

การทดลอง

3.1 การเตรียมตัวอย่างของกรดฟอลิกในสารละลายบัฟเฟอร์

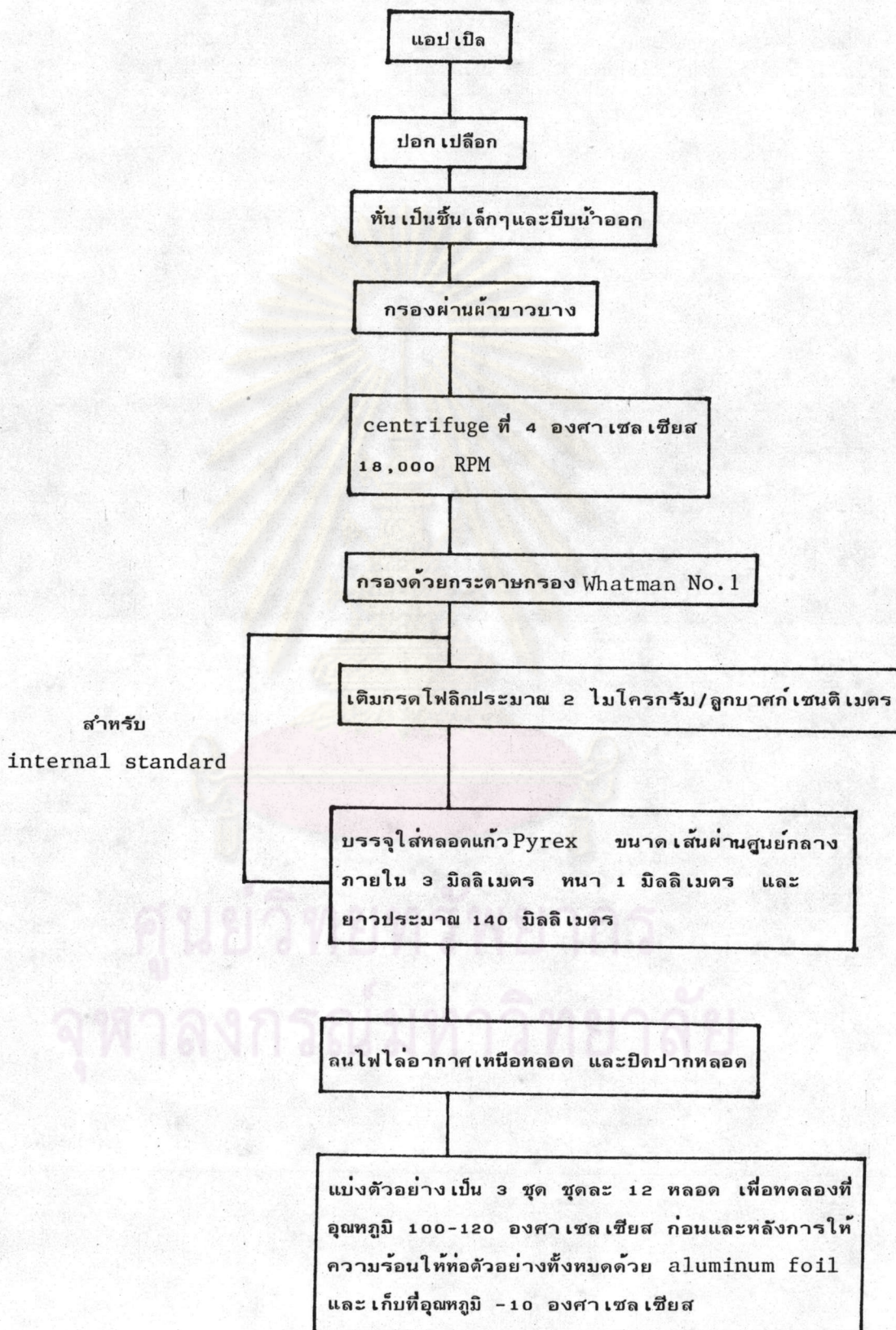
ชั่งกรดฟอลิก 1 กรัม (purity 94%, BDH Chemical Ltd.) โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด (Readability 0.01 มิลลิกรัม) ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นเบสโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วปรับ pH ให้เป็นกลางโดยใช้สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุสารละลายในขวดสีชาห่อด้วย aluminum foil เก็บใน freezer ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

สำหรับการทดลองผลของอุณหภูมิ pH และเวลาต่อการสลายตัวของกรดฟอลิก ให้นำสารละลายที่เตรียมไว้ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วย citrate-phosphate buffer pH 3, 4 หรือ 5 จนมีปริมาตรเป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร วัด pH ที่แน่นอนของสารละลายตัวอย่างทั้งหมด

ส่วนการศึกษาผลของ reducing agent คืออัตราการสลายตัวของกรดฟอลิก ให้เติม ascorbic acid ลงในสารละลายกรดฟอลิกในบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH เป็น 4 แล้ว โดยให้ความเข้มข้นของ ascorbic acid เป็น 13.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารละลาย ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ ascorbic acid ที่ใกล้เคียงกับที่พบในผลไม้บางชนิด เช่น แอปเปิ้ลสด และกล้วย (West และคณะ, 1966)

บรรจุสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้สำหรับการทดลองลงในหลอดแก้ว Pyrex ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 140 มิลลิเมตร โดยใช้ syringe ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ฉีดใส่หลอดแก้วเพื่อให้อากาศหนีออกเพื่อให้อากาศเป็นสุญญากาศ แล้วจึงฉีกปากหลอดห่อตัวอย่างด้วย aluminum foil แล้วเก็บใน freezer ที่ -10 องศาเซลเซียส

### 3.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำแอมเปิลในการทดลอง





internal standard ในที่นี้เป็นตัวอย่างน้ำแอปเปิลที่ไม่เติมกรดฟอสฟอริก และได้นำไปผ่านการให้ความร้อนที่สภาวะต่าง ๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่มีกรดฟอสฟอริก เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบเวลาแยกและหาปริมาณกรดฟอสฟอริกด้วย HPLC

### 3.3 การวัดอุณหภูมิ (Temperature Measurement)

อุณหภูมิในหลอดทดลองวัดโดยใช้เครื่องบันทึกอุณหภูมิและ เวลาแบบตัว เลข (Procos V II, CHINO, Japan) ซึ่งประกอบด้วย Copper/Constantan Thermocouple เครื่องจะบันทึกอุณหภูมิและ เวลาลงบนกระดาษพิมพ์ด้วยระบบอัตโนมัติตามโปรแกรมที่จัดให้ ค่าอุณหภูมิที่วัดได้จะมีความผิดพลาดเพียง  $\pm 0.5$  องศาเซลเซียส และสามารถวัดอุณหภูมิได้ตั้งแต่  $-200$  องศาเซลเซียส ถึง  $400$  องศาเซลเซียส

### 3.4 การให้ความร้อนในระหว่างการทดลอง (Thermal Processing System)

ใช้ oil bath ซึ่งประกอบด้วย heating unit ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง  $\pm 0.4$  องศาเซลเซียส และ agitator ซึ่งจะกวนน้ำมันเกิดการหมุนเวียน ช่วยให้ความร้อน ถูกถ่ายเทไปเท่า ๆ กันทุกจุดใน oil bath

ก่อนทำการทดลองทุกครั้งต้องอบที่เสียบหลอดทดลองซึ่งทำด้วยสังกะสี ให้มีอุณหภูมิมากกว่าอุณหภูมิของน้ำมันที่ต้องการทดลอง เพื่อควบคุมอุณหภูมิภายใน oil bath ให้คงที่ในตอนเริ่มต้นทดลอง ตัวอย่างที่จะทดลองต้องนำมาทำให้ละลายก่อนที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเข้าตู้แช่แข็งสำหรับเป็น control ส่วนที่เหลือถูกทำให้ร้อนใน oil bath ที่อุณหภูมิและเวลาที่ต้องการ ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนจนได้เวลาที่ต้องการจะถูกดึงขึ้นจาก oil bath โดยวิธีการสูบลม และรีบทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำแข็ง เมื่อหลอดเย็นให้ล้างคราบไขมันออก ห่อหุ้มหลอดด้วย aluminum foil แล้วนำไปแช่แข็งที่  $-10$  องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟอสฟอริกที่เหลือต่อไป ตัวอย่างที่เป็น control ซึ่งไม่ผ่านความร้อนก็ให้เก็บในลักษณะเดียวกับตัวอย่างที่ผ่านความร้อน อุณหภูมิและช่วงเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนแก่ตัวอย่างที่จะทำการทดลองทั้งหมดได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1, 3.2 และ 3.3

ตารางที่ 3.1 อุณหภูมิและช่วงเวลาด่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer (pH 4.00)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (นาที)			
100	360	720	1,080	1,440
110	300	600	900	1,200
120	180	420	540	720

ตารางที่ 3.2 อุณหภูมิและช่วงเวลาด่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของ pH และ reducing agent ที่มีต่อการสลายตัวของกรดโฟลิก

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH ของตัวอย่าง	ช่วงเวลา (นาที)			
120	3.01	120	240	360	480
120	4.02	180	360	540	720
120	5.01	240	480	720	960
120	4.02 <sup>*</sup>	180	360	540	720
	(มี ascorbic acid 0.132 มิลลิกรัม/กรัม)				

<sup>\*</sup> เป็นค่า pH ที่วัดหลังจากเติม ascorbic acid แล้ว

ตารางที่ 3.3 อุณหภูมิและช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดโฟลิกในน้ำแอมเปิล (pH 4.17)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (นาที)		
100	480	960	1,440
110	420	840	1,260
120	240	480	720

### 3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดโฟลิก (Analysis of Folic Acid Content)

ใช้วิธีของ Allen และ Newman (1980) โดยใช้ HPLC ซึ่งประกอบด้วย Liquid Chromatography model : LC-3A (Shimadzu, Japan) ร่วมกับ Column : Zobax, ODS (C<sub>18</sub>) (Shimadzu, Japan) ใช้ UV delector วัดที่ 285 นาโนเมตร และ Recorder integrator model: C-R1 A (Shimadzu, Japan) ซึ่งใกล้เคียงกับระบบที่ใช้โดย Allen และ Newman (ภาคผนวก ก.) รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์และวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.