



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์

ภาคผนวก ก-1

การทำบริสุทธิ์วิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

ด้วยวิธี cold saponification (AOCS, 1997)

ขั้นตอนการทำ cold saponification มีขั้นตอน ดังนี้

(1) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่าง 2 g ใส่ลงใน flat-bottom flask ขนาด 100 mL แล้วละลายตัวอย่างนั้นด้วย ethanol 96% ปริมาตร 8 mL โดยการหมุนแกว่งเบาๆ จากนั้นเติม pyrogallol 100 mg และหมุนแกว่งเบาๆ ให้ละลาย แล้วพ่นแก๊สไนโตรเจน (N_2) เข้าไปแทนที่อากาศ จากนั้นเติมสารละลาย KOH 60% (w/w) 4 mL แล้วพ่นแก๊สไนโตรเจนไล่อากาศอีกครั้งก่อนปิดด้วยจุกแก้ว นำ flask ไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ $26^\circ C$ เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการเขย่าตลอดเวลา ซึ่งขั้นตอนต่างๆ จะต้องกระทำโดยไม่ให้ถูกแสงแดดโดยตรง อาจใช้ขวดสีชาหรือหุ้มด้วย aluminum foil

(2) เติม deionized water 50 mL และถ่ายตัวอย่างใส่ลงใน separating funnel ขนาด 250 mL ล้าง flask ด้วย diethyl ether 50 mL [Diethyl ether – peroxide free ที่เติม 0.1% (w/w) pyrogallol] เทใส่รวมกันใน separating funnel แล้วเขย่าสกัดเป็นเวลา 1 นาที ให้เปิดวาล์วไล่ความดันที่เกิดขึ้น ด้วย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น ไขเอาสารละลายส่วนล่าง (aqueous layer) ใส่ separating funnel อันใหม่ และสกัดซ้ำด้วย diethyl ether 30 mL อีก 4 ครั้ง แล้วจึงรวมส่วนของ ether extracts

(3) ล้างส่วนของ diethyl ether extracts ที่รวมได้ด้วย deionized water 50 mL (เขย่าด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันการเกิดอิมัลชัน) จากนั้นเติม hydrochloric acid 0.01 M 30 mL และเติม sodium sulphate anhydrous 3 g ผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อช่วยดูดซับน้ำ จากนั้นแยกส่วน diethyl ether ออกจากส่วนที่เป็นน้ำ เก็บสารที่ได้ใน round bottom flask สีชาที่ใช้สำหรับ rotary evaporator

(4) นำไประเหยไล่ diethyl ether ออกจากได้สภาวะลดความดันโดยใช้ rotary film evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน $40^\circ C$ และความดัน 330 mbar ถ้ายังมีส่วนของเหลวเหลืออยู่ใน round bottom flask ให้เติม ethanol 99% และนำไประเหยซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิไม่เกิน $40^\circ C$ และความดัน 72 mbar จากนั้นล้างส่วนที่เหลือด้วยอะซิโตนไตรล แล้วถ่ายสารละลายใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 mL พร้อมปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไตรล และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-20^\circ C$ ก่อนวิเคราะห์ความเข้มข้นของวิตามินอีเครื่อง HPLC

ภาคผนวก ก-2

การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-, แกมมา-, เดลตา-โทโคเฟอรอล

ด้วยเทคนิค RP- HPLC (Rangkadilok *et al*, 2010)

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีโดยใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Knauer : EZchrom Germany ใช้คอลัมน์ชนิด reversed C₁₈, YMC-Pack ODS-A, S-5 12 μ m, 12 nm, 50×4.6 mm โดยมีส่วนของ Guard column ชนิดเดียวกับคอลัมน์ และฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์แบบ Manual injection ตรวจวัดปริมาณสารตัวอย่างด้วย diode array detector (DAD- detector) $\lambda_{\max}$ 295 nm

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column type	: reversed C ₁₈ , YMC-Pack ODS-A, S-5 12 μ m, 12 nm, 50×4.6 mm
Mobile phase	: 5% น้ำปราศจากไอออน (ultrapure water) : 10% เมทานอล (methanol) : 85% อะซิโตนไทรล์ (acetonitrile)
Isocratic condition	: 5:10:85
Flow rate	: 1.0 mL/min
Detector	: diode array detector (DAD- detector) $\lambda_{\max}$ 295 nm
Injection volume	: 20 μ L
Analysis time	: 30 นาที
Column temperature	: 30°C
Calibration	: External standard calibration



ภาคผนวก ข

การคำนวณ

ภาคผนวก ข-1

ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH radical

ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH radical สามารถคำนวณโดยวิธีที่อ้างอิง จาก Kim (2005)

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1) / (A_0) \times 100]$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ของปฏิกิริยาควบคุม (สารละลาย blank ที่ไม่มีการเติมวิตามินอี)

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ของสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมวิตามินอี

ภาคผนวก ข-2

การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (%)

การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (%) สามารถคำนวณโดยวิธีที่อ้างอิง จาก Kim (2005)

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(A_1 / A_0) \times 100]$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm ของปฏิกิริยาควบคุม (สารละลาย blank ที่ไม่มีการเติมวิตามินอี)

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm ของสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมวิตามินอี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Tidarat Norsuwan

ตำแหน่งปัจจุบัน : พนักงานมหาวิทยาลัยสายวิชาการ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อ

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 202 ถ.โชตนา ต.ช้างเผือก อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50300

ประวัติการศึกษา

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ.2550

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ.2546