Research Article

Received: July 16, 2019; Accepted: November 8, 2019

# ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์อะไมโลส ในตัวอย่างข้าวเจ้าด้วยวิธีจับกับไอโอดีน

# Factors Affecting Amylose Analysis in Rice Samples by Iodine Binding Method

ชลธิดา ชลธิศชโลทร และนภา ตั้งเตรียมจิตมั่น*

*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

*ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131*

เบญจวรรณ ชิวปรีชา

*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

*ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131*

อรสา สุริยาพันธ์

*ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*

*แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหาคร 10400*

Chonthida Chonlathidchalotorn and Napa Tangtreamjitmun*

*Depatment of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University,*

*Long-Hard Bangsaen Road, Saensook, Muang, Chon Buri 20131*

Benchawan Chiwapreecha

*Biology Department, Faculty of Science, Burapha University,*

*Long-Hard Bangsaen Road, Saensuk, Mueng, Chonburi, 20131*

Orasa Suriyaphan

*Department of Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University,*

*Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok 10400*

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์อะไมโลสในข้าวเจ้าด้วยวิธีจับกับไอโอดีนเพื่อสร้างมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานระดับสากล ISO 6647: 2015 และวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง ข้าว เลขที่ มกษ. 4004-2560 ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ผลการศึกษาพบว่าปัจจัยหลักสำคัญที่ทำให้ผลการวิเคราะห์

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** napa@buu.ac.th

ปริมาณอะไมโลสมีความคลาดเคลื่อนสูงมาจากการใช้สารบริสุทธิ์อะไมโลสในการสร้างกราฟมาตรฐานแทนการใช้แป้งข้าวมาตรฐาน กราฟมาตรฐานที่เตรียมจากแป้งข้าวมาตรฐานมีสมการเส้นตรง y = 0.0161x - 0.0046 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ($R^2$) 0.9980 มีความเที่ยงภายในวัน 2.6 และ 1.7 %RSD (n = 5) ที่ปริมาณอะไมโลส 12 และ 29 % ตามลำดับ ส่วนความเที่ยงระหว่างวันมีค่า 5.3 และ 3.1 %RSD (n = 10) ที่ปริมาณอะไมโลส 12 และ 29 % ตามลำดับ เมื่อนำวิธีที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยสารมาตรฐานอ้างอิงแป้งข้าวเจ้า BCR-467 ปรากฏว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากนั้นได้นำวิธีนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณอะไมโลสในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 26 ตัวอย่าง

**คำสำคัญ :** อะไมโลส; ไอโอดีน; ข้าว

## Abstract

Factors affecting the error of amylose analysis in rice samples by iodine binding method were studied in order to establish a standard amylose analysis in rice samples for laboratories in Thailand. A comparison between an international standard method, ISO 6647: 2015 and rice department standard method, TAS 4004-2017 from the Ministry of Agriculture and Cooperatives (Thailand) was studied. The results showed that the main factor that caused large error in amylose analysis was the use of pure amylose standards instead of cultivated rice flour standards in constructing the calibration curve. The calibration curve constructed with cultivated rice flour standards was linearly followed the equation y = 0.0161x - 0.0046 with $R^2$ 0.9980. The precision within-day was 2.6 and 1.7 %RSD (n = 5) at amylose 12 and 29 %, respectively. The precision between-day was 5.3 and 3.1 %RSD (n = 10) at amylose 12 and 29 %, respectively. The accuracy of the method was validated with rice flour certified reference material BCR-467. The Student's t-test showed that there was no significant difference in the result at 95 % confidence level. This method was used to analyze amylose in 26 rice samples with various cultivars.

**Keywords:** amylose; iodine; rice

## 1. บทนำ

ข้าว (Oryza sativa L.) มีส่วนประกอบหลัก คือ สตาร์ช ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคทิน อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นของน้ำตาลกลูโคส โดยมีโมเลกุลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ $\alpha$-1,4 ไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ส่วนอะไมโลเพคทิน เป็นอะไมโลสที่มีพันธะกิ่งแยก ที่ตำแหน่ง $\alpha$-1,6 [1] ปริมาณอะไมโลสเป็นดัชนีที่บ่งชี้คุณภาพข้าว โดยข้าวต่างพันธุ์กันจะมีปริมาณอะไมโลสที่ต่างกัน การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสจึงมีความสำคัญ เพราะสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ของข้าว ซึ่งมีการจำแนกชนิดของข้าวตามปริมาณอะไมโลสเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ข้าวที่มีอะไมโลสต่ำ (< 20 %) เมื่อหุงสุกเนื้อจะนุ่มและเหนียว ข้าวที่มีอะไมโลสปานกลาง (21-25 %) และข้าวที่มีอะไมโลสที่สูง (26-33 %) เมื่อหุงสุกเนื้อจะค่อนข้างแข็งตามปริมาณอะไมโลสที่มากขึ้น [2]

McCready และ Hassid เป็นกลุ่มแรกที่เสนอวิธีหาปริมาณอะไมโลสด้วยการทำปฏิกิริยากับไอโอดีน ได้เป็นสารสีน้ำเงิน (iodine binding method) โดยใช้อะไมโลสบริสุทธิ์ผสมกับอะไมโลเพคทินบริสุทธิ์ในอัตราส่วนต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm [3] ต่อมาในปี ค.ศ. 1971 Juliano ได้ปรับปรุงวิธีเพื่อเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำของวิธี โดยปรับเปลี่ยนวิธีการเตรียมน้ำแป้งของปฏิกิริยาและใช้ความยาวคลื่นที่ 620 nm แต่ใช้เพียงสารมาตรฐานอะไมโลสในการสร้างกราฟมาตรฐาน [4] จากนั้นองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization, ISO) ได้เสนอวิธีการที่ Juliano ปรับปรุงขึ้นนี้เป็นวิธีมาตรฐาน ISO 6647 ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 และมีการพัฒนาวิธีมาตรฐานนี้เรื่อยมาจนถึงปี ค.ศ. 2015 ได้มีการรับรองวิธีมาตรฐานล่าสุดเป็น ISO 6647: 2015 ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนที่ 1 วิธีอ้างอิง (reference method) [5] เป็นวิธีหาปริมาณอะไมโลสในพันธุ์ข้าวเจ้าชนิดต่าง ๆ ของประเทศนั้น ๆ ด้วยเทคนิค size exclusion chromatography เพื่อนำมาทำเป็นแป้งข้าวมาตรฐานที่มีเปอร์เซ็นต์อะไมโลสต่าง ๆ กัน ส่วนที่ 2 วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง (routine method) [6] ซึ่งนำแป้งข้าวมาตรฐานที่ทราบค่าอะไมโลสด้วยวิธีอ้างอิงในส่วนที่ 1 มาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณอะไมโลสในข้าวเจ้าตัวอย่างที่ปลูกขึ้นเองในประเทศนั้น ๆ วิธีนี้ให้เลือกวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 หรือ 720 nm ถึงแม้จะมีวิธีมาตรฐานระดับสากล แต่เมื่อหน่วยงานเครือข่ายสากลเพื่อคุณภาพข้าว (International Network for Quality Rice, INQR) ได้ทดลองหาความเที่ยงโดยส่งตัวอย่างข้าว 17 พันธุ์ไปยังห้องปฏิบัติการทั่วโลกจำนวน 27 แห่ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสด้วยวิธี iodine binding method ที่ดำเนินเป็นประจำของแต่ละห้องปฏิบัติการ พบว่าปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ซ้ำในแต่ละห้องปฏิบัติการมีความเที่ยงสูง แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้ระหว่างห้องปฏิบัติการพบว่ามีค่าต่างกันกระจายออกไปมากสำหรับตัวอย่างเดียวกัน [7] นอกจากนี้สำหรับประเทศไทยจะมีวิธีวิเคราะห์ที่ระบุอยู่ในมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 4004-2560 จากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ [8] ที่ใช้อะไมโลสบริสุทธิ์ในการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส โดยการเกิดสีกับไอโอดีนที่ต่างจากวิธีมาตรฐานของ ISO 6647: 2015 จึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจและได้นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องไดโอดอาร์เรย์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (diode array spectrophotometer) รุ่น HP 8453 บริษัท Hewlett Packard ประเทศเยอรมนี เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น MS105DU บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ไมโครปิเปต (micropipette ) ขนาด 100-1000 µL และ 0.5-5 mL รุ่น Research® Plus บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมนี เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (hotplate stirrer) รุ่น C MAG HS7 จากบริษัท IKA ประเทศมาเลเซีย และแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) แบบแท่งทรงกระบอก ขนาด 10×6 mm และเครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น FiveEasy บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

สารมาตรฐานอ้างอิงแป้งข้าวเจ้า BCR-467 สถาบัน Institute for Reference Materials and Measurements ประเทศเบลเยียม สารมาตรฐานอะไมโลสจากมันฝรั่ง (amylose from potato: A0512.0005) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐ

อเมริกา และแป้งข้าวมาตรฐานที่มีปริมาณอะไมโลส 14.19, 18.70 และ 27.49 % จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี สารมาตรฐานเหล่านี้จะเก็บไว้ที่ -4 °C ในตู้เย็น และนำออกมาวางไว้ในเดซิเคเตอร์จนถึงอุณหภูมิห้องก่อนจะนำไปชั่ง

เอทานอล 95 % ($C_2H_6O$, 46.1 g/mol) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, 40 g/mol บริษัท Carlo Erba Reagents ประเทศอิตาลี ไอโอดีน ($I_2$, 253.8 g/mol) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI, 166 g/mol) กรดอะซิติก 100 % ($CH_3COOH$, 60.05 g/mol) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี สารเคมีทุกตัวเป็นเกรดวิเคราะห์

**2.2 การเตรียมน้ำแป้ง**

บดตัวอย่างข้าว 1 กรัม ด้วยโกร่งบดสารและร่อนผ่านตะแกรง 40 mesh ชั่งแป้งข้าวที่ได้ 0.02500 g ใส่บีกเกอร์ขนาด 10 mL เติม 95 % เอทานอล 0.25 mL เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 mol/L 2.25 mL ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน (≈ 16-24 h) จากนั้นเทใส่ขวดวัดปริมาตร 25 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

**2.3 การทำปฏิกิริยาเกิดสีกับไอโอดีน [6]**

เติมน้ำกลั่น 30 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL เติมกรดอะซิติก 1 mol/L 0.5 mL เติมสารละลายไอโอดีน (เตรียมจาก $I_2$ 0.2 g ผสม KI 2.0 g ในสารละลาย 100 mL) 1 mL และเติมสารละลายน้ำแป้ง (จากข้อ 2.2) 2.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 10 min แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไดโอดอาร์เรย์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 620 nm

**2.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานจากแป้งข้าวมาตรฐาน**

นำแป้งข้าวมาตรฐานที่มีปริมาณอะไมโลส 14.19, 18.70 และ 27.49 % มาชั่งโดยคำนวณน้ำหนักของข้าวที่ต้องชั่งเพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์ที่เป็นเลขลงตัว คือ ชั่งแป้งข้าวมาตรฐาน 14.19 % มา 0.01233 g จะได้อะไมโลส 7 % ชั่งแป้งข้าวมาตรฐาน 18.70 % มา 0.02005 g จะได้อะไมโลส 15 % ชั่งแป้งข้าวมาตรฐาน 27.49 % มา 0.02000 และ 0.02728 g จะได้อะไมโลส 22 และ 30 % ตามลำดับ นำไปเตรียมน้ำแป้งตามวิธีในข้อ 2.2 และทำให้เกิดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีในข้อ 2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างข้าว

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

**3.1 การเตรียมน้ำแป้ง**

3.1.1 การลดน้ำหนักแป้งในการเตรียมน้ำแป้ง

เนื่องจากน้ำหนักแป้งที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสตามวิธีมาตรฐาน ISO 6647: 2015 และ มกษ. 4004-2560 คือ 0.1 g เตรียมเป็นน้ำแป้ง 100 mL แต่นำไปใช้เพียง 5 mL ในการทำให้เกิดสี ดังนั้นเพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีและลดของเสียที่เกิดจากการวิเคราะห์ จึงได้ศึกษาการลดปริมาตรน้ำแป้งที่เตรียมจาก 100 เป็น 25 mL โดยลดน้ำหนักแป้ง สารเคมีและน้ำที่ใช้เตรียมเพื่อรักษาความเข้มข้นของน้ำแป้งไว้เท่าเดิม โดยการใช้เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ชั่งแป้งข้าวมาตรฐานและตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เตรียม 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ชั่ง 0.10000 g เตรียมเป็นน้ำแป้ง 100 mL และชุดที่ 2 ชั่ง 0.02500 g เตรียมเป็นน้ำแป้ง 25 mL นำไปเตรียมตามวิธีในข้อ 2.2-2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ได้ข้อมูลดังในตารางที่ 1

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแป้งข้าว 5 ตัวอย่าง มาคำนวณปริมาณอะไมโลสจากกราฟมาตรฐานของแต่ละชุด ได้ผลดังในตารางที่ 2

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ paired t-test พบว่า p-value (two tail) = 0.13 ซึ่งมากกว่า $\alpha$ (0.05) แสดงว่าปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้แป้งข้าวน้ำหนักต่างกันในการเตรียมน้ำแป้งที่ความเข้มข้นเดียวกัน

**Table 1** Calibration curve equation preparing from different weights of starch

| Set | Starch (g) | Regression equations | $R^2$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.10000 | y = 0.0162x - 0.0099 | 0.9998 |
| 2 | 0.02500 | y = 0.0161x - 0.0046 | 0.9980 |

**Table 2** Determined amylose content in samples using different weights of starch

| No. | Amylose (%) | |
|---|---|---|
| | Starch 0.02500 g | Starch 0.10000 g |
| 5 | 12.48 | 12.22 |
| 10 | 23.24 | 23.89 |
| 23 | 26.31 | 27.25 |
| 24 | 27.96 | 28.42 |
| 25 | 20.14 | 20.33 |

งานวิจัยนี้จึงเลือกเตรียมน้ำแป้งโดยชั่งแป้ง 0.02500 g เตรียมเป็นน้ำแป้ง 25 mL โดยมีเงื่อนไขว่าต้องบดข้าวให้เป็นแป้งที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด เนื่องจากการใช้แป้งข้าวมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐาน ปริมาณอะไมโลสที่ได้จากการชั่งแป้งข้าวแต่ละครั้งอาจต่างกันได้ ถ้าแป้งข้าวมาตรฐานไม่มีความเป็นเนื้อเดียวเพียงพอ ถึงแม้จะชั่งแป้งข้าวมาเท่ากัน แต่อาจได้อะไมโลสมาไม่เท่ากัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างจากการใช้สารอะไมโลสบริสุทธิ์มาเตรียมกราฟมาตรฐาน ดังจะเห็นได้จากข้อกำหนดของสารมาตรฐานอ้างอิงแป้งข้าวเจ้า BCR-467 ที่ใช้สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ระบุว่าปริมาณน้อยที่สุดในการใช้งานสารมาตรฐานอ้างอิงแป้งข้าวเจ้านี้คือ 0.1000 g ประโยชน์ของการสามารถใช้น้ำหนักข้าวปริมาณน้อยในการวิเคราะห์อะไมโลส จะเห็นได้ชัดในกรณีการศึกษาพันธุ์ข้าวที่มีตัวอย่างข้าวจำนวนน้อย [9]

3.1.2 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมน้ำแป้ง

เมื่อนำแป้งข้าวมาตรฐานและตัวอย่างข้าว 5 ตัวอย่าง ไปเตรียมน้ำแป้งตามข้อ 2.2 โดยทดลอง 2 ชุด ชุดที่ 1 ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนตามข้อ 2.2 ไม่

**Table 3** Calibration curve equations from starch dispersion preparing in different conditions

| Set | Conditions | NaOH (mol/L) | Regression equations | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Stand overnight | 2 | y = 0.0161x - 0.0046 | 0.9980 |
| 2 | Stir 10 min at 80°C | 1 | y = 0.0163x + 0.0060 | 0.9996 |

**Table 4** Determined amylose content in samples using different conditions in starch dispersion

| No. | Amylose (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 23 | 24 | 25 |
| Stand overnight | 12.48 | 23.24 | 26.31 | 27.96 | 20.14 |
| Stir 10 min at 80 °C | 12.61 | 22.22 | 27.55 | 27.48 | 18.42 |

เปลี่ยนแปลงสภาวะ ส่วนชุดที่ 2 เปลี่ยนเป็นใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 mol/L และกวนด้วย magnetic bar พร้อมทั้งให้ความร้อน 80 °C ใน heating block ที่วางบน hotplate stirrer เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำแป้งทั้ง 2 ชุด มาทำให้เกิดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีในข้อ 2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงของแป้งข้าวมาตรฐานทั้ง 2 ชุด ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ได้ข้อมูลดังในตารางที่ 3

จากนั้นจึงใช้สมการกราฟมาตรฐานของแต่ละชุดคำนวณหาค่าอะไมโลสในตัวอย่างข้าวแต่ละชุด ได้ผลดังในตารางที่ 4 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ paired t-test พบว่า p-value (two tail) = 0.50 ซึ่งมากกว่า $\alpha$ (0.05) แสดงว่าปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้สภาวะในการเตรียมน้ำแป้งต่างกัน

การเตรียมน้ำแป้งด้วยวิธีทิ้งค้างคืนนี้ใช้เวลาเป็นตัวช่วยในการทำให้แป้งแตกตัว แต่การกวนใช้เวลาสั้นทำให้การเตรียมน้ำแป้งทำได้รวดเร็วโดยใช้การกวนและความร้อนช่วยให้แป้งแตกตัว แต่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 mol/L ซึ่งความเข้มข้นต่ำกว่าแบบทิ้งค้างคืน วิธีทิ้งค้างคืนนับว่าสะดวก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์มากทำให้ประหยัดต้นทุนและเวลา แต่ต้องมีการวางแผนการวิเคราะห์ล่วงหน้า เพราะจะได้ผลวิเคราะห์ในวันถัดไป ส่วนวิธีกวนพร้อมทั้งให้ความร้อนใช้อุปกรณ์มากกว่า โดยเฉพาะการให้ความร้อนด้วย heating block ที่วางบนเครื่อง hotplate stirrer พร้อมทั้งกวนด้วย ทำให้ผลวิเคราะห์ที่ได้สามารถทำซ้ำได้ดีกว่าการให้ความร้อนด้วย water bath โดยไม่มีการกวน (เป็นวิธีตาม ISO 6647: 2015) หรือการกวนอย่างเดียวโดยไม่ให้ความร้อน (เป็นวิธีตาม มกษ. 4004-2560) สภาวะการเตรียมน้ำแป้งทั้ง 2 วิธี ที่ทดลองในงานวิจัยนี้ไม่มีปัญหาแม้กับแป้งที่ได้จากการใช้โกร่งบดสารบดเม็ดข้าวด้วยมือ เพราะขนาดอนุภาคของแป้งที่ได้จะค่อนข้างใหญ่ ประมาณ 420 µm (40 mesh) แต่เมื่อเตรียมด้วยสองวิธีนี้จะได้น้ำแป้งที่เป็นเนื้อเดียวไม่มีเศษอนุภาคของแป้งหลงเหลืออยู่ ต่างจากการกวนอย่างเดียวหรือให้ความร้อนอย่างเดียว ที่บางครั้งพบว่ามีเศษอนุภาคแขวนลอยเหลืออยู่ จึงทำให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อนต่างกันออกไปในแต่ละครั้ง ขนาดของแป้งตามวิธีมาตรฐาน ISO 6647: 2015 และ มกษ. 4004-2560 ซึ่งระบุให้บดข้าวด้วยเครื่องบด คือ 150-180 µm (100-80 mesh) นับว่ามีความสำคัญมาก ถ้าขนาดของแป้งไม่ได้ตามนี้ วิธีเตรียมน้ำแป้งที่ศึกษาทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้น้ำแป้งที่เป็นเนื้อเดียวกัน และวิเคราะห์ซ้ำได้

ดังนั้นเพื่อความสะดวกในงานวิจัยนี้จึงเลือกเตรียมน้ำแป้ง ทิ้งค้างคืนไว้ และนำมาทำให้เกิดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงในวันถัดไป ทำให้สามารถวิเคราะห์อะไมโลสได้ทีละหลายตัวอย่างพร้อมกันเป็นจำนวนมากกว่าการเลือกใช้การกวน 10 นาที ที่ 80 °C ในการเตรียมน้ำแป้ง เนื่องจากเครื่อง hotplate stirrer มีราคาสูง จึงมีจำนวนจำกัด ทำให้เสียเวลาในการรอ แต่ถ้าเตรียมเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืนจะประหยัดเวลากว่ามาก รวมทั้งลดต้นทุนการวิเคราะห์ในการซื้อเครื่องบดข้าว

**3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไอโอดีน**

ขั้นตอนนี้ศึกษาปัจจัย 2 อย่าง คือ

3.2.1 ปริมาตรกรดอะซิติก

เนื่องจากวิธีมาตรฐาน ISO 6647: 2015 และ มกษ. 4004-2560 มีการเติมกรดอะซิติก 1 mol/L ปริมาตรที่ต่างกันถึง 2 เท่า ในการทำให้เกิดสีของอะไมโลสกับไอโอดีน จึงศึกษาปริมาตรกรดอะซิติกที่เหมาะสม โดยใช้แป้งข้าวมาตรฐานที่มีอะไมโลส 27.49 % เตรียมเป็นน้ำแป้งตามวิธีข้อ 2.2 และทำปฏิกิริยากับไอโอดีนตามวิธีในข้อ 2.3 โดยเตรียม

ทั้งหมด 10 ชุด ซึ่งเติมกรดอะซิติก 1 mol/L ปริมาตรต่าง ๆ กัน นำไปวัด pH และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ได้ความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 1

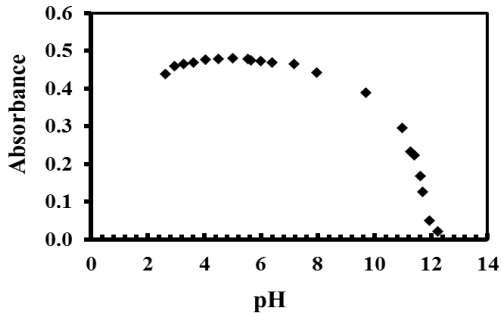


**Figure 1** Effect of pH on absorbance of amylose-iodine complex

รูปที่ 1 พบว่าช่วง pH ที่เหมาะสมในการเกิดสารเชิงซ้อนของอะไมโลสกับไอโอดีน คือ 4.0-5.5 ซึ่งเท่ากับกรดอะซิติก 1 mol/L ปริมาตร 0.5-2.0 mL เป็นปริมาตรกรดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เนื่องจากน้ำแป้งถูกเตรียมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นกรดอะซิติกส่วนหนึ่งจึงใช้ในการสะเทินเบสของน้ำแป้งก่อนที่จะไปปรับ pH ของสารละลายให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไอโอดีน ดังนั้นหากปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำแป้งต่างกัน ปริมาณกรดอะซิติกที่ใช้ก็จะต่างกันด้วย และช่วงpH ที่เหมาะสมของการเกิดสารเชิงซ้อนที่ค่อนข้างกว้าง ทำให้สามารถใช้ปริมาตรกรดต่างกันได้มากถึง 4 เท่า เพื่อเป็นการประหยัดสารงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรกรดอะซิติก 0.5 mL อย่างไรก็ตาม เนื่องจากกรดอะซิติกเป็นกรดที่มีความดันไอสูง จึงกลายเป็นไอหลุดออกมาจากสารละลายได้ถ้าปิดฝาภาชนะไม่แน่นพอ หรือเวลาใช้มีการเทมาใส่ในบีกเกอร์ที่ไม่มีฝาปิด ดังนั้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกจึงมีโอกาสที่จะเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา จึงควรเช็ค pH ของสารละลายที่เกิดสีเป็นครั้งคราว เพื่อให้มั่นใจว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสม

3.2.2 ปริมาตรของสารละลายไอโอดีน

เมื่ออะไมโลสในน้ำแป้งทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน แต่สารละลายไอโอดีนเองมีสีเหลือง ดังนั้นสีของสารละลายที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาจึงมีสีน้ำเงินออกเขียวหรือสีเขียวคล้ำ ๆ ถ้าสารละลายมีไอโอดีนมากเกินไปจะบดบังสีของผลิตภัณฑ์ ทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงเกิดความคลาดเคลื่อนได้ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารละลายไอโอดีนที่ใช้ โดยใช้แป้งข้าวมาตรฐานที่มีปริมาณอะไมโลส 27.49 % นำไปเตรียมน้ำแป้งตามวิธีในข้อ 2.2 และทำให้เกิดสีตามวิธีในข้อ 2.3 แต่เติมสารละลายไอโอดีนปริมาตรต่าง ๆ กัน คือ 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 mL ตามลำดับ โดยมีการเตรียม

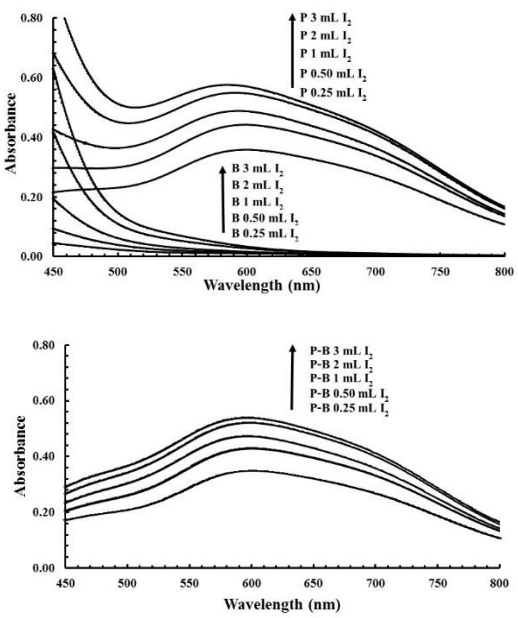


**Figure 2** Effect of iodine volume on absorbance of amylose-iodine complex (P) and blank (B) solution

สารละลายแบลงค์ของสารละลายไอโอดีนแต่ละปริมาตรด้วย เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์และผลิตภัณฑ์ดังในรูปที่ 2 (บน) เมื่อนำสเปกตรัมของแบลงค์ลบออกจากผลิตภัณฑ์จะได้รูปที่ 2 (ล่าง)

รูปที่ 2 พบว่าที่ความยาวคลื่น 620 nm สัญญาณการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์มีค่าต่ำมาก แต่ก็มีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาตรของไอโอดีน ดังนั้นในการวิเคราะห์อะไมโลสโดยการเกิดสีกับไอโอดีนนี้ ไม่ควรใช้ปริมาตรของไอโอดีนที่มากเกินไป สัญญาณการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่หักลบสารละลายแบลงค์แล้ว จะมีลักษณะค่อนข้างสมมาตร และจะเห็นว่าค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงได้สูงสุด หรือค่า $\lambda_{max}$ จะอยู่ที่บริเวณ 600 มากกว่า 620 nm อันเนื่องมาจากการรบกวนของอะไมโลเพคทินที่เกิดสีกับไอโอดีนได้สารเชิงซ้อนมีค่า $\lambda_{max}$ อยู่ที่ 550 nm [10] ส่วนสารเชิงซ้อนของอะไมโลสและไอโอดีนจะมีค่า $\lambda_{max}$ อยู่ที่ 620 nm ดังในรูปที่ 3 นอกจากนี้ในรูปที่ 2 จะเห็นว่าสเปกตรัมที่เติมสารละลายไอโอดีน 2 และ 3 mL สัญญาณมีค่าใกล้เคียงกันมาก ส่วนสเปกตรัมเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2 mL มีค่าเพิ่มขึ้นเพียง 15 % เช่นเดียวกับการเติมสารละลายไอโอดีนเพิ่มขึ้นจาก 0.5 เป็น 1 mL เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรไอโอดีนที่เติมเพิ่มไปถึงหนึ่งเท่าตัว ดังนั้นจึงเลือกเติมสารละลายไอโอดีน 1 mL ซึ่งมีปริมาตรเท่ากับที่ใช้กันในวิธีมาตรฐาน ISO 6647: 2015 และ มกษ. 4004-2560 โดยความเข้มข้นของไอโอดีนจะเท่ากัน คือ $8.6 \times 10^{-3}$ mol/L และเป็นการเตรียมไอโอดีนในสารละลาย KI เพื่อทำให้เกิดเป็นสารละลายไตรไอโอไดด์ ($I_3^-$) ที่ละลายน้ำได้ดี

**3.3 สารมาตรฐานที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐาน**

ในวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะไมโลสตามวิธีมาตรฐานของ ISO 6647:2015 และ มกษ. 4004-2560 มีการใช้สารมาตรฐานในการสร้างกราฟต่างกัน โดยที่ ISO สร้างกราฟมาตรฐานจากแป้งข้าวมาตรฐาน แต่กรมการข้าวสร้างกราฟมาตรฐานจากอะไมโลสบริสุทธิ์ งานวิจัยนี้จึงได้สร้างกราฟมาตรฐานทั้ง 2 แบบ เพื่อเปรียบเทียบกัน

3.3.1 กราฟมาตรฐานจากอะไมโลสบริสุทธิ์

ชั่งอะไมโลส 0.04000 g เตรียมเป็นปริมาตร 100 mL ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยเพิ่มปริมาตรของสารเคมีตามสัดส่วน จากนั้นนำมาทำให้เกิดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีในข้อ 2.3 แต่จะมีการเติมสารละลายอะไมโลส 0.5, 1, 2, 3 และ 4 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของอะไมโลสเป็น 4, 8, 16, 24 และ 32 % ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สเปกตรัมการดูดกลืนแสง มีค่า $\lambda_{max}$ ที่ 620 nm (รูปที่ 3 ซ้าย) เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm มาสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าได้สมการเส้นตรง $y = 0.0131x + 0.0034$ และและมี $R^2$ 0.9997 (รูปที่ 3 ขวา)

รูปที่ 4 (ซ้าย) พบว่าค่า $\lambda_{max}$ จะไม่เท่ากันที่แต่ละความเข้มข้นของอะไมโลส โดยเคลื่อนจาก 560 ไปที่ 600 nm เมื่อเปอร์เซ็นต์ของอะไมโลสเพิ่มขึ้น อันเนื่องจากในแป้งข้าวมีทั้งอะไมโลสและอะไมโลแพคทิน ซึ่งสามารถเกิดสีกับไอโอดีนและให้สัญญาณทั้งคู่ โดยที่อะไมโลแพคทินให้ค่า $\lambda_{max}$ 550 nm [10] ส่วนอะไมโลสให้ค่า $\lambda_{max}$ ที่ 620 nm (รูปที่ 3 ซ้าย) สเปกตรัมที่ได้จึงเป็นค่าการดูดกลืนแสงรวมของสาร 2 ตัวนี้ แป้งข้าวที่มีเปอร์เซ็นต์อะไมโลสต่ำจะมีอะไมโลเพคทินสูง ค่า $\lambda_{max}$ จึงเลื่อนไปทางซ้าย ดังจะเห็นได้จากสเปกตรัมของแป้งข้าวที่ 7 และ 15 % ส่วนแป้งข้าวที่ 22 และ 30 % เตรียมมาจากแป้งข้าวมาตรฐานตัวเดียวกัน คือ 27.49 % จะมีค่า $\lambda_{max}$ ที่

เท่ากัน คือ ประมาณที่ 600 nm ดังนั้นกราฟมาตรฐานที่ใช้แป้งข้าวมาตรฐานนี้จึงเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ซึ่งเป็นค่า $\lambda_{max}$ ของอะไมโลสกับไอโอดีน แม้จะไม่ใช่จุดที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสเปกตรัมแป้งข้าวมาตรฐานก็ตาม เพราะที่ความยาวคลื่นนี้ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับเปอร์เซ็นต์อะไมโลส ดังจะเห็นได้จากเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ไปพลอตกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4 ขวา) จะได้สมการเส้นตรง y = 0.0163x - 0.0044 และมี $R^2$ 0.999

เมื่อเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานทั้งสองแบบ จะเห็นว่ากราฟมาตรฐานจากอะไมโลสบริสุทธิ์ให้ค่าความชันต่ำกว่ากราฟมาตรฐานจากแป้งข้าว เนื่องจากในตัวอย่างข้าวมีอะไมโลเพคทินด้วย ดังนั้นถ้าใช้กราฟมาตรฐานที่เตรียมจากอะไมโลสบริสุทธิ์ไปหาปริมาณอะไมโลสในข้าวตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยไม่ได้กำจัดอะไมโลเพคทินออก ค่าอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้จะมากกว่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากแป้งข้าวประมาณ 21 % ดังแสดงในตารางที่ 5 การใช้กราฟมาตรฐานจากแป้งข้าวซึ่งมีองค์ประกอบเหมือนกับตัวอย่างข้าวที่จะวิเคราะห์ ผลที่ได้จึงมีความถูกต้องมากกว่า ซึ่งงานวิจัยในระยะหลังส่วนใหญ่ที่พบก็ใช้แป้งข้าวมาตรฐานจากกรมข้าวของประเทศนั้น ๆ ในการสร้างกราฟมาตรฐานเช่นกัน [11,12]

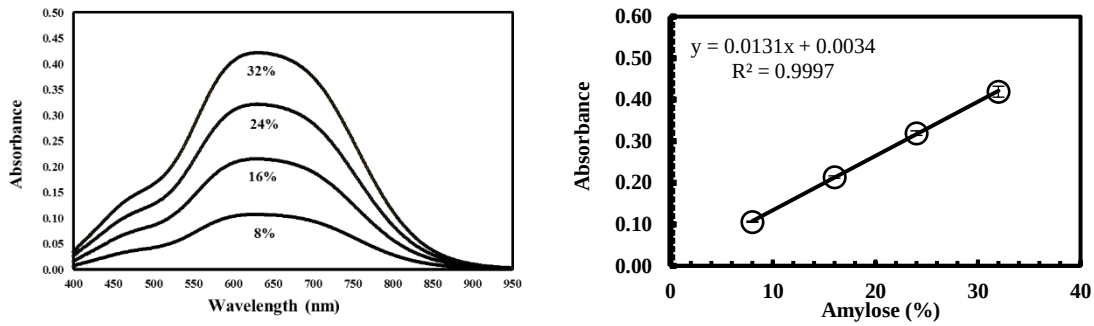


**Figure 3** Calibration spectrum (left) and curve (right) of iodine binding method using pure amylose standard

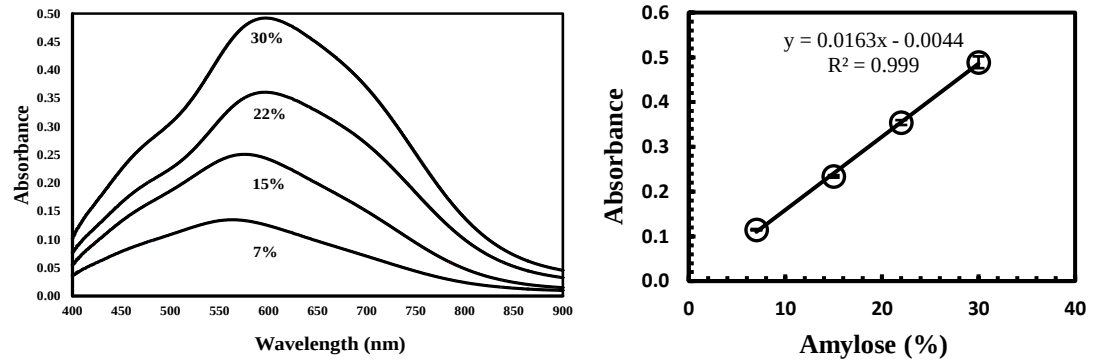


**Figure 4** Calibration spectrum (left) and curve (right) of iodine binding method using rice starch standard

**Table 5** Difference of amylose contents in rice samples determined with different calibration curves

| No. | Amylose (%, n = 3) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 23 | 24 | 25 |
| Pure amylose standard | 14.93 | 28.32 | 32.14 | 34.19 | 24.46 |
| Rice starch standard | 12.48 | 23.24 | 26.31 | 27.96 | 20.14 |
| Difference (%) | 19.7 | 21.9 | 22.2 | 22.3 | 21.5 |

**Table 6** Five days duplicate determination of amylose content in rice samples for precision analysis

| Day | Amylose set 1 (%) | | Amylose set 2 (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | Replicate 1 1 | Replicate 2 | Replicate 1 | Replicate 2 |
| 1 | 12.21 | 12.63 | 29.00 | 29.92 |
| 2 | 10.92 | 11.53 | 29.06 | 28.65 |
| 3 | 12.24 | 12.32 | 29.80 | 29.20 |
| 4 | 12.68 | 13.06 | 29.78 | 29.38 |
| 5 | 12.40 | 11.84 | 27.16 | 28.11 |

**3.4 ความถูกต้อง (accuracy ) และความเที่ยง (precision) ของวิธี**

ความถูกต้องของวิธีตรวจสอบโดยวิเคราะห์อะไมโลสในสารมาตรฐานอ้างอิงแป้งข้าวเจ้า BCR-467 โดยทำ 2 ชุด พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าจริง (27.7 %) เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ t-test โปรแกรม Minitab 17 ได้ค่า p-value = 0.268 และ 0.587 ซึ่งมากกว่า $\alpha$ (0.05) จึงสรุปได้ว่าวิธีการนี้มีความถูกต้องสูง

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีทำโดยชั่งตัวอย่างข้าว 5 ตัวอย่าง ที่มีอะไมโลสใกล้เคียงกัน 2 ชุด คือ ชุดที่มีความเข้มข้นต่ำ ≈12 % (ชุดที่1) และชุดที่มีความเข้มข้นสูง ≈29 % (ชุดที่2) ทุกชุดปิเปตมาตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ไปเตรียมน้ำแป้งตามวิธีในข้อ 2.2 และทำให้เกิดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงสร้างกราฟมาตรฐานตามวิธีในข้อ 2.4 คำนวณหาปริมาณอะไมโลสได้ผลดังในตารางที่ 6

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 6 มาวิเคราะห์ด้วยสถิติ single ANOVA ด้วยโปรแกรม Excel ได้ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มและความแปรปรวนในกลุ่มของแต่ละชุดดังในตารางที่ 7 เมื่อนำมาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จะได้ค่าความเที่ยงภายในวันเท่ากับ 2.6 และ 1.7 %RSD (n = 5) ที่อะไมโลส 12 และ 29 % ตามลำดับ ส่วนความเที่ยงระหว่างวันมีค่า 5.3 และ 3.1 %RSD (n = 10) ที่อะไมโลส 12 และ 29 % ตามลำดับ

**3.5 ปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างข้าว**

ข้าวเจ้า 22 ตัวอย่าง และข้าวเหนียว 4 ตัวอย่าง เป็นข้าวที่ปลูกปี พ.ศ. 2558-2559 โดยหมายเลข 1-5 นำมาจากจากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม หมายเลข 6-13 มาจากคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

**Table 7** Statistical results of single ANOVA for precision analysis

| ANOVA of set 1 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sources of variation | SS | df | MS | F | p-values | $F_{crit}$ |
| Between groups | 2.92 | 4 | 0.73 | 7.17 | 0.03 | 5.19 |
| Within groups | 0.51 | 5 | 0.10 | | | |
| Total | 3.43 | 9 | | | | |
| ANOVA of set 2 | | | | | | |
| Source of variation | SS | df | MS | F | p-value | $F_{crit}$ |
| Between groups | 5.39 | 4 | 1.35 | 5.53 | 0.04 | 5.19 |
| Within groups | 1.22 | 5 | 0.24 | | | |
| Total | 6.61 | 9 | | | | |

**Table 8** Determined amylose content in rice samples with various cultivars (n = 3)

| No. | Rice cultivars | Amylose (%) | No. | Rice cultivars | Amylose (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1, 5 | Riceberry (chemical) | 12.6, 13.3 | 18 | Jow Hawm Suphan Buri | 14.9 |
| 2-4 | Riceberry (organic) | 11.8-12.0 | 19 | Khao Gong | 14.4 |
| 6 | RD60 | 14.2 | 20 | Khao Hawm Mali | 15.9 |
| 7 | Mali Dum | 12.9 | 21 | Khao Mun Poo | 13.7 |
| 8 | Jow Hawm Dong | 7.4 | 22 | Khao Dang | 28.1 |
| 9 | Jow Dang | 19.9 | 23, 24 | Khao Sao Hai | 26.2, 29.9 |
| 16 | RD41 | 20.4 | 25, 26 | Khao Hawm Pratum | 19.1, 20.7 |
| 17 | RD43 | 15.9 | | | |

วิทยาเขตสามพร้าว อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี หมายเลข 14-18 จากศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี ตำบลรั้วใหญ่ อำเภอเมืองสุพรรณบุรี จังหวัดสุพรรณบุรี หมายเลข 19-26 จากร้านค้าในจังหวัดชลบุรีและกรุงเทพมหา นคร นำข้าวทั้งหมดมาเตรียมเป็นน้ำแป้งและวิเคราะห์อะไมโลส โดยเปรียบเทียบหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานแป้งข้าว จะพบว่าข้าวตัวอย่างส่วนใหญ่มีอะไมโลสต่ำกว่า 20 % ราย ละเอียดดังในตารางที่ 8

## 4. สรุป

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสโดยไม่ได้กำจัดอะไมโลเพคทินออกจากตัวอย่าง มีความคลาดเคลื่อนสูงมาจากการใช้สารบริสุทธิ์อะไมโลสในการสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าการใช้แป้งข้าวมาตรฐานประมาณ 21 % นอกจากนี้ยังมีสาเหตุย่อย ๆ หลายประการที่อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ เช่น การใช้ $\lambda_{max}$ ที่ 620nm ซึ่งอยู่ในช่วงที่ลาดเอียงของสเปกตรัม จึงทำให้

เกิดความคลาดเคลื่อนในการอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้มากกว่าปกติที่ใช้ $\lambda_{max}$ ที่เป็นจุดสูงสุดของสเปกตรัมซึ่งจะอยู่บริเวณแนวราบของยอดพีค กรดอะซิติก และสารละลายไอโอดีนเป็นสารที่ไม่อยู่ตัว ดังนั้นถ้าเตรียมไว้แล้วใช้นานเกินไป ความเข้มข้นอาจลดลงทำให้ผลวิเคราะห์ผิดพลาดได้ การวิเคราะห์อะไมโลสด้วยวิธีจับกับไอโอดีนนี้มีการรบกวนจากอะไมโลแพคทินด้วย จึงได้มีการเรียกปริมาณอะไมโลสที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้ว่า apparent amylose ซึ่งจัดเป็นการวิเคราะห์แบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) จึงมีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนได้เช่นกัน [12] ดังนั้นมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสในข้าว คือ ควรใช้กราฟมาตรฐานที่เตรียมจากแป้งข้าวมาตรฐานที่เป็นข้าวชนิดเดียวกับข้าวตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ใช้ $\lambda_{max}$ที่ 620 nm และใช้กรดอะซิติกและสารละลายไอโอดีนที่เตรียมไว้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ เตรียมน้ำแป้งด้วยวิธีทิ้งค้างคืน หรือถ้าต้องการความรวดเร็วให้เตรียมด้วยการกวนพร้อมทั้งให้ความร้อนด้วย เพื่อลดปัญหาการเหลือเศษอนุภาคของแป้งข้าวที่อาจบดไม่ละเอียด (ใหญ่กว่า 150-180 µm) ตกค้างอยู่ในน้ำแป้ง

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 58/2561

## 6. References

[1] Tester, R.F., Karkalas, J., and Qi, X., 2004, Starch-composition, fine structure and architecture, J. Cereal Sci. 39: 151-165.

[2] Suwannaporn, P., Pitiphunpong, S. and Champangern, S., 2007, Classification of rice amylose content by discriminant analysis of physicochemical properties, Starch Stärke 59: 171-177.

[3] McCready, R.M. and Hassid, W.Z., 1943, The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch, J. Am. Chem. Soc. 65: 1154-1157.

[4] Juliano, B.O., 1971, A simplified assay for milled rice amylose, Cerel Sci. Today 16: 334-340.

[5] International Organization for Standardization (ISO), 2015, International Standard ISO/IEC 6647-1: 2015(E)- Rice- Determination of Amylose Content, Part 1: Reference Method, 2nd Ed., Geneva.

[6] International Organization for Standardization (ISO), 2015, International Standard ISO/IEC 6647-1: 2015(E)-Rice-Determination of Amylose Content, Part 2: Routine Method, 2nd Ed., Geneva.

[7] Fitzgerald, M.A., Bergman, C.J., Resurrection, A.P., Möller, J., Jimenez, R., Reinke, R.F., Martin, M., Blanco, P., Molina, F., Chen, M.H., Kuri, V., Romero, M.V., Habibi, F., Umemoto, T., Jongdee, S., Graterol, E., Reddy, K.R., Bassinello, P.Z., Sivakami, R., Rani, N.S., Das, S., Wang, Y.J., Indrasari, S.D., Ramli, A., Ahmad, R., Dipti, S.S., Xie, L., Lang, N.T., Singh, P., Toro, D.C., Tavasoli, F. and Mestres, C., 2009, Addressing the dilemmas of measuring

amylose in rice, Cereal Chem. 86: 492-498.

[8] Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2017, TAS 4004-2017: Thai Agricultural Standard: Thai Rice, National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Bangkok. (in Thai)

[9] Rattanapol, P. and Sreewongchai, T., 2012, Development of amylose content analysis in rice grain using small amount of sample, 50th Kasetsart University Annual Conference: Agricultural Extension and Home Economics, Plants, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

[10] Juliano, B., Perez, C.M., Blakeney, A.B., Castillo, T., Kongseree, N., Laignelet, B. and Webb, B.D., 1981, International cooperative testing on the amylose content of milled rice, Starch Stärke 33: 157-162.

[11] Avaro, M.R.A., Pan, Z., Yoshida, T. and Wada, Y., 2011, Two alternative methods to predict amylose content of rice grain by using tristimulus cie lab values and developing a specific color board of starch-iodine complex solution, Plant Prod. Sci. 14: 164-168.

[12] Hu, X., Lu, L., Fang, C., Duan, B. and Zhu, Z., 2015, Determination of apparent amylose content in rice by using paper-based microfluidic chips, J. Agric. Food Chem. 63: 9863-9868.