวิธี Smoothing S. Golay, Normalization (Mean, Maximum, Range), Baseline offset, Standard normal variate (SNV), de-trending, SNV+De-trending, Multiplicative scattering correction (MSC), First derivative (5 and 11 points) และ Second derivative (5 and 11 points) และจะคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่า Coefficient of determination (R^2) ที่สูงที่สุด Standard error of prediction (SEP) และ Bias ต่ำที่สุด

3 ผลและวิจารณ์

จากการตรวจวัดสเปกตรัมของฮิสตามีนบริสุทธิ์พบว่า มีพีคเกิดขึ้นที่เลขคลื่น 3,942, 4,304 และ 5,909 cm^{-1} (2,537, 2,323 และ 1,692 nm) (Figure 2)

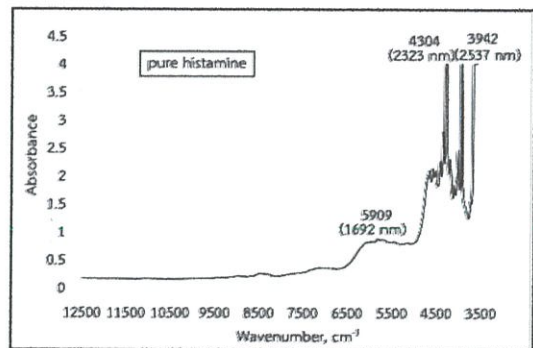


Figure 2 Average spectrum of pure histamine.

จากการตรวจวัดสเปกตรัมแบบ Reflectance ของเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ในตัวอย่างปลาทั้งตัวพบว่า พีคการดูดกลืนคลื่นเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1,432, 1,705 และ 1,882 nm ตามลำดับ (Figure 3) ซึ่งพีคที่กว้างในช่วง 1,350-1,500 nm และ 1,800-2,050 nm เป็นพีคของน้ำ

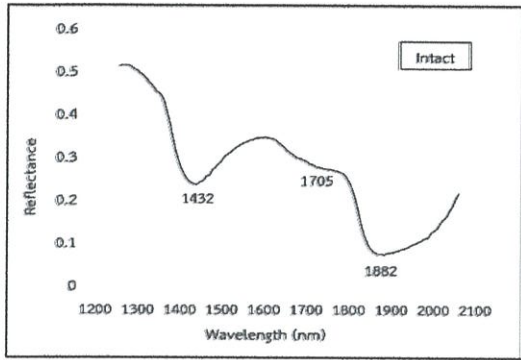


Figure 3 Average spectrum of intact fish.

ในตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา พบว่าพีคการดูดกลืนคลื่น ไม่เด่นชัดที่ความยาวคลื่น 1,417, 1,698 และ 1,860 nm ตามลำดับ (Figure 4)

ในตัวอย่างเนื้อปลาสด พบว่าพีคการดูดกลืนคลื่นเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1,417, 1,690 และ 1,853 nm ตามลำดับ (Figure 5) ซึ่งพีคที่ 1,690 nm เป็นพีคของฮิสตามีน และในตัวอย่างเนื้อปลาสดที่สแกนผ่านแก้วพบว่า พีคการดูดกลืนคลื่นแสงเด่นชัดเกิดที่ความยาวคลื่น 1,410, 1,653, 1,816 และ 1,941 nm ตามลำดับ (Figure 6) ซึ่งพีคที่กว้างในช่วง 1,350-1,500 nm และ 1,900-2,050 nm เป็นพีคของน้ำ

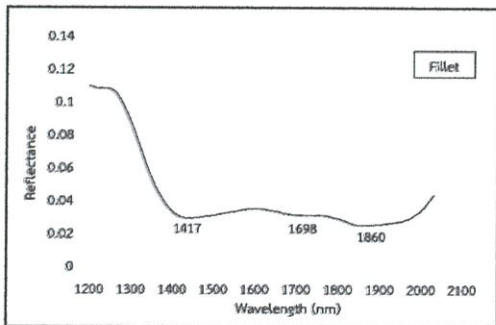


Figure 4 Average spectrum of fillet.

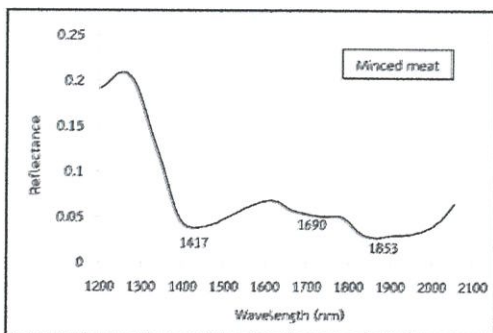


Figure 5 Average spectrum of minced meat.

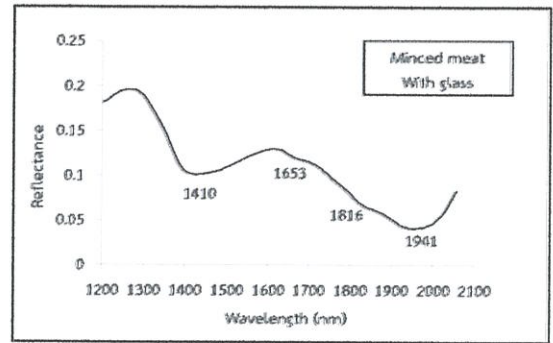


Figure 6 Average spectrum of minced meat with glass.

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

Table 2 แสดงสมรรถนะของแบบจำลอง PLS สำหรับการวัดฮิสตามีนของปลาซาร์ดีนในตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยแสดงแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับชุด Prediction และชุด Calibration จะเห็นได้ว่าในตัวอย่างเนื้อปลาสดและตัวอย่างเนื้อปลาสดที่สแกนผ่านแก้วแบบจำลองสามารถทำนายความแม่นยำได้เท่ากัน แสดงว่าจานแก้วไม่มีผลต่อสเปกตรัม ซึ่งจะเห็นว่าการสแกนเนื้อปลาสดได้ผลดีที่สุดทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบดเนื้อปลาทำให้เนื้อของตัวอย่างสม่ำเสมอขึ้นและน้ำบางส่วนได้ระเหยออกไปจากตัวอย่าง และจากการสแกนเนื้อปลาสดจะเห็นพีคของฮิสตามีนปรากฏดัง Figure 5 จาก Williams ระบุว่าค่า R^2 ระหว่าง 0.26-0.49 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงกับค่าที่วัดโดยวิธีมาตรฐานมีความสัมพันธ์ที่ไม่ดี ความแม่นยำที่ต่ำอาจเป็นเพราะเนื้อปลามีปริมาณน้ำมาก ดังจะเห็นใน Figure 3 ในกรณีตัวอย่างปลาเต็มตัว พบพีคเด่นชัดที่เป็นพีคกว้างของน้ำที่ความยาวคลื่น 1,450 และ 1,940 nm ในกรณีตัวอย่างชิ้นเนื้อปลา (Figure 4) เกิด over absorption (ดูดกลืนคลื่นมาก) คือสัญญาณการสะท้อนกลับของคลื่นต่ำมาก ในช่วงประมาณ 0.3 และในกรณีของเนื้อปลาสดและเนื้อปลาสดที่สแกนผ่านแก้ว (Figure 5 and 6) ลักษณะของสเปกตรัมพบการดูดกลืนแสงของน้ำมาก (พีคของน้ำสูง) แต่มีการดูดกลืนคลื่นของฮิสตามีนน้อยกว่า จากเหตุผลดังกล่าวประกอบกับปริมาณที่ต่ำของฮิสตามีนในเนื้อปลา จึงทำให้ความแม่นยำในการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีไม่เพียงพอ

4 สรุป

จากการวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการสะท้อนแสงของปลาซาร์ดีนจากการตรวจวัดเครื่อง

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

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

Remark: N= Number of scanned spectra, Mean= Average, Max= Maximum, Min= Minimum, SD= Standard deviation.

Table 2 Result of PLS modelling for histamine in sardine.

Sample (Wavelength Range, nm)	Pre treatment	PC	Calibration set			Prediction set		
			R2	SEC	Bias	R2	SEP	Bias
Intact 1255-2060	De-trending	8	0.570	23.750	-1.691e-05	0.467	27.485	-8.231
	Raw spectrum	13	0.609	22.582	-2.325e-05	0.307	30.069	-7.622
	SNV+De-trending	10	0.609	22.640	2.225e-06	0.253	30.727	-9.587
Fillet 1181-2030	SM 11 point+ Normalize Range	8	0.354	28.994	2.215e-05	0.389	30.764	-1.612
	SM 11 point+ Derivative S.Golay 2nd 5 point	6	0.358	28.908	-4.232e-06	0.318	30.289	-4.204
	SM 5 point+ Derivative S.Golay 2nd 11 point	7	0.409	27.726	7.763e-08	0.470	27.209	1.094
Minced meat 1159-2053	SM 5 point+ Normalize Max	5	0.340	29.280	4.410e-06	0.376	29.516	-0.682
	SM 5 point+ Derivative S.Golay 2nd 11 point	7	0.489	27.726	7.763e-08	0.470	27.209	1.094
Minced meat with glass 1158-2053	SM 5 point+ Derivative S.Golay 2nd 11 point	7	0.489	27.726	7.763e-08	0.470	27.209	1.094
	SM 5 point	19	0.608	22.59	-0.0002	0.136	33.954	-3.433

Remark: SM= Smoothing, PC= PLS factor, SNV= Standard normal variate, R²= Coefficient of determination, SEC= Standard error of Calibration, SEP= Standard error of prediction, Bias= average error.

พบว่าแบบจำลองในการทำนายสามารถให้การทำนายปริมาณฮิสตามีนในเนื้อปลาสดและในเนื้อปลาสดที่สแกนผ่านแก้วได้ผลดี

ที่สุด โดยแบบจำลองได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี Smoothing 5 points+Derivative S. Golay 2 nd 11 points

โดยมีค่า R^2 , SEP และ Bias คือ 0.470, 27.209 และ 1.094 ตามลำดับ โดยมี PLS factor เท่ากับ 7 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเชิงแสงกับค่าที่วัดโดยวิธีมาตรฐานมีความสัมพันธ์ที่ไม่ดี อาจเป็นเพราะองค์ประกอบภายในของปลา มีน้ำมาก ทำให้เกิดการบดบังฟีดของฮิสตามีนซึ่งมีปริมาณน้อยมากในระดับ ppm

5 กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณบริษัท ไทยยูเนี่ยนฟิรเชิน โปรดักส์ จำกัด มหาชน จังหวัดสมุทรสาคร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บข้อมูล ตัวอย่างปลาและเครื่องมือในการวัดปริมาณฮิสตามีน

6 เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง ประมวลข้อมูลจากกรมศุลกากร 2012. การส่งออกสินค้าประมงของไทย, แหล่งข้อมูล: <http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/v07255.pdf> เข้าถึงเมื่อ 15 กรกฎาคม 2556.
- AOAC international. 2005. AOAC Official Method 977.13 and AOAC Official Method 957.07 Histamine in Seafood.
- Federal Register. 1995. Decomposition and histamine—raw, frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related, Species 60, 39754–30956.
- Köse S., Kaklıkkaya N., Koral S., Tufan B., Buruk K. C., Aydin F. 2011. Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products—evaluation against an EU accepted HPLC method, Journal of Food Chemistry 125, 1490-1497.
- Williams, P. 2007. Near-infrared Technology-Getting the Best out of Light, Canada: PDK Grain.

ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ-นามสกุล นางสาวกิ่งดาว ชนะโชติ
- วัน เดือน ปีเกิด 3 มกราคม 2534 ที่กรุงเทพฯ
- ที่อยู่ 20/33 หมู่บ้านกิตติชัยวิลล่า 11 ถนนมิตรไมตรี
แขวงหนองจอก เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530 โทร. 097-2974732
- ประวัติการศึกษา
- พ. ศ. 2555 - วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเกษตร
สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ความชำนาญเฉพาะด้าน
- เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
- ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย
- พ. ศ. 2555 - ผ่านการฝึกงานภาคฤดูร้อนที่บริษัทจาร์พา เทคโนโลยีเซ็นเตอร์
เกี่ยวกับเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
- ผู้ช่วยวิจัยในโครงการการวิเคราะห์ปริมาณปาเปนและเนื้อสัมผัสของ
มะละกอด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ซึ่งมี Prof. Munehiro
Tanaka (Saga University, Japan) เป็นหัวหน้าโครงการซึ่งร่วมทำวิจัยกับ
รศ. ดร. ปานมนัส ศิริสมบุรณ์ หัวหน้าศูนย์วิจัยเนียร์อินฟราเรด
สเปกโทรสโกปี สำหรับผลผลิตทางการเกษตรและอาหาร
- พ. ศ. 2557 - ตีพิมพ์วารสารสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย ฉบับที่ 20 วันที่ 1
มกราคม – มิถุนายน 2557
- ปัจจุบัน - นักศึกษาระดับมหาบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- รางวัลเกียรติคุณ
- พ.ศ. 2555 - โล่รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 ประเภทโปสเตอร์ดีเด่น
จากการแข่งขันในงานประชุมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทยครั้งที่ 19
ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร