



ภาษาไทย

จรัญ จันทลักขณา. "สถิติ วิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย." ภาควิชาสัตวบาล,
คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2523.

สุรพล อุบัติสสกุล. "สถิติ การวางแผนการทดลองเบื้องต้น." ภาควิชาพืชไร่นา,
คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2523.

อารี วัลยะเสวี และคณะ. "โลหิตจางเนื่องจากการขาดสารอาหาร." ใน โรคโภชนาการ,
หน้า 200-201. วันดี วราวิทย์, บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร: คณะแพทย-
ศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี, 2502.

ภาษาต่างประเทศ

Allen, B.A, and Newman, R.A. "HPLC Separation of Clinically Important
Folic Acid Derivative Using Ion-Pair Chromatography."
J. Chromatogr. 190 (1980): 241-245.

Association of Vitamin Chemists. "Methods of Vitamin Assay."
pp. 37-62. Association of Vitamin Chemists Inc., New York,
1966.

Bailey, L.B., Mahan, C.S. and Dimperio, D. "Folacin and Iron Status
in Low-Income Pregnant Adolescents and Mature Women." Am.J.
Clin. Nutr. 33 (1980): 1997.

Branfman, A.R. and Mc.Comish, M. "Rapid Separation of Folic Acid
Derivatives by Paired-Ion High-Performance Liquid
Chromatography." J. Chromatogr. 151 (1978): 87-89.

- Bush, B.T., Frenz, J.H., Melander, W.R., Horvath, C. Cashmore, A.R.,
Dryer, R.N., Knipe, J.O. Coward, J.K. and Bertino, J.R.
"Retention Behavior of Pteroyl-Oligo-r-L-Glutamates in
Reversed-Phase Chromatography." J. Chromatogr. 168 (1979):
343-353.
- Chapman, S.K., Greene, B.C. and Streiff, R.R. "A Study of Serum Folate
by High-Performance Ion-Exchange and Ion-Pair Partition
Chromatography." J. Chromatogr. 145 (1978): 302-306.
- Chen, T.S. and Cooper, R.G. "Thermal Destruction of Folic Acid: Effect
of Ascorbic Acid, Oxygen and Temperature." J. Food Sci.
44 (1979): 713-716.
- Chung, A.S.M., Pearson, W.N., Darby, W.J., Miller, O.N. and Goldsmith,
G.A. "Folic Acid, Vitamin B-6, Pantothenic Acid and Vitamin
B-12 in Human Diets." Am. J. Clin. Nutr. 9 (1961): 573.
- Clifford, C.K. and Clifford, A.J. "HPLC Analysis of Food for Folic Acid."
J. AOAC. 60 (6) (1977): 1248-1251.
- Colman, N., Green, R. and Metz, J. "Prevention of folic acid deficiency
by food fortification II: Absorption of folic acid from fortified
staple foods." Am. J. Clin. Nutr. 28 (1975): 459.
- Connor, M.A. and Keagy, P.A. "Folic acid retention and cookie diameter in
enriched cookies: Regression analysis using factorial design."
Cereal Chem. 58 (3) (1981): 239-244.
- Dawson, R.M.C. and McKenzie, H.A. pH and Buffers in Data for Biochemi-
cal Research. p. 475. Oxford University, New York, 1969.

- Day, B.P.F. and Gregory, J.F. "Determination of Folacin Derivatives in Selected Foods by High-Performance liquid Chromatography." J. Agric. Food. Chem. 29 (1981): 374-377.
- _____. "Thermal Stability of Folic Acid and 5-Methyl Tetrahydrofolic Acid in Liquid Model Systems." J. Food Sci. 48 (1983): 581-587.
- Dick, M.I.B., Harrison, I.T. and Farrer, K.T.H. "The Thermal Stability of Folic Acid." Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 26 (1948): 239.
- Food and Nutrition Board. "Recommended Dietary Allowances." 9 th rev. ed. National Academy of Sciences, Washington D.C., 1980.
- Garrett, E.R. "Prediction of Stability in Pharmaceutical Preparations. II: Vitamin Stability in Liquid Multivitamin Preparations." J. Am. Pharm. Assoc. 45 (3) (1956): 171.
- Gregory, J.F., Day, B.P.F. and Ristow, K.A. "Comparison of HPLC, Radiometric, and Lactobacillus casei Methods for the Determination of Folacin in Selected Foods." 47 (1982): 1568-1571.
- Gregory, J.F., Sartain, D.B, and Day, B.P.F. "Fluorometric Determination of Folacin in Biological Materials Using High Performance Liquid Chromatography." J. Nutr. 114 (1984): 341-353.
- Guthrie, H.A. in Introductory Nutrition. 3 rd ed., pp. 280-287, The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1975.
- Herbert, V. "Nutritional Requirements of Vitamin B-12 and Folic acid." Am. J. Clin. Nutr. 21 (1968): 743.

- Hurt, H.D. "Effect of Canning on The Nutritive Value of Vegetable." Food Technol. 33 (2) (1979): 63-65.
- Labuza, T.P. "Nutrient Losses during Drying and Storage of Dehydrated Foods." CRC Critical Review of Food Technol. 3 (1972): 217.
- _____. "Enthalpy/Entropy Compensation in Food Reaction." Food Technol. 34 (2) (1980): 67.
- Lee, Y.C., Kirk, J.R., Bedford, C.L., and Heldman, D.R. "Kinetics and Computer Simulation of Ascorbic Acid Stability of Tomato Juice as Function of Temperature, pH and Metal Catalyst." J. Food Sci. 42 (1977): 640-644, 648.
- Levenspiel, O. in Chemical Reaction Engineering 2 d ed. p. 21, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1972.
- Lund, D.B. "Design of Thermal Process for Maximizing Nutrient Retention." Food Technol. 31 (2) (1977): 71.
- _____. "Effect of Commercial Processing on Nutrients." Food Technol. 33 (2) (1979): 28-34.
- Mnkeni, A.P. and Beveridge, T. "Thermal Destruction of Pteroylglutamic Acid in Buffer and Model Food Systems." J. Food Sci. 47 (1982): 2038-2041.
- O'Broin, J.B., Temperley, I.J., Brown, J.P. and Scott, J.M. "Nutritional Stability of Various Naturally Occurring Monoglutamate Derivatives of Folic Acids." Am. J. Clin. Nutr. 28 (5) (1975): 438-444.
- Paine-Wilson, B. and Chen, T.S. "Thermal Destruction of Folacin - Effect of pH and Buffer Ions." J. Food Sci. 44 (1979): 171-172.

- Perloff, B.P. and Butrum, R.R. "Folacin in Selected Foods."
J. Am. Dietet. Assoc. 70 (1977): 161-172.
- Perry, J. and Chanarin, I. "Absorption and Utilization of Polyglutamyl
Forms of Folate in Man." Br. Med. J. 4 (1968): 546-549.
- Reed, L.S. and Archer, M.C. "Separation of Folic Acid Derivatives
by HPLC." J. Chromatogr. 121 (1976): 100-103.
- Reed, P.B. in Nutrition: An Applied Science. pp. 263-271. West
Publishing Company, St. Paul, New York, Los Angeles, San
Francisco, 1980.
- Reingold, R.N., Picciano, M.F. and Perkin, E.G. "Separation of
Folate Derivatives by in Situ Paired-Ion High-Pressure
Liquid Chromatography." J. Chromatogr. 190 (1980):
237-240.
- Reingold, R.N. and Picciano, M.F. "Two Improved HPLC Separations of
Biological Significant Forms of Folate." J. Chromatogr. 234
(1982): 171-179.
- Rodriguez, M.S. "A Conspectus of Research on Folacin Requirements
of Man." The Journal of Nutrition. 108 (1978): 1983-2103.
- Shane, B. "High Performance Liquid Chromatography of Folates: Identifi-
cation of Poly-r-Glutamate Chain Lengths of Labeled and
Unlabeled Folates." Am. J. Clin. Nutr. 35 (1982): 599-608.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. in Principles and Procedures of
Statistics: A Biometrial Approach. 2 d ed. Mc Graw- Hill
Book Company, New York, 1980.

Stockstad, E.L.R., et al. "The Degradation of The Fermentation
Lactobacillus casei Factor 1." J. Am. Chem. Soc. 70
(1948): 5.

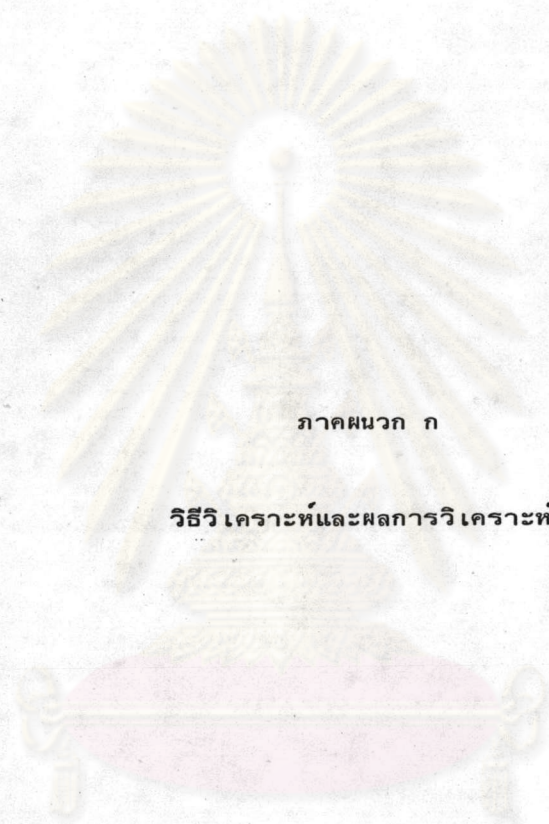
Tannenbaum, S.R. in Nutritional and Safety Aspects of Food Processing.
pp. 72-93. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 1979.

Water Associates. "Paired-Ion Chromatography: An Alternative to
Ion-Exchange." Bull. No. F 61 pp. 4-8. Water Assoc. Inc.,
Milford, Mass., 1976.

West, E.S., Todd, W.R., Mason, H.S. and Van Bruggen, J.T. in Textbook
of Biochemistry. 4 th. ed., p.832, The MacMillan Co.,
New York, 1966.

Wilson, E.D., Fisher, K.H. and Garcia, P.A. in Principles of Nutrition,
4 th. ed., pp. 244-247, John Wiley & Son, Inc., New York,
Chichester, Brisbane, Toronto, 1979.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์และผลการวิเคราะห์

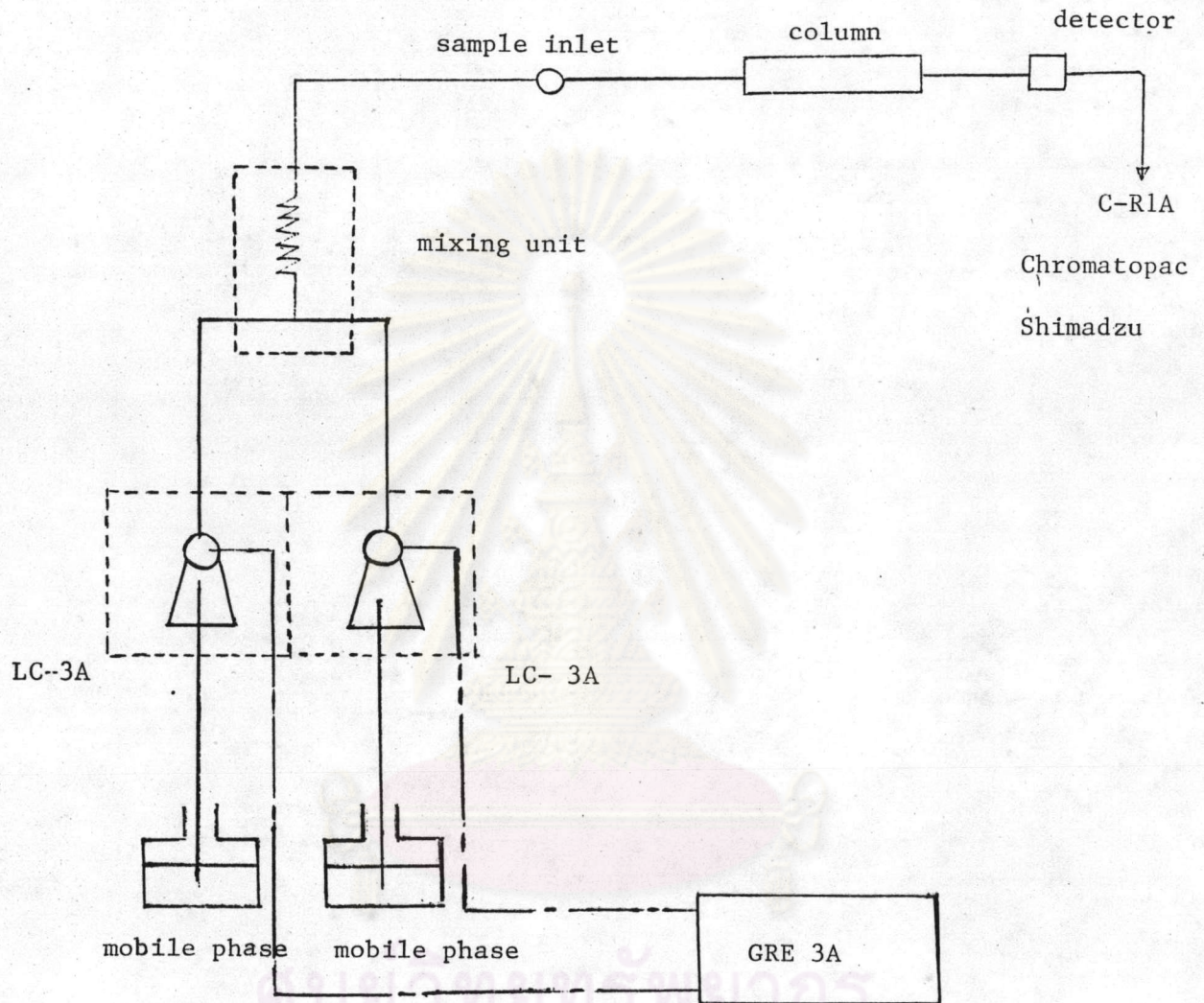
ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโฟลิก ด้วย HPLC

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ HPLC ที่มีระบบใกล้เคียงกับในเอกสารอ้างอิง (Allen และ Newman, 1980) ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระบบ HPLC ที่ใช้ในเอกสารอ้างอิง กับระบบ HPLC ที่เลือกใช้ในการทดลองนี้

	ระบบ HPLC ที่ใช้ในเอกสารอ้างอิง	ระบบ HPLC ที่ใช้ในการทดลองนี้
Model	A Spectra-Physics Model 8,000 microprocessor-controlled HPLC	LC - 3A (Shimadzu, Japan)
Chromatographic Mode	reversed - phase	reversed - phase
Column	A Spectra - Physics, ODS (C ₁₈) 5 um Column (25 cm. x 4.6 mm. ID)	Zobax, ODS (C ₁₈) 5 um column (25 cm. x 4.6 mm. ID) (Shimadzu du Pont)
Condition	mobile phase : Methanol-H ₂ O-Pic A flow rate 1.0 ml/min column temperature, ambient	mobile phase : Methanol-H ₂ O-Pic A flow rate 1.3 ml/min column temperature, ambient
Detection Method	A Shoefel Model 770 Variable-wavelength UV detector (Set at 285 nm.) 0.1 a.u.f.s. (absorbance units full scale)	C - RIA Chromatopac Shimadzu UV detector (set at 285 nm) Attenuation 2° mv/ full scale



รูปที่ 1 แผนภาพแสดง High Performance Liquid Chromatography
 LC - 3A (Shimadzu, Japan)

สารเคมี

1. กรดโฟลิก (Folic acid หรือ Pteroylglutamic acid) purity 94% ของ BDH Chemical Ltd. Poole, England
2. วิตามินซี (Ascorbic acid, powder) ของ BASF, Germany
3. Mobile phase - Methanol - H₂O - Pic A
Methanol-HPLC grade ของ J.T. Baker. U.S.A.
H₂O - deionized distilled water
Pic A (Tetrabutylammonium phosphate) ของ Water Associates, Inc., Milford, U.S.A.

สารละลายทุกตัวใน Mobile phase จะต้องกรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ทหนา 0.45 ไมโครเมตร (Millipore Corp., Bedford, MA 01730)

4. Citrate - phosphate buffer pH 3, 4 และ 5
5. สารละลายกรดเกลือ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีการA. เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดโฟลิก

1. ชั่งกรดโฟลิก 0.00040 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่กลั่นสองครั้ง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้กรดโฟลิกละลายจนหมด ปรับ pH ให้เป็นกลาง โดยใช้สารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล
2. เติม ascorbic acid ลงในสารละลายเพื่อเป็น antioxidant ให้ความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีกรดโฟลิกอยู่ 3.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายมาตรฐานด้วยกระดาษกรอง

ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ทหนา 0.22 ไมโครเมตร เก็บสารละลายมาตรฐานในขวดสีชา เพื่อป้องกันไม่ให้แสงทำลายกรดโฟลิก นำขวดสารละลายไปเก็บใน freezer ที่อุณหภูมิต่ำ -18 องศาเซลเซียส

4. ปิเปิดสารละลายมาตรฐาน 5.00, 2.50 และ 1.25 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เจือจางให้ถึงปริมาตรโดยใช้ น้ำกลั่นที่มี ascorbic acid อยู่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ทหนา 0.22 ไมโครเมตร จะได้สารละลายความเข้มข้น 1.88, 0.94 และ 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

B. การเตรียม Mobile - phase : Methanol - H₂O - Pic A

เตรียมตามวิธีการซึ่งอธิบายไว้ใน Bulletin F.61. (Water Assoc., 1976) โดยเตรียมเป็น 2 ชุด เพื่อใช้กับ pump A และ B ในการ run gradient

pump A - 30% Methanol ในน้ำ + Pic A เข้มข้น 0.005 โมลาร์

pump B - 50% Methanol ในน้ำ + Pic A เข้มข้น 0.005 โมลาร์

C. การเตรียมสารละลายตัวอย่างของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer และน้ำแอปเปิล

สารละลายตัวอย่างของกรดโฟลิกใน citrate-phosphate buffer และในน้ำแอปเปิลที่ผ่านการให้ความร้อน มีปริมาณน้อย จึงควรกรองสารละลายตัวอย่างทุกตัวด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 ไมโครเมตร ทหนา 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำไปบรรจุหลอด หลังจากการทดลองแล้วสามารถนำไปวิเคราะห์ที่ใดที่หนึ่งโดยไม่ต้องกรองอีก

D. การทำ Liquid Chromatography

1. run gradient ที่ 20% ของ pump B นาน 5 นาที หลังจากนั้นเพิ่ม % Methanol ของ pump B ด้วยอัตรา 5% ต่อนาที จนถึง 40% การไหลของ Mobile phase 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน 180 กิโลกรัมต่อตาราง เซนติเมตร

2. ฉีดสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ครั้งละ 25 ไมโครลิตร โดยใช้ microsyringe ขนาด 250 ไมโครลิตร (Scientific Glass Engineering PTY. LTD., AUSTRALIA) reset ประมาณ 5 นาที จึงฉีดตัวอย่างใหม่

3. กรดโฟลิกในสารละลายตัวอย่างจะถูกแยกออกโดย HPLC ส่วนปริมาณสามารถหาได้จากการวัด absorption ที่ 285 นาโนเมตร ด้วย UV detector

4. บันทึกเป็น peak พร้อม peak area โดยใช้ recorder integrator

5. ล้าง column ด้วยน้ำกลั่นแล้วตามด้วย Methanol เมื่อเสร็จการทดลองเพื่อยืดอายุการใช้งานของ column

การคำนวณ

ตัวเลขของ peak area จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่าง โดยการทำให้ regression analysis หาค่า Correlation Coefficient ได้ = 0.99082 นำมา plot standard curve ของสารละลายมาตรฐานก่อนแล้วจึงหาจำนวนไมโครกรัมของกรดโฟลิกในสารละลายตัวอย่าง

การเตรียม Citrate-phosphate buffer (Dawson และ Mckenzie, 1969)

Stock Solution

A : สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 19.21 กรัมในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร)

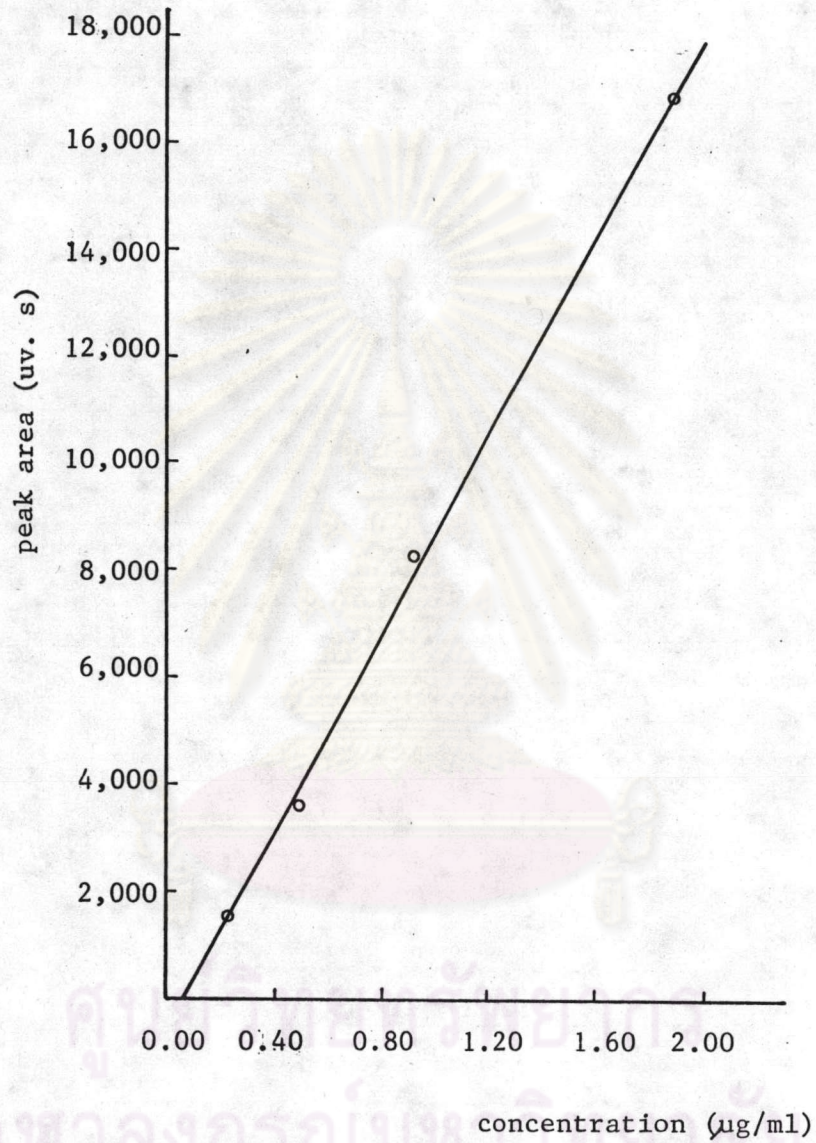
B : สารละลายไดเบสิก โซเดียม ฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 71.7 กรัมในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร)

เตรียม citrate-phosphate buffer ที่ pH ต่าง ๆ ได้จากการใช้ stock solution A จำนวน X มิลลิตร ร่วมกับ stock solution B จำนวน Y มิลลิตร และเจือจางให้เป็น 100 มิลลิตร จะได้สารละลายที่ pH ต่าง ๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาตรของ stock solution A และ B ที่ใช้เตรียม citrate - phosphate buffer pH ต่าง ๆ

pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
X (มิลลิตร)	39.8	30.7	24.3	17.9	6.5
Y (มิลลิตร)	10.2	19.3	25.7	32.1	43.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



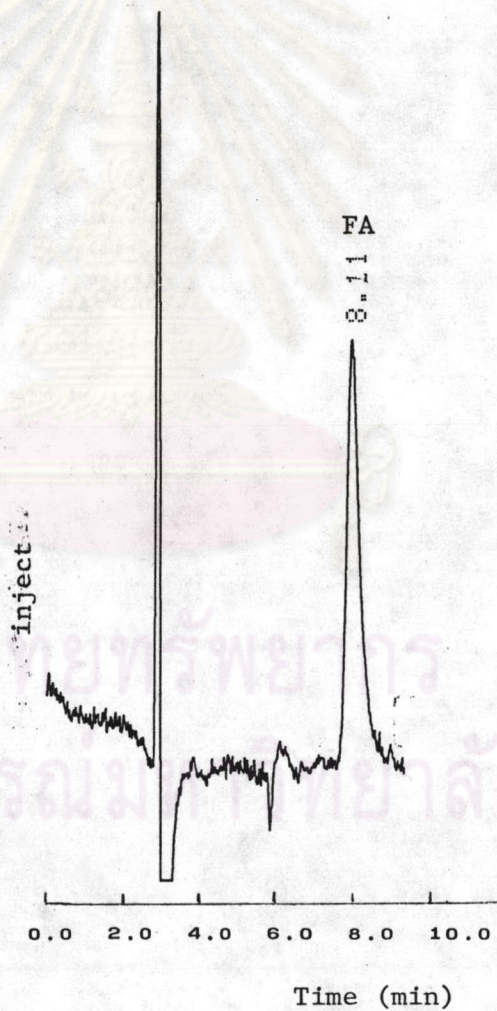
รูปที่ 2 standard curve ของปริมาณกรดฟอลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับ peak area ในโครมาโตแกรมของ HPLC

ตัวอย่างโครมาโตแกรมของกรดโฟลิกที่สภาวะต่าง ๆ

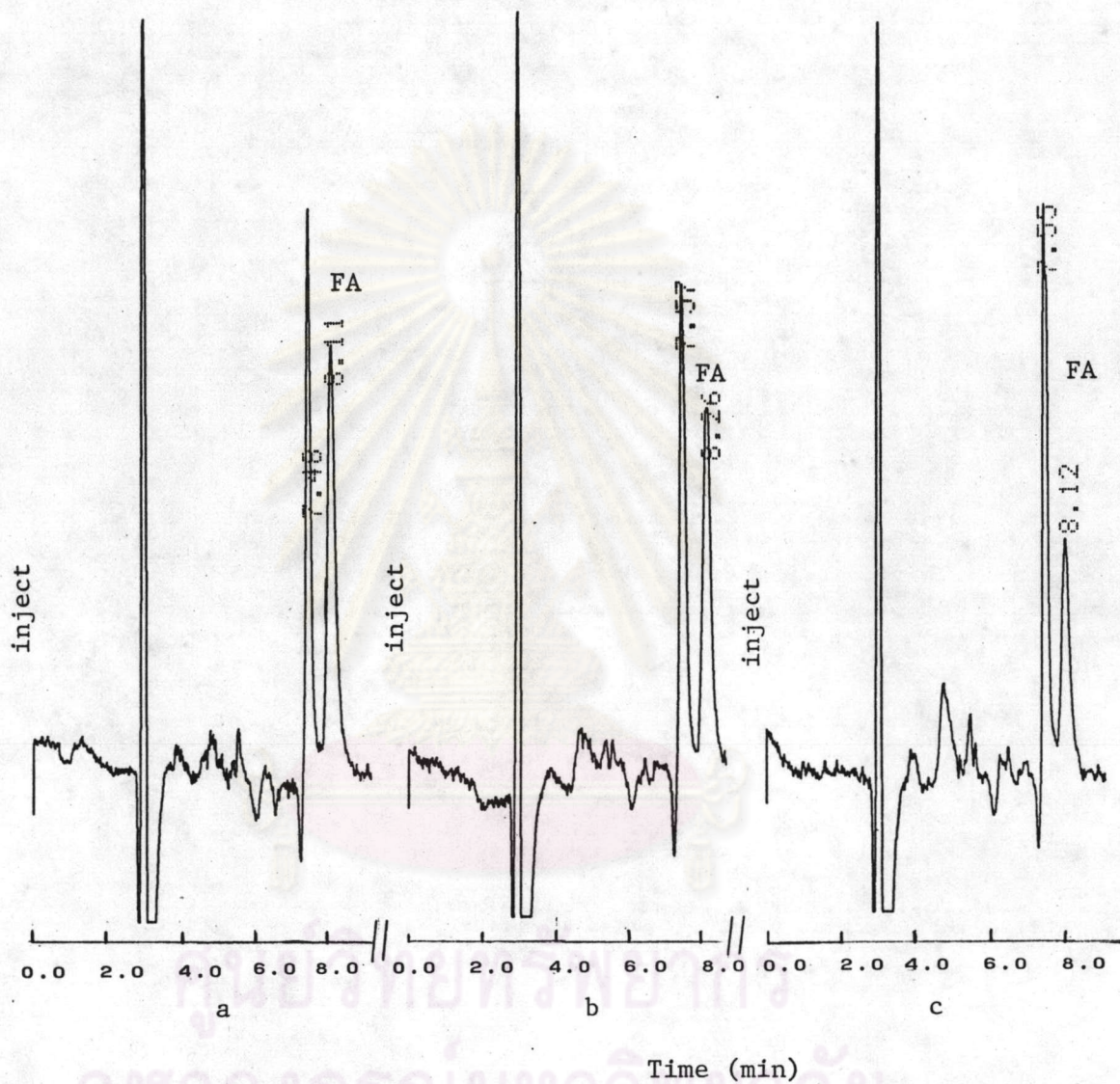
โครมาโตแกรมทุกรูปได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC ที่ condition เหมือนกัน คือ flow rate = 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความดัน 180 กิโลกรัมต่อตาราง เซนติเมตร ปริมาตรที่ฉีด = 25 ไมโครลิตร

ตัวเลขบน peak แสดง retention time (นาที)

FA = Folic acid



รูปที่ 3 โครมาโตแกรมของกรดโฟลิกในสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

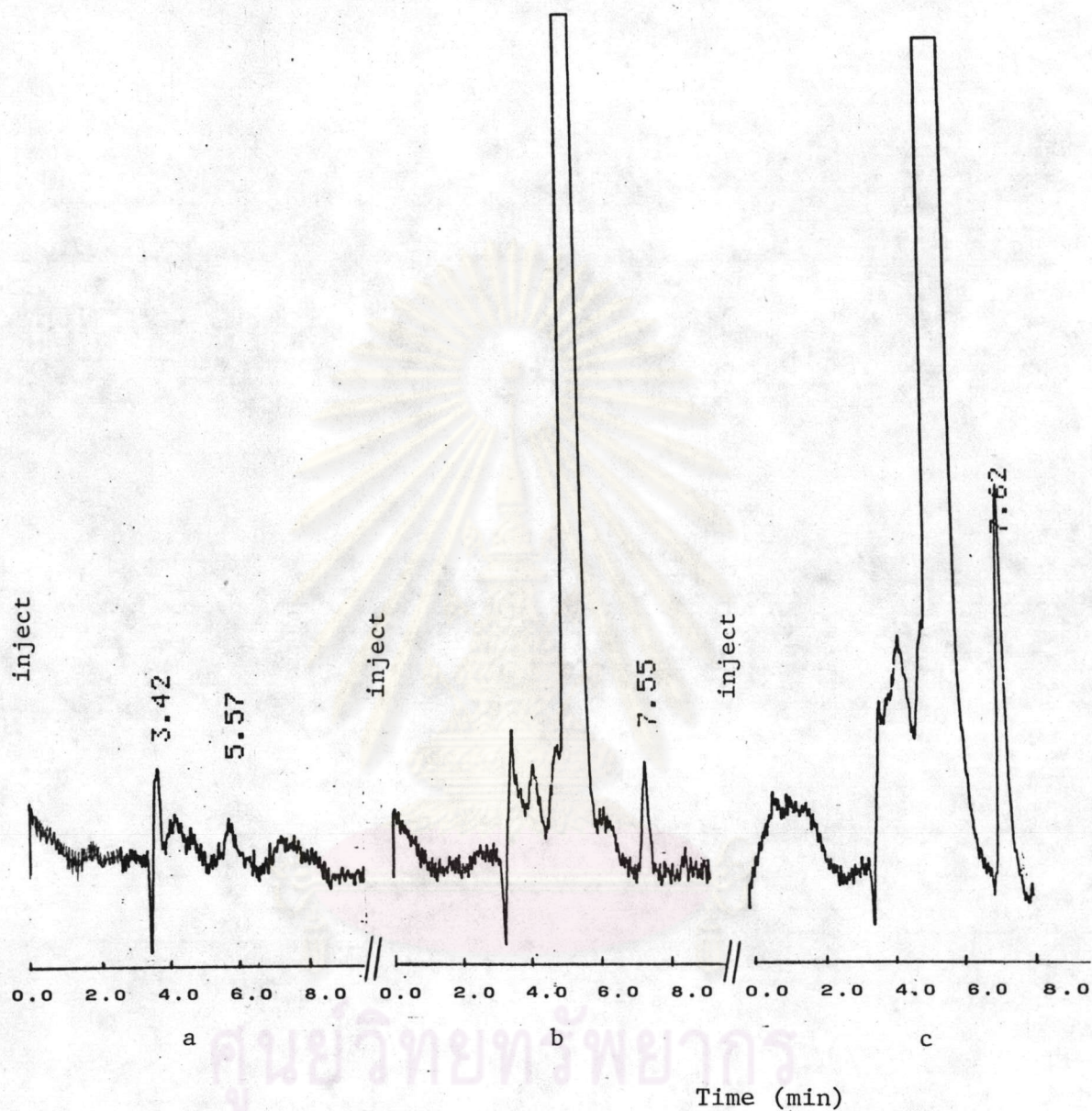


รูปที่ 4 โคโรมาโตแกรมของกรดไขมันใน citrate-phosphate buffer pH 4.00

a. control

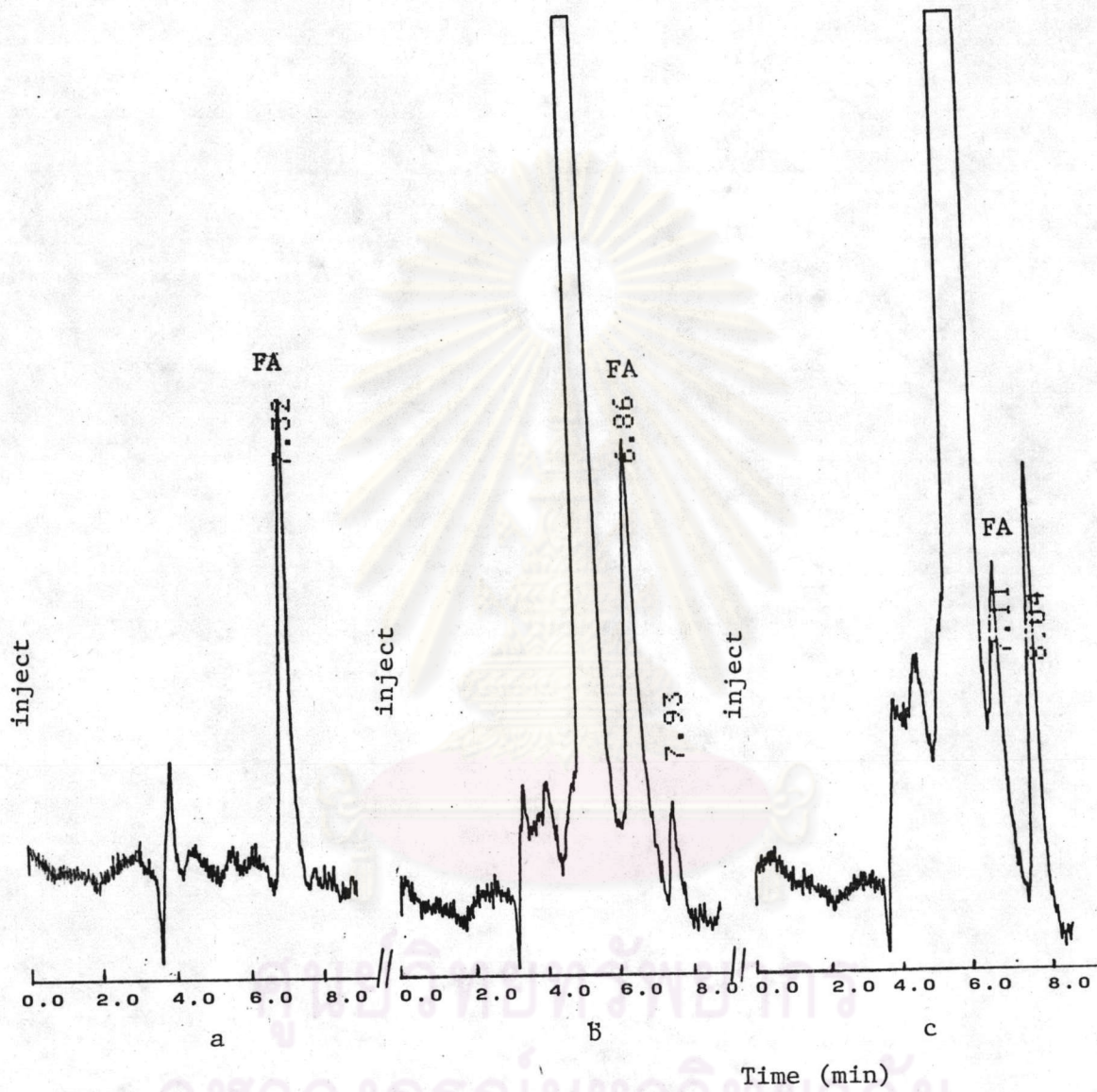
b. เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

c. เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 7 ชั่วโมง



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของน้ำแอมเปิล

- a น้ำแอมเปิลสด
- b น้ำแอมเปิล เมื่อได้รับความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง
- c น้ำแอมเปิล เมื่อได้รับความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง



รูปที่ 6 โครมาโตแกรมของกรดไขมันในน้ำแอมเปิล

a control

b เมื่อได้รับความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง

c เมื่อได้รับความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟอสฟอริกที่สภาวะต่าง ๆ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกใน citrate-phosphate buffer (pH 4.00)
ก่อนและหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
100	0	1.68483
	360	1.45049
	720	1.33268
	1,080	1.05674
	1,440	0.87788
110	0	1.57049
	300	1.29875
	600	1.09535
	900	0.91347
	1,200	0.69752
120	0	1.66381
	180	1.23570
	420	0.93108
	540	0.81072
	720	0.67503

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกใน citrate-phosphate buffer ที่ pH ต่าง ๆ ก่อนและหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	pH	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
120	3.01	0	1.69295
		120	1.31096
		240	1.02196
		360	0.93006
		480	0.51971
	4.02	0	1.66120
		180	1.30534
		360	1.05503
		540	0.85457
		720	0.68184
	5.01	0	1.68715
		240	1.65478
		480	1.53511
		720	1.46234
		960	1.32545

ศูนย์วิทยุทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกใน citrate-phosphate buffer (pH 4.02)
ก่อนและหลังจากการให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ กัน
โดยมี ascorbic acid 0.1320 มิลลิกรัม/กรัม

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
120	0	1.60850
	180	1.47217
	360	1.26024
	540	1.19589
	720	1.13119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกในน้ำแอมป์ เบิลสด (PH 4.17) ก่อนและหลังจาก
การให้ความร้อนที่อุณหภูมิและ เวลาต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
100	0	1.57482
	480	1.33938
	960	1.18656
	1,440	1.02181
110	0	1.56168
	420	1.22909
	840	1.01696
	1,260	0.85586
120	0	1.56365
	240	1.17114
	480	0.81347
	720	0.47702

ตารางที่ 7 Thermal lag, ค่าเฉลี่ยและส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานของอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดฟอสฟอริกใน citrate - phosphate buffer (pH 4.00)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน ของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Thermal lag (นาที)
100	99.86	0.24	0.75
110	110.06	0.30	0.83
120	119.82	0.29	0.66

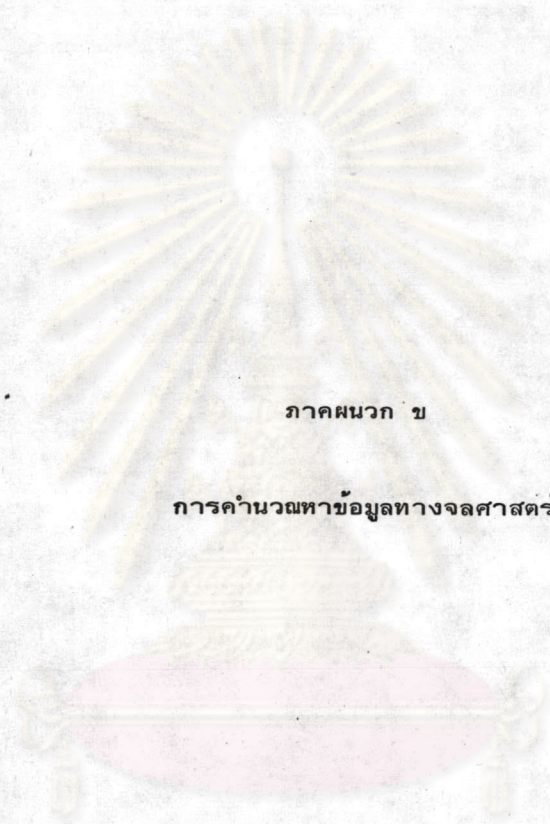
ตารางที่ 8 Thermal lag, ค่าเฉลี่ยและส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานของอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดฟอสฟอริกใน citrate-phosphate buffer ที่ pH 3.01, 4.02, 5.01 และใน pH 4.02 ที่มี ascorbic acid อยู่ 0.1320 มิลลิกรัม/กรัม

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน ของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Thermal lag (นาที)
120 (pH 3.01)	119.86	0.30	0.83
120 (pH 4.02)	120.13	0.39	0.92
120 (pH 5.01)	120.12	0.36	0.87
120 (pH 4.02) มี ascorbic acid	119.86	0.15	0.85

ตารางที่ ๑ Thermal lag, ค่าเฉลี่ยและส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานของอุณหภูมิต่าง ๆ
ที่ใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดฟอสฟอริกที่ เดิมลงในน้ำ
แอปเปิลสด (pH 4.17)

อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน ของอุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	Thermal lag (นาที)
100	100.14	0.34	0.82
110	110.06	0.21	0.70
120	119.91	0.40	0.65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ข

การคำนวณหาข้อมูลทางจลศาสตร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การหา slope ของ regression line (จันทลักขณา, 1980, อุบัติสสกุล, 1980, Steel และ Torrie, 1980)

1. Regression line ที่ไม่ผ่าน origin สำหรับ standard curve และ Arrhenius plot.

สมการเส้นตรง:

$$y_i = a + bx_i$$

a = intercept บนแกน y

b = regression coefficient หรือ slope ของ regression

x_i = ตัวแปรอิสระ

y_i = ตัวแปรตาม

จากหลักของ least squares คำนวณหาค่า b ได้จากสูตรต่อไปนี้

$$b = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}$$

n = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

2. regression line ที่ผ่าน origin สำหรับการหาค่า reaction rate constant (k)

สมการเส้นตรงจะแทนด้วย $y_i = bx_i$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2}$$

การหาค่า Correlation Coefficient (r,R)

จากสมการเส้นตรง

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)\left(\sum_{i=1}^n y_i\right) / n}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}\right] \left[\sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n y_i\right)^2}{n}\right]}}$$

ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน ช่วง เชื่อมัน และการตรวจสอบสมมติฐาน

1. กรณี regression line ไม่ผ่าน origin

ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานของ slope, S_b หาได้ตามขั้นตอนดังนี้

1.1 คำนวณ residual sum of square หรือ error sum of square, SSE

$$SSE = S_{yy} - b S_{xy}$$

$$\text{โดย } S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

1.2 จำนวน residual mean square, S^2

$$S^2 = \frac{SSE}{n-2}$$

ซึ่ง $n-2$ เป็น df. โดยที่ n คือจำนวนข้อมูลทั้งหมด การใช้ df. เป็น $n-2$ เนื่องจากหักค่าเฉลี่ย (mean) 1 และค่า regression coefficient

(b) 1

1.3 หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ b , S_b

$$S_b = \frac{S^2}{S_{xx}}$$

$$\text{โดย } S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}$$

ช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของ $b = b \pm t_{0.05, n-2} S_b$

การตรวจสอบ null hypothesis $H_0 : b = 0$ ใช้ t-test
เปรียบเทียบค่า t ที่คำนวณได้กับ t จากตารางโดยใช้ $df. = n-2$

$$t \text{ คำนวณ, } n-2 = \frac{b}{S_b}$$

2. กรณี regression line ผ่าน origin

$$SSE = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i y_i\right)^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2}$$

$$S^2 = \frac{SSE}{n-1}$$

ใช้ df. เป็น n-1 เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า mean

$$S_b = \sqrt{\frac{S^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2}}$$

หาช่วงเชื่อมั่นและตรวจสอบสมมติฐานโดยวิธีเดียวกับกรณี regression line ไม่ผ่าน origin แต่ df. สำหรับค่า t = n-1

3. การตรวจสอบสมมติฐานสำหรับค่า correlation coefficient

$$H_0 : r = 0$$

ใช้ t-test คำนวณ t จากสูตร

$$t = \frac{r}{\sqrt{(1-r^2)/(n-2)}}, \text{ df.} = (n-2)$$

การทดสอบความแตกต่างนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย Correlation Coefficient ระหว่าง
ปฏิบัติการอันดับศูนย์กับปฏิบัติการอันดับหนึ่ง หรือปฏิบัติการอันดับหนึ่งกับปฏิบัติการอันดับสอง

ใช้ t-test ดังตัวอย่างการทดสอบความแตกต่างนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่าง
ปฏิบัติการอันดับหนึ่งและปฏิบัติการอันดับสองของข้อมูลในตาราง 4.1

อันดับของปฏิบัติการ	ค่าเฉลี่ย Correlation Coefficient (R^2)	ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน (S)	จำนวนข้อมูล (n)
ปฏิบัติการอันดับหนึ่ง	0.950	0.011	3
ปฏิบัติการอันดับสอง	0.922	0.013	3

$$S_c = \frac{S_1^2 (n_1 - 1) + S_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$= \frac{2(0.011)^2 + 2(0.013)^2}{4}$$

$$= 0.0121$$

$$S.E. = 0.0121 \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

$$= 0.010$$

$$\begin{aligned}
 t &= \frac{\bar{R}_1 - \bar{R}_2}{\text{S.E.}} \\
 &= \frac{0.950 - 0.922}{0.010} \\
 &= 2.800
 \end{aligned}$$

จากตาราง t-distribution ที่ $t_{\frac{\alpha}{2}, n-2}$

$$t_{0.25,4} = 2.776$$

ดังนั้น ค่าเฉลี่ยของ Correlation Coefficient ของปฏิกริยาอันดับหนึ่ง และปฏิกริยาอันดับสอง มีความแตกต่างกับที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวอารี ตั้งบุญธินา
วัน เดือน ปี เกิด 25 มีนาคม พ.ศ. 2497
การศึกษา 2521 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2521 - ปัจจุบัน วิทยาลัยเทคโนโลยีและอาชีวศึกษา
วิทยาเขต เกษตรปทุมธานี



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย