



โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบวิตามินซีในน้ำผลไม้
(Development of test kit for determination of
vitamin C in fruit juices)

ผู้วิจัย

ดร.ศิริวรรณ ตี๋ภู

ดร.อมร ไชยสัตย์

นายปรีชา มั่นสลาย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

สิงหาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจสอบวิตามินซีในน้ำผลไม้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ทีมผู้วิจัยขอขอบคุณ
สภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
ราชมงคลธัญบุรี ที่สนับสนุนปัจจัยต่างๆในการดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณนางสาวสุริยาภา จงจินากุล นายเกรียงไกร จันตุ และนายวิรัตน์ น้อยกลัด นักศึกษาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ช่วยในการดำเนินงานและ
รวบรวมข้อมูลงานวิจัยส่วนหนึ่ง และขอขอบคุณอาจารย์พงษ์นรินทร์ ชุมแสง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทำ
ชุดทดสอบ

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการ และผู้สนับสนุนงานวิจัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำจนทำให้
งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

สิงหาคม 2555

คำนำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบวิตามินซีในน้ำผลไม้เป็นโครงการวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่มและน้ำผลไม้สด โดยใช้ชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นมา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าชุดทดสอบสามารถวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีได้ในช่วงความเข้มข้น 1×10^{-5} - 5×10^{-3} M โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที และสามารถนำชุดทดสอบไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างจริงได้ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธีที่ใช้ทั่วไป แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมามีประสิทธิภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปริมาณวิตามินซีเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้พร้อมดื่มและน้ำผลไม้สด

ทีมผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ทั้งในด้านการศึกษาและอุตสาหกรรม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆต่อไป

ผู้วิจัย

สิงหาคม 2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบสำหรับหาปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้ เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็วและมีความถูกต้องสูง โดยได้สร้างเป็นชุดทดสอบภาคสนามใช้หลักการเกิดสีของ Prussian blue วิตามินซีจะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ Fe^{3+} ให้กลายเป็น Fe^{2+} เพื่อทำปฏิกิริยากับ $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{4-}$ ได้เป็นสารละลาย Prussian blue ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำเงิน และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 709 นาโนเมตร ศึกษาหาสภาวะต่างๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดทดสอบ เช่น ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ความเข้มข้นของ $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{4-}$ พีเอชของสารละลายและผลของตัวรบกวนต่างๆ เพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้ชุดทดสอบที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง มีความเที่ยง และความแม่นยำสูง เมื่อนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้ คั้นสดและน้ำผลไม้พร้อมดื่ม ผลการทดลองที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไทเทรตพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน โดยที่ชุดทดสอบมีข้อดีกว่าคือใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 10 นาที ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ราคาถูกและสามารถนำไปวิเคราะห์ในภาคสนามได้

คำสำคัญ ชุดทดสอบ วิตามินซี น้ำผลไม้

ABSTRACT

This research fabricated a test kit for detection of vitamin C to approach a fast and rapid analytical method. The test kit was established by using Prussian blue. The ferric chloride was reduced by vitamin C and then reacted with potassium ferricyanide to form a blue solution of Prussian blue. The developed color was monitored at absorption wavelength of 709 nm. Optimum conditions effective the performance of the test kit were studied including Fe^{3+} concentration, $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{-4}$ concentration, pH and interferences to enhance the test kit performance. Under optimum condition the test kit provided wide linear range, high precision and accuracy. It has been successfully applied to analyze the vitamin C in fruit juices and the results were compared well to the standard titration method. The advantages of this test kit are short analysis time (10 min), without any sample preparation steps, low cost and easy to carry it for analytical on field.

Keyword Test kit, Vitamin C, Fruit juices

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ปัญหาและที่มา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 วิตามินซี	3
2.2 น้ำผลไม้พร้อมดื่ม	3
2.3 วิธีวิเคราะห์ห้วิตามินซีทั่วไป	4
2.4 ชุดทดสอบวิตามินซี	4
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	7
3.1 สารเคมี	7
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	7
3.3 ศึกษาการเกิด Prussian blue	7
3.4 การเตรียม Prussian blue โดยใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์	8
3.5 ศึกษาความเสถียร	8
3.6 ศึกษาความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่เหมาะสม	8
3.7 ศึกษาความเข้มข้นของ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ที่เหมาะสม	8
3.8 ศึกษาผลของ pH	8
3.9 ศึกษาผลของตัวรบกวน (Interference)	9
3.9.1 ใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี	9
3.9.2 ผสม Prussian blue กับตัวรบกวน	9

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.10 ศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบวิตามินซี	9
3.10.1 ช่วงความเข้มข้นของวิตามินซี	
3.10.2 ศึกษาการทำซ้ำของการวิเคราะห์ (Repeatability)	10
3.10.3 ศึกษาการทวนซ้ำของการวิเคราะห์ (Reproducibility)	10
3.10.4 ศึกษาค่าความถูกต้อง (Accuracy)	10
3.11 สร้างชุดทดสอบวิตามินซี ในน้ำผลไม้	11
3.11.1 เตรียมแถบสีมาตรฐาน	11
3.11.2 ออกแบบชุดทดสอบ	11
3.12 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้	11
3.12.1 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้กั้นสด	11
3.12.2 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้พร้อมดื่ม	11
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	12
4.1 ผลการศึกษาการเกิด Prussian blue	12
4.2 ผลการศึกษา Prussian blue จาก วิตามินซี	12
4.3 ผลการศึกษาความเสถียรของ Prussian blue	13
4.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่เหมาะสม	15
4.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ที่เหมาะสม	17
4.6 ผลการศึกษาผลของ pH	18
4.7 ผลการศึกษาผลของตัวรบกวน (Interference)	19
4.7.1 ผลจากการใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี	19
4.7.2 ผลจากการผสม Prussian blue กับตัวรบกวน	20
4.8 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบวิตามินซี	22
4.8.1 ช่วงความเข้มข้นของวิตามินซี	22
4.8.2 ผลการศึกษาข้อจำกัดการทำซ้ำ (Repeatability)	22
4.8.3 ผลการศึกษาข้อจำกัดการทวนซ้ำของวิธี (Reproducibility)	23
4.8.3 ผลการศึกษาค่าความถูกต้อง (Accuracy)	24
4.9 สร้างชุดทดสอบวิตามินซี ในน้ำผลไม้	24
4.9.1 ผลการเตรียมแถบสีมาตรฐาน	24
4.9.2 ผลการออกแบบชุดทดสอบ	25

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.10 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้	26
4.10.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้คั้นสด	26
4.10.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้พร้อมดื่ม	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	28
5.1 สรุปผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างทางเคมีของกรดแอสคอร์บิก	1
2.1	โครงสร้างของ Prussian blue	5
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น ของ Prussian blue	12
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น ของ Prussian blue ที่ได้จากการใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์	13
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เวลาต่างๆ	15
4.4	การเปรียบเทียบสีของสารละลาย Prussian blue ที่ pH ต่างๆ	18
4.5	กราฟแผนภูมิแท่งแสดงผลการจากการใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี	20
4.6	กราฟแผนภูมิแท่งแสดงผลการจากการผสม Prussian blue กับตัวรบกวน	21
4.7	สารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีในช่วงความเข้มข้นต่างๆ	22
4.8	แถบสีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีด้วยชุดทดสอบ	25
4.9	ชุดทดสอบวิตามินซีในน้ำผลไม้	26

สารบัญตาราง

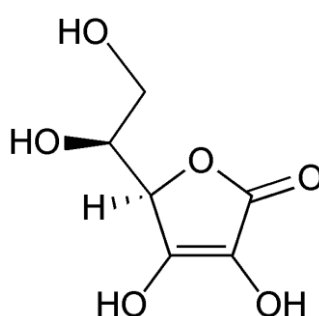
ตารางที่	หน้า	
3.1	ศึกษาผลของตัวรบกวน	9
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่เกิดจากวิตามินซีที่เวลาต่างๆ โดยวัดที่ความยาวคลื่นที่ 709 นาโนเมตร	12
4.2	แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ FeCl ₃ โดยใช้ วิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ และใช้K ₃ [Fe(CN) ₆] เป็น 5 เท่าของ FeCl ₃	16
4.3	แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ FeCl ₃ : K ₃ [Fe(CN) ₆] ที่อัตราส่วน 1:3 1:5 และ1:7เท่าโดยใช้วิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ	17
4.4	ค่าการดูดกลืนคลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่ pH ต่างๆ	18
4.5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารรบกวนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการใส่ตัวรบกวนแทนวิตามินซี	19
4.6	ค่าการดูดกลืนแสงของสารรบกวนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการผสม Prussian blue กับตัวรบกวน	21
4.7	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีความเข้มข้น 5X10 ⁻⁴ M ที่สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยทำการวัดซ้ำกัน 6 ครั้ง	23
4.8	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีความเข้มข้น 5X10 ⁻⁴ M ที่สภาวะการทดลองแตกต่างกัน	23
4.9	การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีที่หาได้จากชุดทดสอบกับวิธีไทเทรต	24
4.10	การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้คั้นสดที่หาได้จากชุดทดสอบกับวิธีไทเทรต	27
4.11	การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่หาได้จากชุดทดสอบกับวิธีไทเทรต	28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหาและที่มา

วิตามินซี (อังกฤษ: vitamin C) หรือ กรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของวิตามินซี

วิตามินซีเป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ ร่างกายจึงได้รับวิตามินซีจากการบริโภคเท่านั้น แหล่งของวิตามินซี อยู่ในพืช ผัก ผลไม้ ที่มี รสเปรี้ยว วิตามินซี เป็นสารที่สลายตัวง่าย เมื่อมีความร้อน โลหะหนัก และ ascorbic oxidase enzyme ที่มีอยู่ในผลไม้ ประโยชน์ของวิตามินซี มีบทบาทกว้างขวางในหลายระบบได้แก่ Hydroxylation ของ prolin เพื่อสร้าง collagen ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกระดูก กระดูกอ่อน ฟันและผนังเส้นเลือด , ฤทธิ์ฆ่าเชื้อของเม็ดเลือดขาว, การ reduce เหล็กจาก ferric เป็น ferrous ในกระเพาะอาหาร ช่วยเพิ่มการดูดซึมของเหล็ก antioxidant เป็นต้น หากขาด วิตามินซี ผู้ป่วยจะมีอาการแสดงของการมีเลือดออกตามไรฟัน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เหงือกบวม ฟันหลุดง่าย และแสดงอาการของโรคกระดูกเปราะแตกหักง่าย หากไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้ตายได้ ทารกที่ขาดวิตามิน ซี จะทำให้ร่างกายไม่เจริญเติบโต มีเลือดออกตามเหงือก และผิวหนัง มีความบกพร่องในการเจริญเติบโตของกระดูก และอาจเป็นโรคโลหิตจางได้ การใช้ที่ไม่เหมาะสม ของวิตามินซี ในการรักษาโรคต่อไปนี้ ยังไม่เป็นที่ยอมรับทางการแพทย์ เช่น โรคมะเร็ง เหงือกอักเสบ โรคติดเชื้อ bleeding ฟันผุ โลหิตจาง สิว เป็นหมัน ชะลอความแก่ หลอดเลือดแข็ง และโรคหัวใจห้ามใช้ของวิตามินซีวิตามินซี ห้ามใช้กับยาจำพวกกันเลือดแข็ง เช่น wafarin sodium เพราะจะทำให้เลือดออกมากขึ้น และหากรับประทานวิตามินซีมากเกินไป อาจทำให้เกิดเป็นโรคนิ่วในไต เนื่องจากกรดออกซาลิกที่มีมากขึ้นในปัสสาวะ

ดังนั้นในปัจจุบันทำให้มีผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีส่วนผสมของวิตามิน ซี ผลิตออกมาจำหน่ายในรูปของน้ำผลไม้บรรจุในกล่องหรือขวดพร้อมบริโภค ได้แก่ น้ำผลไม้กระป๋อง ที่ผลิตจากส้ม สับปะรด หรือฝรั่ง ในประเทศไทยธุรกิจผลิตน้ำผลไม้มีแนวโน้มขยายตัวค่อนข้างสูง เพราะเป็นประเทศเกษตรกรรม มีผลไม้ตามฤดูกาลหลากหลาย ทั้งผลิตเพื่อขายในประเทศและเพื่อส่งออกขายนอกประเทศ เช่น จีนฮ่องกง และยุโรปทำให้มูลค่าทางการตลาดในน้ำผลไม้สูงถึง 6,000 ล้านบาทต่อปี โดยในจำนวนนี้แบ่งเป็นน้ำผลไม้ 100% มูลค่า 2,500 ล้านบาท น้ำผลไม้ผสมต่ำกว่า 40% มูลค่า 500 ล้านบาท และน้ำผลไม้ต่ำกว่า 25% มูลค่า 3,000 ล้านบาท วิตามินซีในน้ำผลไม้ทั่วไปได้มาจากผลไม้ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตน้ำผลไม้หรือบางครั้งได้มาจากการเติมกรดแอสคอร์บิก ลงไปในระหว่างการผลิตน้ำผลไม้เพื่อเพิ่มปริมาณวิตามินให้มากขึ้น วิตามินซี มีสมบัติสลายตัวได้เร็วเมื่อโดนแสงแดด ทำให้ปริมาณวิตามินที่อยู่ในน้ำผลไม้ไม่ว่าจะได้มาจากผลไม้หรือจากการเติมกรดแอสคอร์บิกก็สามารถสลายตัวหรือหายไประหว่างกระบวนการผลิตได้ ทำให้ปริมาณที่ระบุข้างขวดน้ำผลไม้พร้อมดื่มอาจจะไม่ตรงกับปริมาณวิตามินซีที่มีอยู่จริงในขณะนั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินซีในน้ำผลไม้ วิธีทั่วไปที่ใช้ในปัจจุบันคือ การไทเทรต แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีข้อด้อย เช่น ต้องอาศัยผู้ทำการวิเคราะห์ที่มีความชำนาญสูง ใช้สารเคมีในปริมาณมากและมีความเป็นพิษ ไม่สามารถวิเคราะห์ในภาคสนามได้ ต้องส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบวิตามินซีที่มีความสะดวกรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ได้ในภาคสนาม มีราคาถูกและใช้งานง่ายสามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวเอง ไม่ต้องส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาแนวทางการสร้างชุดตรวจสอบวิตามินซี
- 1.2.2 เพื่อพัฒนาเครื่องต้นแบบสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน ซี โดยใช้หลักการทางแสง
- 1.3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน ซี เช่น ความเข้มข้นของสารเคมี เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา
- 1.3.3 หาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ เช่น ขีดจำกัดการตรวจวัด ช่วงความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง และความถูกต้องของวิธี ร้อยละการได้กลับคืนของวิธี
- 1.3.4 นำวิธีที่พัฒนาขึ้นสร้างเป็นชุดตรวจสอบภาคสนาม
- 1.3.5 หาปริมาณวิตามิน ซี ในน้ำผลไม้พร้อมดื่มด้วยชุดตรวจสอบวิตามิน ซี ที่พัฒนาขึ้นและเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีที่ใช้ทั่วไปคือวิธีการไทเทรตโดยใช้สถิติเป็นตัวทดสอบข้อมูล

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ประวัติการค้นพบ วิตามินซี เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่สมัย ศตวรรษที่ 18 มีการสังเกตว่าพวกทหารเรือที่มีการรอนแรมออกเดินเรือไปในทะเลเป็นเวลานานๆ ซึ่งมักจะขาดแคลนพวกผักสดผลไม้สด จะป่วยเป็นโรค ลักปิดลักเปิด และสุขภาพไม่ค่อยดี มีอาการอ่อนเพลีย อยู่บ่อยๆ แต่ก็มีคนสังเกตเห็นว่าจะไม่พบอาการดังกล่าวในทหารเรือที่รับประทานมะนาวเป็นประจำ และเมื่อต่อมาความรู้ทางวิทยาศาสตร์ก้าวหน้ามากขึ้น ในปี 1982 ก็สามารถหาสารอาหารสำคัญที่เป็นต้นเหตุของโรคดังกล่าวได้ว่าสารที่พวกทหารเรือขาดไปคือ “กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)” ซึ่งมันมีฤทธิ์สามารถช่วยรักษาโรคลักปิดลักเปิดได้ ในปัจจุบัน กรดแอสคอร์บิก ก็ถูกรู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อของ “วิตามินซี”

2.1 วิตามินซี

วิตามินซีประกอบด้วยธาตุคาร์บอน C ไฮโดรเจน H และออกซิเจน O สูตรโมเลกุลคือ $C_6H_8O_6$ ดังรูปที่ 1.1 สลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสง ความร้อนและอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานะที่เป็นผงและมีไอออนของเหล็กหรือทองแดงเป็นตัวเร่ง เมื่อวิตามินซีเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเสีย 2 อิเล็กตรอนและ 2 ไฮโดรเจน ไอออนกลายเป็น Dehydroascorbic acid วิตามินซีที่ร่างกายนำไปใช้จะมีโครงสร้างแบบ L เรียกว่า L-Ascorbic acid เมื่อเกิดออกซิเดชันจะกลายเป็น L-Dehydroascorbic acid ทั้งสองมีประโยชน์ต่อร่างกายเหมือนกัน แต่ถ้าหากว่าเกิดเปลี่ยนโครงสร้างมาเป็น diketo-L-gulonic acid จะสูญเสียหน้าที่ทางชีวภาพทันที สารนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าวิตามินในอาหารสลายตัวมากน้อยเพียงใด

วิตามินซี เป็นสารที่สำคัญต่อการสร้างกระดูก กล้ามเนื้อ ผิวหนังและฟัน นอกจากนี้ยังช่วยในการรักษาโรคต่างๆ เช่น ไข้หวัด เป็นต้น ทำให้ในปัจจุบันได้มีผลิตภัณฑ์หรืออาหารเสริมต่างๆ ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อช่วยเสริมวิตามินซี ให้แก่ร่างกาย ผลิตภัณฑ์อาหารเช่น น้ำผลไม้พร้อมดื่ม

2.2 น้ำผลไม้พร้อมดื่ม

น้ำผลไม้สามารถเตรียมขึ้นเองหรือมีขายในบรรจุภัณฑ์ต่างๆ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 215) พ.ศ.2543 ได้กำหนดมาตรฐาน “น้ำผลไม้” ในบรรจุภัณฑ์ให้เป็นเครื่องดื่มที่มีหรือทำจากผลไม้ พืชหรือผัก เป็นเครื่องดื่มไม่ว่าจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือออกซิเจนผสมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ตาม และเป็นเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท รวมทั้งเป็นอาหารที่ควบคุมเฉพาะ คุณภาพน้ำผลไม้ นอกจากนี้ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้ เกิดโรคและไม่มีสารปนเปื้อนแล้ว การใช้น้ำตาลหรือวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาลให้เป็นไปตามมาตรฐาน Joint FAO/WHO Codex (http://cs.payap.ac.th/research/vitamin_c.pdf สืบค้นวันที่ 10 มกราคม 2554) โดยทั่วไปน้ำผลไม้จะมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก คาร์โบไฮเดรตในน้ำผลไม้จะเป็น

ผลรวมของน้ำตาล ซูโครส ฟรักโทส กลูโคส และซอร์บิทอล (sorbitol) โดยมีปริมาณระหว่าง 7 - 16 กรัมต่อ 100 ซีซี. มีโปรตีนและแร่ธาตุค่อนข้างน้อย น้ำผลไม้บาง ชนิดมีโพแทสเซียม วิตามินเอ โฟเลต และวิตามินซี สูง

จากการศึกษาของ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิภพ จิรภิญโญ และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์น้ำผลไม้ ในบรรจุภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด จำนวน 40 ชนิด พบว่ามีน้ำตาลซูโครส 2 - 112 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 - 48 กรัมต่อลิตร ฟรักโทส 5 - 75 กรัมต่อลิตร และพบน้ำตาล ซอร์บิทอลมากที่สุดในน้ำลูกพรุน (คือ 67 - 149 กรัมต่อลิตร) น้ำผลไม้ส่วนใหญ่มีค่าความเข้มข้น (วิเคราะห์จากค่าออสโมลาริตีระหว่าง 500 - 1200 มิลลิออสโมล ต่อลิตร) การศึกษาของแพทย์หญิงนฤมล เด่นทรัพย์-สุนทร และคณะ พบว่าน้ำผลไม้สดส่วนใหญ่ ไม่มีซูโครส (ยกเว้นน้ำส้ม น้ำแอปเปิ้ล น้ำสับปะรด) มีความเป็นกรดและปริมาณโซเดียมน้อยกว่า แต่มี โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียมในปริมาณมากกว่าน้ำผลไม้ (http://www.elib-online.com/doctors50/child_food001.html สืบค้นวันที่ 10 มกราคม 2554)

ในกระบวนการการผลิตน้ำผลไม้พร้อมดื่ม บางครั้งได้มีการเติมกรดแอสคอร์บิก ลงไปในช่วงการผลิตน้ำผลไม้เพื่อเพิ่มปริมาณวิตามินให้มากขึ้น ทั้งนี้เพราะสมบัติของวิตามินซีจะสามารถสลายตัวได้เร็วเมื่อโดนแสงแดด ทำให้ปริมาณวิตามินที่อยู่ในน้ำผลไม้ไม่ว่าจะได้มาจากผลไม้หรือจากการเติมกรดแอสคอร์บิกก็ตามสามารถสลายตัวหรือหายไประหว่างกระบวนการผลิตได้ ทำให้ปริมาณที่ระบุข้างขวดน้ำผลไม้พร้อมดื่มอาจจะไม่ตรงกับปริมาณวิตามินซีที่มีอยู่จริง ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบหาปริมาณวิตามินซีที่มีอยู่จริงในน้ำผลไม้พร้อมดื่มด้วยวิธีวิเคราะห์ต่างๆ

2.3 วิธีวิเคราะห์วิตามินซีทั่วไป

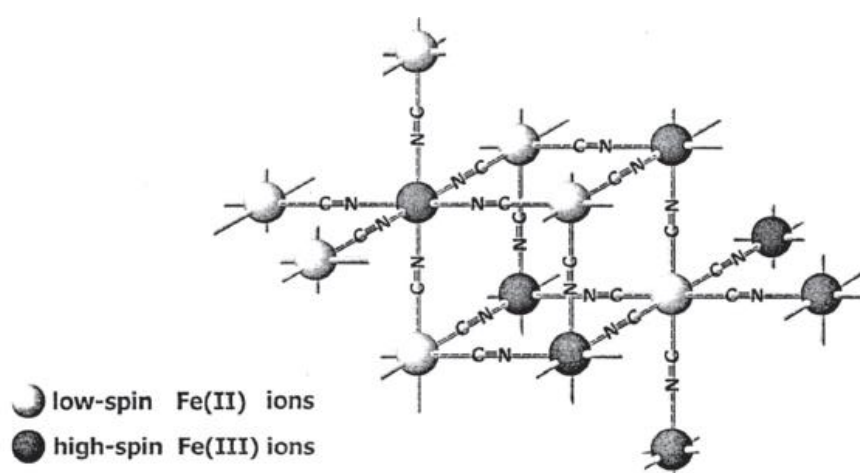
วิธีทั่วไปในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน ซี เช่น การไทเทรตกับไอโอดีน (Lenghor *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 1990; Rao and Sastry *et al.*, 1971) วิธีทางไฟฟ้าเคมี (Thangamuthu *et al.*, 2007; Pournaghi-Azar *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998) วิธีทางโครมาโทกราฟี (Odriozola-Serrano *et al.*, 2007; Fontannaz *et al.*, 2006) และวิธีทางแสง (Arya *et al.*, 2001; Grudpan *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 1986)

แต่พบว่าวิธีดังกล่าวมีข้อด้อย คือ เป็นวิธีที่ซับซ้อน ต้องอาศัยความชำนาญ มีหลายขั้นตอนและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบหาวิตามินซี ที่ง่าย ถูกต้อง สะดวกต่อการใช้งานและรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการเกิดสีของ Prussian blue

2.4 ชุดทดสอบวิตามินซี

ปรัสเซียนบลู (Prussian blue) เป็นสารให้สีน้ำเงินที่ใช้กันแพร่หลายในงานเขียนภาพมากกว่าสามร้อยปี เชื่อกันว่า ปรัสเซียนบลูถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อ ค.ศ.1706 โดยนักผสมสีจากกรุงเบอร์ลินชื่อ Johann Jacob Diesbach ปรัสเซียนบลูมีลักษณะเป็นผงคริสตัลละเอียดสีน้ำเงินเข้ม ไม่ละลายน้ำ ภายหลังจาก

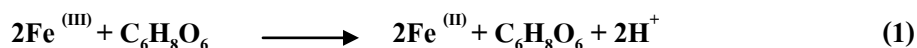
พบว่า เป็นสารประกอบของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ กับ Fe^{III} โครงสร้างและการเกิดพันธะเคมีของสารละลาย Prussian blue เกิดขึ้นโดยโครงสร้างพื้นฐานจะเป็นแบบตาข่ายพอลิเมอร์ three-dimensional ซึ่งประกอบด้วย Fe^{III} และ Fe^{II} สลับกันไปมาบน cubic lattice แสดงดังรูปที่ 2.1 Fe^{II} จะถูกล้อมรอบด้วย octahedrally จากคาร์บอนอะตอมของไอออน cyanide และ Fe^{III} จะถูกเชื่อมต่อกับ nitrogen ของ cyanide ซึ่งส่งผลต่อการ low-spin และ high-spin ของอิเล็กตรอนตามลำดับ โครงสร้างของ Prussian blue สามารถปรับให้เข้ากับไอออนบวกของโลหะและโมเลกุลของน้ำได้ (Koncki et al., 2002)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Prussian blue

Prussian blue เป็นสารอนินทรีย์สังเคราะห์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ที่เกิดเนื่องจาก Fe^{2+} ทำปฏิกิริยากับ $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ ได้เป็น Prussian blue ($\text{K}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$)

เนื่องจาก วิตามินซี มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี ดังนั้นจึงใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์ เพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} ให้กลายเป็น Fe^{2+} ซึ่งจะ去做ปฏิกิริยาต่อกับ $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ ทำให้ได้ Prussian blue ดังสมการ



ถ้ามีปริมาณวิตามินซีมาก จะทำให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้มาก ซึ่งสามารถ去做ปฏิกิริยาต่อกับ $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ ทำให้ได้ Prussian blue มากด้วย ทำให้ได้สีน้ำเงินเข้ม แต่ในทางกลับกัน ถ้ามีปริมาณวิตามินซีน้อย Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้น้อย ส่งผลให้去做ปฏิกิริยาต่อกับ $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ ได้น้อยด้วย ทำให้ได้

Prussian blue ปริมาณน้อยลง ทำให้ได้สีน้ำเงินอ่อนลง ดังนั้นจึงใช้หลักการความสัมพันธ์ของสีของ Prussian blue ที่เกิดขึ้นกับปริมาณของวิตามินซี มาใช้ในการสร้างชุดทดสอบวิตามินซี

การนำเอาสมบัติการเปลี่ยนสีของ Prussian blue มาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ มีข้อดีหลายอย่างเช่น ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว กระบวนการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อนและมีความถูกต้องสูง เช่นการวิเคราะห์หาปริมาณ Rutin (Hassan *et al.*, 1999) กลูโครอส (Lenarczuk *et al.*, 2001a) และวิตามิน ซี (Arya *et al.*, 2001; Lenarczuk *et al.*, 2001b; Grudpan *et al.*, 1999; Koncki *et al.*, 1998) เป็นต้น

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

1. D-Fructose Analytical (Grade , Ajex Finechem)
2. D-Glucose, Anhydrous (Bio Basic INC (Biotechnology))
3. Iron(III) Chloride Hexahydrate pure P.A.(POCH)
4. L-Ascorbic Acid (Laboratory Grade , Ajex Finechem)
5. Nitric Acid (Analytical Reagent , J.T.Baker)
6. Potassium Chloride, Crystal (Analytical Grade , J.T.Baker)
7. Potassium Ferricyanide (Analytical Grade , Ajex Finechem)
8. Potassium Ferrocyanide (Analytical Grade , Ajex Finechem)
9. Potassium Iodate (Analytical Grade , Ajex Finechem)
10. Potassium Iodide (Analytical Grade Ajex Finechem)
11. Sodium Thiosulphate 5-hydrate (Anala R , BDH)
12. Starch soluble (Acs-for analysis , CARLO ERBA reagent)
13. Sucrose (Analytical Grade , Ajex Finechem)
14. Sulfuric acid (Analytical Reagent , J.T.Baker)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง pH Meter (Model UB-10) บริษัท เบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด
2. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Model Fisher Scientific 420) บริษัท FormaScientific, Inc
3. เครื่อง UV- Visible Spectrophotometer (Model UV 1601) บริษัท Shimadzu

3.3 ศึกษาการเกิด Prussian blue

โดยการผสม FeCl_3 ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 1 ml กับ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 1 ml คนให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จะเกิดสารละลายสีน้ำเงินของ Prussian blue ขึ้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงและหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

3.4 การเตรียม Prussian blue โดยใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์

นำสารละลาย FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml เตรียมในกรดไนตริก 0.15% และวิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ปริมาตร 1 ml เตรียมในกรดไนตริก 0.15% มาผสมกันในปิกเกอร์ จากนั้นเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml เตรียมในโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 M ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุด

3.5 ศึกษาความเสถียร

เตรียมสารละลาย Prussian blue ตามข้อ 3.4 จากนั้นนำสารละลาย Prussian blue ที่ได้ไปศึกษาความเสถียร โดยนำสารละลาย Prussian blue ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เวลา 1-60 นาที

3.6 ศึกษาความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่เหมาะสม

ในการทดลองนี้ใช้ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ที่มีความเข้มข้นมากกว่า FeCl_3 5 เท่าเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดสารละลาย Prussian blue เกิดการตกตะกอน ดังนั้นโดยศึกษาผลของความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่ความเข้มข้น 0.1×10^{-3} , 0.5×10^{-3} , 1×10^{-3} และ 1.5×10^{-3} M และใช้ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่าของ FeCl_3 แต่ละความเข้มข้นของ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ คือ 0.5×10^{-3} , 2.5×10^{-3} , 5×10^{-3} และ 7.5×10^{-3} M ตามลำดับโดยใช้วิตามินซีที่ความเข้มข้นคงที่คือ 5×10^{-4} M ตามลำดับ สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm

3.7 ศึกษาความเข้มข้นของ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ที่เหมาะสม

หาความเข้มข้นของ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ที่เหมาะสม โดยใช้ FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M (ได้จากข้อ 2.6) และวิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M และเปลี่ยนความเข้มข้น $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ได้แก่ 3×10^{-3} , 5×10^{-3} และ 7×10^{-3} M (3, 5 และ 7 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ FeCl_3) สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm

3.8 ศึกษาผลของ pH

ศึกษาผลของ pH จาก 1.5-6.0 โดยเตรียมวิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ในกรดไนตริกให้มี pH 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยใช้ FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M และ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm

3.9 ศึกษาผลของตัวรบกวน (Interference)

ศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีต่อการวิเคราะห์หาวิตามินซีโดยอาศัยการเกิดสีของ Prussian blue ซึ่งสนใจศึกษาสารที่เป็นส่วนประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำผลไม้พร้อมดื่ม เช่น กลูโคส ซูโครส และฟรุคโตส ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ตรวจพบในน้ำผลไม้ (http://www.elibonline.com/doctors50/child_food001.html สืบค้น 20 มกราคม 2554) โดยออกแบบการทดลองดังนี้

3.9.1 ใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี

ผสม FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml กับตัวรบกวนตามตารางที่ 3.1 ปริมาตร 1ml และเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm

ตารางที่ 3.1 ศึกษาผลของตัวรบกวน

ตัวรบกวน	ความเข้มข้น (M)
กลูโคส	0.2 และ 0.3
ซูโครส	0.15 และ 0.3
ฟรุคโตส	0.05 0.2 และ 0.4

3.9.2 ผสม Prussian blue กับตัวรบกวน

เตรียมสารละลาย Prussian blue จากการผสม FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml และ วิตามินซี ความเข้มข้น 5×10^{-4} M ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml จะได้สารละลาย Prussian blue ต่อมาเติมตัวรบกวนตามตารางที่ 3.1 ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm

3.10 ศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบวิตามินซี

3.10.1 ช่วงความเข้มข้นของวิตามินซี

นำ FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมกับวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 5×10^{-2} 1×10^{-3} 5×10^{-3} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 1×10^{-5} 5×10^{-5} และ 1×10^{-6} M ปริมาตร 1 ml มาผสมกันในบีกเกอร์ จากนั้นเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นและนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm

3.10.2 ศึกษาการทำซ้ำของการวิเคราะห์ (Repeatability)

ผสม FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml และ วิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ปริมาตร 1 ml มาผสมกันในบีกเกอร์ จากนั้นเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ได้เป็นสารละลาย Prussian blue นำสารละลายที่ได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm ทำการวัดซ้ำ 6 ครั้ง และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

3.10.3 ศึกษาการทวนซ้ำของการวิเคราะห์ (Reproducibility)

ทำการทวนสอบวิธีโดยการเตรียมสารละลาย Prussian blue จากวิตามินซี ความเข้มข้น 5×10^{-4} M ใหม่ในแต่ละวัน ทำการทดลองทั้งหมด 6 วัน นำสารละลายที่ได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 709 nm และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.10.4 ศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากชุดทดสอบที่สร้างขึ้นกับวิธีไทเทรต โดยใช้ความเข้มข้นของวิตามินซีที่ 1×10^{-5} 5×10^{-5} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 1×10^{-3} 2.25×10^{-3} และ 5×10^{-3} M

วิธีการไทเทรต มีขั้นตอนดังนี้

1.การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 M

โดยการเตรียม KIO_3 ที่ชั่งมา 3.xxxx g ปรับปริมาตร 1000 ml เติมลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 25 ml จากนั้นเติม 10% KI ปริมาตร 10 ml และเติมกรด H_2SO_4 0.1 M ปริมาตร 3 ml สารละลายจะมีสีน้ำตาล จากนั้นนำไปไทเทรตทันทีกับ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ จนสารละลายเป็นสีเหลืองจาง แล้วจึงเติมน้ำแป้ง (อินดิเคเตอร์) ลงไปปริมาตร 2 ml สารละลายจะมีสีน้ำเงินแล้วนำไปไทเทรตกับ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ จนสารละลายเป็นสีใส จดบันทึกปริมาตรสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้(ทำการไทเทรตซ้ำกัน 2-3 ครั้ง)

2.การหาปริมาณของวิตามินซี

โดยนำตัวอย่างวิตามินซีปริมาตร 10 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม KIO_3 ปริมาตร 25 ml 10% KI ปริมาตร 10 ml และเติมกรด H_2SO_4 0.1 M ปริมาตร 3 ml สารละลายจะมีสีน้ำตาล จากนั้นนำไปไทเทรตทันทีกับ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ จนสารละลายเป็นสีเหลืองจาง แล้วจึงเติมน้ำแป้ง (อินดิเคเตอร์) ลงไปปริมาตร 2 ml สารละลายจะมีสีน้ำเงินแล้วนำไปไทเทรตกับ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ จนสารละลายเป็นสีใส จดบันทึกปริมาตรสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้(ทำการไทเทรตซ้ำกัน 2-3 ครั้ง)

3.11 สร้างชุดทดสอบวิตามินซี ในน้ำผลไม้

3.11.1 เตรียมแถบสีมาตรฐาน

เตรียมวิตามินซีที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5×10^{-3} 1×10^{-3} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 5×10^{-5} และ 1×10^{-5} M เพื่อนำไปสร้างแถบสีมาตรฐานสำหรับชุดทดสอบเบื้องต้น

3.11.2 ออกแบบชุดทดสอบ

ออกแบบชุดทดสอบเพื่อสร้างเป็นชุดทดสอบ โดยในชุดทดสอบวิตามินซีจะประกอบด้วย อุปกรณ์และสารเคมี และขั้นตอนวิธีการทดลอง

3.12 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้

3.12.1 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้กั้นสด

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้กั้นสด เช่น น้ำฝรั่ง น้ำมะนาว และน้ำสับปะรด จำนวน 3 ตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างมีลักษณะขุ่นจะนำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองก่อน หลังจากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในกรณีตัวอย่างมีปริมาณวิตามินซีมากกว่าความเข้มข้นที่ชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้ แล้วปิเปตตัวอย่าง 1 ml มาผสมกับ FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M จำนวน 1 ml และเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบสีที่ได้กับแถบสีมาตรฐานที่สร้างขึ้น อ่านค่าปริมาณของวิตามินซีที่ได้และเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีไทเทรตแบบปริดออกซ์

3.12.2 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้พร้อมดื่ม

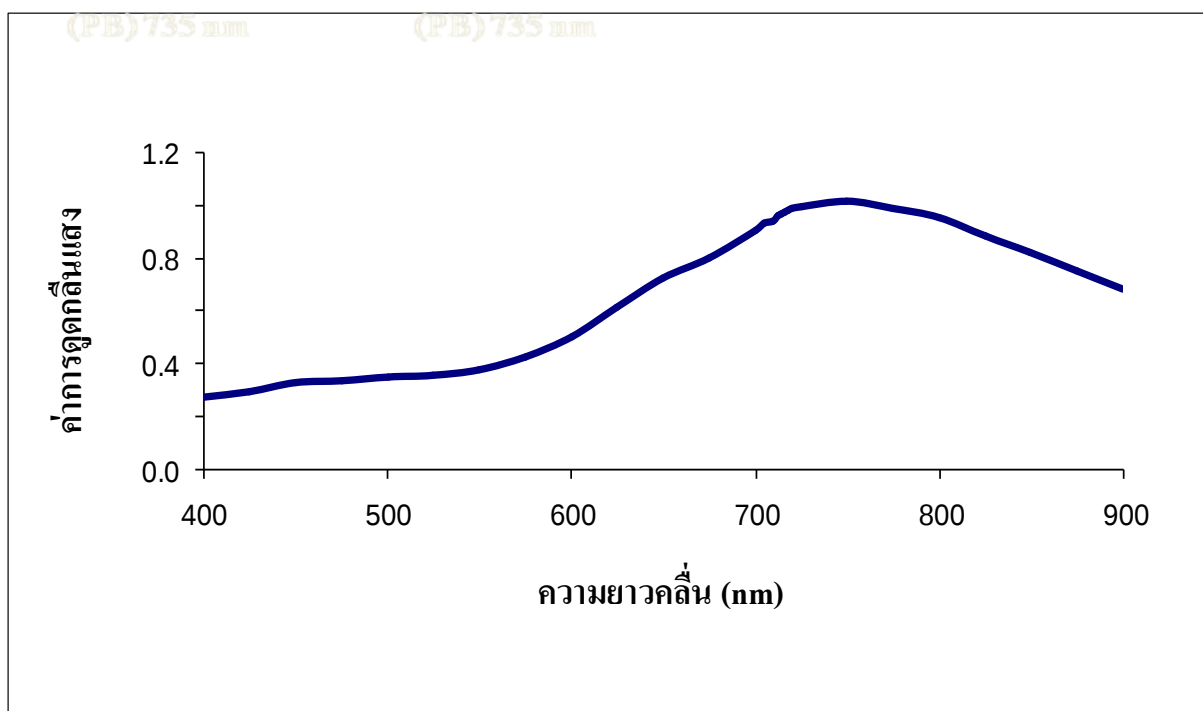
วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้พร้อมดื่ม จำนวน 9 ตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างมีลักษณะขุ่นจะนำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองก่อน หลังจากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณวิตามินซีมากกว่าความเข้มข้นที่ชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้ ปิเปตตัวอย่าง 1 ml มาผสมกับ FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M จำนวน 1 ml และเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบสีที่ได้กับแถบสีมาตรฐานที่สร้างขึ้น อ่านค่าปริมาณของวิตามินซีที่ได้และเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีไทเทรตแบบปริดออกซ์

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการเกิด Prussian blue

เตรียม Prussian blue จากการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง $K_4[Fe(CN)_6]$ กับ $FeCl_3$ ผลการทดลองพบว่าได้สารละลายสีน้ำเงิน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสง ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 พบว่ามีความยาวคลื่นสูงสุดที่ 720 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นของ Prussian blue

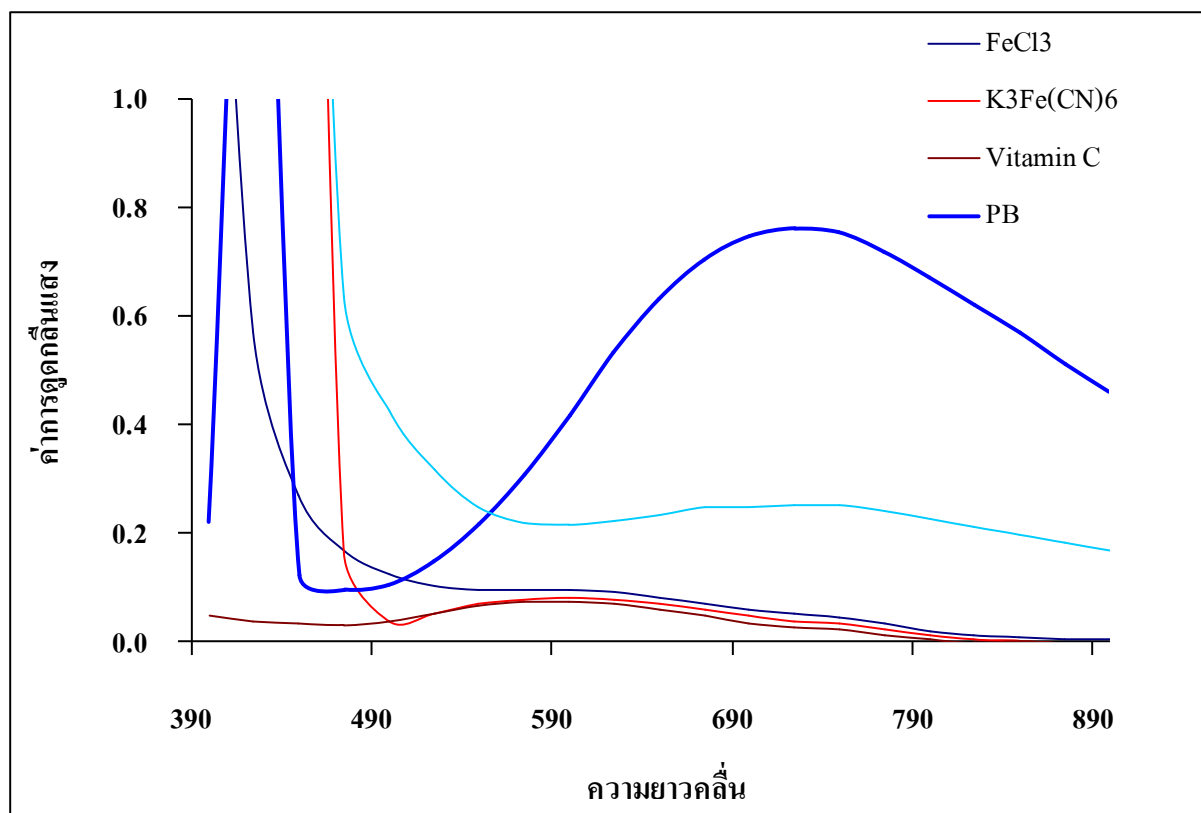


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ Prussian blue

4.2 ผลการศึกษา Prussian blue จาก วิตามินซี

เตรียม Prussian blue จากการผสมระหว่าง $FeCl_3$ กับ วิตามินซี วิตามินซีจะเปลี่ยน $Fe(III)$ เป็น $Fe(II)$ จากนั้นทำปฏิกิริยากับ $K_3[Fe(CN)_6]$ และพบว่าได้สารละลายสีน้ำเงินของ Prussian blue เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุด ผลการทดลองสารละลายสีน้ำเงินที่ได้มีความยาวคลื่นที่ 709 นาโนเมตร แสดงว่าสารละลายสีน้ำเงินที่ได้เป็นสารละลาย Prussian blue เพราะมีความยาวคลื่น

อยู่ในช่วง 700-800 นาโนเมตร ในขณะที่สารละลายต่างที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาไม่ได้ให้ค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้ ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ Prussian blue ที่ได้จากการใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์

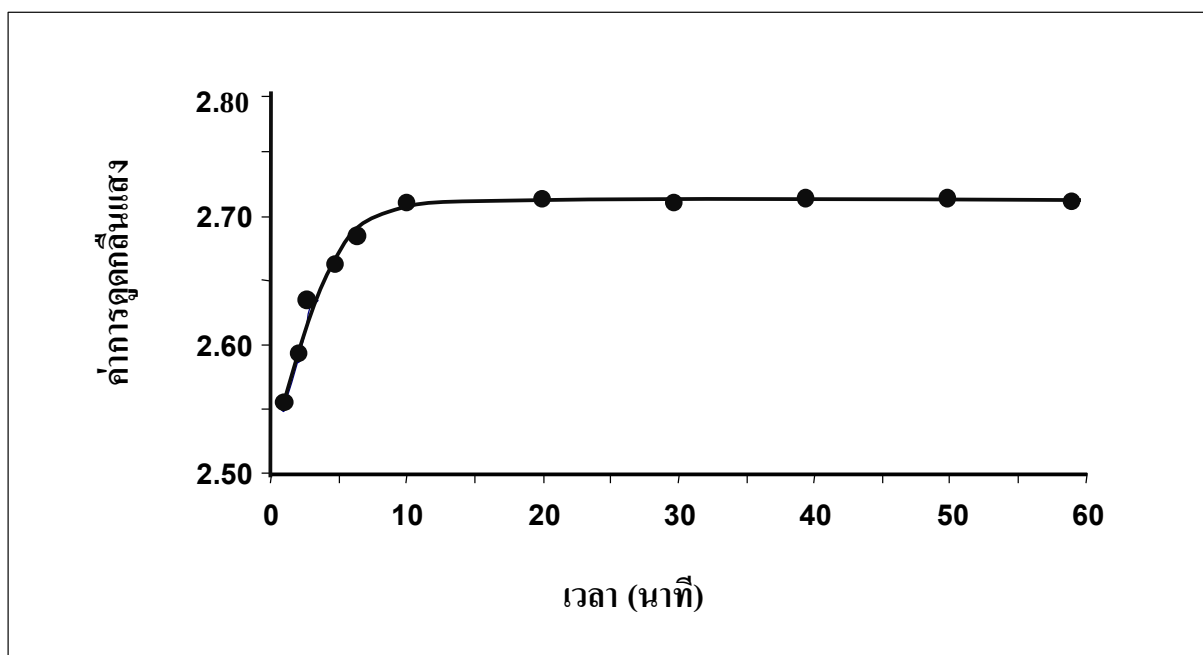
ดังนั้นจึงใช้ทฤษฎีนี้เพื่อหาความเข้มข้นของวิตามินซี โดยใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์ เพื่อทำให้เกิดเป็น Prussian blue

4.3 ผลการศึกษาความเสถียรของ Prussian blue

จากการศึกษาความเสถียรของสารละลาย Prussian blue ที่เวลาต่างๆเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี โดยเตรียมจากวิตามินซี ความเข้มข้น 5×10^{-4} M ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่เกิดจากวิตามินซีที่เวลาต่างๆ โดยวัดที่ความยาวคลื่นที่ 709 นาโนเมตร

เวลา(นาทื)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2.5518
2	2.5914
3	2.6351
4	2.6587
5	2.6587
6	2.6833
7	2.6833
8	2.6833
9	2.6833
10	2.7092
20	2.7092
30	2.7092
40	2.7092
50	2.7092
60	2.7092



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ

ผลการทดลองเมื่อเวลาผ่านไปค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น จนถึง 10 นาที หลังจาก 10 นาทีขึ้นไป จนถึง 60 นาที ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ แสดงว่า Prussian blue มีความเสถียรหลังจากเกิดปฏิกิริยา 10 นาที ดังนั้นจึงใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาของ Prussian blue จาก วิตามินซี 10 นาที ในการทดลองต่อไป

4.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่เหมาะสม

จากการศึกษาความเข้มข้นของ FeCl_3 มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย Prussian blue FeCl_3 จะต้องมีความเข้มข้นมากเกินพอ เพื่อที่จะใช้วิตามินซี เป็นตัวรีดิวซ์ได้สมบูรณ์ ผลการทดลองแสดงผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ FeCl_3 โดยใช้ วิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ และใช้ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ เป็น 5 เท่าของ FeCl_3

FeCl_3 (M)	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (M)	ค่าการดูดกลืนแสงของ วิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} (M)	ผลการทดลอง
0.1×10^{-3}	0.5×10^{-3}	0.9635	
0.5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	1.0985	
1×10^{-3}	5×10^{-3}	2.7003	
1.5×10^{-3}	7.5×10^{-3}	มากกว่า 3.9999	

จากตารางที่ 4.2 พบว่าทุกความเข้มข้นของวิตามินซี เมื่อ FeCl_3 มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นสีน้ำเงินของ Prussian blue มีความเข้มเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้น 0.1×10^{-3} M ถึง 1.5×10^{-3} M แต่เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 1×10^{-3} M พบว่าสีของสารละลาย Prussian blue มีความเข้มมากและไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกความเข้มข้นของ FeCl_3 ที่ 1×10^{-3} M

4.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ $K_3[Fe(CN)_6]$ ที่เหมาะสม

จากการศึกษาความเข้มข้น $K_3Fe[(CN)_6]$ จะต้องมากเกินไป เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาของ วิตามินซี และ $FeCl_3$ ได้สมบูรณ์ และต้องมีอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการตกตะกอนของสารละลาย ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ $FeCl_3 : K_3[Fe(CN)_6]$ ที่อัตราส่วน 1:3 1:5 และ 1:7 ทำโดยใช้ วิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ

$FeCl_3$ (M)	$K_3[Fe(CN)_6]$ (M)	ค่าการดูดกลืนแสงของ วิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} (M)	ผลการทดลอง
1×10^{-3}	3×10^{-3}	2.6351	
1×10^{-3}	5×10^{-3}	2.6833	
1×10^{-3}	7×10^{-3}	2.7372	

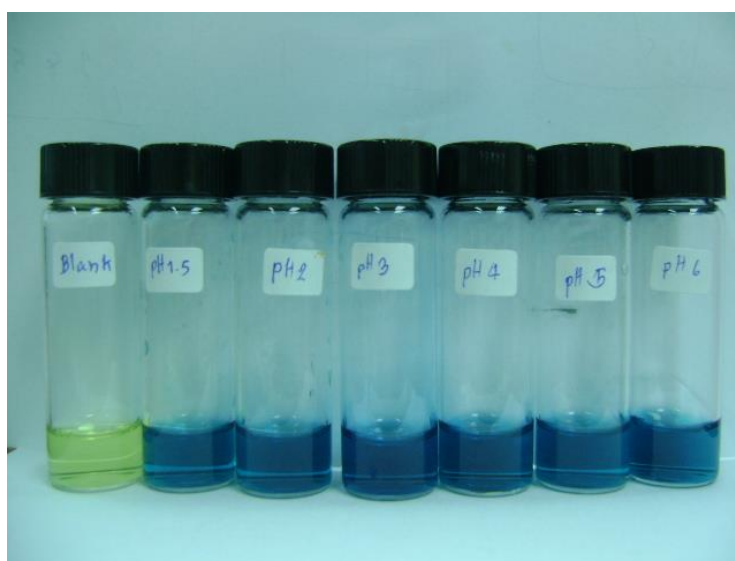
จากตารางที่ 4.3 พบว่าสีของ Prussian blue เข้มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ $K_3[Fe(CN)_6]$ เพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} M และ 7×10^{-3} M ความเข้มของสีที่ได้นั้นใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก $K_3[Fe(CN)_6]$ ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} M เพราะใช้สารเคมีน้อยกว่า

4.6 ผลการศึกษาผลของ pH

จากการศึกษาผลของ pH ในการเกิดสารละลาย Prussian blue โดยมีวิตามินซี ความเข้มข้น 5×10^{-4} M ที่ pH ต่างๆผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 ผลการทดลองพบว่า pH ไม่มีผลต่อการเกิด Prussian blue ในน้ำผลไม้ pH อยู่ในช่วง 2-6 เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่า pH ไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินซี

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่ pH ต่างๆ

สารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซี pH ต่างๆ	ค่าการดูดกลืนแสง
1.5	2.7372
2	2.7372
3	2.8341
4	2.7668
5	2.7372
6	2.7668



รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบสีของสารละลาย Prussian blue ที่ pH ต่างๆ

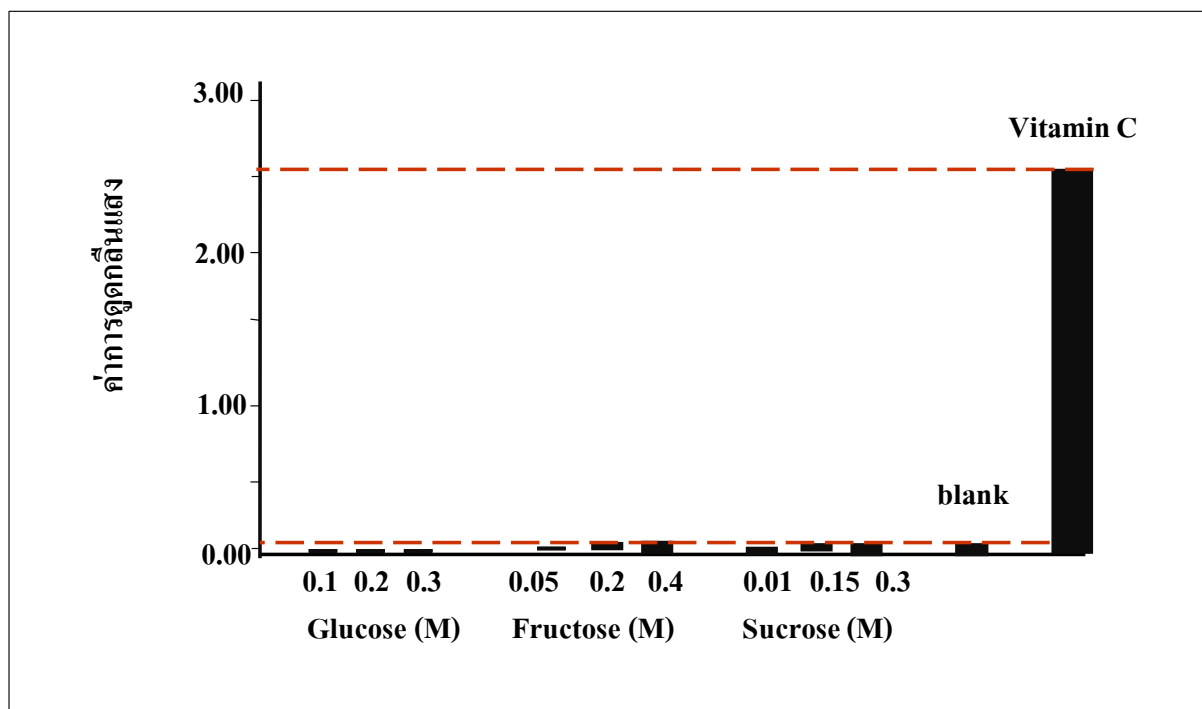
4.7 ผลการศึกษาผลของตัวรบกวน (Interference)

4.7.1 ผลจากการใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี

จากตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จาก กลูโคส ฟรุคโตสและซูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับสารละลายแบลงค์ (กรดไนตริก) เมื่อเปรียบเทียบกับสีที่ได้จากวิตามินซี พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวรบกวนต่างๆน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินซีถึง 10 เท่า ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตัวรบกวนไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี

ตารางที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารรบกวนที่ความเข้มข้นต่างๆจากการใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี

ความเข้มข้น (M)	การดูดกลืนแสงของ กลูโคส	การดูดกลืนแสงของ ฟรุคโตส	การดูดกลืนแสงของ ซูโคส
0.01	-	-	0.0054
0.05	-	0.0122	-
0.1	0.0111	-	-
0.15	-		0.0206
0.2	0.0118	0.0308	-
0.3	0.0208	-	0.042
0.4	-	0.0729	-



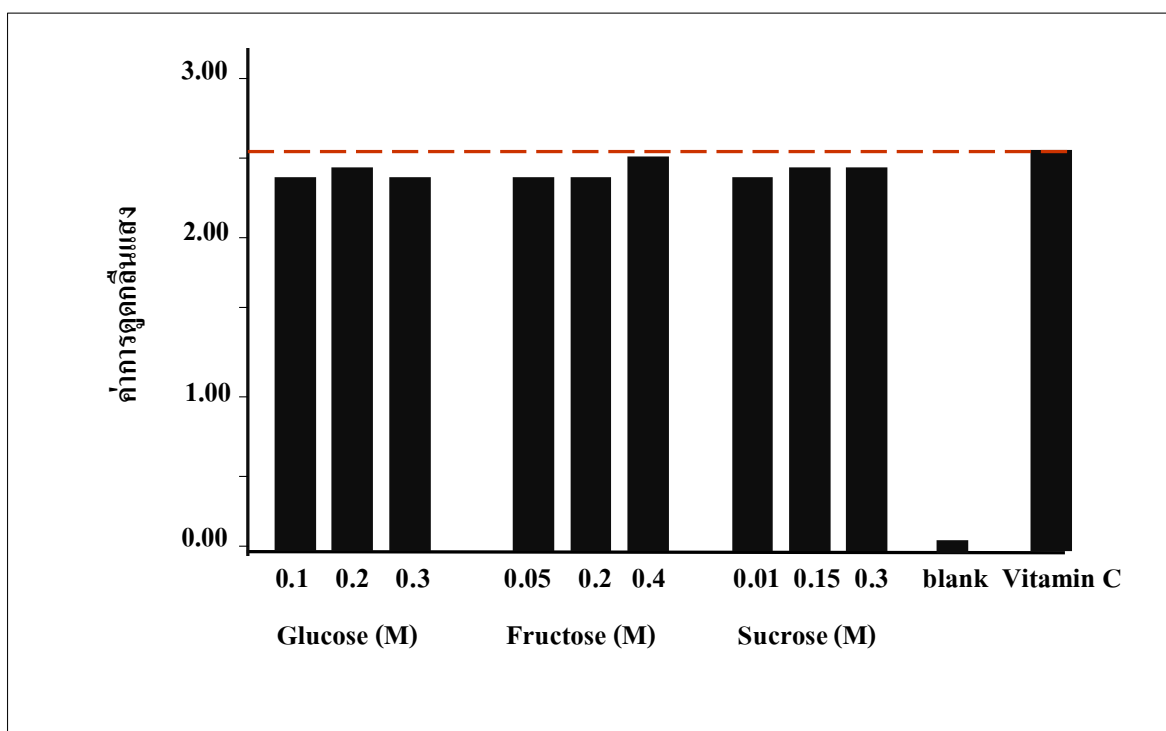
รูปที่ 4.5 กราฟแผนภูมิแท่งแสดงผลการจากการใช้ตัวรบกวนแทนวิตามินซี

4.7.2 ผลจากการผสม Prussian blue กับตัวรบกวน

เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลาย Prussian blue ที่ได้จาก กลูโคส ฟรุคโตสและซูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับสารละลาย Prussian blue (ตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.6) แสดงว่าตัวรบกวนต่างๆที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่พบในน้ำผลไม้ ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาวิตามินซี

ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารบวกรที่ความเข้มข้นต่างๆจากการผสม Prussian blue กับตัวบวกร

ความเข้มข้น (M)	การดูดกลืนแสงของ กลูโคส	การดูดกลืนแสงของ ฟรุคโตส	การดูดกลืนแสงของ ซูโครส
0.01	-	-	2.4362
0.05	-	2.4362	-
0.1	2.4220	-	-
0.15	-	-	2.5407
0.2	2.4507	2.4082	-
0.3	2.4362	-	2.4758
0.4	-	2.4817	-



รูปที่ 4.6 กราฟแผนภูมิแท่งแสดงผลการจากการผสม Prussian blue กับตัวบวกร

4.8 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบวิตามินซี

4.8.1 ช่วงความเข้มข้นของวิตามินซี

ศึกษาช่วงความเข้มข้นต่างๆของวิตามินซี ที่ใช้ในการทำให้เกิดเป็นสารละลาย Prussian blue พบว่ามีช่วงความเข้มข้นคือ 5×10^{-3} 1×10^{-3} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 5×10^{-5} และ 1×10^{-5} M ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 สารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีในช่วงความเข้มข้นต่างๆ

จากรูปที่ 4.7 สีของสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซี ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มของสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของวิตามินซีที่เพิ่มขึ้นสามารถแยกสีได้ด้วยตาเปล่าและสารละลายที่ได้ไม่ตกตะกอน ดังนั้นช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของชุดทดสอบนี้คือ

4.8.2 ผลการศึกษาข้อจำกัดการทำซ้ำ (Repeatability)

จากการศึกษาข้อจำกัดการทำซ้ำของสารละลาย Prussian blue ที่วิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 พบว่ามี % RSD เท่ากับ 3 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์หาวิตามินซีให้การทำซ้ำที่ดี 1×10^{-5} - 5×10^{-3} M

ตารางที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ที่สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยทำการวัดซ้ำกัน 6 ครั้ง

ทำการวัดสารละลาย Prussian blue (ครั้งที่)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2.7092
2	2.7092
3	2.6128
4	2.8341
5	2.8341
6	2.8341
% RSD = 3	

4.8.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดการทวนซ้ำของวิธี (Reproducibility)

จากการศึกษาขีดจำกัดการทวนซ้ำของวิธีของสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ดังตารางที่ 4.8 พบว่ามี % RSD เท่ากับ 3 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการวัดมีการทวนซ้ำของวิธีที่ดี

ตารางที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ที่สภาวะการทดลองแตกต่างกัน โดยทำการวัด 6 วัน

3

ทำการวัดสารละลาย Prussian blue(วันที่)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	2.7092
2	2.6351
3	2.6128
4	2.4817
5	2.6587
6	2.6351
%RSD = 3	

4.8.3 ผลการศึกษาค่าความถูกต้อง (Accuracy)

จากการทดลองศึกษาการเปรียบเทียบผลจากชุดทดสอบโดยใช้วิตามินซีที่ความเข้มข้น 1×10^{-5} 5×10^{-5} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 1×10^{-3} 2.25×10^{-3} และ 5×10^{-3} M กับวิธีไทเทรต ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.9 พบว่าผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีสอดคล้องกันสรุปได้ว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องสูง

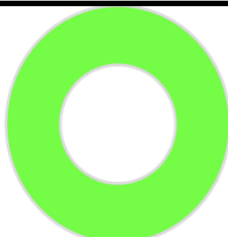
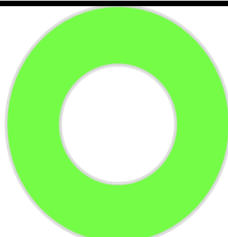
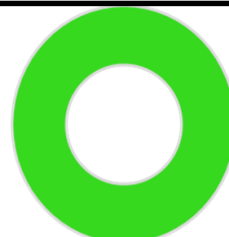
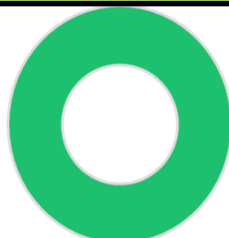
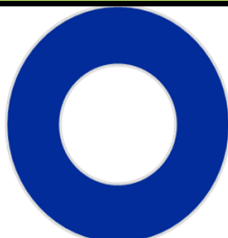
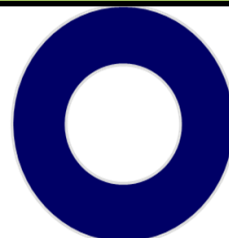
ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีที่หาได้ชุดทดสอบกับวิธีทั่วไป (ไทเทรต)

ความเข้มข้นของวิตามินซี ตัวอย่าง (M)	ชุดทดสอบ (M)	วิธีไทเทรต
1×10^{-5}	Blank- 1×10^{-5}	9.5×10^{-6}
5×10^{-5}	5×10^{-5} - 1×10^{-4}	5.3×10^{-5}
1×10^{-4}	1×10^{-4} - 5×10^{-4}	1.12×10^{-4}
5×10^{-4}	1×10^{-4} - 5×10^{-4}	4.86×10^{-4}
1×10^{-3}	5×10^{-4} - 1×10^{-3}	8.96×10^{-4}
2.25×10^{-3}	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	2.16×10^{-3}
5×10^{-3}	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	4.89×10^{-3}

4.9 สร้างชุดทดสอบวิตามินซี ในน้ำผลไม้

4.9.1 ผลการเตรียมแถบสีมาตรฐาน

จากการทดลองโดยการเตรียมสารละลาย Prussian blue ที่มีวิตามินซี ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 1×10^{-3} 5×10^{-3} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 1×10^{-5} และ 5×10^{-5} M แล้วนำสีของสารละลายที่เตรียมได้ไปสร้างเป็นแถบสีมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.8

แถบสีมาตรฐาน		
		
1×10^{-5} โมลาร์ (1.76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5×10^{-5} โมลาร์ (8.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	1×10^{-4} โมลาร์ (17.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
		
5×10^{-4} โมลาร์ (88 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	1×10^{-3} โมลาร์ (176 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5×10^{-3} โมลาร์ (880 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

รูปที่ 4.8 แถบสีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีด้วยชุดทดสอบ

4.9.2 ผลการออกแบบชุดทดสอบ

ได้ออกแบบชุดทดสอบ ดังรูปที่ 4.9 ชุดทดสอบนี้ตรวจสอบได้ 30 ตัวอย่าง ก่อนทดสอบควรอ่านวิธีใช้ให้ละเอียดทุกขั้นตอน

ส่วนประกอบของชุดทดสอบ

1. หลอดดูดพลาสติก (1 มิลลิลิตร) ใส่ในถุงพลาสติก 30 หลอด ใช้แล้วทิ้ง
2. หลอดดูดน้ำยา A (1 มิลลิลิตร) 1 หลอด ใช้แล้วล้างใช้ใหม่
3. หลอดดูดน้ำยา B (1 มิลลิลิตร) 1 หลอด ใช้แล้วล้างใช้ใหม่
4. ขวดพลาสติก 3 ขวด ใช้แล้วล้างใช้ใหม่
5. แถบสีมาตรฐาน

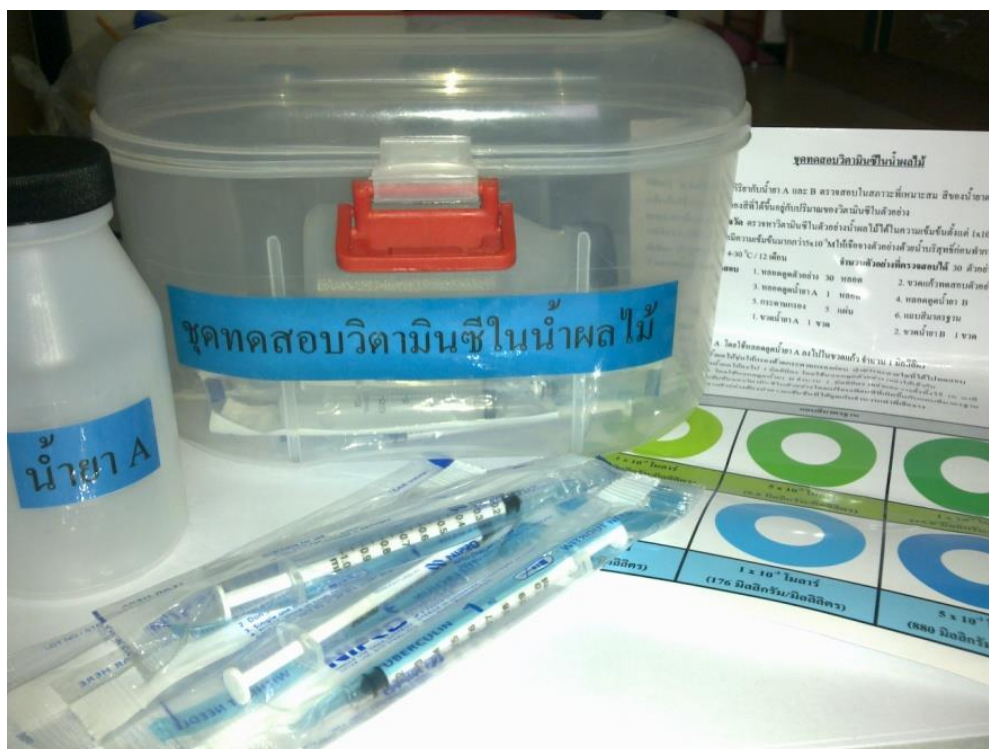
น้ำยาตรวจสอบ 2 ชนิด

ขวดน้ำยา A 1 ขวด

ขวดน้ำยา B 1 ขวด

วิธีการใช้

- 1.เติมน้ำยา A 1 มิลลิลิตร ลงในขวดพลาสติก
- 2.เติมน้ำผลไม้ตัวอย่างลงไป 1 มิลลิลิตร
- 3.เติมน้ำยา B ลงไป 1 มิลลิลิตร
- 4.เขย่าตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วสังเกตสีของสารละลายเทียบกับแถบสีมาตรฐาน



รูปที่ 4.9 ชุดทดสอบวิตามินซีในน้ำผลไม้

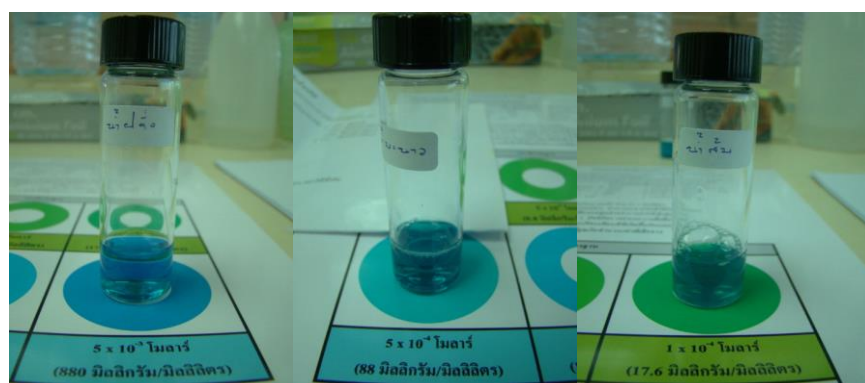
4.10 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้

4.10.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้ก้นสด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้ก้นสด คือ น้ำฝรั่ง น้ำมะนาว และ น้ำสับปะรด ด้วยชุดทดสอบและเปรียบเทียบกับวิธีไทเทรต ได้ผลการทดลองตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.10 พบว่าชุดทดสอบให้ผลการทดลองสอดคล้องกับวิธีไทเทรต

ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้คั้นสดที่หาได้จากชุดทดสอบกับวิธีทั่วไป (ไทเทรต)

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้น (M)	
	ชุดทดสอบ	วิธีไทเทรต
น้ำฝรั่ง	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	4.57×10^{-3}
น้ำมะนาว	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	2.25×10^{-3}
น้ำสับปะรด	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	1.55×10^{-3}



รูปที่ 4.10 การหาปริมาณของวิตามินซีในน้ำผลไม้คั้นสดด้วยชุดทดสอบ

4.10.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในน้ำผลไม้พร้อมดื่ม

จากการทดลองศึกษาการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้พร้อมดื่มจำนวน 9 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดทดสอบกับวิธีไทเทรต ผลการทดลองพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกับ สรุปได้ว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมามีความถูกต้องสูง และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไทเทรต (ตารางที่ 4.11) ชุดทดสอบมีข้อดีกว่าคือมีขั้นตอนการทดลองที่ง่าย ใช้สารเคมีน้อย ค่าใช้จ่ายน้อยและให้ผลรวดเร็ว

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่หาได้จากชุดทดสอบกับวิธีไทเทรต

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ความเข้มข้น(M)	
	ชุดทดสอบ	วิธีไทเทรต
1	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	6.04×10^{-3}
2	blank - 1×10^{-4}	1.04×10^{-4}
3	Blank	ไม่มีวิตามินซี
4	1×10^{-5} - 5×10^{-5}	5×10^{-5}
5	5×10^{-4} - 1×10^{-3}	8.97×10^{-4}
6	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	1.36×10^{-3}
7	1×10^{-4} - 5×10^{-4}	4.4×10^{-4}
8	1×10^{-3} - 5×10^{-3}	1.18×10^{-3}
9	1×10^{-5} - 5×10^{-5}	1.5×10^{-5}

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้สร้างชุดทดสอบหาปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้โดยใช้หลักการเกิดสีของ Prussian blue วิตามินซีจะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ Fe^{3+} ให้กลายเป็น Fe^{2+} เพื่อทำปฏิกิริยากับ $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{4-}$ จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ Prussian blue ซึ่งมีสีน้ำเงิน และมีการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ 709 นาโนเมตร โดยสารละลาย Prussian blue มีความเสถียรที่เวลา 10 นาที

ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีโดยใช้หลักการเกิดสีของ Prussian blue พบว่าความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมคือ $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ และความเข้มข้นของ $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{4-}$ ที่เหมาะสมคือ $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ทำให้ได้สารละลาย Prussian blue ที่ไม่ตกตะกอนและมีความเสถียรสูง

ศึกษาผลของปัจจัยรบกวน คือ pH และสารรบกวนผลการทดลองพบว่า pH ในช่วง 1.5 - 6 ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินซีส่วนสารรบกวนที่เลือกศึกษาคือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีรายงานว่าเป็นส่วนประกอบในน้ำผลไม้ พบว่าที่ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ทุกความเข้มข้นไม่มีผลไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี แสดงว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์สูงเมื่อได้สภาวะการผสมทดลองที่เหมาะสมแล้วนำมาสร้างแถบสีมาตรฐาน เพื่อสร้างเป็นชุดทดสอบภาคสนาม ชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมีความเที่ยง (% RSD = 3) และความแม่นยำสูง (% RSD = 3) มีความสามารถในการตรวจหาปริมาณของวิตามินซีในช่วง $1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-3} \text{ M}$

นำชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมาไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี ในตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสด และน้ำผลไม้พร้อมดื่ม พบว่าผลที่ได้จากชุดทดสอบและวิธีการไทเทรต สอดคล้องกันแสดงว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีเบื้องต้นน้ำผลไม้โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 10 นาที ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายราคาถูก

เอกสารอ้างอิง

- Arya S.P., Mahajan M., Jain P. 2001. Spectrophotometric determination of vitamin C with iron(II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol complex. **Analytica Chimica Acta**. 427 : 245–251.
- Fernandes J.C.B., Neto G.O., Kubota L.T. 366. Use of column with modified silica for interfering retention in a FIA spectrophotometric method for direct determination of vitamin C in medicine. **Analytica Chimica Acta** 366: 11-22.
- Fontannaz P., T Kiliçamara, Heudi O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. **Food Chemistry** 94: 626-631.
- Grudpan K., Kamfoo K., Jakmunee J. 1999. Flow injection spectrophotometric or conductometric determination of ascorbic acid in a vitamin C tablet using permanganate or ammonia. **Talanta** 49 :1023–1026
- Hassan H.N., Barsoum B.N., Habib I.H.I. 1999. Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a Kalman Filter approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 20: 315–320.
- Hernández-Méndez J., Mateos A.A., Parra M.J.A., María C.G. 1986. Spectrophotometric flow- injection determination of ascorbic acid by generation of triiodide. **Analytica Chimica Acta** 184: 243-250.
- Koncki R. 2002. Chemical Sensors and Biosensors Based on Prussian Blues *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 32:79–96.
- Koncki R.; Wolfbeis O. 1998. Optical chemical sensing based on thin films of Prussian Blue. **Sensors and Actuators B: Chemical** 51: 355-358.
- Kumar G. K., Indrasenan P. 1990. Titrimetric methods for the determination of vitamin C in some pharmaceutical preparations by use of two N-bromoimides. **Talanta** 37: 269-271.
- Lenarczuk T., Wencel D., Stanis G., Koncki R. A . 2001a. Prussian blue-based optical glucose biosensor in flow-injection analysis **Analytica Chimica Acta**. 447: 23-32.
- Lenarczuk T., Stanis G., Koncki R. 2001b. Application of Prussian blue-based optical sensor in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 26: 163-169.
- Lenghor N., Jakmunee J., Vilen M., Sara R., Christian G.D., Grudpan K. 2002. Sequential injection redox or acid–base titration for determination of ascorbic acid or acetic acid. **Talanta** 58: 1139-1144.

Odriozola-Serrano I., Hernández-Jover T., Martín-Belloso O. 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. **Food Chemistry** 105: 1151-1158.

Pournaghi-Azar M. H., Ojani R. 1997. A selective catalytic voltammetric determination of vitamin C in pharmaceutical preparations and complex matrices of fresh fruit juices. **Talanta** 44: 297-303.

Rao G. G., Sastry G. S. 1971. Titrimetric determination of ascorbic acid with cerium(IV) sulphate. **Analytica Chimica Acta**. 325-328.

Sun J.J., Zhou D.M., Fang H.Q., Chen H.Y. 1998. The electrochemical copolymerization of 3,4-dihydroxybenzoic acid and aniline at microdisk gold electrode and its amperometric determination for ascorbic acid. **Talanta** 45: 851-856.

Thangamuthu R., Senthil Kumar S.M., Chandrasekara Pillai K. Direct amperometric determination of l-ascorbic acid (Vitamin C) at octacyanomolybdate-doped-poly(4-vinylpyridine) modified electrode in fruit juice and pharmaceuticals. **Sensors and Actuators B: Chemical** 120: 745-753.

http://cs.payap.ac.th/research/vitamin_c.pdf

http://www.elib-online.com/doctors50/child_food001.html

ภาคผนวก