

ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

1.1 บทนำ

วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์อ้างอิงจาก **ลิขิต ศิริสันติเมธาคม (2549)** ดังนี้คือ ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สพาหะ ความดันคอลัมน์ 200 กิโลปาสคาล อุณหภูมิที่ตำแหน่งฉีดสาร 180 °C คอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ใช้ 20 เปอร์เซ็นต์ PEG-20M ชนิดของตัวตรวจวัดที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ เอฟ ไอ ดี ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 250 °C โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์ คือ คงอุณหภูมิที่ 150 °C เป็นเวลา 15 นาที

1.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

- 1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น GC-14B ของบริษัทชิมัดซี (Shimadzu) ประเทศญี่ปุ่น ต่อกับตัวตรวจวัดชนิดเอฟไอดี (Flame ionization detector, FID) ของบริษัทชิมัดซี ประเทศญี่ปุ่น
- 2 เครื่องประมวลผลรุ่น 7 Ae plus ของบริษัทชิมัดซี ประเทศญี่ปุ่น
- 3 คอลัมน์ 20 เปอร์เซ็นต์ PEG-20M บริษัทชิมัดซี ประเทศญี่ปุ่น ความยาว 3 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของแผ่นฟิล์มที่เคลือบ 0.25 ไมโครเมตร
- 4 เข็มฉีดยาสำหรับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Syringe for GC) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัทSGE (เอสจีอี) ประเทศออสเตรเลีย
- 5 โพรพานอล
- 6 เอทานอล

1.3 วิธีทำการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้โพรพานอลที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานเอทานอล (ในข้อ 1 และ 2) ในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร)
4. ฉีดสาร (ในข้อ 3) เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ หลังจากนั้นนำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน
5. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) แล้วฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะเดียวกันการฉีดสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (ในข้อ 4)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ในสาโทโดยวิธี DPPH

2.1 บทนำ

อนุมูลอิสระ (Oxidants) คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบ ที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย จะทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลาย

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ อนุมูลอิสระได้โดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ในร่างกายได้ (โอภา วัชรคุปต์, 2550)

2.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. หลอดทดลอง
2. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water)
3. สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล
4. เมทานอล
5. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทหิมาดชิ ประเทศญี่ปุ่น
6. คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

2.3 วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างสาโทปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนลงในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water) ปริมาตร 1,900 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล เติมนลงไป 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นแบลนค์ (Blank)
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu

3.1 บทนำ

การวิเคราะห์สารฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารประกอบฟีนอลิก โดยสารละลาย Folin-Ciocalteu ในสภาวะที่เป็นด่างจะให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้กรดแกลลิก เป็นตัวแทนของสารประกอบฟีนอลิก

3.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. หลอดทดลอง
2. สารละลาย folin-ciocalteu เจือจาง 10 เท่าโดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลาย
3. สารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 75 กรัม/ลิตร
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทชิมิวดซ์ ประเทศญี่ปุ่น
6. คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

3.3 วิธีการ (Othman et al., 2009)

1. คูดสารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย folin-ciocalteu (เจือจาง 10 เท่าโดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลาย) ลงไปจำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
3. เติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 75 กรัม/ลิตร ลงไป 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. นำไปบ่ม ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
6. เปรียบเทียบหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การหาปริมาณสารแกมมาโอไรซานอลโดยวิธี UV Spectrophotometric Method

4.1 บทนำ

โอไรซานอล (Oryzanol) เป็นสารธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง พบมากในผิวของเมล็ดข้าวกล้องหรือที่เรียกว่า รำข้าว โอไรซานอลเป็นสารที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับวิตามินอี ในการต้านอนุมูลอิสระ และยังเป็นสายโซ่ธรรมชาติที่ดีในการป้องกัน การเกิดออกซิเดชันของน้ำมัน ที่สำคัญโอไรซานอลสามารถป้องกันการออกซิเดชันของกรดไขมันอิ่มตัวได้ดีกว่าวิตามินอีกลุ่มโทโคฟีรอล และกลุ่มโทโคไตรอีนอล ซึ่งการเกิดออกซิเดชันนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะที่ผิดปกติในร่างกายเช่น โรคมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือด นอกจากนี้ โอไรซานอลยังมีคุณสมบัติช่วยลดโคเลสเตอรอลที่ไม่ดี (LDL-C) ให้กับร่างกายอีกด้วย สารโอไรซานอลถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง

4.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. หลอดทดลอง
2. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทหิมาดชิ ประเทศญี่ปุ่น
3. คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย
4. สารละลายแกมมาโอไรซานอลมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 วิธีการ (Lilitchan et al, 2008)

1. นำตัวอย่างสาโท ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer
2. นำค่าการดูดกลืนแสง ที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณสารแกมมาโอไรซานอล จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากซึ่งวิธีการเดียวกันโดยใช้สารละลายแกมมาโอไรซานอลมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่างสาโท

5. การหาปริมาณสารสีที่เกิดขึ้นโดยวิธี UV spectrophotometric method

5.1 บทนำ

Monascus sp. สามารถผลิตสารสี (pigment) ได้ 6 ชนิด ได้แก่ monascin, ankaflavin (สารสีเหลือง) monascorubrin, rubropunctatin (สารสีส้ม) corubramine และ rubropunctamine (สารสีแดง) โดยสารสีดังกล่าวสามารถวัดปริมาณได้โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400, 470 และ 500 นาโนเมตร สำหรับสารสีเหลือง, สีส้ม และสีแดง ตามลำดับ

a. วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. หลอดทดลอง
2. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทหิมาดชิ ประเทศญี่ปุ่น
3. คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

5.2 วิธีการ (Johns and Stuart, 1991)

นำตัวอย่างของสาโทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 470 และ 500 นาโนเมตร สำหรับสารสี สีเหลือง สีส้ม และสีแดง ตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ Colour intensity โดยวิธี UV spectrophotometric method

6.1 บทนำ

ความเข้มของสี (Colour Intensity) คือค่าที่ใช้ระบุว่าสีนั้นมีความเข้มมากเท่าใด ใช้ระบุความเข้มสีของไวน์หรือสาโทได้

6.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. หลอดทดลอง
2. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทซิมัดซี ประเทศญี่ปุ่น
3. คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

6.3 วิธีการ (Pérez-Lamela et al, 2007)

นำตัวอย่างของสาโทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 520 และ 620 นาโนเมตร และคำนวณค่า colour intensity จากสมการ

$$\text{Colour Intensity} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

โดยที่ A_{420} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสาโทที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

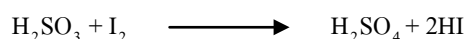
A_{520} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสาโทที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

A_{620} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสาโทที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

7. การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดและซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระโดยวิธี Ripper

7.1 บทนำ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และ คณิต วิจิตพันธ์, 2549)

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยาก ซับซ้อนและสามารถหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ทั้งที่อยู่ในรูปอิสระ และที่รวมอยู่กับสารประกอบอื่น แต่อาจจะมีความแม่นยำไม่มากนัก โดยวิธีนี้สามารถหาซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในสารละลายตัวอย่างทั้งในรูปอิสระ (Free SO_2) และอยู่ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่น (bound SO_2) ในกรณีของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระสามารถวิเคราะห์ได้โดยการไตเตรทด้วยสารละลายไอโอดีน โดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในสภาวะที่เป็นกรดในรูปของกรดซัลฟูรัส (H_2SO_3) จะทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจนหมดตามปฏิกิริยาข้างล่าง ไอโอดีนที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา



ส่วนการหาปริมาณซัลเฟอร์ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่นนั้นจะต้องหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวมก่อน โดยใช้ด่างในการย่อยสลายซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อยู่ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่น ให้อยู่ในรูปของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระก่อน จากนั้นทำแบบเดียวกับการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ได้จะเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวม เมื่อนำซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระมาหักลบออกจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวมก็จะได้ปริมาณซัลเฟอร์ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่น

7.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. บิวเรทขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ผงโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)
4. สารละลายไอโอดีนมาตรฐาน (0.01 N standard iodine solution)
5. สารละลายน้ำแป้ง (1% soluble starch indicator)
6. สารละลายกรดซัลฟูริก (น้ำกลั่นต่อกรดซัลฟูริกเข้มข้น = 3:1 โดยปริมาตร)
7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1N NaOH)

7.3 วิธีการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด

1. เปิดสารตัวอย่างจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป ปิดจุกพร้อมแกว่งผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์
3. เติมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร
4. เติมผงโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปจนกว่าสีไวน์จะจางลง
5. เติมสารละลายกรดซัลฟูริก (น้ำกลั่นต่อกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3:1 โดยปริมาตร) ลงไป 5 มิลลิลิตร
6. ไตรเตรทด้วยสารละลายไอโอดีนมาตรฐานอย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะปรากฏเป็นสี น้ำเงินของน้ำแป้งประมาณ 20 วินาที จดปริมาตรของสารละลายไอโอดีนที่ใช้ นำไปคำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากสมการ

$$\text{ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์} = \frac{V_1 N_1 \times 32 \times 1000}{V_s}$$

โดยที่ V_1 = ปริมาตรของสารละลายไอโอดีนมาตรฐานที่ใช้ไปในการไตรเตรท (มิลลิลิตร)

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนมาตรฐาน (นอร์มอล)

V_s = ปริมาตรของตัวอย่างสารโทที่ใช้ (มิลลิลิตร)

7.4 วิธีการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ

1. เปิดสารตัวอย่างจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. เติมผงโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปจนกว่าสีไวน์จะจางลง
4. เติมสารละลายกรดซัลฟูริก (น้ำกลั่น:กรดซัลฟูริกเข้มข้น 3:1 โดยปริมาตร) ลงไป 5 มิลลิลิตร
6. ไตรเตรทด้วยสารละลายไอโอดีนมาตรฐานอย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะปรากฏเป็นสีน้ำเงินของน้ำแป้งประมาณ 20 วินาที จดปริมาตรของสารละลายไอโอดีนที่ใช้ นำไปคำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากสมการเดียวกับ การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด

8. การวิเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

8.1 บทนำ (AOAC, 2005)

แอนโทไซยานินเป็นสารให้สีที่พบในธรรมชาติ โดยสารแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ ประมาณ 85% เป็น cyanidin-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside (Hu et al., 2003) ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential) ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

8.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. potassium chloride 0.025 โมลาร์
2. sodium acetate, 0.4 โมลาร์
3. หลอดทดลอง
4. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทชมัคซี ประเทศญี่ปุ่น
5. กิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

8.3 วิธีการ

1. ใช้ pH 1.0 buffer (potassium chloride 0.025 โมลาร์) เป็นตัวเจือจางตัวอย่างแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 700 นาโนเมตร
2. ใช้ pH 4.5 buffer (sodium acetate, 0.4 โมลาร์) เป็นตัวเจือจางตัวอย่างแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 700 นาโนเมตร กำหนดปริมาณแอนโทไซยานิน จากสมการ

$$\text{Monomeric anthocyanin pigment (mg/l)} = \frac{A_{\text{diff}} \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon}$$

โดย MW = molecular weight of cyaniding-3-glucoside, 449.2 กรัม/โมล

DF = อัตราการเจือจาง

ϵ = molar absorptivity of cyaniding-3-glucoside, 26,900 l/mol · cm

$$A_{\text{diff}} = [A_{520} - A_{700}]_{\text{pH}1.0} - [A_{520} - A_{700}]_{\text{pH}4.5}$$