

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ก. ค่าพีเอช (Amerine and Ough, 1985)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Eutech รุ่น pH510
2. บีกเกอร์ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
3. สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)
4. น้ำกลั่น

วิธีการ

1. เสียบปลั๊กไฟ แล้วกดเปิดเครื่องที่ ON-OFF ที่หน้าจอของเครื่องจะมีตัวอักษรและตัวเลขปรากฏขึ้น
2. อุณหภูมิเครื่องก่อนใช้ประมาณ 15-20 นาที ในระหว่างนี้เอาหัววัด ออกจากครอปสีดำที่บรรจุสารละลาย KCl 3 โมลาร์ แล้วแช่หัววัด ในน้ำกลั่นนาน 15-20 นาที
3. ทำการอุ่นเครื่องแล้ว และต้องการวัดค่าพีเอช ให้เช็คน้ำจอว่าแสดงพีเอช 1 ถ้าหน้าจอไม่แสดงค่านี้ให้กด MODE จนหน้าจอแสดงพีเอช 1
4. ล้างหัววัดด้วยน้ำกลั่น ชบน้ำกลั่นที่ติดปลายหัววัดด้วยกระดาษทิชชู แล้วจึงนำหัววัดไปแช่ในสารละลายหรือตัวอย่างที่ต้องการวัดค่าพีเอช แช่หัววัดไว้จนกระทั่งค่าพีเอชที่หน้าจอนิ่ง จึงเอาหัววัดออกจากตัวอย่าง
5. ล้างปลายหัววัด ด้วยน้ำกลั่นจนแน่ใจว่าล้างตัวอย่างหรือสารละลายออกหมด ชบน้ำกลั่นที่ติดที่ปลายหัววัด ด้วยกระดาษซับ แล้วจึงวัดค่าพีเอชในสารละลายหรือตัวอย่างต่อไป
6. ในกรณีที่เลิกใช้งาน ให้เก็บหัววัดที่ล้างด้วยน้ำกลั่นสะอาดแล้วเก็บไว้ในสารละลาย KCl 3 โมลาร์ ที่อยู่ในหลอดสีดำเท่านั้น ห้ามใส่น้ำกลั่นในหลอดสีดำ หรือแช่หัววัดในน้ำกลั่นนานเกินไป จะทำให้เกิดคราบเกลือที่หัววัด
7. ในระหว่างการเปิดเครื่องวัดพีเอช ที่ยังไม่ได้อัดค่าพีเอช สามารถแช่หัววัดไว้ในน้ำกลั่นหรือน้ำประปาได้ แต่ต้องไม่น้อยเกิน 5 ชั่วโมง เพราะจะทำให้เกิดคราบเกลือที่หัววัด

ข. ปริมาณกรดทั้งหมด (Zoecklein *et al.*, 1995)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ไตเตรท
2. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)
4. ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (Phenolphthalein)

วิธีการ

1. นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ต้มภายใต้การรีฟลักซ์ (Reflux) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อไล่อาร์บอนไดออกไซด์ ล้างคอนเดนเซอร์ด้วยน้ำกลั่น
2. ทำให้เย็นในน้ำเย็น
3. ไตเตรทตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ หรือใช้เครื่องวัดพีเอชวัดหาจุดยุติเท่ากับ 8.2
4. กำหนดหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปมิลลิมูลต่อลิตรของไวน์ตัวอย่างหรือในรูปของกรดซิตริก

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (เทียบกับกรดซิตริก)} = \frac{\text{มล. ของ NaOH} (\text{นอร์มอล ของ NaOH}) \times 0.070 \times 1,000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

ค. ปริมาณแอลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1985)

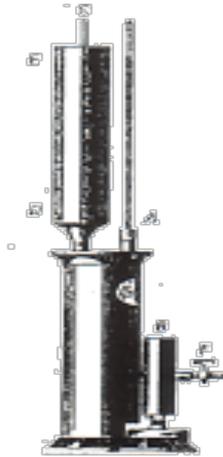
อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือวัดแอลกอฮอล์แบบอิมูลิโอมิเตอร์
2. ขวดน้ำกลั่น

วิธีการ

1. การหาจุดเดือดของน้ำ เติมน้ำกลั่นปริมาณ 30 มิลลิลิตร ลงในส่วน boiling chamber A ในขณะที่เดียวกันเติมน้ำเย็นลงไปในส่วนของ condensor D
2. นำเทอร์โมมิเตอร์ C ใส่งไปในตำแหน่งช่องใส่เทอร์โมมิเตอร์ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์

3. อ่านค่าอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์เมื่อมีค่าคงที่ประมาณ 15-30 วินาที ซึ่งเป็นจุดเดือดของน้ำ ตั้งไว้เป็นค่ามาตรฐานบนจานอ่านค่า
4. ทิ้งไว้ให้เย็นและล้างเครื่องมือ
5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-4 แต่เปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็นตัวอย่างที่ต้องการแล้วอ่านค่าอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์ที่ได้เทียบกับค่าบนจานอ่านค่า



รูปผนวกที่ 1 เครื่องมือวัดแอลกอฮอล์แบบอีบุคิโอมิเตอร์

ง. การวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Amerine and Ough, 1985)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ไตเตรท
2. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ขวดปรับปริมาตร
4. สารละลายน้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1
5. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 25
6. สารละลายไอโอดีนมาตรฐาน
7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

วิธีการ

1. การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ

- 1.1 ปิ่เปิดสารละลายตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.2 เติมน้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

- 1.4 ไตรเตรตกับสารละลายไอโอดีนมาตรฐาน จนได้จุดยุติเป็นสารละลายสีน้ำเงิน
- 1.5 บันทึกปริมาตร คำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ (มิลลิกรัม/ลิตร)

$$\text{ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ} = \frac{(\text{มล. ของไอโอดีนที่ใช้}) (\text{นอร์มอล ของไอโอดีน}) \times 32 \times 1000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มล.)}}$$

(1 มิลลิตรของสารละลายไอโอดีน 0.02 นอร์มอล ทำปฏิกิริยาพอดีกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 0.0064 กรัม)

2. การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด

- 2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 25 มิลลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิตร
- 2.2 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
- 2.3 เติมน้ำแข็งเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน
- 2.4 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 10 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 2.5 ไตรเตรตกับสารละลายไอโอดีนมาตรฐาน จนได้สารละลายสีน้ำเงิน
- 2.6 บันทึกปริมาตร คำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)

$$\text{ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ} = \frac{(\text{มล. ของไอโอดีนที่ใช้}) (\text{นอร์มอล ของไอโอดีน}) \times 32 \times 1000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

(1 มิลลิตร ของสารละลายไอโอดีน 0.02 นอร์มอลทำปฏิกิริยาพอดีกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 0.0064 กรัม)

จ. ค่าการดูดกลืนแสง (Jesco, 1996)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible Spectrophotometer)
2. ถังวัด (Cuvette, length path 1 ซม.)

วิธีการ

1. เปิดเครื่อง และอุ่นเครื่องก่อนใช้งาน ประมาณ 30 นาที
2. เข้าโปรแกรม Spectra Manager
3. กด Environment หน้าจอจะขึ้น V-500 Series initialize รอจนหน้าจอขึ้นเมนู hardware setting
4. กด Execute
5. เลือกหลอดกำเนิดแสง Halogen (wavelength 350-1100 nm) กด ตกลง และปิดหน้าต่าง
6. เลือกโปรแกรม Fixed wave length measurement
7. เลือก Measurement เพื่อตั้งค่า Parameter แล้วกด Auto zero
8. ใส่น้ำกลั่นลงใน Cuvette แล้ววางในช่องตัวอย่าง S
9. กดปุ่ม Blank รอเครื่องอ่านค่า หน้าจอจะปรากฏค่าการดูดกลืนแสงจำนวน 3 ค่าพร้อมค่าเฉลี่ย
10. นำ Blank ออกจากช่องตัวอย่าง
11. นำตัวอย่างใส่ใน Cuvette จากนั้นวางลงในช่องวางตัวอย่าง
12. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ปรากฏเช่นเดียวกับข้อ 9
13. นำตัวอย่างอื่นๆที่ต้องการวัดมาวางลงในช่องตัวอย่างเพื่ออ่านค่าเช่นเดียวกับข้อ 9
14. เมื่อทำการวัดเสร็จแล้ว ทำการปิดหลอดกำเนิดแสง โดยกด Environment แล้วจึงเลือกเมนูเพื่อปิดหลอด Halogen
15. ออกจากโปรแกรม แล้วปิดสวิทช์เครื่อง

ฉ. ปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส (คัดแปลงจาก Agilent Technologies, 2012)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง High Performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1200-series, Agilent Technology, Germany)
2. Fluorescence Detector (FLD)
3. ZORBAX Carbohydrate column (4.6mm×150 mm, 5 μ m) (Agilent Technology, Germany)
4. Syringe filter; Nylon 0.45 μ m
5. Acetonitrile (HPLC grade)

6. น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Deionized water; DI)
7. Fructose, Glucose, Sucrose

วิธีการ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Stand curve)

1. เตรียมสารละลายผสมของน้ำตาล Fructose, Glucose และ Sucrose ที่ความเข้มข้น 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% และ 1.0% ตามลำดับ
2. นำสารละลายมาตรฐานมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ด้วยสารละลายผสมของ ACN (โดยผสมสารละลายมาตรฐาน : สารละลายผสมของ ACN = 1:10) (สารละลายผสม ACN หมายถึง ACN : DI = 1:1)
3. กรองสารละลายมาตรฐานด้วย Syringe filter (Nylon 0.45 μ m)
4. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vial เพื่อรอวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมตัวอย่างน้ำเมาและไวน์

1. นำตัวอย่างน้ำเมาหรือไวน์เมามาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ด้วยสารละลายผสมของ ACN (โดยผสมสารละลายมาตรฐาน : สารละลายผสมของ ACN = 1:10) (สารละลายผสม ACN หมายถึง ACN : DI = 1:1)
2. กรองตัวอย่างด้วย Syringe filter (Nylon 0.45 μ m)
3. ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vial เพื่อรอวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC

1. นีดสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ปริมาตร 10 μ L โดยใช้สารละลายผสม ACN : DI = 3:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีอัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 30 $^{\circ}$ C และอุณหภูมิของ detector 35 $^{\circ}$ C
2. สร้างกราฟสารละลายมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม Chemstation (Agilent Technology) และควรให้มีความ Correlation ระหว่าง 0.9000-1.0000 (<http://tldc.siam.edn/class-Research/pdf/09.pdf>)
3. คำนวณความเข้มข้นของ Fructose, Glucose และ Sucrose ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Chemstation (Agilent Technology, Germany)

ข. ปริมาณกรดอินทรีย์ (ดัดแปลงจาก Agilent Technologies, 2012)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง High Performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1200-series, Agilent Technology, Germany)
2. Diode Array Detector (DAD)
3. ZORBAX SB-Aq (4.6mm×150mm, 5µm) (Agilent Technology, Germany)
4. Syringe filter; Nylon 0.45 µm
5. อะซิโตนไนไตรท์ (Acetonitrile; ACN HPLC grade)
6. น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Deionized water; DI)
7. Sodiumdihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) 20mM pH 2
8. Malic, Tartaric, Oxalic, Citric, Lactic, Acetic, Succinic และ Ascorbic acids

วิธีการ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (stand curve)

1. เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์ Malic, Tartaric, Oxalic, Citric, Lactic, Acetic, Succinic และ Ascorbic acids ที่ความเข้มข้น 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% และ 1.0% ตามลำดับ
2. กรองสารละลายมาตรฐานด้วย Syringe filter (Nylon 0.45 µm)
3. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vial เพื่อรอวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมตัวอย่างน้ำเม่าและไวน์

1. นำตัวอย่างน้ำเม่าและไวน์เม่ามา กรองตัวอย่างด้วย Syringe filter (Nylon 0.45 µm)
3. ปิเปตไวน์เม่า 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vial เพื่อรอวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยเครื่อง HPLC

1. ฉีดสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ปริมาตร 10 µL โดยใช้ Sodiumdihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) 20mM pH 2 และน้ำ ที่อัตราส่วนเท่ากับ 99:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C

2. สร้างกราฟสารละลายมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม Chemstation (Agilent Technology) และ ควร ให้ มี ค่า correlation ระหว่าง 0.9000-1.0000 (<http://tldc.siam.edn/class-Research/pdf/09.pdf>)

3. คำนวณความเข้มข้นของ Malic, Tartaric, Oxalic, Citric, Lactic, Acetic, Succinic และ Ascorbic acids ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Chemstation (Agilent Technology, Germany)

ข. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (วันเพ็ญ, 2541)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้แบบพกพา (Handrefractometer) 0-28 องศาปริกซ์
2. หลอดหยด
4. ขวดน้ำกลั่น

วิธีการ

1. เปิดแผ่นทับปริซึม หยดน้ำกลั่นเล็กน้อยบริเวณผิวหน้าปริซึมและปิดแผ่นทับ ส่องตรงเลนส์ตาดูแถบสีฟ้าเพื่อปรับ (Calibrate) ให้ตรงเลข 0
2. เช็ดน้ำกลั่นด้วยกระดาษซับ แล้วใช้หลอดหยดดูดตัวอย่าง หยดลงผิวหน้าปริซึม ปิดแผ่นทับส่องเลนส์ตาอ่านค่าตรงแถบสีฟ้า บันทึกค่าที่ได้

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าของของแข็งหรือร้อยละของน้ำตาลขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง ควรระมัดระวังผิวหน้าของปริซึม ล้างด้วยน้ำกลั่นหรือแอลกอฮอล์ เช็ดให้สะอาดและปิดแผ่นทับปริซึมทุกครั้งที่เกิดใช้งานแล้วเพื่อป้องกันฝุ่นละอองและสกปรก เพราะจะทำให้ค่าที่อ่านได้จากรีแฟรคโตมิเตอร์ผิดพลาดได้

ณ. อะเซทาลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. โพแทสเซียมไดฟอสเฟต (Potassium diphosphate, $K_4P_2O_7$)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
3. นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD)

4. อะเซทาลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส (Aldehyde dehydrogenase, AI-DH)
5. อะเซทาลดีไฮด์ (Acetaldehyde)
6. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible Spectrophotometer)
7. คิวเวท (Cuvette) length path 1 เซนติเมตร

การเตรียมสารเคมี

1. Potassium diphosphate 0.3 โมล/ลิตร พีเอช 9.0
ละลาย Potassium diphosphate 5.0 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และปรับพีเอช 9.0 ด้วย Hydrochloric acid 1 โมล/ลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. Nicotinamide-adenine dinucleotide 25 มิลลิโมล/ลิตร
ละลาย Nicotinamide-adenine dinucleotide 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร
3. Aldehyde dehydrogenase 40 ยูนิต/มิลลิลิตร
ละลาย AI-DH 60 ยูนิต ในน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร
4. สารละลายมาตรฐาน Acetaldehyde 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ชั่ง AI-DH 100 มิลลิกรัม (130 ไมโครลิตร) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และก่อนนำมาใช้ในงาน เจือจางสารละลายในอัตราส่วน 1:10

วิธีการ

เติมสารลงในหลอดคิวเวท	แบลนค์ (มล.)	ตัวอย่าง (มล.)	ความเข้มข้น
Buffer (I)	1.00	1.00	$K_4P_2O_7$ 90 มิลลิโมล/ลิตร
NAD (II)	0.20	0.20	NAD 1.5 มิลลิโมล/ลิตร
Redist water	2.00	1.80	
sample or standard	-	0.20	ปรับความเข้มข้น 140 ไมโครโมล/ลิตร
ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นประมาณ 2-3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A1)			
AI-DH (III)	0.05	0.05	ประมาณ 6×10^2 ยูนิต/ลิตร
ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์ (3-4 นาที) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A2)			

กำหนดความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง $A_2 - A_1$ นำไปคำนวณดังนี้

$$C \text{ (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{V \times MV}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

กำหนดให้

- V = ปริมาตรสุดท้าย
 v = ปริมาตรตัวอย่าง
 MV = มวลโมเลกุล
 d = ขนาดคิวเวท
 ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH
 ΔA = $\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}$

ญ. แอลฟาคีโทกลูทาเรท (α -Ketoglutaric acid)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. โซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Disodium hydrogen orthophosphate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4)
3. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)
4. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีเตท (Ethylenediamine-tetraacetate, $\text{EDTA Na}_2\text{H}_2$)
5. รีดิวซ์นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide, NADH-Na_2)
6. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate, NaHCO_3)
7. กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase, GIDH)
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
9. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible Spectrophotometer)
10. คิวเวท (Cuvette) length path 1 ซม.

การเตรียมสารเคมี

1. บัฟเฟอร์

ละลาย Disodium hydrogen orthophosphate 58.4 กรัม, Potassium dihydrogen phosphate 3.8 กรัม, Ammonium dihydrogen phosphate 11.5 กรัม และ Ethylenediamine-tetraacetate

7.4 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับพีเอช 7.6 ด้วย Sodium hydroxide และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide 6 มิลลิโมล/ลิตร

ละลาย Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide 30 มิลลิกรัม และ Sodium hydrogen carbonate 60 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร

3. Glutamate dehydrogenase 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Glutamate dehydrogenase 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร และเติม Ammonium dihydrogen phosphate 3 มิลลิโมลาร์ 4.5 มิลลิลิตร

วิธีการ

เติมสารลงในหลอดคิวเวท	แบลงค์ (มล.)	ตัวอย่าง (มล.)
Buffer (I)	3.00	2.90
NADH (II)	0.10	0.10
ตัวอย่าง	-	0.10
ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นประมาณ 2-3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A1)		
GIDH (III)	0.10	0.10
ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์ (5-6 นาที) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A2)		

กำหนดความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง A1-A2 นำไปคำนวณดังนี้

$$C \text{ (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{V \times MV}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

กำหนดให้

V = ปริมาตรสุดท้าย

v = ปริมาตรตัวอย่าง

MV = มวลโมเลกุล

d = ขนาดคิวเวท

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH

ΔA = $\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}$

ฏ. ไพรูเวท (Pyruvic acid)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ไตรเอทานอลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Triethanolamine hydrochloride)
2. เอทรีลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (Ethylenediamine-tetraacetate, EDTA Na_2H_2)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH 5 mol/L)
4. รีดิวซ์นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide, NADH- Na_2)
5. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate, NaHCO_3)
6. แอล-แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (L-Lactate dehydrogenase, L-LDH)
7. ไพรูเวทโซเดียมซอลต์ (Pyruvate sodium salt)
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
9. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible Spectrophotometer)
10. คิวเวท (Cuvette) length path 1 ซม.

การเตรียมสารเคมี

1. บัฟเฟอร์

ละลาย Triethanolamine hydrochloride 14 กรัม และ Ethylenediamine-tetraacetate 0.28 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7.6 ด้วย Sodium hydroxide 5 โมล/ลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide 6 มิลลิโมล/ลิตร

ละลาย Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide 30 มิลลิกรัม และ Sodium hydrogen carbonate 60 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร

3. L-Lactate dehydrogenase 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย L-Lactate dehydrogenase 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐาน Pyruvate sodium salt 0.5 กรัม/ลิตร

ละลาย Pyruvate sodium salt 63 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

