

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การสลายตัวของกรดโฟลิกในระหว่างกระบวนการให้ความร้อน

4.1.1 การสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer

จากตัวอย่างโคม่าトイแกรมของ HPLC ในภาคผนวก ก รูปที่ 4 พนว่า กรดโฟลิกใน citrat-phosphate buffer pH 4.00 เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 7 ชั่วโมง peak area ของกรดโฟลิกจะลดลง เมื่อเทียบกับ control และโคม่าトイแกรมที่เปลี่ยนไป เช่น กรณี 3 ชั่วโมง ในรูปที่ 4 (b) กับ 7 ชั่วโมง ในรูปที่ 4(c) พนว่ามี peak บาง peak เกิดขึ้น และ เกิดมากขึ้นเมื่อ heating time นานขึ้น ขณะที่ peak area ของกรดโฟลิกลดลง แสดงว่าความร้อนทำให้กรดโฟลิกสลายตัว จึงสอดคล้องกับการทดลองของ Day และ Gregory (1983) ซึ่งกล่าวไว้ว่า degradation products ของกรดโฟลิกที่ที่พบเป็น p-ABG และ Pt-6-COOH การสลายตัวของกรดโฟลิก เช่นนี้จะมีผลให้คุณค่าทางอาหารของกรดโฟลิกลดลง (Food and Nutrition Board, 1980) ในงานทดลองนี้ใช้ HPLC คนละระบบกับของ Day และ Gregory (1980) และยังไม่ได้ identify degradation products

โคม่าトイแกรมของ HPLC สำหรับกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer ที่ pH 3.01 และ 5.01 ที่ให้ผลคล้ายคลึงกัน

4.1.2 การสลายตัวของกรดโฟลิกในน้ำแอปเปิล

กรดโฟลิกในน้ำแอปเปิลมีการสลายตัว เมื่อได้รับความร้อนจากหลักฐานในโคม่าトイแกรมของ HPLC (ภาคผนวก ก. รูปที่ 6) การสลายตัวของกรดโฟลิกที่เติมลงในน้ำ

แอล เปิล เกิดขึ้นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารเดิมในน้ำแอล เปิล ดังนั้นโภคภาระของน้ำแอล เปิลที่ได้รับความร้อนจึงต่างไปจากน้ำแอล เปิลสด (ภาคผนวก ก รูปที่ ๕) ในงานทดลองนี้จึงให้ความร้อนกับน้ำแอล เปิลสดที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ควบคู่ไปกับน้ำแอล เปิลที่เติมกรดโฟลิก ทำให้มีส่วนต่างในการแยก peak ของกรดโฟลิกจาก peak อื่น ๆ

4.2 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH 4.00

ตารางที่ 4.1 ค่า Correlation Coefficient ที่ได้จากการทำ regression บนสมการแบบต่าง ๆ ระหว่างความเข้มข้นของกรดโฟลิกที่เหลืออยู่ใน citrate-phosphate buffer ที่ pH 4.00 กับช่วงเวลาที่ให้ความร้อน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Correlation Coefficient (R^2)		
	ปฏิกิริยาอันดับศูนย์	ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง	ปฏิกิริยาอันดับสอง
100	0.973	0.962	0.936
110	0.962	0.951	0.910
120	0.906	0.939	0.922
ค่าเฉลี่ย	0.947	0.951	0.922
ส่วนเบี่ยงเบน-มาตรฐาน	0.036	0.012	0.013

จากตาราง 4.1 ค่า Correlation Coefficient เฉลี่ยของปฏิกิริยา

อันดับหนึ่งมีค่าสูงสุด แต่ใกล้เคียงกับปฏิกิริยาอันดับสูนย์ เมื่อตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาอันดับสูนย์และปฏิกิริยาอันดับหนึ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ และมีความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาอันดับหนึ่งและปฏิกิริยาอันดับสูนย์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่า Correlation Coefficient เฉลี่ยจากตาราง นอกจากปฏิกิริยาอันดับหนึ่งจะให้ค่าสูงสุดแล้ว ยังมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่างๆ ที่สำคัญ เช่น Mnkeni และ Beveridge (1982) กล่าวว่า เป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ตั้งนั้น การสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate Buffer pH 4.00 ระหว่างอุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส อาจอธิบายได้ด้วยปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง

ค่า k จากปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH 4.00 เมื่ออธิบายโดยปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง จะมีค่าสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 100-120 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pain-Wilson และ Chen (1979) กับ Mnkeni และ Beveridge (1982) เมื่อเปรียบเทียบพบว่า ค่า k ที่ได้ในการทดลองนี้จะใกล้เคียงกับค่า k ที่ Pain-Wilson และ Chen (1979) ได้ศึกษาไว้ที่ 100 องศาเซลเซียสซึ่งกรดโฟลิกให้ค่า k เท่ากับ 0.861×10^{-5} วินาที⁻¹ และตัวว่าค่า k ที่ Mnkeni และ Beveridge (1982) ได้ศึกษาไว้ที่อุณหภูมิ 100-121 องศาเซลเซียส ที่ pH 4.0 ($k = 2.056 \times 10^{-5} - 6.500 \times 10^{-5}$ วินาที⁻¹) ซึ่งความแตกต่างของค่า k อาจเกิดจากความแตกต่างของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งมีความแม่นยำ และ sensitivity ต่างกัน

ตารางที่ 4.2 ค่า k ของกรดโพลิกใน citrate-phosphate buffer pH 4.00
ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	$k \times 10^5$ (วินาที $^{-1}$)	Correlation Coefficient [*] R^2
100	0.714 \pm 0.168	0.961
110	1.084 \pm 0.205	0.951
120	2.192 \pm 0.239	0.939

* จากความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln co/c$ กับเวลา ค่าที่ได้พบว่ามีสัมภានทางสถิติที่
ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

เมื่อนำไปหาค่า E_a จาก Arrhenius plot (รูปที่ 4.2) พบว่าความร้อนมีผล
ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่ออธิบายโดยสมการของ Arrhenius ได้ค่า E_a เท่ากับ
 $69.9 \pm 15.5 \text{ kJ mole}^{-1}$ หรือ $16.7 \pm 3.7 \text{ kcal mole}^{-1}$ ที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ค่า Correlation Coefficient (R^2) จากความสัมพันธ์ระหว่าง
 $\ln k$ กับส่วนกลับของอุณหภูมิสัมบูรณ์มีค่าเท่ากับ 0.975

การหาข้อมูลทางจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง สามารถทำได้ 2 วิธี จากการ
คือไปนี้

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad \dots \dots \dots \quad 5.1$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad \dots \dots \dots \quad 5.2$$

$$\text{จากความสัมพันธ์ในปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง } \ln co/c = kt \quad \dots \dots \dots \quad 5.3$$

แทนค่า k จาก 5.3 ในสมการ 5.2 จะได้ความสัมพันธ์ คือ

การหาข้อมูลทางจนศาสตร์ โดยใช้สมการ 5.2 และ 5.3 เรียก Two-Step

Method ถ้าใช้สมการ 5.4 เรียก One-step Method.

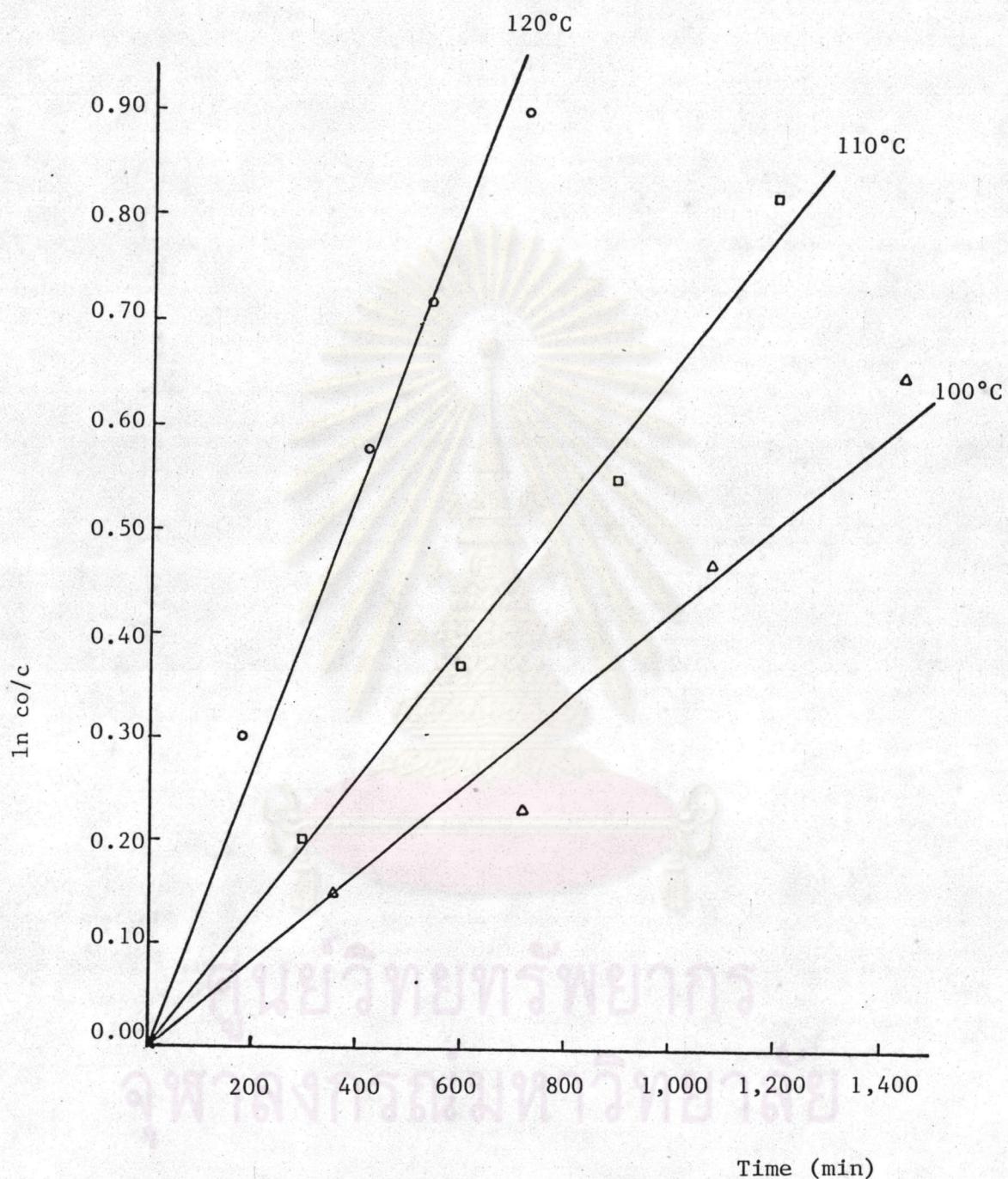
จากการคำนวณค่า E_a และ A โดยใช้ทั้ง 2 วิธี (ตารางที่ 4.3) พบว่า ค่า E_a ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๙ เปอร์เซ็นต์ โดยค่า E_a จาก Two-Step Method จะให้ค่า E_a ที่ดีกว่า แต่มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงกว่า ค่า E_a จาก One-Step Method ทั้งนี้เนื่องจากการคำนวณโดยใช้ One-Step Method นั้นใช้ข้อมูลความเข้มข้นและเวลาในการคำนวณโดยตรง แต่การคำนวณโดยใช้ Two-Step Method ใช้ค่า k ที่คำนวณจากข้อมูลความเข้มข้นและเวลาที่แต่ละอุณหภูมิ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ย และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่แล้ว

ส่วนค่าแฟกเตอร์แห่งความถี่ (A) จะแตกต่างกันมาก เมื่อคำนวณโดยใช้ Two-Step Method และ One-Step Method เนื่องจากค่า A มาจาก $\ln A$ ในสมการ 5.2 และ 5.4 ตามลำดับ ตั้งนั้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า k หรือ E_a เพียงเล็กน้อยก็มีผลให้ค่า A ต่างกันมาก

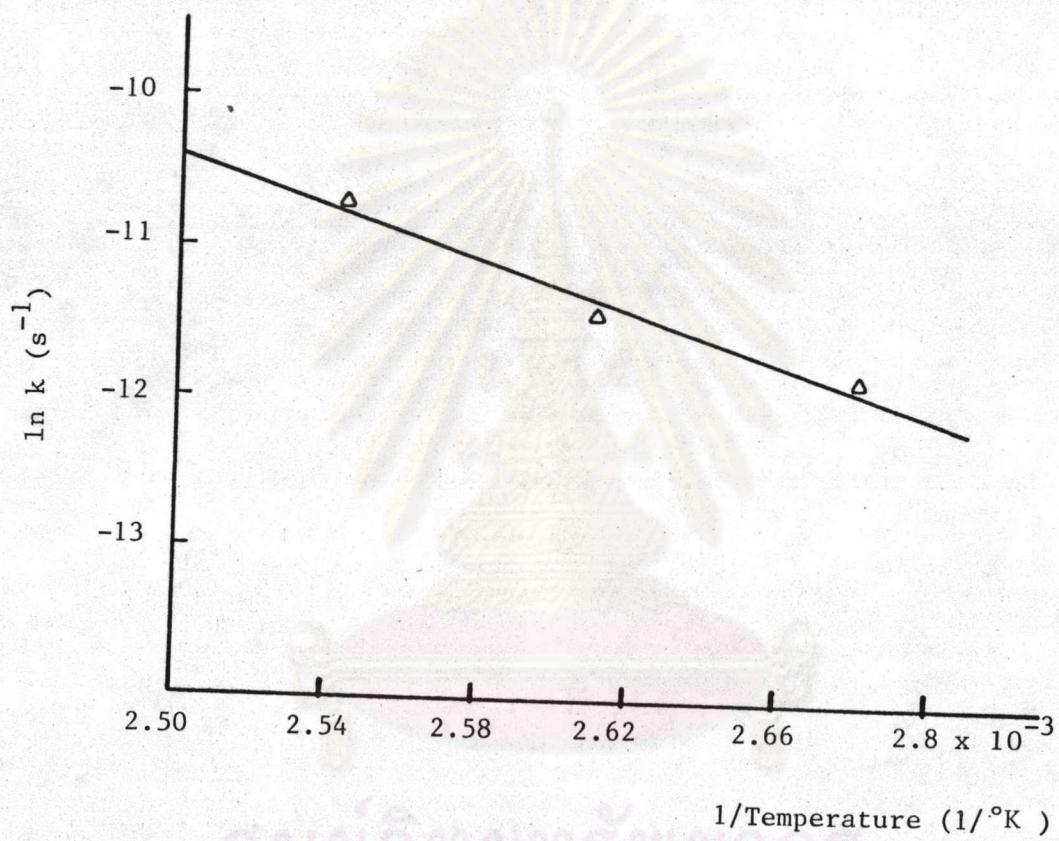
ตารางที่ 4.3 ค่า E_a และค่า A จากการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH 4.00 ที่คำนวณจาก One-Step Method และ Two-Step Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์*

ข้อมูลทางเคมีศาสตร์	Two-Step Method	One-Step Method
$E_a, \text{ kJ.mole}^{-1}$ (kcal mole-1)	69.9 \pm 15.5 (16.2 \pm 3.7)	75.2 \pm 9.6 (18.0 \pm 2.3)
$A \times 10^{-4}, \text{ s}^{-1}$	4.1	21.8

*ค่า R^2 ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln k$ กับ ส่วนกลับของอุณหภูมิสัมบูรณ์ มีค่า
เมื่อเท่ากับ 0.975 และที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(\ln co/c) - \ln t$ กับ ส่วนกลับ²
ของอุณหภูมิสัมบูรณ์ มีค่าเท่ากับ 0.881



รูปที่ 4.1 อัตราการสลายตัวของกรดโพลิกใน citrate-phosphate buffer (pH 4.00) เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 4.2 Arrhenius plot สำหรับการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer (pH 4.00) ในช่วง อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส

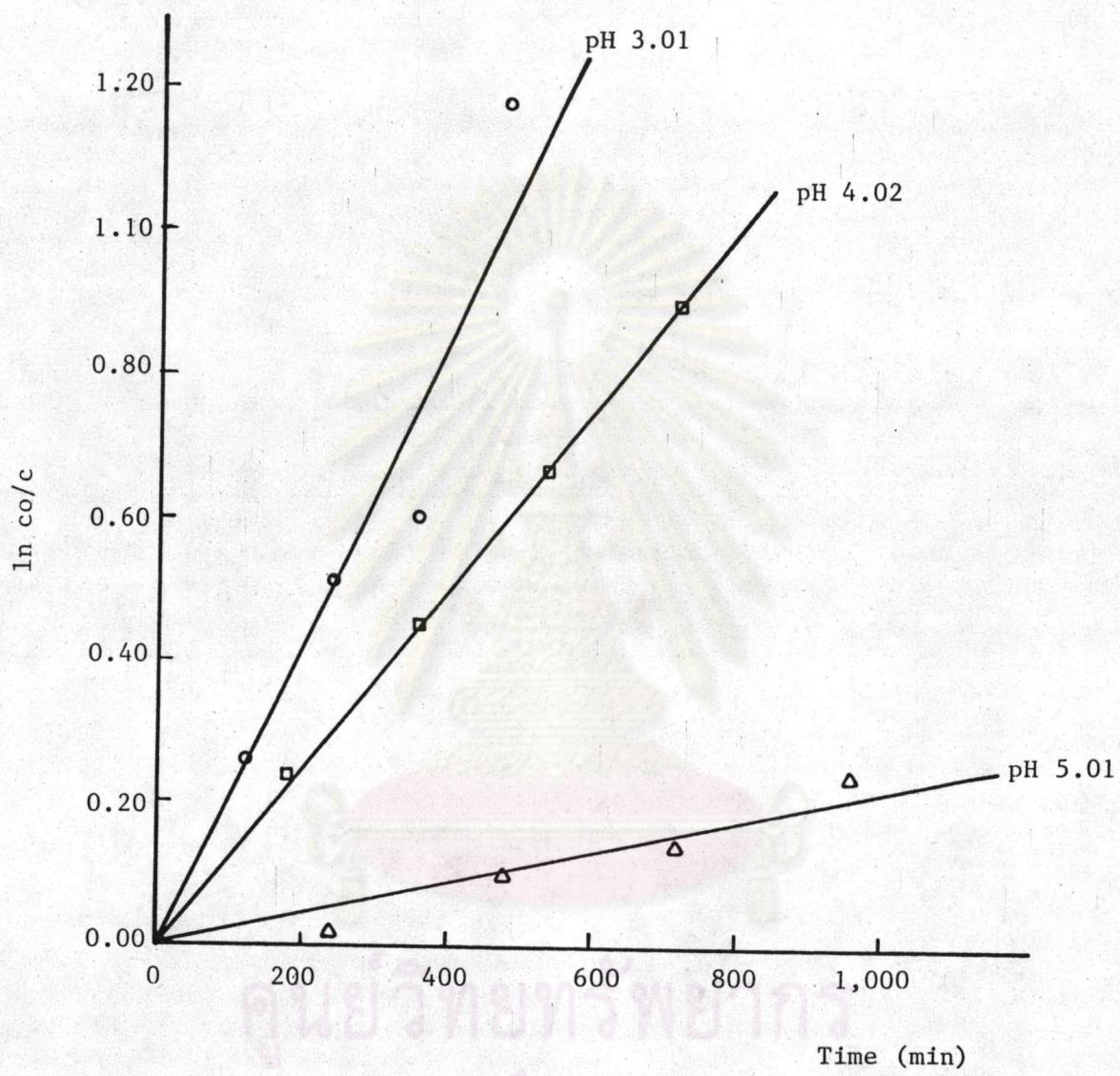
4.3 ผลของ pH ต่อการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer

ปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer ที่ 120 องศาเซลเซียส pH 3.01 - 5.01 ให้ความสัมพันธ์ที่ดีมาก เมื่ออธินายด้วยปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยให้ค่า Correlation Coefficient ระหว่าง $\ln co/c$ กับเวลา ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ค่า k ที่ได้จากการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH ต่าง ๆ จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ลดลง จาก pH 5.01 - pH 3.01 ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.4, รูปที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pain-Wilson และ Chen (1979) กับ Mnkeni และ Beveridge(1982) โดยค่า k ที่ได้ต่ำกว่า ค่า k ของ Mnkeni และ Beveridge(1982) ส่วน Pain-Wilson และ Chen (1979) ทดลองที่ 100 องศาเซลเซียส จึงไม่สามารถเปรียบเทียบค่า k ที่ได้

ตารางที่ 4.4 ค่า k ของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

pH	$k \times 10^5$ วินาที	Correlation Coefficient R^2
3.01	3.619 \pm 0.796	0.935
4.02	2.078 \pm 0.214	0.954
5.01	0.371 \pm 0.142	0.942

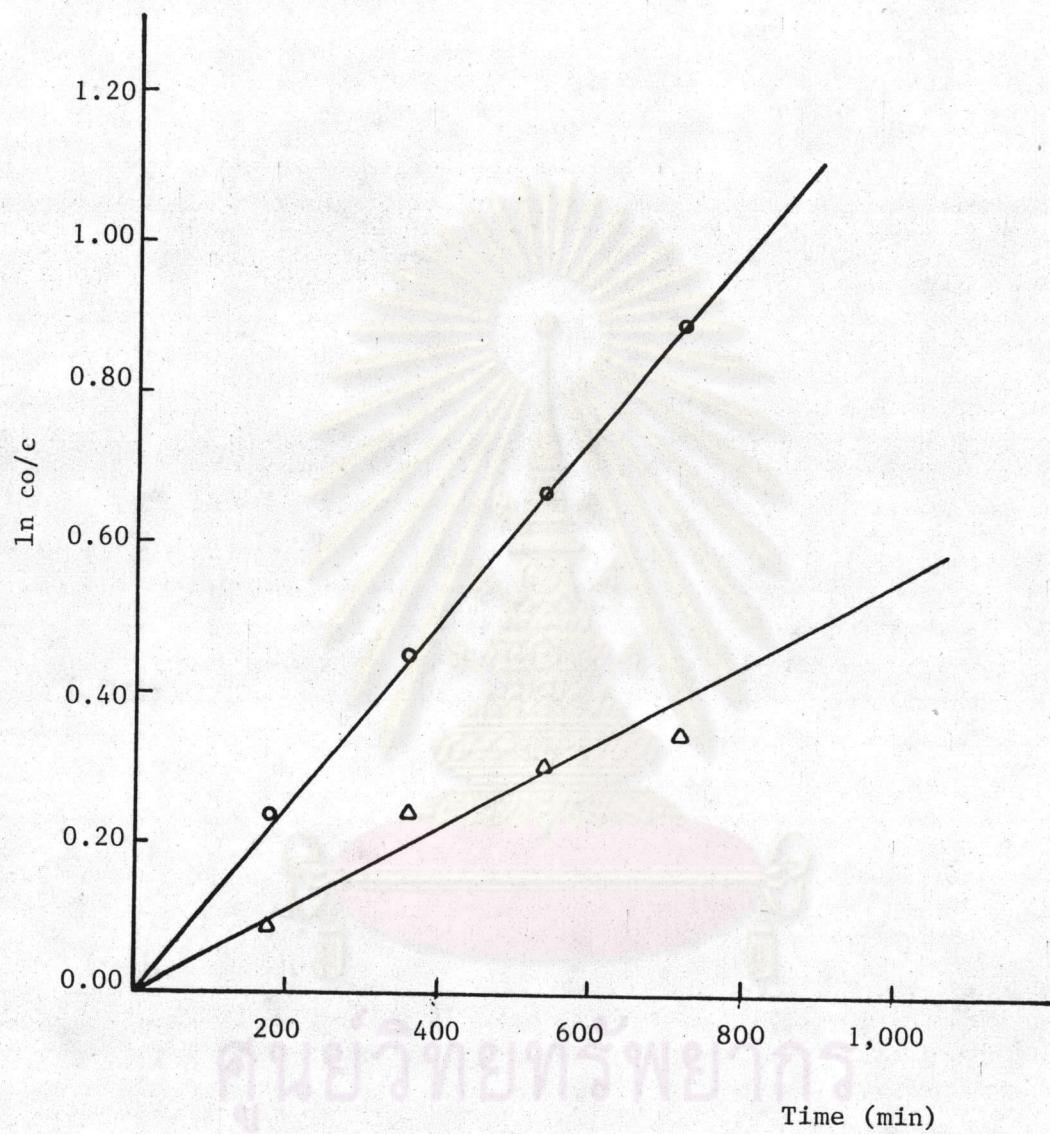


รูปที่ 4.3 ผลของ pH ต่ออัตราการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer ซึ่งได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
ต่างๆ กัน



4.3 ผลของ reducing agent

การสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH4.02 ที่เติม ascorbic acid ในปริมาณ 13.2 มิลลิกรัม ต่อสารละลายน้ำ 100 กรัม ให้ค่า Correlation Coefficient ระหว่าง $\ln \frac{c_0}{c}$ กับเวลา เท่ากัน 0.967 ซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ค่า $k = (0.889 \pm 0.132) \times 10^{-5}$ วินาที $^{-1}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ซึ่งน้อยกว่าค่า k ที่สภาวะเดียวกัน เมื่อไม่เติม ascorbic acid ดังเบรย์เทียนในรูปที่ 4.4 โดยค่า k จะลดจาก 2.078×10^{-5} วินาที $^{-1}$ มาเป็น 0.889×10^{-5} วินาที ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Day และ Gregory (1982) ซึ่งเติม ascorbic acid ในปริมาณ 5.64 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรของสารละลายน้ำและสรุปว่า ascorbic acid ทำให้ % retention ของกรดโฟลิกสูงขึ้น ดังนั้นจึงอาจสรุปว่า ascorbic acid ซึ่งเป็น reducing agent มีผลช่วยให้กรดโฟลิกสลายตัวช้าลง



รูปที่ 4.4 ผลของ ascorbic acid ต่ออัตราการสลายตัวของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer (pH 4.02) เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศา เชลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน

○ —○ ไม่เติม ascorbic acid

△ —△ เติม ascorbic acid

(13.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารละลายน้ำ)

4.4 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิล
(pH 4.17)

ปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิลที่อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส อาจอธิบายได้ด้วยปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เช่น เดียวกับใน citrate-phosphate buffer pH 4.00 โดยให้ค่า Correlation Coefficient ดังแสดงในตาราง 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่า Correlation Coefficient ที่ได้จากการทำ regression บนสมการแบบต่าง ๆ ระหว่างความเข้มข้นของกรดไฟลิกที่เหลืออยู่ในน้ำแอปเปิล กับช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ให้ความร้อน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Correlation Coefficient (R^2)		
	ปฏิกิริยาอันดับศูนย์	ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง	ปฏิกิริยาอันดับสอง
100	0.990	0.997	0.995
110	0.973	0.994	0.999
120	0.999	0.980	0.827
ค่าเฉลี่ย	0.987	0.991	0.941
ส่วนเมี่ยงเบน-มาตราฐาน	0.013	0.009	0.098

จากตาราง 4.5 เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่า Correlation Coefficient เฉลี่ย ด้วย t-test พบร่วมกันว่า ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ส่วนปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และปฏิกิริยาอันดับสอง ไม่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แต่ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งก็ให้ค่า Correlation Coefficient เฉลี่ยสูงสุด และมีส่วนเมี่ยงเบนมาตราฐานต่ำกว่าปฏิกิริยาอันดับอื่น ประกอบกับ Mnkeni และ Beveridge (1982) ได้ศึกษาการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิลและสรุปว่า เป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ดังนั้นการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิลระหว่าง 100-120 องศาเซลเซียส อาจอธิบายได้ด้วยปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง

ค่า k ที่ได้จากการสลายตัวของกรดโฟลิกในน้ำแอปเปิล ($\text{pH } 4.17$) ในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 จะมีค่าน้อยกว่าค่า k จากการสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH 4.00 (ตารางที่ 4.2) ที่อุณหภูมิ 100 และ 110 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ค่า k จากการสลายตัวของกรดโฟลิกในน้ำแอปเปิลจะสูงกว่า ในน้ำแคนป์ เป็นม่องค์ประกอบของสารอาหารหลายชนิด เมื่อเทียบกับในระบบบัฟเฟอร์ และสารอาหาร เหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน เมื่อได้รับความร้อนตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.1.2 อาจมีผลให้ค่า k ที่ได้จากการสลายตัวของกรดโฟลิกในระบบบัฟเฟอร์แตกต่างไปจากค่า k ที่ได้จากการสลายตัวในน้ำแอปเปิล

ตารางที่ 4.6 ค่า k ของกรดโฟลิกในน้ำแอปเปิล ($\text{pH } 4.17$) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	$k \times 10^5$ (วินาที $^{-1}$)	Correlation Coefficient R^2
100	0.502 \pm 0.031	0.997
110	0.823 \pm 0.080	0.994
120	2.558 \pm 0.482	0.980

* จากความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln co/c$ กับเวลา ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ

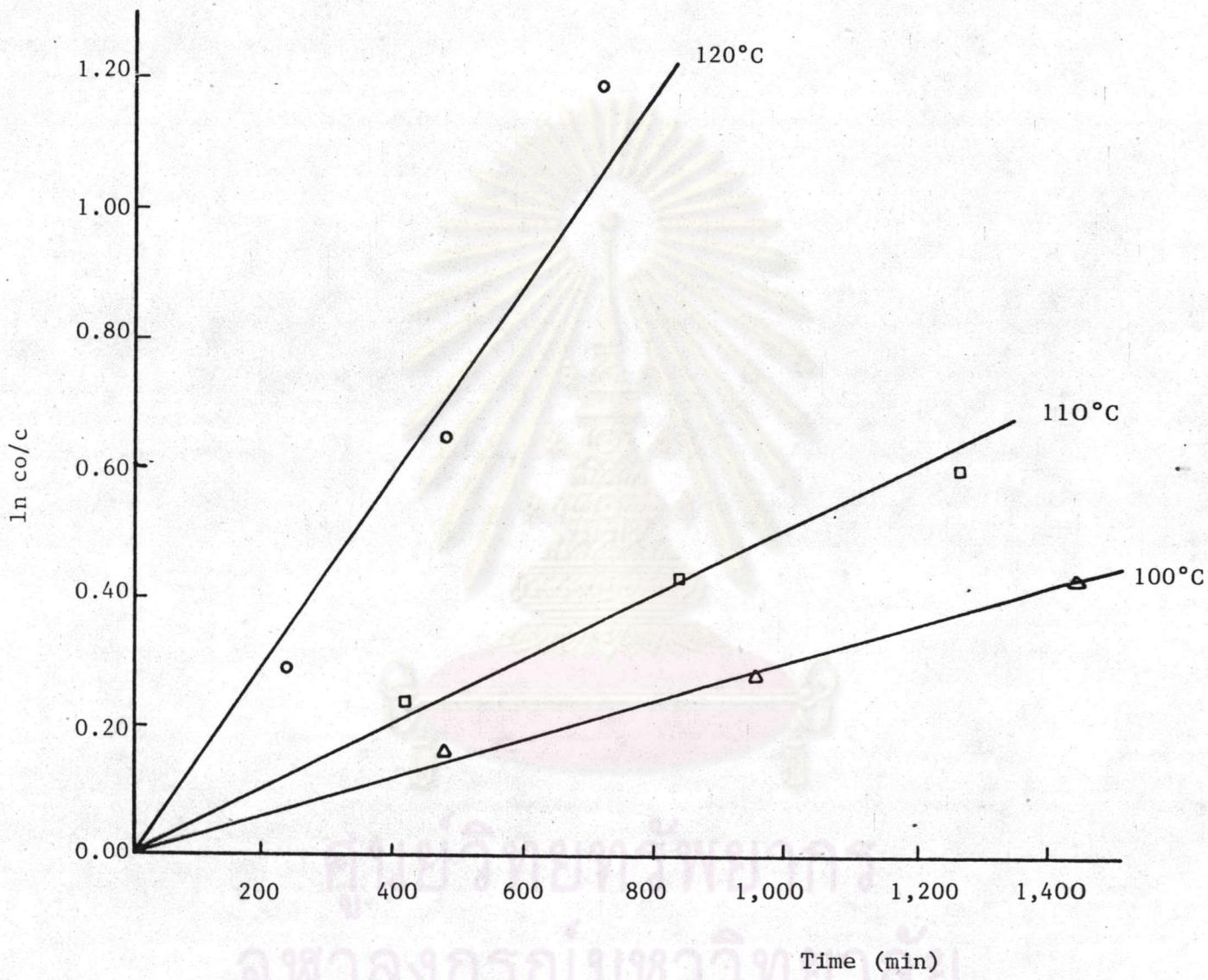
เชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

เมื่อหาค่า E_a จากการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิล พนวจความร้อนมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา ค่า E_a และ A ที่คำนวณจาก One-Step Method และ Two-Step Method ได้แสดงในตารางที่ 4.7 และแสดง Arrhenius plot ในรูปที่ 4.6 ค่า E_a จาก One-Step Method จะมีค่าต่ำกว่า และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำกว่า ค่า E_a จาก Two-Step Method แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๙ เปอร์เซนต์ และค่า E_a ของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิลมีค่าใกล้เคียงกับค่า E_a ของกรดไฟลิกใน citrate-phosphate buffer pH 4.00 โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕ เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า E_a ของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิลจากการทดลองนี้กับการทดลองอื่นพบว่าใกล้เคียงกับที่ Mnkeni และ Beveridge (1982) ได้ศึกษาไว้ ซึ่งได้ค่า E_a เท่ากับ $20 \text{ kcal mole}^{-1}$

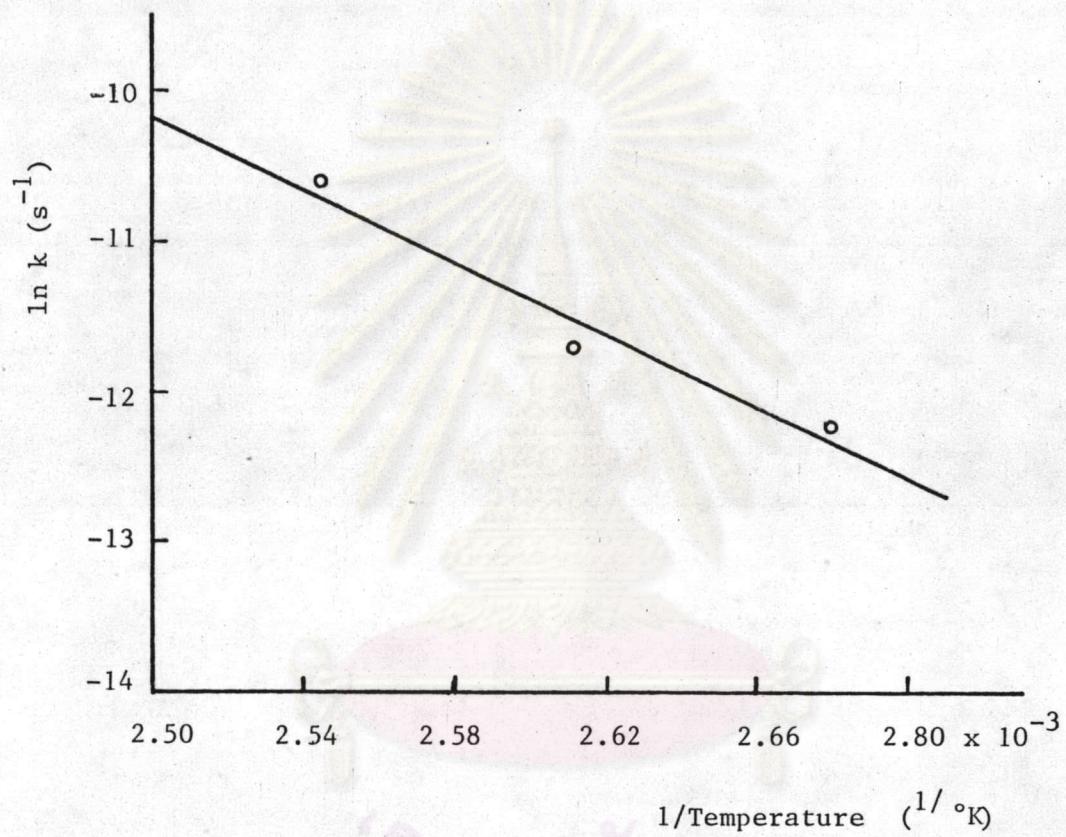
ตารางที่ 4.7 ค่า E_a และ A จากการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิล (pH 4.17) ที่คำนวณโดยใช้ Two-Step Method และ One-Step Method ที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕ เปอร์เซนต์*

ข้อมูลทางเคมีศาสตร์	Two-Step Method	One-Step Method
$E_a, \text{ kJ mole}^{-1}$	99.9 ± 22.3	90.7 ± 21.4
kcal mole^{-1}	(23.9 ± 5.3)	(21.7 ± 5.1)
$A \times 10^{-7}, \text{ s}^{-1}$	44.6	2.4

* ค่า R^2 จากความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln k$ กับ ส่วนกลับของอุณหภูมิองศาสัมบูรณ์ มีค่า = 0.944 และจากความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(\ln c_0/c) - \ln t$ กับ ส่วนกลับของอุณหภูมิองศาสัมบูรณ์ มีค่า = 0.935



รูปที่ 4.5 การสลายตัวของกรดโพลิกในน้ำและเบส (pH 4.17) เมื่อได้รับความร้อน
ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 4.6 Arrhenius plot สำหรับการสลายตัวของกรดไฟลิกในน้ำแอปเปิล (pH 4.17) ในช่วงอุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส