ภาคผนวก

1. วิธีการหาความชื้นโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) ยี่ห้อ CEM รุ่น Smart Systems

วิธีการ

1. เปิดสวิตช์เครื่องและตั้งค่าต่างๆ ตามคู่มือประจำเครื่อง Microwave โดยเครื่องจะทำงานที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

2. ยกฝาเครื่องขึ้นใส่กลาส ไฟเบอร์ แซมเปิ้ล แพด (Glass Fiber Sample Pads) จำนวน 2 แผ่น ลงบนบาลานซ์แพน (balance pan) แล้วปิดฝาลง กด แทร์ (Tare) เพื่อปรับน้ำหนักเป็นศูนย์

3. เมื่อเครื่องปรับน้ำหนักเป็นศูนย์เรียบร้อยแล้ว ยกฝาขึ้น นำกลาส ไฟเบอร์ แซมเปิ้ล แพด ออกจากเครื่อง ป้ายตัวอย่างน้ำผึ้งประมาณ 2 กรัม ลงบนกลาส ไฟเบอร์ แซมเปิ้ล แพด โดยเกลี่ยให้เป็นแผ่นบางๆ สม่ำเสมอ จากนั้นประกบด้วย กลาส ไฟเบอร์ แซมเปิ้ล แพด อีกแผ่น รีบวางลงบน บาลานซ์แพน เบาๆ แล้วปิดฝาเครื่อง แล้วกดเอ็นเตอร์ (enter)

4. เครื่องจะอ่านและบันทึกน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างน้ำผึ้งก่อนเริ่มวิเคราะห์

5. เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ เครื่องจะแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้น และผลของเปอร์เซ็นต์ของแข็ง

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส และมอลโทส ในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

สารเคมี

อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) 90% เตรียมโดยเจือจางอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 900 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.45 ไมครอน และไล่อากาศออก

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างน้ำผึ้งมาเจือจางลง 10 เท่า

2. ทำการกรองตัวอย่างผ่านเมมเบรน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.45 ไมครอน

วิธีการ

1. เปิดเครื่องและปรับตั้งค่าต่างๆ ตามคู่มือประจำเครื่องเพื่อให้พร้อมต่อการใช้งาน โดยตั้งอัตราการไหลของโมบายเฟสเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้คอลัมน์ลิโฟซอล์ฟ (Liphosorp) ดีเทคเตอร์ (detector) เป็นรีเฟลกทีฟอินเด็กซ์ (Reflective index)

2. ใช้ไซริงส์ดูดตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร จากนั้นทำการฉีดตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ ใช้เวลา 40 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง

3. ผลจากการวิเคราะห์จะถูกพิมพ์ออกมาเป็นกราฟและพื้นที่ใต้กราฟ

4. นำพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่างๆ

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาล

1. ดูดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ ฟรุกโทส กลูโคส เจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 40, 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนซูโครส และมอลโทส เจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 เปอร์เซ็นต์

2. นำสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลดังกล่าวมาฉีดวิเคราะห์ โดยวิธี HPLC ฉีดตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร 3 ครั้ง

3. นำพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณหาความสัมพันธ์ของสมการเชิงเส้น

3. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

3. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบเข้าโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นตัวดีแล้ว นำออกชั่งทันทีด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

คำนวณหาเถ้าด้วยสมการ

$$\text{เถ้า (\%)} = \frac{(b-a) \times 100}{W}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังการเผา

W = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

4. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด

วิธีการ

1. วิเคราะห์หากรดทั้งหมด (total acidity) โดยดูดตัวอย่าง 2 กรัม

2. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมทั้งหยดฟีนอลทาลีน ลงไป 2-3 หยด

3. ไตไตรดด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติสังเกตจากการเกิดสีชมพูอ่อน บันทึกผลปริมาตรของด่างมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรด คำนวณปริมาณกรดโดย

ใช้สูตร

$$\% TA = \frac{V \times N \times 75 \times 100}{1000 \times V}$$

เมื่อ %TA คือ เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดทั้งหมด ควรมีค่าประมาณ 0.6-0.05%

V คือ ปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

V คือ ปริมาณของน้ำผึ้งที่ใช้

75 คือ โมลอิควิวาเลนต์ของกรดทาร์ทาริค

5. การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) เข้มข้น 93 – 98%

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม และโพแตสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 45% (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ชนิดเกล็ด 450 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCI) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3)4% เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่กรดบอริคลงไป 4 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลงแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทธิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิล-เรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออ-เรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยการอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 – 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารที่อบแล้ว 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด ทำการไตเตรดด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1.1 ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้งให้ได้น้ำหนักประมาณ 2 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

1.2 เติมสารเร่งรวม 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

1.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร

1.4 นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวใสทิ้งไว้ในเย็น

2. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

2.1 เมื่อสารละลายเย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.2 ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย ต่อหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 มิลลิลิตรอยู่ โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแล้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดแก้ววิเคราะห์ช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

2.3 หยดอินดิเคเตอร์รวมในกรดบอริค 2 – 3 หยด

2.4 ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา ทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

3. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

3.1 ไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

3.2 บันทึกปริมาตรของกรดเกลือ เพื่อใช้คำนวณต่อไป

การคำนวณหาโปรตีนด้วยสมการ

$$\text{โปรตีน (\%)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007 \times 6.25}{W}$$

เมื่อ a = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

6. การเตรียมตัวอย่าง และวิเคราะห์หาการเจริญเติบโตของผลึก (ดัดแปลงจาก Rufford, 2000)

สารเคมี

สารละลายเอทานอลที่อิ่มตัวด้วยกลูโคส 90 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยการเจือจางเอทานอลเข้มข้น 900 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และเติมกลูโคสลงไปละลายเรื่อยๆ จนกลูโคสไม่สามารถละลายได้อีกต่อไป

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำผึ้ง 5 กรัม ผสมกับสารละลายเอทานอลที่อิ่มตัวด้วยกลูโคส 90 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ตัวอย่างน้ำผึ้งละลายเหลือไว้เพียงแต่กลูโคสโมโนไฮเดรต และนำไปวัดขนาดผลึกในขั้นตอนต่อไป

วิธีการ

1. ทำการวัดขนาดผลึกโดยเครื่อง มาสเตอร์ไซเซอร์ อี (Mastersizer E) โดยเทสารละลายเอทานอลที่อิ่มตัวด้วยกลูโคส ลงไปในอ่างวัด 500 มิลลิลิตร เปิดสวิทซ์ใบพัด เพื่อให้สารละลายแขวนลอยตลอดเวลา

2. ทำการวัดแบ็คกราวด์ของสารละลายเอทานอลที่อิ่มตัวด้วยกลูโคส 90 เปอร์เซ็นต์

3. ทำการวัดตัวอย่างที่เตรียมไว้โดยเทลงไปในอ่างวัดเบาๆ จดหมด ใช้เวลาในการวัด 10 นาที ต่อ 1 ตัวอย่าง และบันทึกผลที่ได้รับจากคอมพิวเตอร์

4. ถ้าต้องการวัดตัวอย่างต่อไปให้ล้างอ่างวัดด้วยน้ำกลั่น และตามด้วยสารละลายเอทา-นอลที่อิ่มตัวด้วยกลูโคส 90 เปอร์เซ็นต์ หลายๆครั้ง

5. จากนั้นทำตามขั้นตอนในข้อ 1 ถึงข้อ 3 ตามลำดับ

7. การวัดสีโดยเครื่องวัดสี ยี่ห้อ HunterLab รุ่น ColorFlex

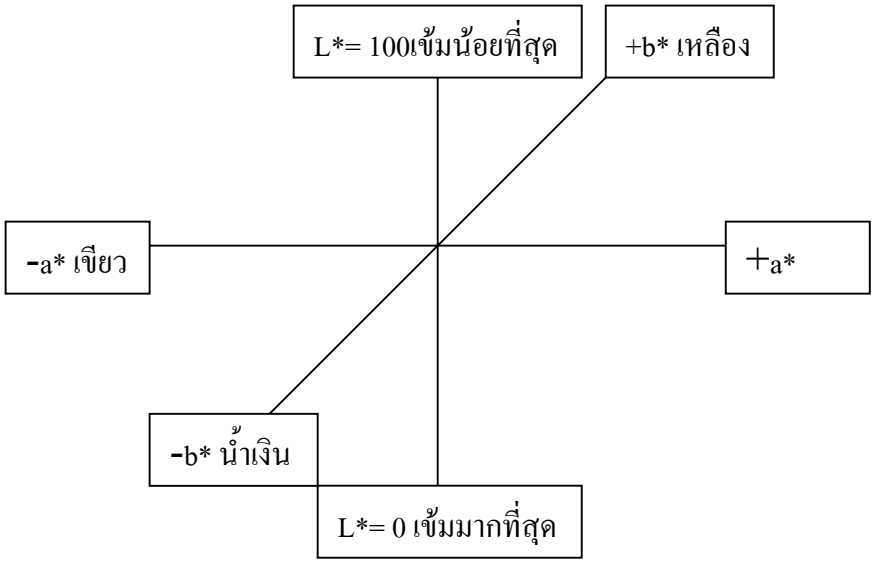
การเตรียมตัวอย่าง

1. ตัวอย่างเป็นน้ำผึ้งใช้ยางวงรัดขอบถ้วย แล้วจึงบรรจุตัวอย่างให้ถึงขอบบนยาง ปิดด้วยแผ่นปิดตัวอย่าง

2. ใช้แผ่นปิดตัวอย่าง กรณีที่ตัวอย่างมีความโปร่งแสง และเพื่อไม่ให้แสงรบกวนจากภายนอก

วิธีการ

1. เปิดคอมพิวเตอร์ เข้าสู่โปรแกรมการทำงาน Universal V3.73
2. หลังจากเปิดเครื่องแล้วประมาณ 15 นาที จึงทำการ calibrate ด้วยแผ่นสีมาตรฐาน
3. คลิกที่ standardize เลือก port size 1.25 นิ้ว
4. วางแผ่นสีดำโดยวางด้านสีดำมันลงบน port แล้วคลิก ok
5. วางแผ่นสีขาวมาตรฐานให้จุดสีขาวบนแผ่นสีอยู่กึ่งกลาง port
6. เครื่องจะทำการ calibrate จนเสร็จสิ้น คลิก ok เครื่องพร้อมทำงาน
7. จากนั้นทำการกำหนดค่าในการวัดสี คลิกเมาส์ที่ active view
8. คำสั่ง scale เลือก CIELAB เพื่อให้เครื่องแสดงค่าวัดสีในระบบ Hunter
9. illuminant เลือกเพื่อกำหนดแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ เลือก D65
10. เมื่อเสร็จสิ้นจากการตั้งค่า จึงเริ่มวัดตัวอย่าง โดยการวางตัวอย่างลงบน port และคลิกเมาส์ที่ read me
11. ใส่ชื่อตัวอย่าง ค่าที่ได้จะปรากฏในตาราง และอ่านผลเปรียบเทียบกับภาพข้างล่างนี้



8. การวัดค่า Water Activity โดยเครื่องหาค่า Water Activity ยี่ห้อ Novasina รุ่น Thermoconstanter

วิธีการ

1. ก่อนใช้งานทำการ calibrate ตามวิธีการดังนี้

1.1 นำ salt standard (ความชื้นมาตรฐาน) มาใส่ใน measuring chamber ให้เริ่มต้นด้วย salt standard SAL-90 (90.1%ERH)

1.2 ปิดฝาครอบให้เรียบร้อย

1.3 หมุนปุ่มสีเหลืองตรงด้านหน้าไปยังหมายเลข 2

1.4 รอจนกว่าค่า Aw ใกล้เคียงกับค่า salt standard ที่ใส่เข้าไป

1.5 กดปุ่ม enter จนกระทั่งข้อความบนจอหยุดกะพริบ

1.6 ทำการ calibrate หลายๆ ค่าในคราวเดียวกันเป็นลำดับ เริ่มจากค่ามากถึงค่าน้อย อย่างน้อยสองค่า ซึ่งสามารถครอบคลุมถึงค่า Aw ที่คาดว่าจะเป็นค่า Aw ของตัวอย่างที่ต้องการจะวัดค่า

1.7 เครื่องจะทำการ calibrate จนเสร็จสิ้นกระบวนการ

1.8 เข้าโปรแกรมวัดค่า Aw จากนั้นหมุนปุ่มสีเหลืองของเครื่อง Thermoconstanter ไปที่ตำแหน่งที่ 1

2. นำตลับพลาสติกมาใส่สารตัวอย่างให้ได้ปริมาตร 80-90 เปอร์เซ็นต์ของความจุ

3. นำตลับตัวอย่างมาใส่ไว้ใน Measuring Chamber

4. ปิดฝา chamber โดยหมุนตามเข็มนาฬิกา และปิดฝาครอบ

5. รอจนกระทั่ง Relative Humidity ของอากาศที่วัดได้อยู่ในสภาวะที่สมดุลกับสารตัวอย่าง หาค่า Aw ที่ต้องการด้วยสมการ

$$\text{Water Activity (Aw)} = X / 100$$

เมื่อ X = Relative Humidity ของอากาศที่วัดได้ในสภาวะที่สมดุลกับสารตัวอย่าง