เติมสารลงในหลอดคิวเวท	แบลงค์ (มล.)	ตัวอย่าง(มล.)	ความเข้มข้น
Buffer (I)	1.00	1.00	triethanolamine 0.24 มิลลิโมล/ลิตร
NADH (II)	0.10	0.10	NADH 0.19 มิลลิโมล/ลิตร
ตัวอย่างหรือสารละลาย มาตรฐาน	-	0.10	ปรับความเข้มข้น 180 ไมโคร โมล/ลิตร
น้ำกลั่น	2.00	1.90	-

ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A1)

L-LDH (III)	0.02	0.02	17.6×10^3 ยูนิต/ลิตร
-------------	------	------	-------------------------------

ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์ (5-6 นาที) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm (A2)

กำหนดความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง A1-A2 นำไปคำนวณดังนี้

$$C \text{ (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{V \times MV}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

กำหนดให้

V = ปริมาตรสุดท้าย

v = ปริมาตรตัวอย่าง

MV = มวลโมเลกุล

d = ขนาดคิวเวท

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH

ΔA = $\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}$

กฎ. การวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของแอนโรไซยานินโดยใช้ LC/MS (ดัดแปลงจาก Duan *et al.*, 2007)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography Agilent, 1200
2. คอลัมน์ชนิด Zorbax SB C18 (ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน 4.6 x 150 มิลลิเมตร)
3. การ์ดคอลัมน์ชนิด Phenomenex USA. C18 (ขนาด 4 x 3.0 มิลลิเมตร)
4. เครื่อง Mass detector (MS) Agilent, G1956B
5. อะซิโตนไนไต์ (Acetonitile)
6. ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (Trifluoroacetic acid)

วิธีการ

1. น็อคสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ปริมาตร 10 μL ใช้สารละลาย Acetonitrile (A) และ 0.1 % TFA (B) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้การไหลของสาร A เท่ากับ 7 % และเพิ่มเป็น 20 % ภายในเวลา 60 นาที ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดสัญญาณที่ 500 และ 520 นาโนเมตร

2. กำหนดสภาวะ Mass detector (MS) ดังนี้

Ionization mode	: API-ES
Polarity	: Positive
Gas temperature	: 320 °C
Drying gas	: N ₂ 13 L/min.
Nebulizer pressure	: 40 psi
Quadrupole temperature	: 100 °C
Volt capillary positive	: 4000 V
Volt capillary negative	: 3500 V
Scan mode	: 100 – 1000 m/z

จ. การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Suh *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
3. โซเดียมอะซิเตรท (Sodium acetate)
4. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 (ผสม Potassium chloride ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล จำนวน 125 มิลลิลิตร และ Hydrochloric acid ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล จำนวน 385 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน ปรับพีเอชเป็น 1.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น)
2. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 (ผสม Sodium acetate ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 400 มิลลิลิตร และ Hydrochloric acid ความเข้มข้น 1 นอร์มัล จำนวน 240 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน ปรับพีเอช 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น)

วิธีการ

1. แบ่งสารละลายตัวอย่างเป็น 2 ส่วน (โดยใช้ปริมาตรที่แตกต่างกัน ไปขึ้นอยู่กับปริมาณสารกลุ่มแอนไซยานินที่มีอยู่ในเม่าแต่ละสายพันธุ์)
2. เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 ให้ครบ 1 มิลลิลิตร
3. เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 ให้ครบ 1 มิลลิลิตร
4. เก็บสารละลายทั้งสองไว้นาน 2 ชั่วโมง
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 และ 690 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลนด์
6. คำนวณปริมาณแอนไซยานินทั้งหมดได้จากสูตร โดยเปรียบเทียบกับ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyaniding-3-glucoside)

$$\text{แอนไซยานิน} = \frac{(A1 - A2) \times MW \times DF \times 1000}{EL}$$

$$E = 29600$$

$$L = \text{ขนาดคิวเวท}$$

$$DF = \text{Dilution factor}$$

$$MW = 484.5 \text{ (มวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์)}$$

A1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 520 - 690 นาโนเมตร ของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0

A2 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 520 - 690 นาโนเมตร ของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5

๓. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล (ดัดแปลงจาก Mauricio *et al.*, 2007)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
2. ฟอลินซีโอแคลเตอูรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu reagent)
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
4. กรดแกลลิก (Gallic acid)

วิธีการ

1. ปรับปริมาตรตัวอย่าง (แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณสารฟีนอลที่มีอยู่ในแต่ละสายพันธุ์) โดยใช้ น้ำกลั่น ให้ครบ 3 มิลลิลิตร
2. เติม Folin-Ciocalteu reagent 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3. เติมสารละลายอิมตัวของ Sodium carbonate 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid

ฅ. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระ (ดัดแปลงจาก Adedapo *et al.*, 2009)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เอ บี ที เอ ส (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; ABTS)
2. โทรลอกซ์ ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid; Trolox)
3. สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate solution)
4. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย ABTS โดยผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับ Potassium persulfate solution ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:0.5 (โมล/โมล) แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์
2. เจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำกลั่นจนวัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.9-1.0 ที่ความยาวคลื่น 734 nm
3. นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ (โดยใช้ปริมาตรที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเม้าแต่ละพันธุ์) ปรับให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
4. เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ Trolox

ณ. การวิเคราะห์ชนิดของสารให้กลิ่นระเหย (ดัดแปลงจาก Bonino *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (Agilent; Hewlett-Packard, 7890A)
2. Headspace solid phase micro extraction (HS-SPME); Supelco, Bellefonte PA, USA
4. Polydimethylsiloxane (PDMS)
3. คอลัมน์ชนิด DB5ms (0.25 มิลลิเมตร x 30 เมตร x 0.25 ไมโครเมตร)
4. ดีเทคเตอร์ (detector) ชนิด Mass Selective Detector, 5975C

วิธีการ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Stand curve)

เตรียมสารละลายผสมของสารให้กลิ่นมาตรฐาน 16 ชนิด ได้แก่ Butanoic acid ethyl ester, Hexanoic acid ethyl ester, Nonanoic acid ethyl ester, Tetradecanoic acid ethyl ester, Phthalic acid diisobutyl ester, Cyclohexanepropanoic acid ethyl ester, Hexadecanoic acid ethyl ester, Limonene, Beta.-myrcene, 2-Methyl-1 butanol, Phenethyl alcohol, 2,3-Butanediol, Acetic acid, Octanoic acid, Eicosane และ Butylated hydroxytoluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm ตามลำดับ

การเตรียมตัวอย่างน้ำเมาและไวน์

เตรียมตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียสในขวด Head space ใช้ SPME และ PDMS ดูดซับสารให้กลิ่นที่ระเหยออกมาจากตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที

วิธีการวิเคราะห์

1. ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง Gas Chromatography โดยใช้ SPME
2. วิเคราะห์หาชนิดของสารให้กลิ่นระเหยโดยใช้คอลัมน์ชนิด DB5ms (0.25 มิลลิเมตร x 30 เมตร x 0.25 ไมโครเมตร) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็น Mobile phase อัตราการเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิขาเข้า (Inlet temperature) 200 °ซ อุณหภูมิส่วนตู้อบ (Oven temperature) 35 °ซ นาน 20 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 250 °ซ ในอัตรา 25 °ซ ต่อ นาที เป็นเวลานาน 15 นาที ใช้ดีเทคเตอร์ (Detector) ชนิด Mass Selective Detector อุณหภูมิ Quadrupole 250 °ซ อุณหภูมิของ MS source 150 °ซ เปรียบเทียบโครมาโตแกรม ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์โดยใช้ Libraries search ของ W8N05ST และ

NIST08 (Agilent Technologies, 2007) รายงานผลสารให้กลิ่นเป็นกลุ่ม เช่น Acids, Esters, Higher alcohols และ Terpene เป็นต้น