ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวก 1 การประเมินลักษณะทางสัณฐานข้าวเหนียวก่ำ (IRRI-IBPRG,1980)

ลักษณะ	**เกณฑ์การประเมิน**
1. สีแผ่นใบ	(1) เขียวอ่อน
	(2) เขียว
	(3) เขียวเข้ม
	(4) เขียวขอบม่วง
	(5) ม่วงที่ปลาย
	(6) ม่วงผสมเขียว
	(7) ม่วงทั้งใบ
2. สีกาบใบ	(1) เขียวอ่อน
	(2) เขียว
	(3) เขียวแถบม่วง
	(4) ม่วงที่ริม
	(5) ม่วงผสมเขียว
	(6) ม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะ	เกณฑ์การประเมิน
3. สีเยื่อกันน้ำฝน	(1) ไม่ปรากฏสี
	(2) เขียว
	(3) ม่วง
4. สีเขี้ยวกันแมลง	(1) เขียว
	(2) ม่วง
5. สีข้อ	(1) เหลือง
	(2) เขียว
	(3) เขียวขอบม่วง
	(4) ม่วง
6. สีปล้อง	(3) เหลือง
	(4) เขียว
	(5) เขียวเส้นม่วง
	(6) ม่วง
7. สีกลีบดอก	(1) ฟาง
	(2) เหลือง
	(3) แดง
	(4) ม่วง
	(5) ม่วงดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะ	เกณฑ์การประเมิน
8. สีปลายกลีบดอก	(1) ไม่ปรากฏสี
	(2) ฟาง
	(3) น้ำตาล
	(4) แดง
	(5) ชมพู
	(6) ม่วง
	(7) ม่วงแดง
9. สีปลายยอดเกสรตัวเมีย	(1) ไม่ปรากฏสี
	(2) เหลือง
	(3) เขียว
	(4) ม่วง
	(5) ม่วงดำ
10. หางข้าว	(1) ไม่มี
	(2) มี
11. สีเปลือกเมล็ด	(1) ฟาง
	(2) ฟางขีดน้ำตาล
	(3) ฟางขีดดำ
	(4) ม่วง
	(5) ม่วงดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะ	เกณฑ์การประเมิน
12. สีเยื่อหุ้มเมล็ด	(1) ไม่ปรากฏสี
	(2) แดง
	(3) น้ำตาล
	(4) ม่วง
	(5) ม่วงดำ
	(6) ม่วงน้ำตาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 2 การประเมินลักษณะทางสัณฐานงาขี้ม้อน

(Ju Kyong Lee and Ohmi Ohnishi, 2001)

ลักษณะ	**เกณฑ์การประเมิน**
1. สีผิวใบบน	(1) เขียว
	(2) เขียวอมม่วง
	(3) ม่วง
	(4) ม่วงเข้ม
2. สีผิวใบล่าง	(1) เขียว
	(2) เขียวอมม่วง
	(3) ม่วง
	(4) ม่วงเข้ม
3. สีของลำต้น	(1) เขียว
	(2) เขียวอมม่วง
	(3) ม่วง
4. รูปร่างของใบ	(1) ไม่มีริ้วรอย
	(2) มีริ้วรอย
	(3) ริ้วรอยมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะ	เกณฑ์การประเมิน
5. สีของดอก	(1) เขียว
	(2) ม่วง
6. สีของเมล็ด	(1) ขาว
	(2) เทา
	(3) น้ำตาล
	(4) น้ำตาลเข้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณไขมันโดยรวม, ปริมาณวิตามินอี,

ตารางภาคผนวก 3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (Analysis of Variance) ของปริมาณไขมันโดยรวม ในรำข้าวเหนียวก่ำ

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	23	145.746	6.33679	20.08	0.0000
Error	24	7.575	0.31564		
Total	47	153.321			
Grand Mean	16.872				
CV%	3.33				

ตารางภาคผนวก 4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณไขมันโดยรวม ในเมล็ดงาขี้ม้อน

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	11	241.320	21.9382	42.58	0.0000
Error	12	6.183	0.5153		
Total	23	247.503			
Grand Mean	34.485				
CV%	33.85				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ชนิด Alpha –α ในรำข้าวเหนียวก่ำ

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	23	5011.07	217.873	25.39	0.0000
Error	24	205.93	8.580		
Total	47	5217.00			
Grand Mean	23.530				
CV%	12.45				

ตารางภาคผนวก 6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ชนิด Beta –β ในรำข้าวเหนียวก่ำ

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	23	3548.24	154.271	15.08	0.000
Error	24	245.48	10.228		
Total	47	3793.72			
Grand Mean	30.212				
CV%	10.59				

ตารางภาคผนวก 7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ชนิด Gamma –γ ในข้าวเหนียวก่ำ

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	23	21695.8	943.298	13.87	0.0000
Error	24	1632.1	68.003		
Total	47	23327.9			
Grand Mean	85.437				
CV%	9.65				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณวิตามินอีโดยรวม ในรำข้าวเหนียวก่ำ

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	23	64898.5	2821.67	18.01	0.0000
Error	24	3759.7	156.65		
Total	47	68658.1			
Grand Mean	139.18				
CV%	8.99				

ตารางภาคผนวก 9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณวิตามินอีโดยรวม ในเมล็ดงาขี้ม้อน

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	11	34993.9	3181.26	4.27	0.0096
Error	12	8948.6	745.72		
Total	23	43942.5			
Grand Mean	277.43				
CV%	9.84				

ตารางภาคผนวก 10 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันของรำข้าวเหนียวก่ำ

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	23	16.5821	0.72096	7.53	0.0000
Error	24	2.2973	0.09572		
Total	47	18.8794			
Grand Mean	1.6992				
CV%	18.21				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันของเมล็ดงาขี้ม้อน

Source	DF	SS	MS	F	P
Variety	11	22.3780	2.03436	200.86	0.0000
Error	12	0.1215	0.01013		
Total	23	22.4995			
Grand Mean	2.9414				
CV%	3.42				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

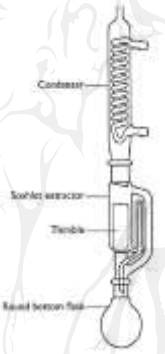
วิธีการหาปริมาณไขมันโดยรวม

การวัดไขมันโดยรวม (Determination of Crude Fat) โดยวิธี Soxhlet

วิเคราะห์ตามวิธีของ Pathak *et al*. (1996)

อุปกรณ์

แบ่งเป็นสามส่วน ดังภาพ 3 คือ เครื่องควบแน่นอยู่บนสุด ถัดมาเป็น soxhlet ที่มี thimble บรรจุตัวอย่างแช่ในสารละลายอีเธอร์ ส่วนล่างสุดเป็นขวดทรงเตี้ย (oil flask) ตั้งอยู่บนเตาเพื่อรองรับไลปิดที่สกัดได้



Soxhlet Extraction Apparatus

สารเคมี

dichloromethane AR.

วิธีทำ

1. ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัมใส่กระดาษกรอง
2. ชั่งน้ำหนักขวดทรงเตี้ย (flask) ที่ใส่หินกันเดือด (pumice stone) 2-3 เม็ด และผ่านการอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส (ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง) สมมุติได้ X กรัม
3. ห่อตัวอย่างจากข้อ 1. ให้มิดชิด (กันตัวอย่างหลุดออกขณะสกัด) ใส่ลงใน thimble
4. นำ thimble ใส่ลงใน soxhlet ต่อปลายล่างของ soxhlet เข้ากับขวดทรงเตี้ย ที่วางอยู่บนเตา ส่วนปากของ soxhlet ต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น ปล่อยน้ำเข้าเครื่องกลั่น
5. เติม dichloromethane ประมาณ 250 มิลลลิตร ทางบนสุดของเครื่องควบแน่น
6. ให้ความร้อนรอจนเกิดการควบแน่น 4-6 หยด ต่อวินาที ใช้เวลา 8 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. นำ thimble ออกจาก soxhlet กลั่นแยกสารเคมี เก็บไว้ใช้ต่อไป จนสารเคมีเหลือก้นขวดไม่เกิน 5 มล. (เพื่อป้องกันการลุกไหม้ในตู้อบ) นำขวดไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในโถอบแห้ง นำไปชั่ง สมมุติได้ Y กรัม

$$\% \text{ Crude fat} = Y - X \times \frac{100}{2}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

วิธีการหาปริมาณวิตามินอี

AOCS Official Method Ce 8-89

Reapproved 1997

Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC

DEFINITION

This method describes a procedure for the determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC. The procedure is not directly applicable to processed products, such as margarines containing tocopherol esters, but it may be used to determine tocopherols in the unsaponifiable matter obtained from such products (see Notes, 1 and 2 and References, 1).

SCOPE

The oil or fat (or the unsaponifiable matter obtained from a processed product containing tocopherol esters) is dissolved in an organic solvent and subjected to direct high-performance liquid chromatographic (HPLC) separation of the individual tocopherols and tocotrienols. Calibration factors are determined for each tocopherol from the chromatography of solutions of standard tocopherols; calibration factors for tocotrienols are taken to be equivalent to that of the corresponding tocopherols. The tocopherol and tocotrienol content of an oil or fat is the quantity of tocopherols and tocotrienols, determined in the sample by the described procedure and expressed in micrograms per gram (μg/g).

APPARATUS

Note—All glassware should be of low actinic activity, or procedure should be performed under yellow lights.

1. HPLC system—consisting of a high-pressure pump, sample injection device, detector and chart recorder or recording integrator. A fluorescence detector should be used, with the excitation wavelength set at 290 nm and emission wavelength at 330 nm. A UV detector may be used if a fluorescence detector is not available. The wavelength of the UV detector should be set at 292 nm.
2. HPLC analytical column—250 × 4 mm, packed with microparticulate silica having a mean particle size of about 5 μm (see Notes, 3).
3. UV spectrometer—capable of absolute measurement of absorbance at precisely defined wavelengths.
4. Rotary film evaporator.

REAGENTS

Note—All solvents should be of HPLC grade, or equivalent. For additional reagents required when prepared fats containing tocopherol esters are being analyzed, see Reagents section in Notes, 2.

1. α-, β-, γ- and δ-Tocopherol standards (see Notes, 4).
2. Methanol (see Notes, *Caution*).
3. Dichloromethane.
4. Hexane (see Notes, *Caution*).
5. Isopropanol.
6. HPLC mobile phase—isopropanol in hexane (0.5:99.5, v/v).

SAMPLING

1. It is essential that the laboratory sample used for preparing the test sample is taken according to a recognized sampling procedure [such as that described in International Organization for Standardization (ISO) 5555], and that the laboratory sample was subsequently protected from the effects of heat and light.

PROCEDURE

1. Preparation of solutions of tocopherol standards—
   (a) α-Tocopherol standard stock solution—Prepare a stock solution of α-tocopherol by accurately weighing about 10 mg of the standard (Reagents, 1) into a 100-mL volumetric flask, and making up to volume with hexane (Reagents, 4). Pipet 10 mL of this solution into an amber glass round-bottom flask, and remove all hexane on a rotary evaporator (Apparatus, 4) at a temperature not higher than 40°C. Restore atmospheric pressure with nitrogen, and remove the flask from the evaporator as soon as all the solvent has been removed. Pipet into the flask 10 mL of methanol (Reagents, 2), and swirl to dissolve the tocopherol. Measure the absorbance of this solution at 292 nm, and calculate the concentration (as μg/mL α-tocopherol) by dividing the absorbance value by 0.0076 (see Notes, 5).
   (b) β-, γ- and δ-Tocopherol standards stock solutions—Prepare similar stock solutions and aliquots for UV spectrometry of β-, γ- and δ-tocopherol standards (Reagents, 1) as described for the α-tocopherol standard stock solution. Measure the absorbance of each of these solutions at the following wavelengths, and use the corresponding divisor factors (see Notes, 5) for calculation of concentration:
      296 nm β-tocopherol = 0.0089
      298 nm γ-tocopherol = 0.0091
      298 nm δ-tocopherol = 0.0087
   (c) Mixed tocopherol standards working solution—Mix appropriate volumes of the stock solutions of the tocopherol standards to obtain a mixed tocopherol standards working solution, and dilute with hexane to give a solution containing between 1 and 5 μg/mL of each tocopherol.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Note—A more concentrated solution may have to be prepared if a UV detector is used. It is important that all standards are protected from light and are stored refrigerated (see Notes, 6).

2. Optimization of working parameters—Condition the column (Apparatus, 2), if necessary (see Notes, 7). Pump the isopropanol/hexane mobile phase (Reagents, 6) through the column at a flow-rate of 1 mL/min for at least 30 min. Inject about 20 μL of the mixed tocopherol standards working solution onto the column and, if necessary, adjust the isopropanol content of the mobile phase and the flow-rate (see Notes, 8) to achieve the following conditions:
   (a) α-tocopherol retention time not less than 5 mins;
   (b) resolution factor (R) for the separation of β- and γ-tocopherol not less than 1.0, i.e., an almost baseline separation (see Notes, 9).

   Select the optimum settings for detector and integrator sensitivity and chart speed. Inject about 20 μL of the mixed tocopherol standards working solution. Repeat the injection, and check that reproducible chromatograms are obtained.
3. Preparation of the test sample—The test sample, in the case of liquid laboratory samples, should be prepared by homogenization, except that filtration should be avoided. In the case of solid samples, transfer a representative portion (i.e. not less than 10% by weight of the laboratory sample) to a glass beaker and carefully homogenize by melting, with gentle mixing, in a water bath at a temperature not exceeding 40 C. The preparation of the test sample should be carried out, as far as is practicable, in subdued light and, in any case, out of direct sunlight.
4. Preparation of the test solution—Weigh accurately about 2 g of the prepared test sample (see Notes, 10) into a 25-mL volumetric flask. Add a quantity of hexane (Reagents, 4), swirling to dissolve the sample, and make up to volume with the same solvent. If a fluorescent detector is used it may be necessary to make further dilution of this solution prior to chromatography. It is important that the test solutions are protected from light prior to analysis and analyzed on the day of preparation.
5. HPLC determination of tocopherols in the test solution—Inject 20 μL of the mixed tocopherol standards working solution onto the column and record the areas of the tocopherol peaks. If an integrator is not available, record peak heights (measured in mm). Inject 20 μL of the test solution onto the column and identify the tocopherols (and tocotrienols) present by reference to the chromatograms obtained from standards (see Notes, 11). Record the areas of the tocopherol peaks (or peak heights). Record the areas of any tocotrienol peaks, if these are present and are to be quantified. Duplicate injections should be made. Inject a further 20 μL of the mixed tocopherol standards working solution and record the areas of the tocopherol peaks.
6. Number of determinations—Carry out two determinations (each consisting of duplicate injections of the prepared test solutions) in rapid succession, using a fresh test portion for each determination.

CALCULATIONS

1. The α-tocopherol content of the sample in μg/g is given by:

$$\frac{C \times a \times D \times 25}{A \times m}$$

Where—
- C = concentration of the α-tocopherol standard (μg/mL)
- A = mean of the peak areas obtained for the α-tocopherol standard
- a = mean of the peak areas obtained for the α-tocopherol in test sample
- m = mass of test sample taken
- D = dilution factor, e.g., for a test solution prepared from a 1:10 dilution of a 25-mL solution of the test portion this factor would be 10

2. The β-, γ- and δ-tocopherol contents of the test sample are calculated in the same way, using the data from chromatography of the corresponding tocopherol standard (see Notes, 12).
3. The tocotrienol content of a sample can be estimated using the C and A values for the corresponding tocopherol (see Notes, 13).
4. Report as the final result the mean of the values obtained from the two determinations, provided the requirements noted in Precision, 2 are met. If the requirements for repeatability are not met, carry out a further two determinations on the test sample. If the range ($x_{max} - x_{min}$) of the four values obtained is $< 1.3 \times r$ (where r = the repeatability value; see Table 1), report as the final result the mean of the four values; otherwise report as the final result the median of the four values, i.e. the mean of the two intermediate values. Report the results for each tocopherol and tocotrienol to the nearest μg.

PRECISION

1. The results of an interlaboratory study organized at the international level gave the statistical results which are summarized in Table 1.
2. Repeatability—When the mean of the values obtained from two single determinations, carried out in rapid succession by the same operator using the same apparatus under the same conditions for the analysis of the same test sample, lies within the range of the mean values cited in Table 1, the difference between the two values obtained should not be greater than the repeatability value (r), which can generally be deduced by linear interpolation from Table 1.
3. Reproducibility—When the values for the final result, obtained by operators in different laboratories using different apparatus under different conditions from the analysis of the same laboratory sample, lie within the range of mean values cited in Table 1, the difference between the values for the final result obtained by those operators should not be greater than the reproducibility value (R) (see Notes, 14), which can generally be deduced by linear interpolation from Table 1.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 1
Statistical analysis of results for tocopherols and tocotrienols[a].

		Tocopherols			
		α-	β-	γ-	δ-
Soybean oil	no. of labs	17	16	17	16
	x, μg/g	69	17	508	263
	RSD_r, %	5	5	3	2
	RSD_R, %	25	31	7	17
Soybean oil–wheat germ oil (1 + 1)	no. of labs	15	16	16	14
	x, μg/g	69	217	225	130
	RSD_r, %	6	3	5	5
	RSD_R, %	19	26	24	20
Soybean oil–corn oil (1 + 1)	no. of labs	17	17	17	16
	x, μg/g	124	12	603	134
	RSD_r, %	6	7	3	3
	RSD_R, %	24	48	10	14
Margarine	no. of labs	10	–	10	10
	x, μg/g	9	–	17	67
	RSD_r, %	19	–	8	3
	RSD_R, %	23	–	20	10
		Tocotrienols			
		α-	β-	γ-	δ-
Refined palm oil	no. of labs	16	–	16	15
	x, μg/g	203	–	213	45
	RSD_r, %	7	–	6	8
	RSD_R, %	23	–	14	39

[a]IUPAC collaborative studies, 1985–1986 and 1986–1987 (References, 1). Statistical analysis according to ISO 5725-1986.

NOTES

Caution

Hexane is flammable and a dangerous fire risk. The TLV is 50 ppm in air. The Occupational Safety and Health Administration recommends that exposure not exceed 350 ng/M^3 for a time-weighted average. Hexane vapor causes lung irritation and produces neurotoxic effects. A fume hood should be used at all times when using hexane.

Ethanol and methanol are flammable. Use effective fume-removal device when heating or evaporating. Methanol is toxic. Avoid contact with eyes. Avoid breathing vapors. Use effective fume-removal device. Can react vigorously with sodium hydroxide + chloroform, potassium hydroxide + chloroform and perchloric acid.

Diethyl ether is highly flammable and is a severe fire and explosion hazard when exposed to heat or flame. It is a central nervous system depressant by inhalation and skin absorption. It will form explosive peroxides upon exposure to light. Handle empty containers, particularly those from which ether has evaporated, with extreme caution. Explosive limits in air are 1.85–48%. The TLV is 400 ppm in air. A fume hood should be used at all times when using diethyl ether.

NUMBERED NOTES

1. It is recommended that the unsaponifiable matter is obtained by a method involving a cold saponification procedure such as that described in Notes, 2. Particular attention must be paid to saponification temperature and time, otherwise low recoveries of tocopherols from tocopherol esters may be obtained.
2. Cold saponification procedure for samples containing added tocopherol esters—

Reagents

(a) Ethanol—approximately 96% pure (see Notes, *Caution*).
(b) Ethanol—absolute, 99% pure (see Notes, *Caution*).
(c) Pyrogallol.
(d) Potassium hydroxide solution—aqueous, 60% (m/m).
(e) Diethyl ether—peroxide-free, containing 0.1% (m/m) pyrogallol (see Notes, *Caution*).
(f) Hydrochloric acid—0.01 mol/L.
(g) Sodium sulphate—anhydrous.

Procedure

(a) Weigh accurately about 2 g of the prepared sample (see Sampling section) into a 100-mL flat-bottom flask, and thoroughly disperse the molten test portion in approximately 8 mL of ethanol [Notes, 2, Reagents, (a)] by gentle swirling. Add 100 mg of pyrogallol [Notes, 2, Reagents, (c)] and swirl to dissolve. Purge the flask with nitrogen, add 4 mL of potassium hydroxide solution [Notes, 2, Reagents (d)], repurge the flask with nitrogen and close with a glass stopper. Place the flask in a 26°C water bath and shake vigorously for 10 min. All operations must be performed in the absence of direct sunlight; use amber glassware or shield with aluminum foil.
(b) Add 50 mL of deionized water to the flask and transfer contents quantitatively to a 250-mL separating funnel. Wash the flask with 50 mL of diethyl ether [Notes, 2, Reagents, (e)] and transfer the washings to the funnel. Shake the separator vigorously for 1 min, releasing the pressure occasionally. Allow the layers to separate, and draw off the lower aqueous layer. Extract the aqueous layer an additional four times with 30-mL aliquots of diethyl ether and combine the ether extracts.
(c) Wash the combined diethyl ether extracts with 50 mL of water (shaking carefully to avoid emulsion formation) and then with 30 mL of dilute hydrochloric acid [Notes, 2, Reagents, (f)]. Add about 3 g of anhydrous sodium sulfate [Notes, 2, Reagents, (g)] with gentle mixing to absorb water. Filter the ether extracts through a phase-separating paper, and collect the filtrate in a round-bottom amber rotary evaporator flask.
(d) Remove the ether under reduced pressure, using a rotary film evaporator, at a temperature of not more than 40°C. If a liquid residue remains in the flask, add ethanol [Notes, 2, Reagents, (b)] and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

reevaporate to dryness. Wash the sides of the flask with hexane (Reagents, 5), transfer the contents quantitatively to a 50-mL volumetric flask and make up to volume. Make a suitable dilution of the prepared test solution (as described in Procedure, 4 in the main method), and proceed to Procedure, 5 (main method).

3. Suitable silica column packing materials are 5 μm LiChrosorb SI 60 or Spherisorb S5W.

4. β-, γ- and δ-Tocopherol standards can be obtained from Merck; α-tocopherol can be obtained from various suppliers. It has been reported that the purity of some commercially available tocopherol standards may vary between 85 and 100% (see References, 2). This confirms the importance of determining the concentration of prepared standard solutions by UV spectrometry.

5. The divisor factors quoted for the tocopherols are derived from their E-values (1%/1 cm) quoted in References, 3. For example the E value (1%/1 cm) of α-tocopherol is 76 at 292 nm (in methanol); therefore a 1 μg/mL solution of α-tocopherol will have an absorbance of 0.0076 at 292 nm.

6. Stock standard solutions can be satisfactorily stored in amber low-actinic glassware for up to a week if refrigerated. Working standard solutions must be prepared each working day. Protection from light is of the utmost importance.

7. If the HPLC column is new or of unknown history, wash and condition for about 10 min with methanol, then dichloromethane, followed by hexane at a flow rate of about 1 mL/min.

8. Mobile-phase flow rates in the range 0.7–1.5 mL/min have been found to be satisfactory. Higher flow-rates can result in poor chromatography, which must be avoided when UV detection is used.

9. The resolution factor (R) is calculated from:

$$R = \frac{(Rd_1) - (Rd_2)}{0.5\,(W_1 + W_2)}$$

Where—

Rd_1 = retention distance of γ-tocopherol
Rd_2 = retention distance of β-tocopherol
W_1 = width at base of γ-tocopherol peak
W_2 = width at base of β-tocopherol peak

It should be possible to achieve an efficiency of 10,000 plates/meter calculated on the δ-tocopherol peak. The efficiency (n), in plates/meter, may be calculated from:

$$n = 5.54\left(\frac{Rd_3}{w_h}\right)^2$$

Where—

Rd_3 = retention distance of δ-tocopherol
w_h = peak width at half height

10. When analyzing processed products such as margarines, and samples containing added tocopherol esters, a cold saponification procedure must be performed prior to chromatography.

Note—When samples contain tocopherol esters, parallel samples spiked with known amounts of α-tocopherol acetate should be analyzed to enable a check to be made on the recovery of tocopherols from tocopherol esters. The saponification procedure is described in Notes, 2.

11. If any tocopherol standards are not available, a blend of wheat germ and soybean oil can be used to obtain chromatograms that contain α-, γ- and δ-tocopherols. These can be used to assist peak identification in test sample chromatograms. Palm oil can be used to identify α- and γ-tocotrienols, if required. The following relative retention times have been found to be typical:

α-tocopherol = 1.0
β-tocopherol = 1.6
δ-tocopherol = 3.0
γ-tocopherol = 1.7

See Figure 1, showing the elution order of tocopherols and tocotrienols.

12. If fluorescence detection is used and the only standard available is α-tocopherol, relate all tocopherols to the α-tocopherol standard, but make this clear when reporting results. If UV detection is used, again relate all tocopherols to the α-tocopherol standard, but normalize the peak areas to α-tocopherol using the divisor values noted in the procedure for preparing standard stock solutions.

13. According to the literature, the fluorescence intensity of tocotrienols is the same as the corresponding tocopherol (References, 4), and the UV absorbencies are similar (References, 3).

14. It should be noted that the reproducibility values (R) cited in Table 1 apply in the particular case when the results of single determinations obtained by two laboratories are being compared. If, when following the method described, it is desired to compare the final results (which have been derived from the means of duplicate determinations) obtained by two laboratories,

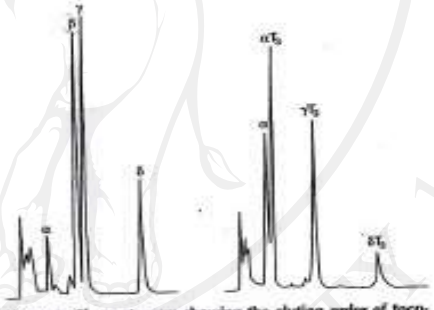


Figure 1. Chromatogram showing the elution order of tocopherols and tocotrienols (References, 6).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

วิธีการหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity)

ตามวิธีของ Brand-William *et al*., 1995

วิธีการเตรียมสาร

1. 0.4 mM Trolox (standard) ; Trolox MW = 250.29

ชั่งสาร 10.01 มิลลิกรัม (ควรบันทึกน้ำหนักที่แท้จริง) ละลายสารด้วยเอทานอล (100%) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น หลังจากเตรียมเสร็จแล้วแบ่งไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วแช่ไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียล สามารถเก็บไว้ได้นานหนึ่งเดือน

2. 0.8 mM DPPH (1,1-Dipheny-2-picylhydrazyl); MW = 395.326

ชั่งสาร 31.36 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล (100%) แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ควรเก็บไว้ในที่มืดและเย็น

3. Trizma buffer (0.25 mM, pH= 7.4)

ชั่งสาร Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.057 กรัม ผสมกับ potassium chloride 17.184 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 5N HCl ให้ได้ pH = 7.4 แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายที่เป็นส่วนผสมระหว่าง DPPH : Tris buffer : 85% EtOH (1:1:1) ให้พอกับปริมาณที่ใช้ (1.8 มิลลิลิตร ต่อ ตัวอย่าง)
2. เติมสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารมาตรฐาน หรือตัวอย่าง จะได้ปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 2.4 มิลลิลิตร
3. บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร โดยใช้ 50% EtOH เป็น blank
5. นำค่าที่ได้จากการวัดไปพล็อตกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณ

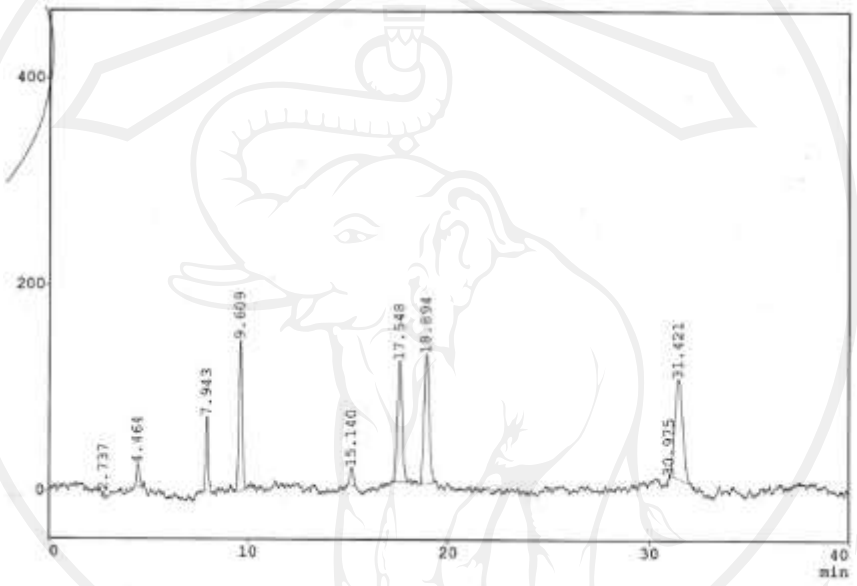
หมายเหตุ ควรเตรียมสารละลายในข้อ 1 หลังจากทำการเจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างลงในหลอดทดลองเรียบร้อยแล้ว เนื่องจาก DPPH จะมีความไวต่อแสงมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

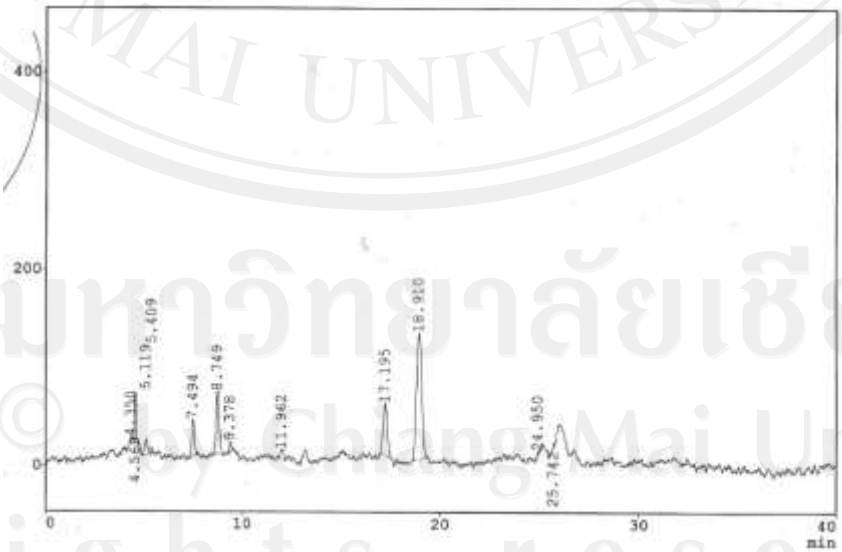
ภาคผนวก ฉ

กราฟปริมาณวิตามินอี

ภาพภาคผนวก 1 แสดงปริมาณวิตามินอีมาตรฐานในข้าวเหนียวก่ำ

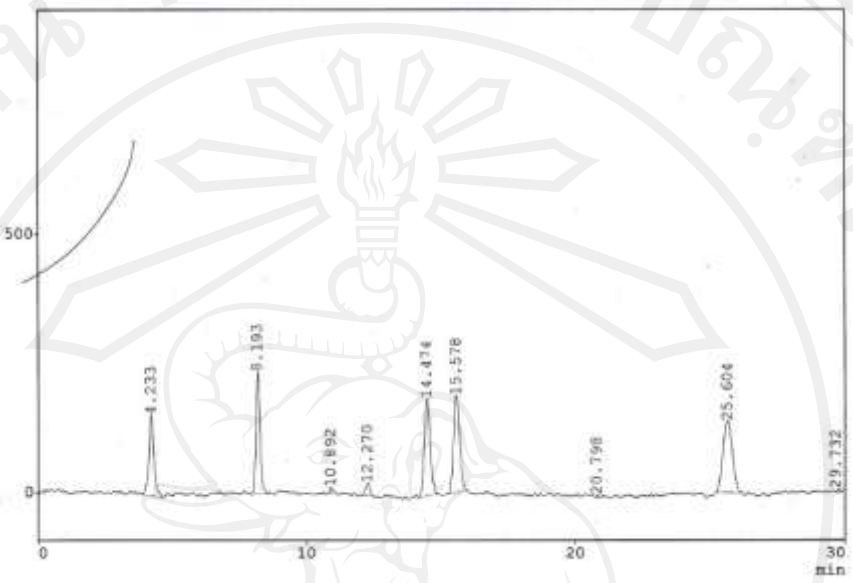


ภาพภาคผนวก 2 แสดงปริมาณวิตามินอี ในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

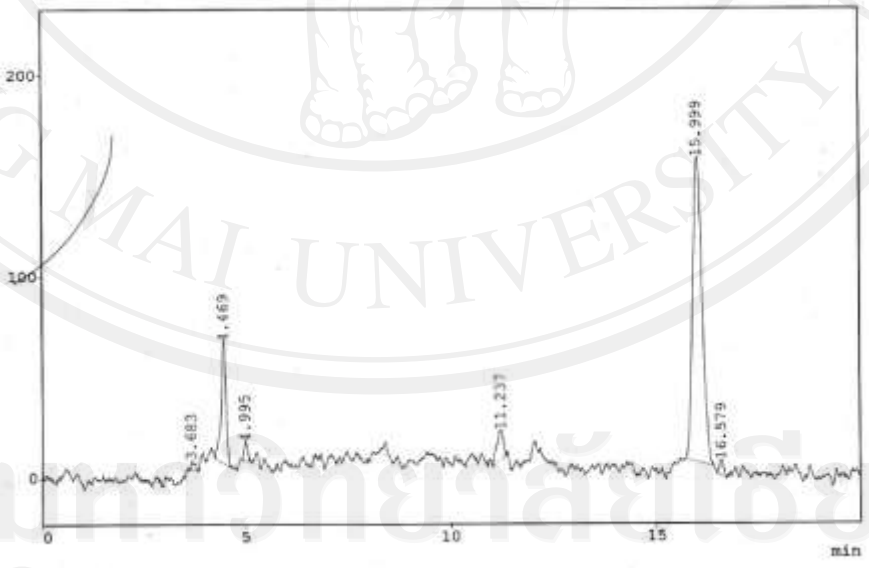


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพภาคผนวก 3 แสดงปริมาณวิตามินอีมาตรฐานในงาขี้ม้อน



ภาพภาคผนวก 4 แสดงปริมาณวิตามินอี ในเมล็ดงาขี้ม้อนพันธุ์นาน้อย 2



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวธิดารักษ์ แสงอรุณ

วัน เดือน ปีเกิด 09 สิงหาคม 2529

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนกาวิละวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2543

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนกาวิละวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2547

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2551

ทุนการศึกษา ทุนสนับสนุนการทำวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากหน่วยวิจัยข้าวก่ำ (Purple Rice Research Unit (PRRU) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทุนสนับสนุนประจำปี 2554 จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved