# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ

## 3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเชียงใหม่ 60 จำนวน 100 กิโลกรัม จากตำบลสันทราย อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวเดือน มิถุนายน 2550 ลดความชื้นโดยการผึ่งในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ถั่วเหลืองมีความชื้นประมาณร้อยละ 12 ทำความสะอาดโดยใช้เครื่องทำความสะอาดที่ใช้ลมและตะแกรง (air-screen cleaner) คัดเอาสิ่งปนเปื้อนออก แล้วเก็บรักษาไว้ในถังพลาสติก โดยคัดแปลงให้บริเวณฝาด้านบนมีรูระบายอากาศ ถังละประมาณ 50 กิโลกรัม เก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง ที่ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บรักษาตั้งแต่เดือน มิถุนายน–พฤศจิกายน 2550 เป็นระยะเวลา 5 เดือน

## 3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเครื่อง NIR

**เครื่องมือและอุปกรณ์วัดสเปกตรัม**

1. เครื่อง NIRSystem 6500 (Foss NIRSystems, Silver Spring, USA)

2. เซลล์บรรจุตัวอย่างสำหรับเมล็ดธัญพืช (coarse sample cell)

3. โปรแกรม Vision® version 2.51 และโปรแกรม the Unscrambler® version 7.6 (Camo, Oslo, Norway)

**วิธีการวัดสเปกตรัม**

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทุกเดือน จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยบรรจุเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองตัวอย่างละ 200 กรัม ในเซลล์บรรจุตัวอย่างสำหรับเมล็ดธัญพืช นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem 6500 ในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง (reflectance) บันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุก 2 นาโนเมตร ด้วยโปรแกรม Vision จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างมาตรวจสอบคุณสมบัติของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง คือ เปอร์เซ็นต์ความงอก และองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันโดยรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง**

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ประกอบด้วย
    1.1 ชุดเครื่องย่อย (Gerhardt Kjeldatherm Digestion Unit ; KB)
    1.2 ชุดเครื่องกลั่น (Gerhardt Vapodest ; VAP 30)
2. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (soxtec system) รุ่น AVANTI 2055
3. ตู้เพาะเมล็ดพันธุ์ (seed germinater)
4. ไตเตรทอัตโนมัติ (automatic titrater, Schott, Germany)
5. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, UM500 Memmert, Germany)
6. เครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer; LD-846, Netherlands)
7. เครื่องบดเมล็ดพันธุ์ (sample mill, Cemotec Foss Tecator, Sweden)
8. โถดูดความชื้น (desicator)
9. ตะแกรงร่อน 100 เมช (sieve)
10. เครื่องชั่ง ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
11. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
12. กระป๋องอลูมิเนียม
13. กระดาษเพาะเมล็ดพันธุ์
14. ปิเปตต์ ขนาด 5 มิลลิลิตร
15. ขวดปรับปริมาตร ขนาดความจุ 1000 มิลลิลิตร
16. บีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร
17. กระบอกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร
18. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
19. cellulose thimble
20. cup
21. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2
22. ปากคีบ (forcep)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**สารเคมี**

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.sulfuric ; $H_2SO_4$)
2. สารละลายกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 32% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
5. สารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
6. สารเร่งปฏิกิริยา (catalyst ; $CuSO_4$:$K_2SO_4$ 1:10)
7. สารละลายอินดิเคติงบอริกแอซิด (indicating boric acid)

**การเตรียมสารละลายอินดิเคติงบอริกแอซิด**

1. ชั่ง methyl red 200 มิลลิกรัม ละลายใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร
2. ชั่ง methylene blue 100 มิลลิกรัม ละลายใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน นำมิกซ์อินดิเคเตอร์ 10 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

8. สารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์

**3.3.1 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความงอกด้วยวิธีมาตรฐาน (standard germination) โดยใช้กระดาษเพาะแบบ between paper (ISTA,1999)**

**ขั้นตอนการหาเปอร์เซ็นต์ความงอก**

1. สุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตัวอย่างละ 50 เมล็ด (4 ซ้ำ)
2. เพาะเมล็ดถั่วเหลืองในกระดาษเพาะ
3. นำเมล็ดที่เพาะเสร็จแล้วใส่ในตู้เพาะเมล็ดพันธุ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์
4. ตรวจนับเปอร์เซ็นต์ความงอกโดยจำแนกลักษณะต้นอ่อนดังนี้ ต้นอ่อนปกติ (normal seedling) ต้นอ่อนผิดปกติ (abnormal seedling) เมล็ดแข็ง (hard seed) เมล็ดสดที่ไม่งอก (fresh ungerminated seed) เมล็ดที่ตาย (dead seed) จากนั้นประเมินผลความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

$$\% \text{ ความงอก} = = \left(\frac{\text{first count} + \text{final count}}{50}\right) \times 100$$

เมื่อ first count = Germination $4^{th}$ day

final count = Germination $7^{th}$ day

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี oven drying (ISTA,1999)**

**ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น**

1. บดเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเครื่องบด
2. นำกระป๋องอะลูมิเนียมอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
3. ชั่งน้ำหนักเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่บดแล้ว 3 กรัม ใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียม ในข้อ 2 แล้ว
4. อบตัวอย่าง ตามข้อ 3 ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก
5. คำนวณหาปริมาณความชื้นโดยมาตรฐานน้ำหนักเปียก (%) จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(B-C)}{(B-A)} \times 100$$

เมื่อ A = น้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝา

B = น้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองบดก่อนอบ

C = น้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองบดหลังอบ

**3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)**

**ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน**

1. บดเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเครื่องบด แล้วร่อนด้วยตะแกรงร่อน 100 เมซ ชั่งแป้งถั่วเหลืองประมาณ 1.5000 กรัมใส่ใน Kjeldahl tube
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 10 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
3. นำไปย่อยด้วยเครื่อง Kjeldahltherm ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อย 400 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส
4. ทิ้งให้เย็น
5. ต่อ Kjeldahl tube เข้ากับเครื่องกลั่น เติมน้ำกลั่นลงไป 40 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนที่เกิดขึ้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 32 ลงไป 50 มิลลิลิตร หรือจนตัวอย่างกลายเป็นสีดำ
6. รองรับสารที่กลั่นด้วยสารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด สารละลายที่ได้จะมีสีม่วงอ่อน
7. กลั่นตัวอย่างประมาณ 4 นาทีหรือจนไอของ $NH_3$ ถูกกลั่นจนหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. หยุดกลั่น จากนั้นนำสารละลายในขวดรองรับที่เปลี่ยนจากสีม่วงอ่อนกลายเป็นสีเขียวอ่อนมาไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวอ่อนเป็นสีม่วงอ่อน

9. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีน โดยใช้แฟคเตอร์ในการคำนวณเท่ากับ 6.25 จากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{1.4 \times N \times (Vs - Vb)}{W}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริก (นอร์มัล)

Vs = ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb = ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด × แฟคเตอร์

**3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยรวมด้วยวิธี solvent extraction (AOAC, 2000)**

**ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยรวม**

1. นำ cup อบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่บดแล้ว 3 กรัม (±0.0005) แล้วห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.2

3. ใส่ตัวอย่างใน thimble บรรจุลงในชุดสกัดไขมัน โดยเติมสารละลาย Petroleum ether 50 มิลลิลิตร ใน cup (ตามข้อ 1) สกัดตัวอย่างด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

4. นำ cup ที่มีน้ำมันติดอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

5. ชั่งน้ำหนัก cup แล้วคำนวณหาปริมาณไขมันโดยรวมโดยมาตรฐานน้ำหนักเปียก (%) จากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมันโดยรวม (\%)} = \frac{(W3 - W1)}{(W2)} \times 100$$

เมื่อ W1 = น้ำหนัก cup (กรัม)

W2 = น้ำหนักตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองบดก่อนสกัด (กรัม)

W3 = น้ำหนัก cup + น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้างสมการ**

ตรวจสอบตัวอย่างผิดปรกติ (outlier) ด้วยวิธี full cross validation ถ้าพบว่าตัวอย่างใดเป็น outlier จึงตัดออก เพื่อลดค่าความผิดพลาด จากนั้นสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค PLSR โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยโปรแกรม the Unscrambler ® version 7.6 และทดสอบสมการด้วยวิธี test set โดยแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสร้างสมการทำนาย เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นระหว่างข้อมูลสเปกตรัมของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเชียงใหม่ 60 ในช่วงความยาวคลื่น 1100 – 2500 นาโนเมตร กับข้อมูลวิเคราะห์ทางเคมีที่วัดได้ด้วยวิธีมาตรฐาน และกลุ่มทดสอบสมการ เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบความแม่นยำหรือประสิทธิภาพของสมการ ในการทำนายค่าวิเคราะห์ทางเคมีของตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน จากนั้นแปลงข้อมูลสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) หรือ log(1/R) ด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ คือ Savitzky-Golay smoothing, Savitzky-Golay second derivative และ MSC และเลือกช่วงความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับปริมาณองค์ประกอบทางเคมี โดยพิจารณาค่าสถิติที่วิเคราะห์ ได้แก่ R, SEC, SEP และ bias ของแต่ละสมการ และเลือกสมการที่เหมาะสมที่สุดในการทำนายองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งที่ตรวจวัด

**3.5 การหาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีกับอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเชียงใหม่ 60**

นำผลจากการทดสอบความงอก และองค์ประกอบทางเคมีมาสร้างกราฟ แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบสหสัมพันธ์และการถดถอย เพื่อนำไปใช้พยากรณ์อายุการเก็บรักษาของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved