

ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand Refractometer

1.1 หลักการ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และ พรเทพ ถนนแก้ว, 2549ก)

การวัดปริมาณน้ำตาลโดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์ (Refractometer) เป็นการวัดโดยอาศัยการหักเหแสงของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น โดยเทียบกับการหักเหแสงของสารละลายซูโครส ค่าที่ได้เป็นสเกลดัชนีการหักเหแสง (refractive index scale) ซึ่งสามารถอ่านค่าได้เป็นองศาบริกซ์โดยตรงของสารตัวอย่าง การวัดปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างเป็นการวัดของแข็งที่สามารถละลายได้ (soluble solids) ในตัวอย่างนั้นๆ ซึ่งของแข็งที่สามารถละลายได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นจะเป็นกรดและสารประกอบอื่นๆ ที่สามารถละลายได้ ค่าที่วัดออกมาเทียบเท่ากับน้ำหนักของน้ำตาล (กรัม) ในน้ำผลไม้ 100 กรัม หรือมีค่าเท่ากับเปอร์เซ็นต์

1.2 วัสดุอุปกรณ์

1. Hand Refractometer
2. น้ำกลั่น
3. หลอดหยด
4. กระดาษชำระ
5. ตัวอย่างสาโท

1.3 วิธีการ

1. ใช้กระดาษชำระชุบน้ำ ทำความสะอาดปริซึมของ Hand refractometer และเช็ดให้แห้ง
2. หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบ (Day light plate) โดยให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตาแล้วปรับตัวเลขให้เป็นศูนย์ โดยใช้ไขควงหมุนน็อตที่อยู่ใกล้ฝาครอบ เมื่อปรับได้แล้วให้ทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง
3. ใช้หลอดหยดดูดสารตัวอย่างที่จะทำการวัดหยดลงในปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบโดยให้สารตัวอย่างกระจายทั่วพื้นที่ผิวของปริซึม และระวังอย่าให้มีฟองอากาศเพราะจะทำให้ค่าที่ได้อ่านได้ผิดพลาด
4. มองผ่านเลนส์ตา และอ่านค่าตรงระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นที่สีฟ้า ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์น้ำตาล (จำนวนกรัมของน้ำตาลต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)

2. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter

2.1 บทนำ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และ พรเทพ ถนนแก้ว, 2549ข)

การวัดพีเอช (pH) ในวัตถุดิบก่อนการหมัก ถือว่ามีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ กรณีมีผลต่อคุณภาพกลิ่นและรส (flavor) สี (colour) และความคงตัว (stability) ตลอดจนระยะเวลาในการเก็บบ่มของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

2.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. สารตัวอย่าง
2. พีเอชมิเตอร์
3. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
4. น้ำกลั่น
5. กระดาษซับ
6. แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)
7. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
8. สารละลายบัฟเฟอร์ มาตรฐาน พีเอช 4.0
9. สารละลายบัฟเฟอร์ มาตรฐาน พีเอช 7.0
10. สารละลายโปแตสเซียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์

2.3 วิธีการ

1. ทำความสะอาดโพรบวัดกรด-ด่าง (pH Electrode) ด้วยน้ำกลั่น แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษชำระ
2. คาลิเบรตเครื่องพีเอช มิเตอร์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ มาตรฐาน พีเอช 4.0 และ พีเอช 7.0

ตามลำดับ

3. ทำความสะอาดโพรบของเครื่องพีเอช มิเตอร์ อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น แล้วซับด้วยกระดาษชำระ
4. จุ่มโพรบวัดลงในสารตัวอย่าง ที่มีการกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก อ่านค่า พีเอช ที่วัดได้
5. ทำความสะอาดโพรบวัดพีเอช ด้วยน้ำกลั่น และซับด้วยกระดาษอีกครั้ง แล้วเก็บรักษาโพรบไว้ในสารละลายโปแตสเซียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดรวม โดยวิธีการไตเตรต

3.1 บทนำ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และ พรเทพ ถนนแก้ว, 2549 ค)

กรดในน้ำผลไม้โดยทั่วไป จะหมายถึงกรดอินทรีย์ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมทางชีวเคมีในผลไม้เอง หรือเกิดจากจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก ปริมาณกรดทั้งหมด จะเป็นตัวชี้วัดว่า สภาพพีเอชในกระบวนการหมักเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์หรือไม่ โดยอาจมีการเติมกรดทาร์ทาริก หรือ กรดมาลิก ลงในน้ำผลไม้ โดยน ออกจากจะช่วยปรับสภาพให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ในกระบวนการหมักแล้ว กรดยังช่วยปรับรสชาติของไวน์ ไวน์ผลไม้ ไวน์ข้าวให้มีลักษณะตามที่กำหนดไว้ และช่วยให้สารบางชนิดในไวน์มีความคงตัว

3.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. สารตัวอย่าง
2. ปีเปตขนาด 5 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
5. ฟีนอล์ฟทาลิน 1 เปอร์เซนต์
6. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล)
7. น้ำกลั่นต้มเดือด เพื่อไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว

3.3 วิธีการ

1. ปีเปตสารตัวอย่างจำนวน 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือด เพื่อไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกแล้ว ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
3. หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลิน 1 เปอร์เซนต์ ลงไป 0.3 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์
4. ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน โดยทำการไตเตรตตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
5. นำปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ได้จากการไตเตรตไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมด จากสมการ ต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)} = \frac{(V)(N)(EW)(100)}{(1000)(U)}$$

โดย

V = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต จนถึงจุดสิ้นสุดปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยคำนวณจากการไทเทรตสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์กับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

U = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่นำมาไทเทรต (มิลลิลิตร)

EW = น้ำหนักสมมูลของกรดที่ต้องการจะหา (น้ำหนักสมมูลของกรดทาร์ตริก = 150 เวลานำมาคำนวณต้องหารด้วย 2 เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมล จะทำปฏิกิริยาพอดีกับ 1 โมลของกรดทาร์ตริก หรือเท่ากับ 75 กรัม/กรัม equivalent)

4. การตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

4.1 บทนำ (สุกานดา วิจิตพันธุ์ และ ลักษณะ เบล่าไพบูลย์, 2549ข)

ฮีมาไซโตมิเตอร์ เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการนับเม็ดเลือด แต่ก็สามารถประยุกต์นำมาใช้ในการตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์และสปอร์ของเชื้อราได้เช่นกัน โดยเมื่อนำฮีมาไซโตมิเตอร์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และปรับโฟกัสลงบนช่องที่ทำไว้เป็นตาราง ซึ่งฮีมาไซโตมิเตอร์แต่ละอันจะกำหนดขนาดของ ความกว้าง , ความยาว และความลึกของช่องตารางไว้อย่างชัดเจน ทำให้สามารถคำนวณหาปริมาตรของช่องตารางเหล่านี้ได้ ทำให้สามารถคำนวณปริมาณเซลล์ยีสต์ หรือสปอร์ของเชื้อราได้

4.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. ฮีมาไซโตมิเตอร์
2. สารตัวอย่าง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ปิเปต ปลอดเชื้อ

4.3 วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างให้มีจำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ 1-10 เซลล์บนพื้นที่สี่เหลี่ยมเล็ก
2. วางกระจกปิดสไลด์บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ตรงบริเวณที่มี chamber แล้วใช้ pasteur pipette ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วหยดไปบนฮีมาไซโตมิเตอร์ บริเวณ platform ซึ่งเป็นแอ่ง ให้ตัวอย่างซึมเข้าไป ในบริเวณช่องใต้กระจกปิดสไลด์
3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 40X
4. ตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ในแต่ละช่องเล็ก และควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 10 ช่องเล็ก

5. คำนวณจำนวนเซลล์ยีสต์จากปริมาตรของสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก

โดยจำนวนที่ นับได้จากแต่ละช่องเล็ก นำมารวมกันและหารด้วยจำนวนช่องที่นับทั้งหมด จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งช่องเล็ก เช่นนับได้ X เซลล์ต่อช่อง เมื่อคำนวณจำนวนเซลล์ยีสต์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร จะได้ดังนี้

สี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็กมีความกว้าง 0.05 มม. ยาว 0.05 มม. และ chamber ลึก 0.1 มม.

ดังนั้น สี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็กมีปริมาตร $= 0.05 \times 0.05 \times 0.1 \text{ มม.}^3$

ถ้านับจำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก = X เซลล์

ปริมาตร $0.05 \times 0.05 \times 0.1 \text{ มม.}^3$ มีจำนวนเซลล์ยีสต์ X เซลล์

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตร } 1,000 \text{ มม.}^3 \text{ (1 มิลลิลิตร) มีจำนวนเซลล์ยีสต์} &= \frac{(X)(10^3)}{0.05 \times 0.05 \times 0.1} \text{ เซลล์} \\ &= 4(X)(10^6) \text{ เซลล์} \end{aligned}$$

หมายเหตุ : ถ้าตัวอย่างที่นำมาใช้นับจำนวนเซลล์ยีสต์มีการทำให้เจือจาง ให้นำ dilution factor เข้ามาคูณ จำนวนที่คำนวณได้

5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

5.1 บทนำ

วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยสภา ะที่ใช้ในการวิเคราะห์ อ้างอิงจาก ลิขิต ศิริสันติเมธาคม (2549) ดังนี้คือ ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สพาหะ ความดันคอลัมน์ 200 กิโลปาสกาล อุณหภูมิที่ตำแหน่งฉีดสาร 180 °C คอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ใช้ 20 เปอร์เซนต์ PEG-20M ชนิดของตัวตรวจวัด ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ เอฟ ไอ ดี ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 250 °C โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์ คือ คงอุณหภูมิที่ 150 °C เป็นเวลา 15 นาที

5.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

5.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น GC-14B ของบริษัทชิมาดะ (Shimadzu) ประเทศญี่ปุ่น ต่อกับตัวตรวจวัดชนิดเอฟไอดี (Flame ionization detector, FID) ของบริษัทชิมาดะ ประเทศญี่ปุ่น

5.2 เครื่องประมวลผลรุ่น 7 Ae plus ของบริษัทชิมาดะ ประเทศญี่ปุ่น

5.3 คอลัมน์ 20 เปอร์เซนต์ PEG-20M บริษัทชิมาดะ ประเทศญี่ปุ่น ความยาว 3 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของแผ่นฟิล์มที่เคลือบ 0.25 ไมโครเมตร

5.4 เข็มฉีดยาสำหรับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Syringe for GC) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัท SGE (เอสจีอี) ประเทศออสเตรเลีย

5.5 โพรพานอล

5.6 เอทานอล

5.3 วิธีทำการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 และ 12 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้โพรพานอลที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร

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 โดยใช้สภาวะเดียวกันการฉีดยาละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (ในข้อ 4)

6. การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric

6.1 บทนำ (กฤษฎา ตลับกลาง, 2554)

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีการนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ในช่วง 1 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิคัล หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้ (Zoecklein และคณะ, 1995)

น้ำตาล monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide จะทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสารที่มีความสามารถดูดซับแสงสูงสุด ที่ความยาวคลื่นแสง 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกปฏิกิริยาในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และน้ำตาล polysaccharide นั้นน้ำตาลจะถูกตัดพันธะอีเทอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำ ออกแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นไตรเอธิลมีเทนซึ่งเป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)

6.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. สารละลายฟีนอล 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
4. หลอดทดลอง
5. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทชัมดชิ ประเทศญี่ปุ่น
6. คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

6.3 วิธีการ

1. ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำกับสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วยโดยใช้น้ำกลั่นปริมาณเท่ากันแทนตัวอย่าง
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2. จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
4. นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi–Nelson

7.1 บทนำ (พรเทพ ถนอมแก้ว, 2549ก)

กลูโคสหรือฟรุคโตสในสารตัวอย่างจะรีดิวซ์คอปเปอร์ในสารละลายต่างได้คิวปรัสคอปเปอร์ (cuprous copper) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลายของอาซิโนโมลิบดีต (arsino molybdate) ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7.2 วัสดุอุปกรณ์

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

7.3 สารเคมี

(1) Somogyi

Somogyi I : ละลายโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate, Na_2SO_4) 288 กรัม โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต (potassium sodium tartrate) 24 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, NaCO_3) 48 กรัม และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, NaHCO_3) 32 กรัม ในน้ำกลั่น 1,600 มิลลิลิตร

Somogyi II : ละลายโซเดียมซัลเฟต 72 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 8 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร

ผสม Somogyi I และ Somogyi II ในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร ก่อนใช้แต่ละครั้ง

(2) Nelson

ละลายแอมโมเนียมโมลิบดีต (ammonium molybdate) 100 กรัม ในน้ำกลั่น 1,800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 84 มิลลิลิตรลงไป หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนต (sodium hydrogen arsenate) ที่มีความเข้มข้น 12 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลงไป และเก็บสารละลายในขวดสีชา

7.4 วิธีการ

1. ดูดสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายผสม Somogyi I มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ
2. นำสารละลายในข้อ 1. ไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเติมสารละลาย Nelson ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยวัดเทียบกับแบลนด์ ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง
3. อ่านค่าความเข้มข้นของกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากวิธีการเดียวกันโดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 25 50 100 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนสารตัวอย่างในสาโท

8. การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ในสาโทโดยวิธี DPPH

1.1 บทนำ

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

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

1.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

1.3 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 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นแบลนด์ (Blank)
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์จากกราฟมาตรฐานโดยใช้ กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu

2.1 บทนำ

การวิเคราะห์สารฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ของสารประกอบฟีนอลิก โดยสารละลาย Folin-Ciocalteu ในสภาวะที่เป็นด่างจะให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานซึ่งใช้กรดแกลลิก เป็นตัวแทนของสารประกอบฟีนอลิก

2.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

2.3 วิธีการ (Othman et al., 2009)

1. คัดสารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย folin-ciocalteu (เจือจาง 10 เท่าโดยใช้ น้ำกลั่นเป็นสารละลาย) 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

10. การหาปริมาณสารแกมมาโอไรซานอลโดยวิธี UV Spectrophotometric Method

10.1 บทนำ

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

10.1 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

10.2 วิธีการ (Lilitchan et al, 2008)

1. นำตัวอย่างสาโท ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer
2. นำค่าการดูดกลืนแสง ที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณสารแกมมาโอไรซานอล จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากซึ่งวิธีการเดียวกันโดยใช้สารละลายแกมมาโอไรซานอลมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรแทนตัวอย่างสาโท (Lilitchan. S และคณะ, 2008)

11. การหาปริมาณสารสีที่เกิดขึ้นโดยวิธี UV spectrophotometric method

11.1 บทนำ

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

11.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

11.3 วิธีการ (Johns and Stuart, 1991)

นำตัวอย่างของสาโทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 470 และ 500 นาโนเมตร สำหรับสารสี สีเหลือง สีส้ม และสีแดง ตามลำดับ

12. การวิเคราะห์ Colour intensity โดยวิธี UV spectrophotometric method

12.1 บทนำ

ความเข้มของสี (Colour Intensity) คือค่าที่ใช้ระบุว่าสีนั้นมีความเข้มมากเท่าใด ใช้ระบุความเข้มสีของไวน์หรือสาโทได้

12.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

12.3 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

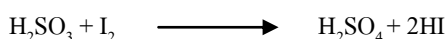
A_{520} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสาโทที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

A_{620} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสาโทที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

13. การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดและซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระโดยวิธี Ripper

13.1 บทนำ (พัฒนา เหล่าไพบุลย์ และ พรเทพ ถนนแก้ว, 2549ง)

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



ส่วนการหาปริมาณซัลเฟอร์ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่นนั้นจะต้องหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวมก่อน โดยใช้ด่างในการย่อยสลายซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อยู่ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่น ให้อยู่ในรูปของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระก่อน จากนั้นทำแบบเดียวกับการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ได้จะเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวม เมื่อนำซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระมาหักลบออกจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวมก็จะได้ปริมาณซัลเฟอร์ในรูปที่จับกับสารประกอบอื่น

13.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

13.3 วิธีการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด

1. ปิเปตสารตัวอย่างจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป ปิดจุก พร้อมแกว่งผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์
3. เติมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร
4. เติมผงโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปจนกว่าสีไวน์จะจางลง
5. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (น้ำกลั่นต่อกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3:1 โดยปริมาตร) ลงไป 5 มิลลิลิตร
6. ไตรเทรตด้วยสารละลายไอโอดีนมาตรฐานอย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะปรากฏเป็นสี น้ำเงินของน้ำแป้งประมาณ 20 วินาที จดปริมาตรของสารละลายไอโอดีนที่ใช้ นำไปคำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากสมการ

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

โดยที่ V_1 = ปริมาตรของสารละลายไอโอดีนมาตรฐานที่ใช้ไปในการไตรเทรต (มิลลิลิตร)

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนมาตรฐาน (นอร์มอล)

V_s = ปริมาตรของตัวอย่างสาโทที่ใช้ (มิลลิลิตร)

13.4 วิธีการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ

1. ปิเปตสารตัวอย่างจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. เติมผงโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปจนกว่าสีไวน์จะจางลง
4. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (น้ำกลั่น:กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3:1 โดยปริมาตร) ลงไป 5 มิลลิลิตร
6. ไตรเทรตด้วยสารละลายไอโอดีนมาตรฐานอย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะปรากฏเป็นสีน้ำเงินของน้ำแป้งประมาณ 20 วินาที จดปริมาตรของสารละลายไอโอดีนที่ใช้ นำไปคำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากสมการเดียวกันกับการหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด

14. การวิเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

14.1 บทนำ (AOAC, 2000)

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

14.2 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

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

14.3 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 คำนวณปริมาณแอนโทไซยานิน 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

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