

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การหมักไวน์ผลไม้

จากการศึกษา“สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไวน์จากผลไม้ท้องถิ่นภาคใต้” จากโครงการที่ 1 โดยใช้สภาวะในการหมักโดยสังเขปดังนี้ ยีสต์ที่ใช้ในการหมักคือ *Saccharomyces cerevisiae* var burgundy หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 4 เดือน

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

การสุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบลักษณะทางกายภาพ จะชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 5 หน่วยภาชนะบรรจุ โดยใช้ผู้ตรวจสอบ 10 คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจสอบโดยให้คะแนนโดยอิสระ ผู้ตรวจสอบ 10 คน ประกอบด้วย ผู้ผลิต 2 คน นักวิชาการ 3 คน ผู้บริโภค 4 คน และบุคลากรในภาครัฐที่เกี่ยวข้อง 1 คน โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	คะแนนเต็ม
ความใส	ใสตามลักษณะของไวน์ผลไม้	10
สี	สีเป็นไปตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ และเป็นไปตามที่ระบุไว้ในฉลาก	10
กลิ่น	มีกลิ่นหอมของผลไม้หรือน้ำผลไม้ที่นำมาผลิตไวน์ผลไม้ตามที่ระบุ และไม่สิ่กลิ่นน้ำส้มสายชูหรือกลิ่นอื่น ๆ ที่ไม่พึงประสงค์ปรากฏเด่นชัด	30
รสชาติ	มีความเป็นกรด หวาน ฝาด เผื่อน และกลมกล่อมตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ	30
คุณภาพโดยรวมของไวน์ผลไม้	มีความใส สี กลิ่น และรสชาติ เป็นที่ยอมรับ	20

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การหมักไวน์ผลไม้

จากการศึกษา“สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไวน์จากผลไม้ท้องถิ่นภาคใต้” จากโครงการที่ 1 โดยใช้สภาวะในการหมักโดยสังเขปดังนี้ ยีสต์ที่ใช้ในการหมักคือ *Saccharomyces cerevisiae* var burgundy หมักที่อุณหภูมิ 25°C. เป็นเวลา 4 เดือน

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

การสุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบลักษณะทางกายภาพ จะชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 5 หน่วยภาชนะบรรจุ โดยใช้ผู้ตรวจสอบ 10 คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจสอบโดยให้คะแนนโดยอิสระ ผู้ตรวจสอบ 10 คน ประกอบด้วย ผู้ผลิต 2 คน นักวิชาการ 3 คน ผู้บริโภค 4 คน และบุคลากรในภาครัฐที่เกี่ยวข้อง 1 คน โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	คะแนนเต็ม
ความใส	ใสตามลักษณะของไวน์ผลไม้	10
สี	สีเป็นไปตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ และเป็นไปตามที่ระบุไว้ในฉลาก	10
กลิ่น	มีกลิ่นหอมของผลไม้หรือน้ำผลไม้ที่นำมาผลิตไวน์ผลไม้ตามที่ระบุ และไม่สีกลิ่นน้ำส้มสายชูหรือกลิ่นอื่น ๆ ที่ไม่พึงประสงค์ปรากฏเด่นชัด	30
รสชาติ	มีความเป็นกรด หวาน ฝาด เผื่อน และกลมกล่อมตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ	30
คุณภาพโดยรวมของไวน์ผลไม้	มีความใส สี กลิ่น และรสชาติ เป็นที่ยอมรับ	20

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี

1. การวัดพีเอช

นำตัวอย่างไวน์มาวัดพีเอชด้วย pH meter

2. วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ (Alcohol)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.1.08 (983.13)

1. เครื่องมือและสารเคมี

1.1 Gas chromatography : ประกอบด้วย flame ionization detector, integrator, heated on-column injector, 6 ฟุต x 2 มม. glass column เพกด้วย 0.2% Carbowax 1500 บน 80-100 mesh Carbowax C

Gas chromatographic specification

Carrier gas	N ₂
Flow rate, mL/min	15
Oven temperature	105°
Injection temperature	175°
Detector temperature	175°

ปรับอากาศและ N₂ สำหรับ flame detector เพื่อให้ได้ optimum สำหรับ carrier gas ปรับ electrometer sensitivity ให้ได้ $\geq 50,000$ count

1.2 Dilutor $\pm 0.1\%$ precision

1.3 Internal standard solution : 0.2%v/v 2-propanolol ในน้ำ

1.4 Alcohol standard solution : เตรียมแอลกอฮอล์ในน้ำให้มีปริมาณเท่ากับ % ของแอลกอฮอล์ในตัวอย่างไม่โดยประมาณ

2. การวัดปริมาณแอลกอฮอล์

2.1 เจือจาง alcohol standard solution 1:100 ด้วย internal standard solution

2.2 ฉีดตัวอย่าง 1.0 มล. อย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของพื้นที่ได้พีคของแอลกอฮอล์กับพื้นที่ได้พีคของ 2-propanolol (RR')

2.3 เจือจางตัวอย่าง 1:100 ด้วย internal standard solution ฉีดตัวอย่าง 1 มล. แล้ววัดค่าอัตราส่วน (RR)



$$\% \text{ alcohol} = (R_{\text{RX}} / \text{alcohol in standard}) / R_{\text{R}'}$$

3. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมทานอล (Methanol)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 26.1.36 (972.11)

1. เครื่องมือ Gas chromatography equipped with flame ionization detector

1.1 Column : 23% Carbowax 1500 (w/w) on chromosorb (60-80 mesh, acid washed)

1.2 Approximate parameter : column temperature 70°C (isothermal); detector และ inlet temperature 150°C, He carrier flow 150 มล./นาที

2. สารเคมี

2.1 แอลกอฮอล์ : USP methanol free

2.2 Methanol stock solution : เจือจาง 99.9 mol% 10 มล. เป็น 100 มล. ด้วย แอลกอฮอล์ 40%

2.3 n-Butyl alcohol internal standard stock solution : เจือจาง 99.9 mol% 10 มล. เป็น 100 มล. ด้วย แอลกอฮอล์ 40%

2.4 Methanol standard solution (0.050% methanol plus 0.030% n-Butyl internal standard) : ใส่ 40% แอลกอฮอล์ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วเติม methanol stock solution (2.2) ลงไป 500 มคล. และ 300 มคล. n-Butyl stock solution (2.3) ลงไป 300 มคล. ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์ 40%

3. การวัดเมทานอล

3.1 ฉีดส่วนผสมของ standard solution 10 มคล. ปรับพารามิเตอร์ให้ได้ความสูงของพีค (peak) ¼ ของสเกล หา retention time ของ methanol และ n-butanol (ประมาณ 3 และ 2 นาที ตามลำดับ)

3.2 ฉีดตัวอย่างไวน์ 10 มคล. เพื่อหาปริมาณเมทานอลโดยประมาณ เพื่อดูว่าไวน์มี n-butanol หรือไม่

3.3 การวัด methanol เมื่อมี n-butanol ในตัวอย่างไวน์ เมื่อทราบปริมาณ methanol ในข้อ 3.2 แล้ว ให้เตรียม standard solution ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยให้ครอบคลุมความเข้มข้นของ methanol ในตัวอย่าง เติม internal standard ลงในตัวอย่างไวน์ และ ใน standard solution ให้ได้เท่ากับ methanol ในตัวอย่างไวน์ คำนวณหาอัตราส่วนของพีคของ

3
641.229
K 56 n
a 9

158223

methanol และ n-butanol แล้วเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนที่ได้กับความเข้มข้นของ methanol ที่มีอยู่ในไวน์

3.4 การวัด methanol เมื่อไม่มี n-butanol : เตรียม methanol standard เหมือนข้อ

3.1 แต่ไม่ใส่ n-butanol ลงในตัวอย่างไวน์ หรือใน standard แล้วเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีคกับความเข้มข้นของ methanol

4. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.2.01 (940.20) ใช้เครื่องมือ Apparatus for modified monitor-Williams method for sulfur dioxide

1. ใส่ตัวอย่างลงใน distilling flask เจือจางด้วยน้ำประมาณ 400 มล. ใส่ HCl 90 มล. ด้วยความดันเล็กน้อย

2. ปลดปล่อยให้ N₂ เข้าในตัวอย่างให้เกิดฟองอย่างสม่ำเสมอ ให้ความร้อนให้เกิด reflux 20-25 นาที (Ca 80 volts on 7 amp transformer) เมื่อการ reflux ถึงสภาพคงที่ ให้ apply line voltage แล้ว reflux 1.75 ชั่วโมง

3. ปิดน้ำใน condenser แล้วให้ความร้อนต่อจนกระทั่ง inlet joint ของ U-tube แรกเกิดการกลั่นตัวและอุ่นขึ้นเล็กน้อย ให้ถอด separator ออกแล้วปิดความร้อน

4. เมื่อที่ข้อต่อส่วนบนเย็นแล้ว แยกส่วนที่ต่อกันออกแล้ว rinse สารลงไปยัง U-tube ที่สอง ให้ต่อ cross over tube กับส่วนข้อต่อที่เหลือของ u-tube แรก แล้วหยด methyl red แล้วไตเตรตด้วย 0.1 N NaOH จนเป็นสีเหลืองใสโดยเขย่าเบา ๆ คำนวณหา SO₂ จากผลการไตเตรตที่ได้ (0.1 N NaOH = 3.203 mg SO₂ แล้วไตเตรต U-tube เช่นเดียวกัน)

5. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณทองแดง (Cu)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.1.23 (970.18)

Atomic adsorption method

1. การเตรียม copper standard solution

1.1 Stock solution (0.2 มก./มล.) : เตรียม volumetric flask ขนาด 500 มล. ใส่น้ำกลั่น และเติม H₂SO₄ ลงไป 2 มล. ชั่ง CuSO₄·5H₂O 0.393 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ

1.2 Working solution (0.004 มก./มล.): นำ stock solution มา 2 มล.ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มล.

2. การเตรียม standard curve

2.1 ใช้ volumetric flask ขนาด 50 มล. ใส่แอลกอฮอล์ลงไปใบละ 25 มล. แล้วใส่ Cu working solution ลงไปใบละ 0, 2, 4, 6, 10 และ 12 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้ความเข้มข้นของทองแดงเท่ากับ 0.0, 0.16, 0.32, 0.48, 0.80 และ 0.96 มก./มล.

3. วัดปริมาณทองแดงโดยใช้เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer : ปฏิบัติตามวิธีการใช้เครื่อง ปรับความยาวคลื่นที่ 324.7 นาโนเมตร ปรับ blank โดยใช้ working solution ที่มีทองแดงอยู่ 0 มก./มล.

4. วัดค่า absorption ของ standard และ ตัวอย่างไวน์ เขียนกราฟระหว่างค่า absorption กับความเข้มข้นของทองแดงเป็น มก./มล. ของ standard แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของเหล็กในตัวอย่างไวน์จากกราฟ

6. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็ก (Fe)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.1.24 (970.19)

Atomic adsorption method

1. ปิเปตไวน์ 20 มล. ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มล. ใส่แอลกอฮอล์ 95% ลงไป 88 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไปปรับปริมาตรให้ครบ 200 มล.

2. Iron standard solution

2.1 Stock solution (10 มก./มล.): ชั่ง ferrous ethylenediammonium sulfate [$\text{FeC}_2\text{H}_4\text{.}(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4\text{.}4\text{H}_2\text{O}$] 0.0684 กรัมละลายน้ำ ใส่ใน volumetric flask และเติม H_2SO_4 2.5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1 ลิตร

2.2 Working solution (ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 มก./มล.): ใช้ volumetric flask ขนาด 100 มล. 5 ใบ ใส่แอลกอฮอล์ 43% ลงไปใบละ 50 มล. แล้วเติม stock solution ลงไป 0, 1, 2, 3 และ 4 มล. ปรับปริมาตรด้วย แอลกอฮอล์ 43%

3. วัดปริมาณเหล็กโดยใช้เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer : ปฏิบัติตามวิธีการใช้เครื่อง ใช้ lean air C_2H_2 flame และ single element Fe lamp ปรับความยาวคลื่นที่ 248.3 นาโนเมตร ปรับ blank โดยใช้ working solution ที่มีเหล็กอยู่ 0 มก./มล.

4. วัดค่า absorption ของ standard และ ตัวอย่างไวน์ เขียนกราฟระหว่างค่า absorption กับความเข้มข้นของเหล็กเป็น มก./มล. ของ standard แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของ

เหล็กในตัวอย่างไวน์จากกราฟ

7. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว (Lead)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 9.2.17 (972.23)

1. เครื่องมือ

1.1 Atomic absorption spectrophotometer

1.2 Lead lamp : Hollow cathode Pb lamp

2. สารเคมี

2.1 Hydrochloric acid 1 N

2.2 Lead standard solution

2.2.1 Stock solution 1 มก.ตะกั่ว/มล. 1 N HNO₃

2.2.2 Working solution (10 มก.ตะกั่ว/มล.) : ปิเปิด stock solution 10 มล. ใส่ volumetric flask 1 ลิตร ใส่ HCl 82 มล. เจือจางด้วยน้ำจนครบ 1 ลิตร

2.2.3 Buffer solution: ชั่ง EDTA 163 กรัม ในน้ำ 200 มล. ใส่ใน volumetric flask 2 ลิตร แล้วใส่ NH₄OH ลงไปละลาย ใส่ 70.5% HClO₄ จำนวน 60 มล. ใน volumetric flask ขนาด 500 มล. ละลาย La₂O₃ 50 กรัม ใน HClO₄ solution หยด methyl orange indicator 8 หยด ลงใน ammonium EDTA solution แล้วเติม La₂O₃ solution ลงใน EDTA solution ขณะที่คนอย่างแรง ถ้าจำเป็นให้เติม NH₄OH เพื่อคงความเป็นต่างของ methyl orange เอาไว้ เจือจางให้ครบ 2 ลิตร

3. การเตรียม standard curve

3.1 เตรียม volumetric flask ขนาด 50 มล. ใส่ Pb working solution 0, 1, 2, 5, 15, 25, และ 30 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วย 1 HCl จะได้ความเข้มข้นของตะกั่ว 0, 0.2, 0.6, 1.0, 3.0, 5.0 และ 1.0 มก./มล.

3.2 เตรียมเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 283.3 นาโนเมตร อัตราการไหลของ C₂H₂ ตามข้อกำหนดของเครื่อง

4. การวัดตะกั่วในตัวอย่าง วัดค่า absorption ของ standard solution และ ตัวอย่างไวน์ คำนวณหาปริมาณของตะกั่วจากสมการ

$$\text{ppm Pb} = [(\mu\text{gPb/ml sample solution}) \times 25] / \text{g sample}$$

8. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารหนู (Arsenic)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 9.1.0. (986.15)

เครื่องมือ Atomic absorption spectrophotometer

1. ปิเปิดตัวอย่างลงใน borosilicate flask 50 มล. แล้วเติมสารละลาย $Mg(NO_3)_2$ แล้วให้ความร้อนบนแผ่นร้อนจนแห้ง แล้วเพิ่มความร้อนจนถึงประมาณ $375^\circ C$.
2. วาง flask ในเตาเผา $450^\circ C$. เพื่อออกซิไดซ์ carbonaceous matter เพื่อทำลาย $Mg(NO_3)_2$ ส่วนที่เกิน
3. นำส่วนที่เหลือทำให้เย็นลงแล้วละลายใน 8 M HCl 2.0 มล. แล้วเติม 20% KI 0.1 มล. เพื่อ reduce As^{5+} เป็น As^{3+} วางไว้ 2 นาทีเป็นอย่างน้อย ให้ทดสอบ blank ร่วมกับตัวอย่าง
4. เตรียม standard นำฟลasks ขนาด 50 มล. มา 6 ใบ เติมสารละลาย 2.0 มล. $MgCl_2$ และเติม standard solution ลงในฟลask 5 ใบให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 และ 0.25 มก. As ใส่ 20% KI ลงไปฟลask ละ 0.1 มล.
5. ต่อ generator ต่อกับเครื่องมือปรับความดันและการไหลของแก๊ส H_2 และ N_2 และเปิดเครื่องมือให้ทำงานตามข้อกำหนดของเครื่อง ติดตั้ง lamp และ recorder set ด้วยความเร็ว 20 มม./นาที
6. เติม 4% $NaBH_4$ 2.0 มล. ลงใน reagent dispenser ของ generator แล้วปิดจุกที่ฟลask ของ standard และตัวอย่างให้แน่น กลับฟลask เบาลา ๆ 1 ครั้งเพื่อผสม standard หรือตัวอย่าง จะเกิด A peak ที่แคบและแหลมทันที
7. เมื่อปากกาของ recorder กลับสู่ base line ให้เอาจุกที่ฟลask ออก แล้วกั้ว reagent dispenser ด้วยน้ำที่بيبออกจากขวด และดูคณน้ำออก แล้วปฏิบัติกับตัวอย่างอื่น ๆ และ standard จนครบทั้งหมด
8. เขียนกราฟระหว่าง A และ ไมโครกรัมของ As แล้วอ่านผลที่ได้จากตัวอย่างจากกราฟ

9. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณอัลดีไฮด์ (Aldehyde)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.1.41 (967.10)

1. สารเคมี

1.1 Potassium metabisulfite solution : ละลาย $K_2S_2O_5$ 15 กรัม ในน้ำ เติม HCl 70 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำ bisulfite titer ของสารละลาย 10 มล. ควรมีค่า > สารละลาย 0.1 N | 24 มล.

1.2 Phosphate EDTA solution : ละลาย $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 200 กรัม และ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ในน้ำปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

1.3 Dilute hydrochloric acid : เจือจาง HCl 250 มล. ด้วยน้ำให้ครบ 1 ลิตร

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 บีบตัวอย่างไวน์มา 50 มล. ซึ่งมี acetaldehyde < 300 มล. ใน volumetric flask ขนาด 500 มล. เติม saturated borax solution 50 มล. และน้ำ 50 มล. ลงใน Erlenmeyer flask 1 ลิตร ที่ใส่น้ำกลั่น 300 มล. $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ solution 10 มล. และ phosphate-EDTA solution 10 มล. (pH ควรอยู่ในช่วง 7.0-7.2) อาจปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ใน $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ solution แล้วเริ่มด้วยตัวอย่างใหม่) เติม phosphate-EDTA solution 10 มล. (pH ควรอยู่ในช่วง 7.0-7.2) ปิด flask เขย่า และวางนิ่ง ๆ 15 นาที แล้วเติม HCl 10 มล. และเติม 0.2% starch indicator ที่เตรียมใหม่ 10 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม 0.1 N I solution ให้มากพอที่จะทำลาย bisulfite ที่เกินโดยจะเกิดสีน้ำเงินอ่อนที่ end point

2.2 เติม sodium borate solution แล้วไตเตรต liberated bisulfite ด้วย 0.05 N I solution จากบิวเรต ขนาด 10 มล. (จนได้สีฟ้าอ่อนเมื่อถึง end point) ไตเตรตต่อและเขย่าตลอดเวลาอย่าให้ถูกแสงอาทิตย์โดยตรง (pH ควรเท่ากับ 8.8-9.5) อาจปรับ pH ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH กับ sodium borate solution

$$\text{Mg CH}_3\text{CHO}/100 \text{ ml} = \text{ml I solution} \times \text{normality I solution} \times 22.0 \times 100 \text{ ml sample}$$

10. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.1.14 (920.64)

1. ใช้ตัวอย่าง 200 มล. แล้วทำให้เป็นกลางโดยไตเตรตกับ 1 N NaOH หาปริมาณของด่างที่ใช้ ใส่ตัวอย่างลงในจานกระเบื้องเคลือบแล้วระเหยให้เหลือปริมาณประมาณ 50 มล.

2. ไตเตรตกับสารละลาย $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ จนเป็นกลาง แล้วเจือจางด้วยน้ำจนครบปริมาตรแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง แยกตะกั่วออกด้วย dry potassium oxalate แล้วหาปริมาณ reducing sugar ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 44.1.16 (906.03)

11. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (Total acid)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 28.1.29 (962.12)

1. กำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ในไวน์โดยใส่ตัวอย่างลงในขวดลูกชมฟู่ประมาณ 25 มล. แล้วต่อกับ H₂O aspirator เขย่า 1 นาทีภายใต้สุญญากาศ

2. ต้มน้ำ 200 มล. ให้เดือดในขวดลูกชมฟู่ปากกว้าง เมื่อต้มแล้วในขณะที่ร้อนให้หยดสารละลาย phenolphthalein indicator ลงไป 1 มล. ทำให้เป็นกลางจนเป็นสีม่วง ใส่ตัวอย่างไวน์ที่กำจัดแก๊สออกไปแล้ว 5 มล. แล้วไตเตรตกับ 0.1N NaOH จนถึงจุดยุติ

การคำนวณ

$$\text{Calculate g tartaric acid/100 ml wine} = \text{ml NaOH} \times \text{normality} \times 0.075 \times 100/5$$

12. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid)

ตามวิธี AOAC (1995) หัวข้อ 26.1.12 (920.60)

- นำตัวอย่างไวน์ 75 มล. ใส่ใน petridish ก้นเรียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 85 มม. ระเหยให้ของเหลวออกไปในเครื่องอังน้ำ
- นำของแข็งที่ได้ทำให้แห้งเป็นเวลา 2-5 ชั่วโมงในตู้อบ 100°C. ทำให้เย็นใน desiccator แล้วนำมาชั่งหาปริมาณของแข็งทั้งหมด

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไวน์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ตามวิธีของ Slinkard and Singleton (1977)

ปิเปตตัวอย่างสารสกัด 12.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร และ Folin-Ciocalteu 12.5 ไมโครลิตร ลงใน microplate ทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง 6 นาที เติม 7% Na₂CO₃ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบและรายงานผลในรูป µg Gallic acid equivalent (µg GAE)

2. การจับอนุมูลอิสระ

- radical scavenging activating (Brand-Williams et al., 1995) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบและรายงานผลในรูป µg Trolox equivalent (µg TE)

ปิเปตตัวอย่างสารสกัด 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม microplate แล้วเติมสารละลายของ DPPH 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร