สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักบางชนิดโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

อิศรา อยู่หว่าง

1 มิ.ย. 2553
270644
TH 001617
เริ่มปริญญา
22 มิ.ย. 2552

งานนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมงานนิพนธ์และคณะกรรมการสอบงานนิพนธ์ ได้พิจารณางานนิพนธ์ของ อิศรา อยู่หว่าง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมงานนิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร. นวศิษฏ์ รักษ์บำรุง)

คณะกรรมการสอบงานนิพนธ์

.....ประธาน

(ดร. จอมใจ สุกใส)

.....กรรมการ

(ดร. จเร จรัสจรูญพงศ์)

.....กรรมการ

(ดร. นวศิษฏ์ รักษ์บำรุง)

ภาควิชาเคมีอนุมัติให้รับงานนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....หัวหน้าภาควิชาเคมี

(ดร. นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)

วันที่ 14 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ ดร. นวศิษฏ์ รักษ์บำรุง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความช่วยเหลือ คำชี้แนะปัญหาต่างๆยังผลให้งานนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ ดร.จอมใจ สุกใส และ ดร.จเร จรัสจรูญพงศ์ ที่ให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานนิพนธ์

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ นายทิว มนูญธรรม ผู้อำนวยการโรงเรียนพิบูลธรรมเวทวิทยา ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการเคมีเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยในครั้งนี้ ขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการีที่ช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และให้การอบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้าตลอดมา บูรพาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และคุณธรรมในการดำเนินชีวิต และขอขอบพระคุณเพื่อนๆสาขาวิชาเคมีศึกษา ที่คอยให้คำปรึกษาปัญหาต่างๆ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อิศรา อยู่หว่าง

50990325: สาขาวิชา : เคมีศึกษา ; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: ปริมาณวิตามินซี / ผักตัวอย่าง / ความร้อน

อิศรา อยู่หว่าง : การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักบางชนิดโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (DETERMINATION OF VITAMIN C IN SOME VEGETABLES BY SPECTROPHOTOMETRY) คณะกรรมการควบคุมงานนิพนธ์ : นวศิษฏ์ รักษ์บำรุง, Ph.D. 41 หน้า. ปี พ.ศ. 2553.

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในรูปของวิตามินซีทั้งหมดของผักตัวอย่าง 4 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และมะระขี้นก เปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีที่มีอยู่ในผักตัวอย่างระหว่างก่อนการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดและหลังจากการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี วิธีของ Roe และ Kuether เริ่มต้นด้วยการสกัดกรดแอสคอร์บิค และออกซิไดซ์กรดแอสคอร์บิคให้อยู่ในรูปกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค จากนั้นทำการไฮโดรไลซ์กรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคให้อยู่ในรูปของกรดไดคีโตกลูโลนิก แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ 2,4–Dinitrophenylhydrazine ได้ตะกอนสีส้มของสารประกอบโอซาโซน (Bis-2,4-Dinitrophenyl hydrazone) ซึ่งละลายในกรดซัลฟุริกให้สีแดงเข้มแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ผลการวิจัยพบว่าปริมาณวิตามินซีในผักตัวอย่างก่อนการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด มะระขี้นกมีปริมาณวิตามินซีมากที่สุด คือ 151.83 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด ลำดับถัดมาคือ คะน้า กวางตุ้ง และตำลึง มีปริมาณวิตามินซี 140.73 $\pm$ 5.09, 132.27 $\pm$ 2.76 และ 40.10 $\pm$ 2.94 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ เมื่อนำผักตัวอย่างมาผ่านการต้มในน้ำเดือดพบว่าผักตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด คือ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และ มะระขี้นก มีปริมาณวิตามินซี 92.61 $\pm$ 4.41, 108.25 $\pm$ 5.60, 135.46 $\pm$ 4.99 และ 12.56 $\pm$ 3.30 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ มะระขี้นกมีการลดลงของปริมาณวิตามินซีน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 10.78 และตำลึงมีการลดลงของปริมาณวิตามินซีมากที่สุดคือ ร้อยละ 68.69

50990325 : MAJOR : CHEMICAL EDUCATION ; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORD : VITAMIN C / VEGETABLE / HEAT

ISSARA YUWANG : DETERMINATION OF VITAMIN C IN SOME VEGETABLES BY SPECTROPHOTOMETRY. ADVISORY COMMITTEE: NAWASIT RAKBAMRUNG, Ph.D. 41 P. 2010.

The objective of the research was mainly to investigate quantitatively of the vitamin C in terms of total vitamin C of four different kinds of vegetables; chinese cabbage, collard, ivy gourd and bitter cucumber before and after they are boiled in hot water. The determination of vitamin C was conducted using a spectrophotometer employing the apparatus used by Roe and Kuether. Firstly, ascorbic acid was extracted and oxidized into the form of dehydroascorbic acid. Then the dehydroascorbic acid was oxidized into diketogulonic acid which later reacted with 2,4–Dinitrophenylhydrazine, producing a orange of osazone compounds. Detected by the spectrophotometer, dissolved Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone in the solution of sulfuric acid yielded dark red in color which responded to the wavelength of 515 nm (absorption). It was found that the amount of vitamin C of vegetables prior the boiling was highest in bitter cucumber which was 151.83 $\pm$ 3.41 mg/100 g (green weight). Collard, chinese cabbage and ivy gourd contained vitamin C of 140.73 $\pm$ 5.09, 132.27 $\pm$ 2.76 and 40.10 $\pm$ 2.94 mg/100g (green weight) respectively. After boiling, vitamin C in the vegetables was decreased in all samples. The examined amount of chinese cabbage, collard, ivy gourd and bitter cucumber were 92.61 $\pm$ 4.41, 108.25 $\pm$ 5.60, 135.46 $\pm$ 4.99 and 12.56 $\pm$ 3.30 mg/100g (green weight), respectively. The smallest reduction was observed in bitter cucumber which was 10.78%, while ivy gourd showed the maximum decrease in vitamin C (68.69%) after boiling.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

วิตามินซี..... 4

คุณสมบัติทางกายภาพ..... 4

คุณสมบัติทางเคมี..... 5

ความต้องการของร่างกาย..... 6

แหล่งวิตามินซีจากอาหาร..... 6

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี..... 6

การหาปริมาณวิตามินซีในรูปของ Reduced form ของกรดแอสคอร์บิค..... 7

การหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในรูปของวิตามินซีทั้งหมด..... 10

หลักการของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์..... 11

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
การสุ่มตัวอย่างผักที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินซี	17
เครื่องมือและอุปกรณ์	17
สารเคมี	17
การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	18
การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์	20
การเตรียมสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน	20
การสร้างกราฟมาตรฐาน	21
การเตรียมผักตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี	21
การหาปริมาณวิตามินซีในผักตัวอย่าง	22
4 ผลการวิจัย	23
การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี	23
การสร้างกราฟมาตรฐาน	25
การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด	27
5 อภิปรายและสรุปผล	31
สรุปผลการวิจัย	31
ข้อเสนอแนะ	32
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก	35
ประวัติย่อของผู้วิจัย	41

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 แสดงสเปกตรัมของแสงที่ตามองเห็น 12

4-1 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐาน Bis-2,4-Dinitrophenyl Hydrazone ที่ความยาวคลื่นต่างๆ 23

4-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ ในหน่วย ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร 25

4-3 แสดงค่าของสมการเส้นตรงได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง 26

4-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างของสารละลายเจือจางที่ 1 27

4-5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างของสารละลายเจือจางที่ 2 27

4-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างที่ผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดของสารละลายเจือจางที่ 1 28

4-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างที่ผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดของสารละลายเจือจางที่ 2 28

4-8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างที่ผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดของสารละลายเจือจางที่ 2 29

4-9 แสดงร้อยละของการลดลงของวิตามินซีเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด 30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	สูตรโครงสร้างเคมีของกรดแอสคอร์บิค	4
2-2	การเปลี่ยนแปลงของกรดแอสคอร์บิคไปเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค	5
2-3	สูตรโครงสร้างของเคมีของกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคและกรดไดคีโตกลูโลนิก	7
2-4	ปฏิกิริยาของไอโอดีนกับกรดแอสคอร์บิคได้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค	7
2-5	ปฏิกิริยาของ 2,6-Dichlorophenolindophenol กับกรดแอสคอร์บิค	8
2-6	ปฏิกิริยาของกรดแอสคอร์บิคที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วทำปฏิกิริยากับ 2,4–Dinitrophenylhydrazine	10
2-7	แสดงการเกิดอันตรกิริยาของสาร	11
2-8	ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	14
4-1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น	24
4-2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร	26
4-3	เปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในสารละลายผักตัวอย่างก่อนผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดและหลังผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด	30

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วิตามินซีเป็นน้ำตาลชนิดหนึ่งซึ่งโมเลกุลเปลี่ยนรูปไป และเป็นวิตามินชนิดละลายในน้ำ หน้าที่สำคัญประการหนึ่งของวิตามินซีคือ เป็นสารจับออกซิเจนชนิดละลายน้ำ และเป็นสารเก็บกวาดอนุมูลอิสระ วิตามินซีเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในร่างกาย ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการทำลายของอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์เติมออกซิเจน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ไฮดรอกซีโพรลีนและไฮดรอกซีซีไลซีน กรดอะโมโนชนิดที่ได้รับอนุมูลไฮดรอกซีเหล่านี้เป็นชิ้นส่วนที่ประกอบกันเข้าเป็นคอลลาเจน ซึ่งเป็นสารยึดเหนี่ยวที่สำคัญของเนื้อเยื่อประสาน และช่วยประกอบให้มีการยึดเหนี่ยวภายในร่างกายเป็นตัวเป็นตน เนื้อเยื่อประสานบางประเภทอยู่ในรูปกระดูกอ่อน เส้นเอ็นและพังผืด การขาดวิตามินซีทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างเยื่อเมือกและขัดขวางการสมานตัวของแผล หากมีวิตามินซีไม่พอเพียง เนื้อเยื่อรอบๆที่รองรับเส้นเลือดฝอย (เส้นเลือดชนิดที่เล็กที่สุด) ทำให้เส้นเลือดฝอยพลอยฉีกขาดไปด้วย เพราะขาดสิ่งรองรับหรือยึดเหนี่ยว (พิสิฐ วงศ์วัฒนะ, 2547)

เป็นที่ทราบโดยทั่วๆไปว่า การขาดวิตามินซี ทำให้เกิดโรคลักปิดลักเปิดซึ่งเป็นโรคที่รู้จักกันมานาน ในศตวรรษที่ 15 ที่ยุโรปมีคนเป็นโรคนี้กันมาก พบบ่อยในพวกกะลาสีเรือที่เดินทางไปกับเรือไกลๆ และไม่ได้ขึ้นบกเป็นเวลานานๆ ทำให้ขาดอาหารประเภทผักสด และผลไม้สด ซึ่งเป็นต้นตอที่สำคัญ ได้มีผู้ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับวิตามินซีมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1907 เรื่อยมาจนถึงปี ค.ศ. 1928 Szent-Gyorgyi เป็นผู้แยกวิตามินซีนี้ได้เป็นครั้งแรกจากต่อมแอดรีนาลีนและส้ม ตั้งชื่อว่า hexuronic acid ในปี ค.ศ.1932 Glennking C. แยกได้จากมะนาว และพบว่า กรด hexuronic นี้เหมือนวิตามินซี คือ มีฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคหนูตะเภาที่เป็นโรคลักปิดลักเปิดได้ จึงตั้งชื่อว่าวิตามินซี ต่อมา Howarth และ Reichstein รู้สูตรโครงสร้างและสังเคราะห์ได้ในปีนี้ ค.ศ.1933 ต่อจากนั้นมาอีกประมาณ 50 ปี ก็มีการสังเคราะห์วิตามินซีในรูปแบบอุตสาหกรรม โดยที่วิตามินซีที่สังเคราะห์ขึ้นมามีคุณสมบัติเหมือนกับที่สกัดได้จากธรรมชาติทุกประการ (สมทรง เลขะกุล, 2542) วิตามินซีเป็นวิตามินที่ร่างกายคนเราไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ และไม่สะสมในร่างกายของเรา ดังนั้น คนเราจำเป็นต้องได้รับวิตามินซีจากอาหาร ผักและผลไม้ที่กินกันทุกวัน ซึ่งอาหารที่คนไทยกินส่วนใหญ่จะให้ปริมาณวิตามินซีที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายในแต่ละวันอยู่แล้ว (วิรัตน์ ทองรอด, 2549)

วิตามินซีสามารถสลายตัวได้รวดเร็วที่สุดในบรรดาวิตามินทั้งหลาย เนื่องจากวิตามินซีมีความไวต่อออกซิเจน แสง และความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเก็บไว้นานๆหรือนำไปผสมกับด่างเพียงเล็กน้อยก็จะไม่มีวิตามินหลงเหลืออยู่เลย ดังนั้นการนำผักและผลไม้ที่มีวิตามินซีไปทำการหุงต้ม ควรจะทำด้วยการใช้เวลาให้สั้นที่สุด (ดวงใจ เฮงสวัสดิ์, 2546)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เนื่องจากสภาพภูมิประเทศอุดมสมบูรณ์และภูมิอากาศเหมาะแก่การเพาะปลูก ทำให้ปลูกพืชทั้งประเภทผักและผลไม้ไว้สำหรับบริโภคได้ตลอดทั้งปี ผักเป็นอาหารที่คนไทยรับประทานเป็นประจำเกือบทุกมื้อ เนื่องจากผักแต่ละชนิดสามารถนำมาประกอบเป็นอาหารได้หลากหลาย การประกอบอาหารเกือบทุกวิธีจำเป็นต้องผ่านความร้อน ทำให้ปริมาณวิตามินบางส่วนโดยเฉพาะวิตามินซีที่มีอยู่ในผักต้องสลายตัวไป ทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง งานวิจัยสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักบางชนิดระหว่างก่อนการผ่านความร้อนโดยการต้มและหลังจากผ่านความร้อนด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี เพื่อนำข้อมูลไปใช้เป็นพื้นฐานทางโภชนาการในการประกอบอาหาร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในผักบางชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึงและมะระขี้นก
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีของผักแต่ละชนิดระหว่างก่อนผ่านความร้อนโดยการต้มและหลังจากผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบข้อมูลเกี่ยวกับวิตามินซีในผักที่ศึกษาบางชนิด
2. ทราบข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณวิตามินซีที่สลายตัวหลังจากผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด
3. ทราบวิธีการหาปริมาณวิตามินซีด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีของ Roe และ Kurther

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักตัวอย่าง 4 ชนิดได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และมะระขี้นก เปรียบเทียบขอบเขตของกลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างก่อนผ่าน

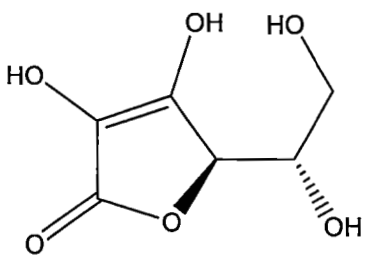
ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดและหลังจากผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด โดยวิธีเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีของ Roe และ Kurther (ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิตามินซี

วิตามินซีมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid) หรือ 2-Oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-ene-diol หรือ L-Ascorbic acid (แอล-แอสคอร์บิคแอซิด)

วิตามินซี มีสูตรทางเคมีเป็น $C_6H_8O_6$ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 สูตรโครงสร้างเคมีของกรดแอสคอร์บิค (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

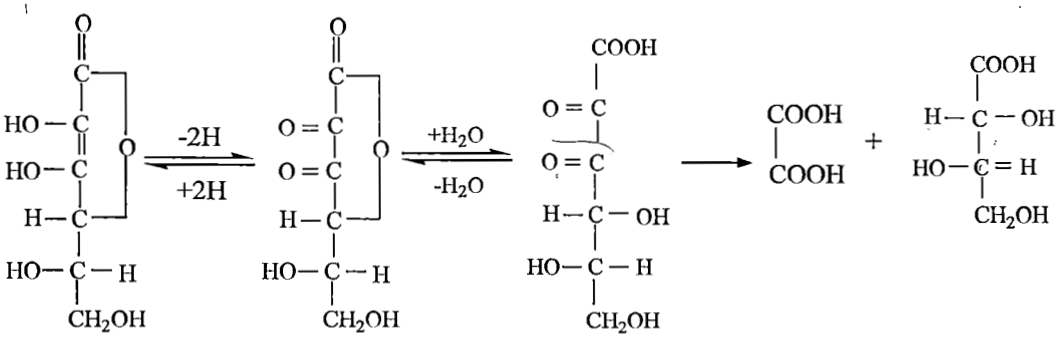
คุณสมบัติทางกายภาพ

วิตามินซีมีลักษณะเป็นผงสีขาว ผลึกรูปเข็ม เกล็ดเล็กๆ สีเหลืองจางๆ ไม่มีกลิ่น มีรสเปรี้ยว มีจุดหลอมเหลว 190-192 °C มีน้ำหนักโมเลกุล 176.13 กรัม/โมล สามารถละลายน้ำได้ดี (33 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร) ในเอธานอล 100 มิลลิลิตร ละลายได้ 3 กรัม ในกลีเซอรอล 100 มิลลิลิตร ละลายได้ 1 กรัม ละลายได้เล็กน้อยในแอซิโตน แต่ไม่ละลายเลยในเบนซีน คลอโรฟอร์มและอีเธอร์ เป็นกรดที่มีค่า pK_1 เท่ากับ 4.17 และ pK_2 เท่ากับ 11.57 เมื่อนำมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 2% จะมี pH อยู่ระหว่าง 2.4 – 2.8 เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง วิตามินซีมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร

คุณสมบัติทางเคมี

วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิคจะมีเสถียรภาพ เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นของแข็ง แต่เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นสารละลายจะถูกออกซิไดส์ได้ง่าย เนื่องจากวิตามินซีมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง โดยจะสลายตัวกลายเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค (Dehydroascorbic acid) ความไม่เสถียรในสารละลายนี้จะเริ่มตั้งแต่ pH เท่ากับ 4 และจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม pH นอกจากนี้วิตามินซียังถูกทำให้สลายตัวได้ง่ายด้วยแสงสว่าง ความร้อน ด่าง และสารออกซิไดซ์ แต่จะคงทนต่อกรดและสารรีดิวซ์ เมื่อรวมกับพวกโลหะ เช่น แคลเซียม โซเดียม คอปเปอร์ และเหล็ก เป็นต้น จะเป็นเกลือได้ง่าย เมื่อถูกแสงสีจะคล้ำลง

วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิคอยู่ในสภาพของสารที่มีประสิทธิภาพ 2 ชนิด คือ แอล-แอสคอร์บิคแอซิด ซึ่งอยู่ใน reduced form และดีไฮโดรแอสคอร์บิคแอซิด อยู่ในรูป oxidized form ทั้งสองรูปนี้จะสามารถเปลี่ยนกลับซึ่งกันและกันได้ด้วยปฏิกิริยารีดักชันและอาจจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสแบบไม่ผันกลับ มีการเปลี่ยนไปเป็น 2,3-ไดคีโตกลูโลนิก ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นกรดออกซาลิกและ L-threomic acid ดังแสดงในภาพที่ 2-2



L-Ascorbic acid Dehydroascorbic acid 2,3-Diketoglulonic acid Oxalic acid L-Threomic acid

ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยนแปลงของกรดแอสคอร์บิคไปเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค (สมทรง เลขะกุล, 2543)

การเปลี่ยนแปลงนี้อาศัยสารช่วยหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนจาก แอล-แอสคอร์บิคแอซิดไปเป็นดีไฮโดรแอสคอร์บิคแอซิดอาศัยพวกสารเร่งต่างๆ เช่น ทองแดง เกลือเหล็ก Quinone,

Hemochromagen, Polyphenol oxidase และ peroxidase ในการเปลี่ยนจาก ดีไฮโดรแอสคอร์บิค แอซิดเป็นแอล-แอสคอร์บิคแอซิดอาศัย DPN, TPN glutathione และสารที่มี –SH อยู่ในโมเลกุล เมื่อแอสคอร์บิคเปลี่ยนเข้าระยะ 2,3-Diketoglulonic acid แล้ว ย่อมหมดประสิทธิภาพเป็นวิตามินซี จากกรดนี้จะเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดออกซาลิก ซึ่งจะถูกขับออกมากับปัสสาวะและ L-Threonic acid ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อเข้าไปในวัฏจักของเครบ(Cheraskin E, Ringsdorf M, & Sisiley EL, 1983, อ้างอิงใน สุชาดา นิลกำแหง และ อโนชา เปาชม, 2543)

ความต้องการของร่างกาย

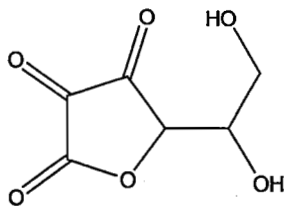
ความต้องการวิตามินซีของร่างกายจะแตกต่างกันไปตามภูมิภาคต่างๆของโลก ดังแสดงในตาราง ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการกำหนดค่าความต้องการวิตามินซี ไว้ตาม Recommened dietary allowance (RDA) ว่าในผู้ใหญ่ปกติควรจะได้รับวันละ 60 มิลลิกรัม การกำหนดค่าความต้องการของวิตามินซี ดังกล่าวนี้ อาจเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาพความเป็นอยู่ของประชากรในแต่ละประเทศ และค่าดังกล่าวก็มิได้คงที่อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามกาลเวลา ดังเช่น เมื่อปี ค.ศ. 1943 RDA ของประเทศสหรัฐอเมริกา มีข้อกำหนดสำหรับวิตามินซีนี้ เท่ากับ 75 มิลลิกรัม/วัน และเปลี่ยนเป็น 45 มิลลิกรัม/วัน ในปี ค.ศ. 1974 และเป็นวันละ 60 มิลลิกรัม/วัน ในปัจจุบัน (สมทรง เลขะกุล, 2543)

แหล่งวิตามินซีจากอาหาร

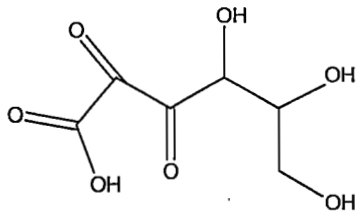
ผลไม้ มันฝรั่ง และผักสีเขียวเป็นแหล่งธรรมชาติที่ดีที่สุดของวิตามินชนิดนี้ วิตามินซีมีอยู่เล็กน้อยในเนื้อสัตว์ ธัญญาหาร เมล็ดพืช และอาหารซึ่งเรามักคิดว่าเป็นแหล่งรวมวิตามินบีชนิดต่างๆ ที่น่าแปลกเป็นอย่างยิ่งก็คือ แหล่งวิตามินซีที่ดีที่สุดกลับไม่ใช่ผลไม้ตะกูลส้ม ตามที่พวกเราถูกทำให้เชื่อกันมาก่อน แต่โรสฮิพส์ บรอกโคลี กะหล่ำปม และพริกหวาน เป็นแหล่งวิตามินซีที่ดีกว่าผลไม้ตระกูลส้ม ผลไม้ไทยที่มีวิตามินซีสูงที่สุดคือ มะขามป้อม (พิสิฐ วงศ์วัฒนะ, 2547)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

การหาปริมาณวิตามินซีทำได้ 2 รูปแบบคือ วิธีการหาในรูปของ Reduced form ของกรดแอสคอร์บิค ส่วนอีกวิธีหนึ่งหาในรูปแบบของปริมาณวิตามินซีทั้งหมด ซึ่งหมายถึงปริมาณของกรดแอสคอร์บิค ดีไฮโดรแอสคอร์บิค และกรดไดคีโตกลูโลนิก



Dehydroascorbic acid



2,3-Diketoglulonic acid

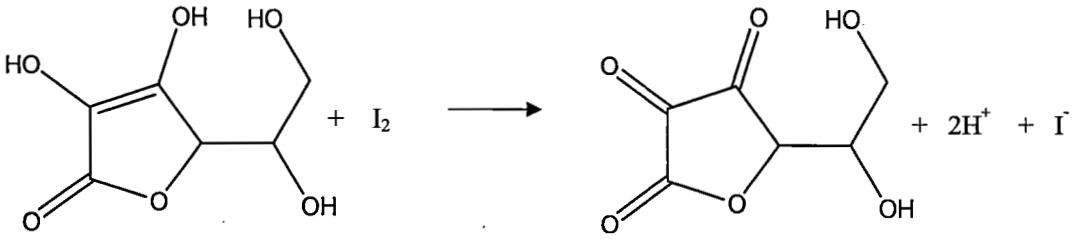
ภาพที่ 2-3 สูตรโครงสร้างของเคมีของกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคและกรดไดคีโตกลูโลนิก(ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

การหาปริมาณวิตามินซีในรูปของ Reduced form ของกรดแอสคอร์บิค

ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในรูปของ Reduced form ของกรดแอสคอร์บิค อาจใช้วิธี Oxidimetric titration โดยมีสารออกซิไดซ์ที่ใช้คือ 2,6-Dichlorophenolindophenol, ไอโอดีน, Methyl blue หรืออาจใช้วิธีการของสเปกโตรโฟโตเมตรี

1. Oxidimetric titration การหาปริมาณวิตามินซีโดยการไทเทรตด้วยสารออกซิไดซ์ มี 3 วิธี ดังนี้ (ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

1.1 Tincturimetrically method หลักการวิเคราะห์นี้จะใช้ไอโอดีนไปออกซิไดซ์กรดแอสคอร์บิค ดังสมการในภาพที่ 2-4



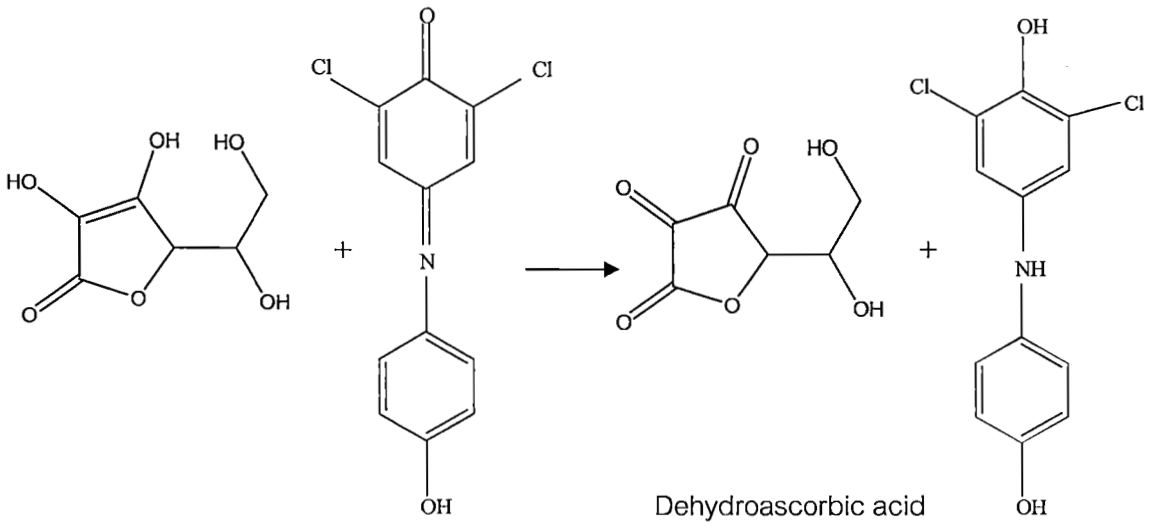
Ascorbic acid

Dehydroascorbic acid

ภาพที่ 2-4 ปฏิกิริยาของไอโอดีนกับกรดแอสคอร์บิคได้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค (ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

ในการทดลองจะไทเทรตสารตัวอย่างที่มีกรดแอสคอร์บิคด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนโดยมีน้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติ ไอโอดีนส่วนที่เกินจะทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งเป็นสีม่วงน้ำเงินทันที แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้หาปริมาณกรดแอสคอร์บิคได้เฉพาะในผักและผลไม้ที่มีวิตามินซีมากพอควร จะใช้ผลิตภัณฑ์นมไม่ได้เนื่องจากอาหารประเภทนี้จะไปลดปริมาณของไอโอดีนที่ใช้

1.2 การไทเทรตกับ 2,6-Dichlorophenolindophenol หลักการนี้เช่นเดียวกับ Tincturimetrically method แต่ใช้ 2,6-Dichlorophenolindophenol เป็นสารออกซิไดซ์แทน ทำให้กรดแอสคอร์บิคเปลี่ยนไปเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค ตามสมการที่แสดงในภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 ปฏิกิริยาของ 2,6-Dichlorophenolindophenol กับกรดแอสคอร์บิค (ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

สารละลาย 2,6-Dichlorophenolindophenol ที่ใช้ไทเทรตในสภาพที่เป็นด่างของโซเดียมไบคาร์บอเนต จะมีสีน้ำเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิคในสภาพที่เป็นกรดจะมีสีชมพู ดังนั้นเมื่อถึงจุดยุติจะเกิดสีชมพู โดยวิธีการนี้จะให้ผลดีกว่าใช้ทิงเจอร์ไอโอดีนเป็นตัวออกซิไดซ์ เพราะแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นตัวทำละลายของไอโอดีนจะระเหยไปทำให้ความเข้มข้นของไอโอดีนเปลี่ยนไป

1.3 วิธี Paper Chromatography และการไทเทรชัน หลักการนี้ใช้ Paper Chromatography ที่จะแยกกรดแอสคอร์บิคออกจากสารรีดิวซ์อื่นๆ หลังจากนั้นจะทำการตัดกระดาษตรงส่วนของกรดแอสคอร์บิค แล้วทำการสกัดด้วยสารละลายกรดออกซาลิกในน้ำเพื่อให้กรดแอสคอร์บิคที่บริสุทธิ์อยู่ในสารละลาย แล้วไทเทรตด้วย 2,6-Dichlorophenolindophenol เข้มข้น 0.001 นอร์มัล (ในกรณีจะหาวิตามินซีทั้งหมด) ต้องหาปริมาณของกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคด้วย โดยจะถูกรีดิวซ์ด้วยไฮโดรเจนซัลไฟต์ก่อนไทเทรตด้วย 2,6-Dichlorophenolindophenol จึงนำปริมาณของกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิครวมกัน จึงเป็นปริมาณของวิตามินซีทั้งหมด วิธีนี้เป็นวิธีเฉพาะซึ่งปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 15 ไมโครกรัม ส่วนสารรีดิวซ์อื่นที่ปะปนมา มีค่าประมาณ 2-3 ไมโครกรัมของค่ากรดแอสคอร์บิคที่หาได้

2. สเปกโตรโฟโตเมทรี แบ่งได้เป็น 2 วิธี

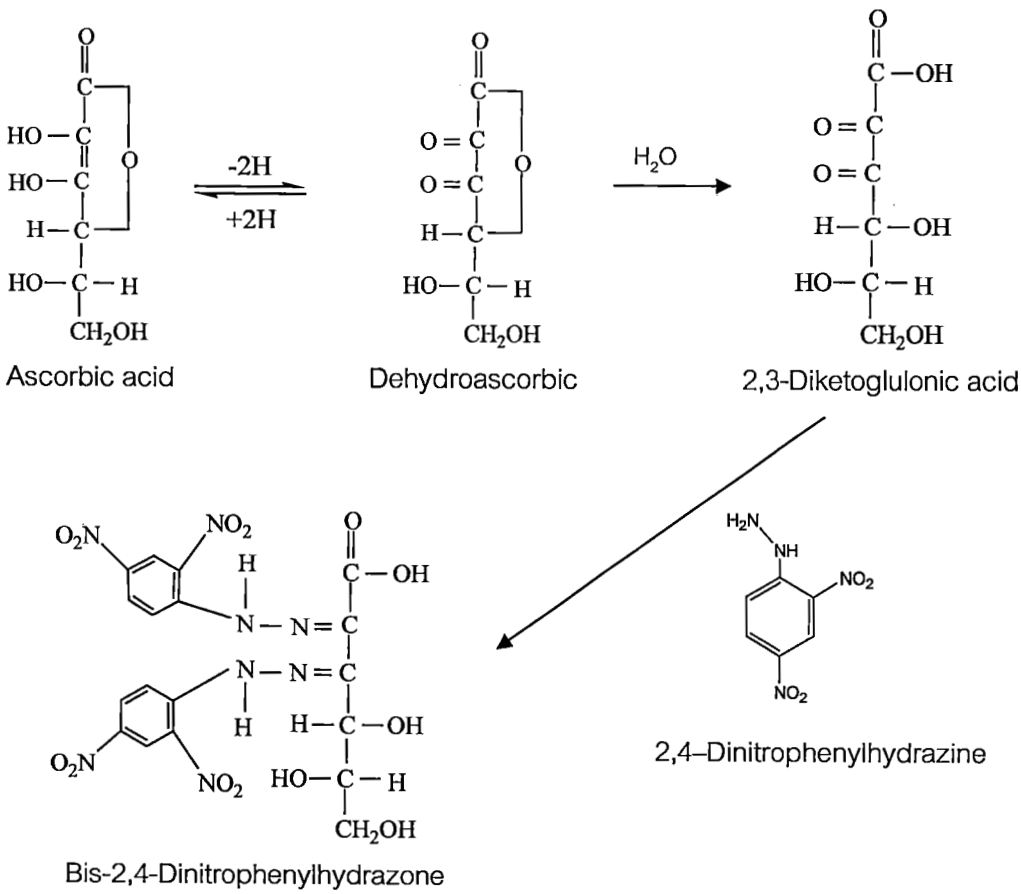
2.1 Mohr method กรดแอสคอร์บิคในผักตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยกรดออกซาลิก และเมื่อทำปฏิกิริยากับ Diazotized-2-nitroaniline จะถูกเปลี่ยนเป็น 2-Nitrophenylhydrazine แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในกรณีที่สารตัวอย่างมีปริมาณกรดแอสคอร์บิคน้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะต้องทำการสกัดเอากรดแอสคอร์บิคออกด้วยไอโซบิวทานอล หลังจากนั้นจะสกัดออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อให้เกิดเกลือของโซเดียม

2.2 Xylene extraction method กรดแอสคอร์บิคหลังจากสกัดด้วยกรดออกซาลิกแล้วจะทำการปรับ pH ของสารละลายด้วย Acetate buffer ให้มีค่า pH อยู่ช่วงระหว่าง 3.6-3.8 แล้วเติมสารละลาย 2,6-Dichlorophenolindophenol ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์ หลังจากนั้นเติมตัวทำละลายเช่น Xylene แล้วแยกเอาชั้นของ Xylene ออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500-520 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะให้ผลถูกต้องยิ่งขึ้น ถ้าเติม 3% เปอร์ออกไซด์ เพื่อที่จะกำจัดการรีดิวซ์ของซัลไฟต์หรือเหล็กเสียก่อน

การหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในรูปของวิตามินซีทั้งหมด

การหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในรูปของวิตามินซีทั้งหมด ทำได้ดังนี้

1. Roe method หลังจากสกัดกรดแอสคอร์บิคด้วยกรดเมตาฟอสฟอริกแล้ว สารตัวอย่างจะถูกออกซิไดซ์ด้วยผงถ่านกัมมันต์ เปลี่ยนไปอยู่ในรูปกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะเปลี่ยนรูปต่อไปเป็นกรดไดคีโตกลูโลนิก แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ 2,4–Dinitrophenylhydrazine ได้ตะกอนสีส้มของสารประกอบโอซาโซน (ในที่นี้คือ Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone) ซึ่งละลายในกรดซัลฟุริกให้สีแดงเข้มแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 520-540 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 2-6 ปฏิกิริยาของกรดแอสคอร์บิคที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วทำปฏิกิริยากับ 2,4–Dinitrophenylhydrazine (ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

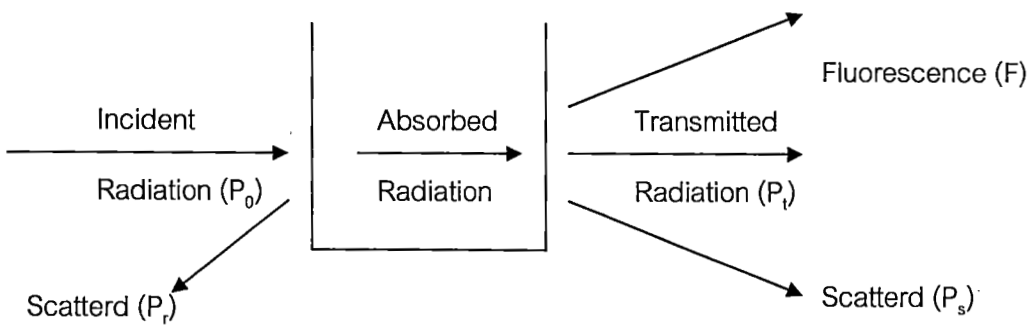
2. Specific method วิธีการนี้ใช้วิธี Roe method มาปรับปรุงแก้ไขเพื่อให้ได้ค่าถูกต้องยิ่งขึ้นโดยพยายามกำจัดสารรบกวนอื่นๆด้วยวิธีโครมาโตกราฟีหรือวิธีแยก วิธีโครมาโตกราฟีที่ใช้ได้แก่ คอลัมน์และทินเลเยอร์ ส่วนวิธีแยกจะใช้เอธิลแอซิเตต เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด วิธีนี้จะให้ผลที่ถูกต้องมากและสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีกรดแอสคอร์บิคจำนวนน้อยได้ (ประพนธ์ ประสพวัฒนา, 2524)

หลักการของเครื่องยูวี- วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ (2552) กล่าวว่า การดูดกลืนแสงหรือรังสีในช่วงอัลตราไวโอเล็ตหรือวิสิเบิล ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-800 นาโนเมตร ของสารเคมีนั้น ส่วนใหญ่ได้แก่ พวกสารอินทรีย์หรือสารประกอบเชิงซ้อนหรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สมบัติของสารดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เทคนิคการวิเคราะห์นี้นิยมเรียกว่า ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี

การเกิดอันตรกิริยากับสารรังสี

เมื่อให้ลำแสงผ่านเข้าไปยังสารละลายหรือวัตถุใดวัตถุหนึ่ง จะพบเสมอว่าบางส่วนของรังสีนั้นถูกดูดกลืน (Absorbed) บางส่วนทะลุผ่านออกไป (Transmitted) บางส่วนเกิดการสะท้อนกลับ (Reflection) และบางส่วนอาจกระเจิง (Scatterd) หรืออาจเกิดขึ้นหลายอย่างพร้อมๆกัน ดังแสดงในภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 แสดงการเกิดอันตรกิริยาของสาร (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

สเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

ลักษณะสเปกตรัมของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าจะครอบคลุมตั้งแต่ความยาวคลื่นสูง ($<0.1^0$ A – 300 m) หรือจากรังสีแกมมาจนถึงคลื่นวิทยุ แต่จะมีช่วงแคบๆของแสงที่ตาเรามองเห็นได้ เรียกว่า วิสิเบิล สเปกตรัม ซึ่งแบ่งเป็นช่วงๆ ตามระดับของพลังงานดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 แสดงสเปกตรัมของแสงที่ตามองเห็น

Wavelength Region (nm)	Colour (absorbed)	Complementary colour (Colour observed)
<380	Ultravilolet	
380-435	Violet	Yellow-green
435-480	Blue	Yellow
480-490	Green-blue	Orange
490-500	Blue-green	Red
500-560	Green	Purple
560-580	Yellow-green	Violet
580-595	Yellow	Blue
595-650	Orange	Green-blue
650-780	Red	Blue-green
>780	Near-infared	

การหาปริมาณของสารกับการวัดปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืน

กฎการดูดกลืนแสงของเบียร์และแลมเบิร์ต กล่าวว่า "ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น" การวิเคราะห์จึงต้องเป็นดังนี้

1. แสงที่ใช้ผ่านสารละลายหรือวัตถุนั้นต้องเป็น monochromatic radiation

2. กระบวนการดูดกลืนแสงของแต่ละอนุภาคนั้นจะต้องไม่ขึ้นแก่กัน นั่นคือสารละลายจะต้องเจือจาง

3. สารละลายที่นำไปวัดต้องเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

เขียนเป็นรูปของสมการได้ดังนี้

$$A = \varepsilon bc$$

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100$$

เมื่อ P_0 หมายถึง ความเข้มข้นของแสงก่อนผ่านตัวกลาง

P หมายถึง ความเข้มข้นของแสงหลังผ่านตัวกลาง

c หมายถึง ความเข้มข้นของสาร (โมล/ลิตร)

b หมายถึง ความหนาของตัวกลาง (เซนติเมตร)

ε หมายถึง โมลาร์แอบซอร์บติวิตี

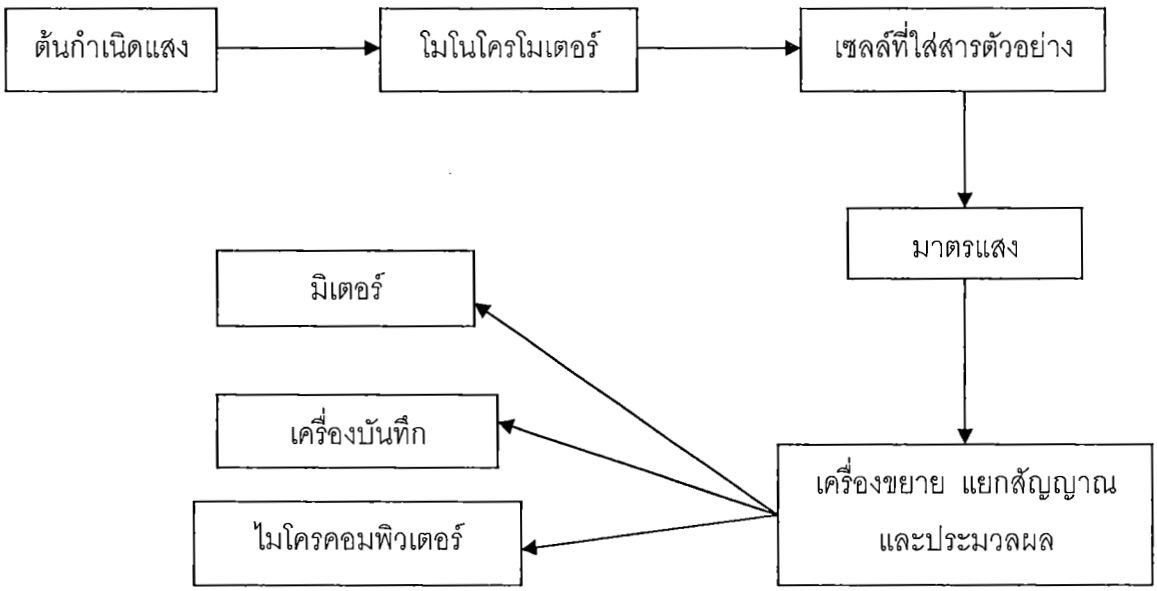
A หมายถึง ค่าปริมาณการดูดกลืนแสง

T หมายถึง ปริมาณการส่งผ่านแสง

ชนิดของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยว ใช้ลำแสงเดียวจากต้นกำเนิดแสงผ่านโมโนโครเมเตอร์แล้วให้ผ่านสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างแล้วจึงไปยังมาตรวัดแสงนั้น ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้ปรับเครื่องอ่านได้ 0 และ 100% T ด้วยแบลงค์ แล้วจึงวัดสารละลายตัวอย่างได้ และจะต้องทำอย่างนี้ทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนคลื่นแสง

2. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ เป็นเครื่องที่ใช้ลำแสง 2 ลำแสง ลำแสงหนึ่งผ่านสารละลายตัวอย่าง อีกลำแสงหนึ่งผ่านสารละลายเปรียบเทียบ



ภาพที่ 2-8 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2552)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กิตติยา ทรงศิริพันธุ์ และวราภรณ์ บูรพาชีพ (2527-2528, บทคัดย่อ) ได้วิจัยหาปริมาณวิตามินซีในผลไม้สดตัวอย่างด้วยการใช้ 2,6-Dicholophenolindophenol โดยแบ่งประเภทของผลไม้ออกเป็น 4 ประเภท ผลการวิจัยพบว่า ผลไม้ที่มีปริมาณวิตามินซีจำนวนมากที่สุดในแต่ประเภทมีดังนี้ ประเภทที่ 1 ผลไม้ที่มีน้ำมาก ได้แก่ ส้มโอ มีปริมาณวิตามินซี 0.471 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประเภทที่ 2 ผลไม้ที่มีรสหวาน ได้แก่ ลำไย มีปริมาณวิตามินซี 53.69 มิลลิกรัม/100 กรัม ประเภทที่ 3 ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว ได้แก่ มะขามป้อม มีปริมาณวิตามินซี 53.06 มิลลิกรัม/100 กรัม และประเภทที่ 4 ผลไม้ที่ใช้ประกอบอาหารคาว ได้แก่ มะละกอดิบ มีปริมาณวิตามินซี 10.44 มิลลิกรัม/100 กรัม

นุชจรีย์ ทวีกุล และอัจฉริยา ช่วยเจริญ (2538, บทคัดย่อ) ได้วิจัยหาปริมาณวิตามินซีในส่วนเปลือกของผักและผลไม้โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างวิตามินซีกับ 2,4-Dinitrophenylhydrazine ในสภาวะที่เป็นกรดทำให้เกิดสารสีแดง จากตัวอย่างผักและผลไม้ 27 ชนิด ในส่วนเปลือกที่ยังสามารถรับประทานได้ ผลการวิจัยพบว่ามีผักและผลไม้ที่ส่วนเปลือกมีวิตามินซีสูง

กว่าส่วนเนื้อมากกว่า 100% จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ลเขียว ส้มโอ มะเขือยาวม่วง องุ่น ชมพู่แตงร้าน ฟักทอง ผักและผลไม้ที่ส่วนเปลือกมีวิตามินซีสูงกว่าส่วนเนื้อไม่ถึง 100% จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ลเหลือง มะดัน หัวไชเท้า มะเขือเทศ ละมุด แอปเปิ้ลแดง มะเขือยาว แตงโมอ่อน ฝรั่ง แคนตาลูป ลูกพลับ และสมอไทย ผักและผลไม้ที่ส่วนเปลือกมีวิตามินซีน้อยกว่าส่วนเนื้อ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ น้ำเต้า มะเฟือง พุทราผลใหญ่ มะขามป้อม แตงกว่า แตงโม มะกอกไทย และบลอคเคอรี่

สิริพร ลาวัลย์ (2546) ได้วิจัยหาปริมาณวิตามินซีในถั่วงอกโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างวิตามินซีกับ 2,4-Dinitrophenylhydrazine ในสภาวะที่เป็นกรดทำให้เกิดสารสีแดง วิจัยตัวอย่างถั่วงอกที่มีอายุการปลูกเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน ซึ่งถั่วงอกอายุ 4 วัน เป็นถั่วงอกที่นำไปจำหน่ายในท้องตลาด พบว่าถั่วงอกที่มีอายุ 2 วัน มีปริมาณวิตามินซีสูงที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 29.06 กรัม/ 100 กรัมถั่วงอก และถั่วงอกอายุ 4 วันมีปริมาณวิตามินซีเฉลี่ยเท่ากับ 10.34 กรัม/ 100 กรัมถั่วงอก จากนั้นทำการทดลองโดยนำถั่วงอกอายุ 2 วันและถั่วงอกอายุ 4 วันมาแช่น้ำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งการแช่น้ำเป็นวิธีการเก็บรักษาถั่วงอกที่ผู้จำหน่ายใช้ก่อนนำไปจำหน่าย ผลการวิจัยพบว่าถั่วงอกอายุ 2 วันมีปริมาณวิตามินซีเฉลี่ยเท่ากับ 15.36 กรัม/ 100 กรัมถั่วงอก และถั่วงอกที่มีอายุ 4 วันมีปริมาณวิตามินซีเฉลี่ยเท่ากับ 6.44 กรัม/ 100 กรัมถั่วงอก

นริศรา มืดนนท์ (2551, บทคัดย่อ) ได้วิจัยหาปริมาณวิตามินซีในผักบางชนิดที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และเกษตรดั้งเดิม จำนวน 5 ชนิด คือ คะน้า ผักบุ้งจีน กะหล่ำปลี ผักกาดหอม และผักกาดขาว วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดด้วยวิธี Molybdenum blue method โดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 727 นาโนเมตร ผลการวิจัยพบว่าผักที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์อยู่ในช่วง 11.60 $\pm$ 0.04 – 84.21 $\pm$ 0.14 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ส่วนผักที่ปลูกแบบเกษตรดั้งเดิมมีปริมาณวิตามินซีอยู่ในช่วง 6.46 $\pm$ 0.27 – 89.91 $\pm$ 0.84 มิลลิกรัม/100 กรัม

Nojavan et al. (2008) ได้ศึกษาผลจากต้น Dog rose ซึ่งมีปริมาณวิตามินซีสูงใน 3 ช่วงอายุของผลคือ ผลสุก ผลห่าม และผลดิบ โดยแบ่งการสกัดออกเป็น 2 วิธีคือ การ freezing และ การทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิคด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography ผลการวิจัยพบว่าการสกัดด้วยการ freezing ให้ผลที่ดีกว่า ปริมาณของกรดแอสคอร์บิคพบมากที่สุดในผล dog rose ที่สุกเต็มที่ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแอสคอร์บิคด้วยวิธีดังกล่าวกับผลส้มพบว่าผล dog rose มีความเสถียรสูงที่สุด ปริมาณกรดแอสคอร์บิคที่พบในผล dog

rose มีจำนวน 417 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด ส่วนในส้มจะพบเพียง 76 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด

Pellegrini et al. (2010) ได้ศึกษาผลของกระบวนการปรุงอาหารอย่างง่าย เช่น การต้ม การใช้เตาอบไมโครเวฟ และการนึ่ง ที่มีต่อสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร ผลการวิจัยพบว่าในส่วนของกรดแอสคอร์บิคด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography นั้นพบว่ากระบวนการปรุงอาหารทุกวิธีมีผลทำให้ปริมาณของกรดแอสคอร์บิคลดลงจำนวนมาก

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การสุ่มตัวอย่างผักที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินซี

ตัวอย่างผักสี่ชนิดได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และมะระขี้นก จากตลาดตำบลบางคลาน อำเภอโพทะเล จังหวัดพิจิตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด Specrtronic 20 ผลิตโดย Milton Roy
2. เซล (cuvette cell)
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermostat)
4. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance)
5. ปิเปต
6. ชุดกรองสุญญากาศ
7. บีกเกอร์
8. Mortar
9. กระบอกตวง
10. แท่งแก้วคนสาร
11. ช้อนตักสาร
12. เครื่องชั่งไฟฟ้า
13. กระดาษกรอง Whatman no.42
14. หลอดทดลอง
15. ที่ตั้งหลอดทดลอง

สารเคมี

1. L-กรดแอสคอร์บิค ($C_6H_8O_6$) AR grade ผลิตโดย Merck, Germany
2. 2,4-Dinitrophenylhydrazine [$(NO_2)_2C_6H_3NHNH_2$] AR grade ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., England

3. Metaphosphoric acid (HPO_3) AR grade ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., England
4. Glacial acetic acid (CH_3COOH) assay 99.9% AR grade ผลิตโดย Merck, Germany
5. Acitavated Charcoal Laboratory Chemical grade ผลิตโดย ASP AJAX Finechem Ltd., Australia
6. Thiourea (CH_4N_2S) AR grade ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., England
7. กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) AR grade ผลิตโดย Carlo Erba, Italy
8. Potassium thiocyanate (KSCN) AR grade ผลิตโดย Univar, Australia

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% (โดยมวล/ปริมาตร)

ชั่ง Metaphosphoric acid 50 กรัม ละลายในน้ำจนได้ปริมาตรอย่างละ 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2. สารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 10% (โดยมวล/ปริมาตร)

ชั่ง Metaphosphoric acid 100 กรัม ละลายในน้ำจนได้ปริมาตรอย่างละ 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3. สารละลายกรดผสมระหว่าง Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% (โดยมวล/ปริมาตร) กับแอซิติกเข้มข้น 10% (โดยปริมาตร/ปริมาตร)

ชั่ง Metaphosphoric acid 50 กรัม ละลายใน glacial acetic acid จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำจนครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

4. การเตรียมผงถ่านกัมมันต์

เติม ผงถ่านกัมมันต์ 200 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10% (โดยปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 1000 มิลลิลิตร ต้มจนเดือดแล้วกรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman) ล้าง ผงถ่านกัมมันต์ ที่กรองได้ด้วยน้ำจนน้ำล้างที่ได้ไม่มี Ferric ion (ทดสอบน้ำล้างได้โดยการเติมสารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนต ถ้าไม่เกิดสีแดงเลือดนกแสดงว่าไม่มี Ferric ion)

5. สารละลาย Thiourea เข้มข้น 1% ในสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5%

ชั่ง thiourea 5 กรัม ละลายในสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

6. สารละลาย Thiourea เข้มข้น 2% ในสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5%

ชั่ง thiourea10 กรัม ละลายในสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

7. สารละลาย กรดซัลฟุริก เข้มข้น 9 นอร์มอล

นำสารละลาย กรดซัลฟุริก เข้มข้นจำนวน 250 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำจำนวน 700 มิลลิลิตร ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งแล้วเจือจางด้วยน้ำจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

8. สารละลาย 2,4-Dinitrophenylhydrazine เข้มข้น 2% (โดยมวล/ปริมาตร)

ชั่ง 2,4-Dinitrophenylhydrazine 2 กรัม ละลายในสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

สารละลาย 2,4-Dinitrophenylhydrazine เข้มข้น 2% เมื่อไม่ต้องการใช้ให้เก็บไว้ในที่เย็น และสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์หลังจากการเตรียมสารละลาย ถ้าระยะเวลานานกว่านี้ต้องเตรียมสารละลายใหม่

9. สารละลาย กรดซัลฟุริก เข้มข้น 85% (โดยปริมาตร/ปริมาตร)

นำสารละลาย กรดซัลฟุริกเข้มข้น จำนวน 450 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำ 45 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร

10. สารละลาย กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง กรดแอสคอร์บิค 100 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ที่เตรียมได้เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจำนวน 50 มิลลิลิตร เติมผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม เขย่าแล้วกรองโดยใช้ Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42

2. ปิเปตสารละลายที่กรองได้ในข้อ1. มาจำนวน 10 มิลลิลิตร เติม Thiourea จำนวน 5 กรัม แล้วเจืองจางด้วยสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

3. ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 2. มาจำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลาย Thiourea เข้มข้น 1% จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายวิตามินซีเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วทำการทดลองตามขั้นตอนการเกิดสารประกอบโอซาโซนและการทำให้สารละลายเกิดสีตามลำดับ

4. นำสารละลายไปวัดค่า Transmittance โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ในช่วง 470 ถึง 560 นาโนเมตร แล้วนำไปเขียนกราฟระหว่าง ความยาวคลื่นในหน่วยนาโนเมตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้จาก %T แล้วหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุดจากกราฟ เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการหาปริมาณวิตามินซีต่อไป

การเตรียมสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลายวิตามินซีมาตรฐานเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง กรดแอสคอร์บิค มาอย่างละเอียด 100 มิลลิกรัมแล้วละลายและเจือจางด้วย metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

2. การเตรียมสารละลายวิตามินซีมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ

ปิเปตสารละลาย กรดแอสคอร์บิค ที่เตรียมได้จากข้อ 1. มาจำนวน 50 มิลลิลิตรเติมผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม แล้วกรองโดยใช้ Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ปิเปตสารละลายที่กรองได้มาจำนวน 10 มิลลิลิตรแล้วเติม thiourea จำนวน 5 กรัม เจือจางด้วยสารละลาย metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค ที่เตรียมได้จำนวน 5, 10, 15, 25, 30 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลาย thiourea เข้มข้น 1 % จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายวิตามินซีเข้มข้น 1.0 , 2.0 , 3.0 , 5.0 , 6.0 และ 10.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายวิตามินซีความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมได้ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานมาทำการทดลองตามขั้นตอนการเกิดสารประกอบโอซาโซนและการทำให้สารละลายเกิดสีตามลำดับ แล้วนำสารละลายที่ได้ในแต่ละหลอด ไปวัดค่า %T โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมคือ 515 นาโนเมตร แล้วนำผลที่ได้จากการทดลอง มาเขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้จาก %T กับความเข้มข้นของวิตามินซีทั้งหมด ในสารละลายมาตรฐานในหน่วย ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายผักตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี

1. การเตรียมผักตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

นำผักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ มี 4 ชนิดได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และมะระขี้นก มาล้างให้สะอาดและไม่ให้สัมผัสกับภาชนะที่เป็นโลหะ ส่วนผักต้องวิเคราะห์หลังการผ่านความร้อนจากการต้ม จะต้มในบีกเกอร์ที่มีน้ำเดือดประมาณ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที แล้วนำขึ้นมาใส่ภาชนะที่เป็นพลาสติก ทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บไว้ในตู้เย็นขณะรอการวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมสารละลายผักตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

ชั่งผักตัวอย่างให้รู้น้ำหนักถึง 0.1 มิลลิกรัม ประมาณ 30 กรัม และเติมสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 10% จำนวน 60 กรัม (ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง) บดให้เป็นเนื้อเดียวกันใน Mortar เป็นเวลา 2 – 5 นาที แบ่งของผสมที่ได้ออกมาให้มีน้ำหนักแน่นอน 30 กรัม แล้วทำให้เจือจางด้วยกรดผสมจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร จากนั้นกรองด้วย Buchner funnel เก็บ filtrate ไว้

3. การออกซิไดส์สารละลายให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค

นำสารละลายจากข้อ 2. จำนวน 50 มิลลิลิตร มาเติมผงถ่านกัมมันต์ จำนวน 1 กรัม เขย่าแล้วกรองด้วย Buchner funnel โดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปิเปตสารละลายแบ่งออกเป็น 2 ความเข้มข้น คือ สารละลายเจือจางที่ 1 ปิเปตมา 10 มิลลิลิตร สารละลายเจือจางที่ 2 ปิเปตมา 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตรของแต่ละสารละลาย แล้วเติมสารละลาย thiourea เข้มข้น 2% จำนวน 5 และ 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเจือจางที่ 1 และสารละลายเจือจางที่ 2 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วเจือจางแต่ละสารละลายด้วยสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนแต่ละสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

4. การเกิดสารประกอบโอซาโซน

ปิเปตสารละลายจากข้อ 3 มาอย่างละ 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองสารละลายละ 2 หลอด โดยหลอดหนึ่งใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบ เติมสารละลาย 2,4 –Dinitrophenylhydrazine เข้มข้น 2% จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ไม่ใช่สารละลายเปรียบเทียบ แล้วนำสารละลายทุกหลอดแช่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายทุกหลอดแช่ในอ่างน้ำแข็ง

5. การทำให้เป็นสารละลายเกิดสี

เติมสารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น 85% จำนวน 5 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ ด้วยหลอดหยด ลงในสารละลายทุกหลอด ขณะที่หลอดต่างๆแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย 2,4 – Dinitrophenylhydrazine เข้มข้น 2% จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่ใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ (Blank) ทุกหลอดขณะแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายทุกหลอดออกจากอ่างน้ำแข็งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

6. การวัดความเข้มของสี

นำสารละลายผักตัวอย่างและสารละลายเปรียบเทียบจากข้อ 1. – 5. มาวัดหาค่า % T ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การหาปริมาณวิตามินซีในผักตัวอย่าง

ทำได้โดยการวัดความเข้มของสี ดังนี้

นำสารละลายผักตัวอย่าง และสารละลายเปรียบเทียบที่ได้มาวัดค่า %T ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกผล

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีทั้งหมด

ความยาวคลื่นที่เหมาะสมซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปรากฏผลดังแสดงในตารางที่ 4-1

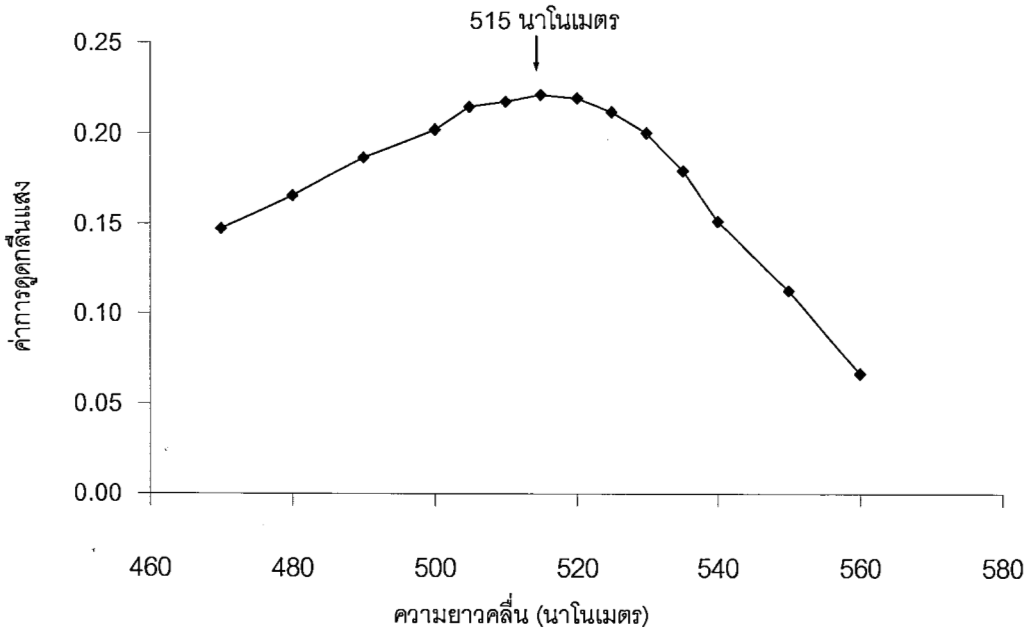
ตารางที่ 4-1 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐาน Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazone ที่ความยาวคลื่นต่างๆ

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	% Transmittance				ค่าการดูดกลืนแสง ± SD (n=3)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
470	71.2	71.2	71.4	71.3	0.147 ± 0.115
480	68.5	68.2	68.3	68.3	0.165 ± 0.153
490	65.0	65.1	65.1	65.1	0.187 ± 0.058
500	62.8	62.8	62.8	62.8	0.202 ± 0.000
505	61.1	61.1	61.0	61.1	0.214 ± 0.058
510	60.6	60.6	60.6	60.6	0.218 ± 0.000
515	60.0	60.1	60.1	60.1	0.221 ± 0.058
520	60.5	60.2	60.5	60.4	0.218 ± 0.173
525	61.5	61.5	61.4	61.5	0.211 ± 0.058
530	63.0	63.3	63.0	63.1	0.201 ± 0.173
535	66.2	66.2	66.2	66.2	0.179 ± 0.000
540	70.5	70.6	70.7	70.6	0.151 ± 0.100
550	77.0	77.2	77.2	77.1	0.113 ± 0.115
560	85.8	85.8	86.0	85.9	0.067 ± 0.115

664.07
ส 764 ก

270644

จากตารางที่ 4-1 ใช้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ตรงกับค่าความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ซึ่งเลือกเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณวิตามินซีต่อไป ดังแสดงดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น

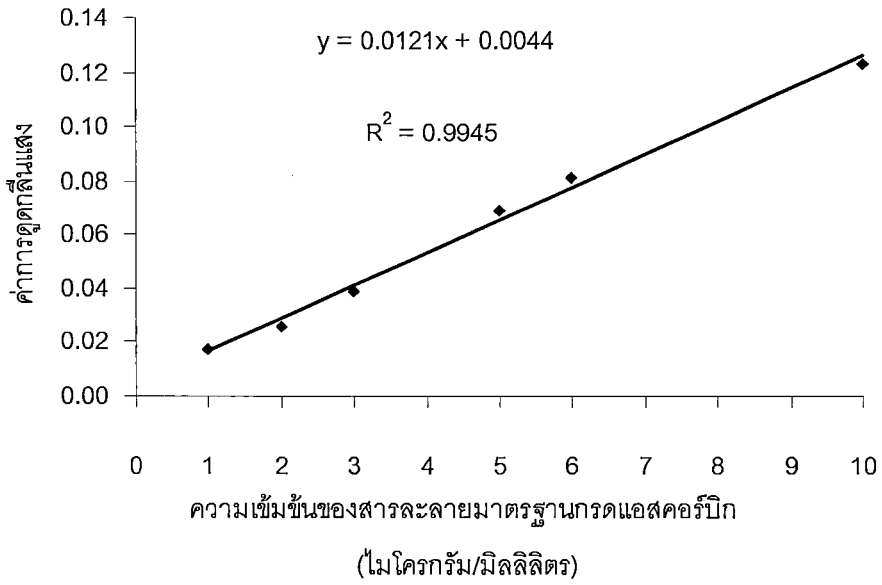
การสร้างกราฟมาตรฐาน

จากผลการทดลองในการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาวิตามินซีทั้งหมด ปรากฏผลดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ ในหน่วย ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิค (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	% Transmittance				ค่าการดูดกลืนแสง ± SD (n = 3)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
1.00	96.2	96.2	96.1	96.2	0.017 ± 0.058
2.00	94.2	94.2	94.2	94.2	0.026 ± 0.000
3.00	91.5	91.5	91.4	91.5	0.039 ± 0.058
5.00	85.4	85.5	85.3	85.4	0.069 ± 0.100
6.00	83.2	83.0	82.9	83.0	0.081 ± 0.153
10.00	75.4	75.2	75.4	75.3	0.123 ± 0.115

จากตารางที่ 4-2 นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ตารางที่ 4-3 แสดงค่าของสมการเส้นตรงได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง

การวิเคราะห์	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ช่วงความเป็นเส้นตรง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	1-10
สมการเส้นตรง	y = 0.0121x + 0.0044
R^2	0.9945
SD ที่ความเข้มข้น 1.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	0.058
SD ที่ความเข้มข้น 5.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	0.100
%RSD	0.552
LOD (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	0.823
LOQ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	2.7445

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในผักตัวอย่าง 4 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และมะระขี้นก ปรากฏผลดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างของสารละลายเจือจางที่ 1

ตัวอย่างผัก	% Transmittance				ค่าการดูดกลืนแสง ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	(n = 3)
กวางตุ้ง	47.0	47.2	47.2	47.1	0.327 ± 0.001
คะน้า	44.7	44.7	44.7	44.7	0.350 ± 0.000
ตำลึง	77.8	78	77.9	77.9	0.108 ± 0.001
มะระขี้นก	40.5	40.2	40.4	40.4	0.394 ± 0.002

* สารละลายเจือจางที่ 1 คือ สารละลายที่ปิเปตมา 10 มิลลิลิตรในขั้นตอนออกซิไดซ์สารละลายให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค

จากตารางที่ 4-4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเจือจางที่ 1 พบว่าสารละลายมะระขี้นกมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือ 0.394 และตำลึงมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุดคือ 0.108

ตารางที่ 4-5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างของสารละลายเจือจางที่ 2

ตัวอย่างผัก	% Transmittance				ค่าการดูดกลืนแสง ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	(n = 3)
กวางตุ้ง	21.3	21.6	21.5	21.5	0.668 ± 0.003
คะน้า	18.4	18.5	18.8	18.6	0.731 ± 0.005
ตำลึง	64.2	64.2	64.4	64.3	0.192 ± 0.001
มะระขี้นก	15.4	15.6	15.6	15.5	0.809 ± 0.003

* สารละลายเจือจางที่ 2 คือ สารละลายที่ปิเปตมา 20 มิลลิลิตรในขั้นตอนออกซิไดซ์สารละลายให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค

จากตารางที่ 4-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเจือจางที่ 2 พบว่าสารละลายมะระขี้นกมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือ 0.809 และตำลึงมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุดคือ 0.192

ตารางที่ 4-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างที่ผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดของสารละลายเจือจางที่ 1

ตัวอย่างผัก	% Transmittance				ค่าการดูดกลืนแสง ± SD (n = 3)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
กวางตุ้ง	58.2	58.4	58.4	58.3	0.234 ± 0.001
คะน้า	51.1	51.4	51.2	51.2	0.290 ± 0.002
ตำลึง	93.2	93.3	93.5	93.3	0.030 ± 0.001
มะระขี้นก	44.5	44.4	44.5	44.5	0.352 ± 0.001

* สารละลายเจือจางที่ 1 คือ สารละลายที่ปิเปตมา 10 มิลลิลิตรในขั้นตอนออกซิไดซ์สารละลายให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค

จากตารางที่ 4-6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเจือจางที่ 1 ของสารละลายผักตัวอย่างหลังจากผ่านความร้อยโดยการต้มในน้ำเดือดพบว่าสารละลายมะระขี้นกมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือ 0.352 และตำลึงมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุดคือ 0.030

ตารางที่ 4-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผักตัวอย่างที่ผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดของสารละลายเจือจางที่ 2

ตัวอย่างผัก	% Transmittance				ค่าการดูดกลืนแสง ± SD (n = 3)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
กวางตุ้ง	31.8	32.0	32.0	31.9	0.496 ± 0.002
คะน้า	27.7	27.9	28.0	27.9	0.555 ± 0.002
ตำลึง	83.5	83.3	83.4	83.4	0.079 ± 0.001
มะระขี้นก	21.6	21.6	21.8	21.7	0.664 ± 0.002

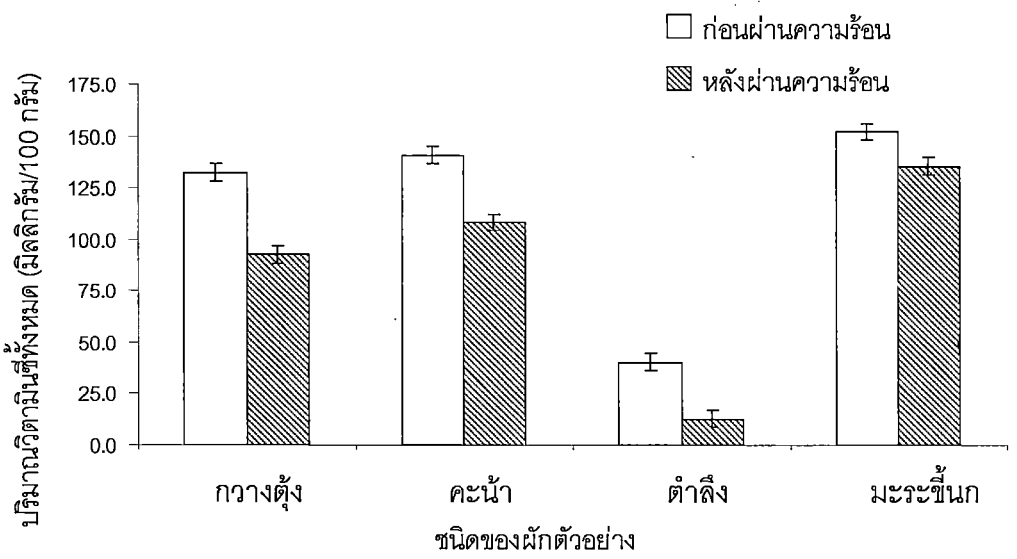
* สารละลายเจือจางที่ 2 คือ สารละลายที่ปิเปตมา 20 มิลลิลิตรในขั้นตอนออกซิไดซ์สารละลายให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค

จากตารางที่ 4-7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเจือจางที่ 2 ของสารละลายผักตัวอย่างหลังจากผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดพบว่าสารละลายมะระขี้นกมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือ 0.664 และตำลึงมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุดคือ 0.079

ตารางที่ 4-8 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีทั้งหมดเปรียบเทียบก่อนผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดและหลังจากผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

ตัวอย่างผัก	วิธีการทดลอง	ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด (มิลลิกรัม/100 กรัม)			
		สารละลายเจือจางที่ 1	สารละลายเจือจางที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	%RSD
กวางตุ้ง	ปกติ	130.32	134.22	132.27 $\pm$ 2.76	2.09
	ต้ม	89.49	95.72	92.61 $\pm$ 4.41	4.76
คะน้า	ปกติ	137.13	144.33	140.73 $\pm$ 5.09	3.62
	ต้ม	104.28	112.21	108.25 $\pm$ 5.60	5.18
ตำลึง	ปกติ	42.17	38.02	40.10 $\pm$ 2.94	7.33
	ต้ม	10.22	14.89	12.56 $\pm$ 3.30	26.25
มะระขี้นก	ปกติ	149.41	154.24	151.83 $\pm$ 3.41	2.25
	ต้ม	138.99	131.93	135.46 $\pm$ 4.99	3.69

จากตารางที่ 4-8 ปริมาณของวิตามินซีทั้งหมดในสารละลายผักตัวอย่างพบว่าผักตัวอย่างทุกชนิดมีปริมาณวิตามินซีลดลงหลังจากที่ผ่านการต้มในน้ำเดือดซึ่งแสดงการเปรียบเทียบการลดลงของปริมาณวิตามินซีทั้งหมดดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-3 เปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในสารละลายผักตัวอย่างก่อนผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดและหลังผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด

ตารางที่ 4-9 แสดงร้อยละของการลดลงของวิตามินซีเปรียบเทียบก่อนการผ่านความร้อนและหลังจากการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด

ตัวอย่างผัก	ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด (มิลลิกรัม/100 กรัม)			
	ก่อนต้ม	หลังต้ม	ปริมาณที่ลดลง	ร้อยละของการลดลง
กวางตุ้ง	132.27 ± 2.76	92.61 ± 4.41	39.66	29.98
คะน้า	140.73 ± 5.09	108.25 ± 5.60	32.48	23.08
ตำลึง	40.10 ± 2.94	12.56 ± 3.30	27.54	68.69
มะระขี้นก	151.83 ± 3.41	135.46 ± 4.99	16.37	10.78

จากตารางที่ 4-9 การลดลงของวิตามินซีทั้งหมดในสารละลายผักตัวอย่างพบว่าตำลึงมีการลดลงมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 68.69 ลำดับถัดมาคือกวางตุ้ง คะน้าและมะระขี้นก คิดเป็นร้อยละ 29.98, 23.08 และ 10.78 ตามลำดับ

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการหาปริมาณวิตามินซีที่มีอยู่ในผักตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง คะน้า ตำลึง และมะระขี้นก เปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีทั้งหมดที่มีอยู่ในผักตัวอย่างระหว่างก่อนผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดกับหลังการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นการหาปริมาณวิตามินซีในรูปของวิตามินซีทั้งหมด ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีสกัดกรดแอสคอร์บิค และออกซิไดซ์กรดแอสคอร์บิคให้อยู่ในรูปกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค จากนั้นทำการไฮโดรไลซ์กรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคให้อยู่ในรูปของกรดไดคีโตกลูโลนิก แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ 2,4–Dinitrophenylhydrazine ได้ตะกอนสีส้มของสารประกอบโอซาโซน (Bis-2,4-Dinitrophenyl hydrazone) ซึ่งละลายในกรดซัลฟุริกให้สีแดงเข้มแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณวิตามินซีในผักตัวอย่างในหน่วยมิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด จากการวิจัยนำผักตัวอย่างมาวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณวิตามินซีในหน่วยมิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย ดังนี้ มะระขี้นก (151.83 $\pm$ 3.41) คะน้า (140.73 $\pm$ 5.09) กวางตุ้ง (132.27 $\pm$ 2.76) และ ตำลึง (40.10 $\pm$ 2.94) เมื่อนำผักตัวอย่างมาผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดและวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในหน่วยมิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักสดพบว่าผักตัวอย่างทุกชนิดมีปริมาณวิตามินซีลดลงเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย ดังนี้ มะระขี้นก (135.46 $\pm$ 4.99) คะน้า (108.25 $\pm$ 5.60) กวางตุ้ง (92.61 $\pm$ 4.41) และ ตำลึง (12.56 $\pm$ 3.30) จากการวิจัยพบว่ากระบวนการปรุงอาหารโดยการต้มมีผลทำให้ปริมาณของวิตามินซีในผักตัวอย่างมีปริมาณลดลง โดยมะระขี้นกเมื่อเปรียบกับผักตัวอย่างชนิดอื่นพบว่ามีปริมาณวิตามินซีมากที่สุดและมีร้อยละการลดลงของวิตามินซีน้อยที่สุด เท่ากับ 10.78 สำหรับกวางตุ้ง คะน้า และ ตำลึงมีร้อยละของการลดลงเท่ากับ 29.98, 23.08 และ 68.69 ตามลำดับ

ผักตัวอย่างที่เลือกมาทำการวิจัยจะมีลักษณะแตกต่างกัน กวางตุ้งและคะน้ามีขนาดลักษณะลำต้นและใบที่คล้ายกัน ตำลึงมีขนาดใบบางและเล็ก มะระขี้นกลักษณะเป็นผลรี ซึ่งเมื่อผ่านความร้อนแล้วกวางตุ้งและคะน้ามีร้อยละการลดลงของปริมาณวิตามินซีที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันคือ 29.98 และ 23.08 ตามลำดับ ตำลึงซึ่งมีใบขนาดเล็ก จะมีการลดลงของปริมาณวิตามินซีมากถึงร้อยละ 68.69 สำหรับมะระขี้นกนั้น ผลที่นำมารับประทานจะนำมาต้มทั้งลูก มีร้อยละการลดลงของปริมาณวิตามินซีเพียง 10.78 ซึ่งจากผลการวิจัยทำให้ทราบได้ว่ารูปร่างลักษณะของใบ

หรือผลของพืชแต่ละชนิดที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อการสูญเสียปริมาณวิตามินซีเมื่อนำไปให้ความร้อนในการประกอบอาหารด้วยวิธีต่างๆ

ข้อเสนอแนะ

1. เพิ่มการศึกษาการเปรียบเทียบโดยการใช้ผักตัวอย่างที่มีลักษณะใบ ลำต้นหรือผลที่คล้ายกัน เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้พบว่าตำลึงซึ่งเป็นผักที่มีใบขนาดเล็กมีการสูญเสียปริมาณของวิตามินซีหลังจากการผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดมากที่สุด

2. การใช้ผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวออกซิไดซ์กรดแอสคอร์บิคไปเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคนั้น มีข้อดีคือสามารถกำจัดสีของสารละลายได้ แต่ถ้าหากใช้มากเกินอาจทำให้เกิดการดูดกลืนวิตามินได้

3. สารละลายที่กรองได้หลังจากผ่านการออกซิไดซ์ด้วยผงถ่านกัมมันต์แล้ว ควรทิ้งไว้ประมาณ 20 – 30 นาที เพื่อให้ กรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคเปลี่ยนไปเป็นกรดไดคีโตกลูโลนิคให้มากที่สุด

4. ในขั้นตอนการออกซิไดซ์กรดแอสคอร์บิคให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิคด้วยผงถ่านกัมมันต์ ควรต้องทดสอบให้แน่ใจว่าไม่มีไอออนของเหล็กเจือปนอยู่ เนื่องจากไอออนของเหล็กสามารถทำปฏิกิริยากับ 2,4-Dinitrophenylhydrazine ได้สีที่อาจจะรบกวนการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ของกรดแอสคอร์บิคกับ 2,4-Dinitrophenylhydrazine

5. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีของผักตัวอย่างชนิดเดียวกันแต่การกระบวนการเพาะปลูก สถานที่และเวลาที่ต่างกันอาจจะทำให้ปริมาณของวิตามินซีที่ได้แตกต่างกัน จึงอาจทำการทดลองเกี่ยวกับปัจจัยดังกล่าวเพื่อเปรียบเทียบเพิ่มเติมได้

6. กระบวนการปรุงอาหารโดยการใช้ความร้อนมีผลทำให้วิตามินซีบางส่วนที่อยู่ในผักสลายตัวไป แต่ยังคงคุณค่าทางอาหาร การรับประทานผักสดถึงแม้จะได้รับคุณค่าทางอาหารที่มากกว่าแต่อาจได้รับเชื้อโรคหากล้างไม่สะอาด จึงควรบริโภคผักที่ผ่านการปรุงด้วยความร้อนเพื่อความสะอาดและปลอดภัย

บรรณานุกรม

กิตติยา ทรงศิริพันธุ์ และวราภรณ์ บูรพาชีพ. (2527-2528). *ตรวจหาปริมาณวิตามินซีในผลไม้*. โครงการพิเศษเภสัชศาสตรบัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ดวงใจ เฮงสวัสดิ์. (2546). วิตามินซี : เพื่อนซี้ของชีวิต, *Food, 33*(4): 235-237.

นริศรา มืดนนท์. (2551). *การหาปริมาณวิตามินซีในผักบางชนิดจากตลาดที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแบบเกษตรดั้งเดิม*. การศึกษาอิสระวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเคมีสำหรับครู, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นุชจรีย์ ทวีกุล และอัจฉริยา ช่วยเจริญ. (2538). *การหาปริมาณวิตามินซีในส่วนของเปลือกผักและผลไม้โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี*. โครงการเภสัชศาสตรบัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ประพนธ์ ประสพวัฒนา. (2524). *การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผัก*. งานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พิสิฐ วงศ์วัฒนะ. (2547). *วิตามิน*. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน.

แม้น อมรสิทธิ์, ยุวดี เชี่ยววัฒนา, ศรีวิไล โอมอภิญญาณ, อทิตยา ศิริภิญญานนท์, อมร เพชรสม, และอุมาพร สุขม่วง (2552). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

วิรัตน์ ทองรอด. (2549). วิตามินซี. *หมอชาวบ้าน, 27*(323), 55-57.

ศิริวรรณ สุทธจิตต์. (2550). *วิตามิน*. กรุงเทพฯ: The Knowledge Center.

สมทรง เลขะกุล. (2543). *ชีวเคมีของวิตามิน*. กรุงเทพฯ: ศุภวนิชการพิมพ์.

สิริพร ลาวัลย์. (2546). ปริมาณวิตามินซีในถั่วงอก. *วารสารมหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 22*(1), 19-26.

สุชาดา นิลกำแหง และ อโนชา เปาชม. (2543). *การสกัดแยกวิตามินซีจากสมุนไพร*. โครงการพิเศษเภสัชศาสตรบัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

Jame, N. Miller, & Jane C. Miller. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (4th ed.). New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Nojavan, S., Khalilian, F., Kiaiec, F.M., Rahimic, A., Arabanian, A., & Chalavi, S. (2008). Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different

maturity stages of Rosa canina L. fruit [Abstract]. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*, 300.

Pellegrini, N., Chiavaro, E., Gardana, C., Mazzeo, T., Contino, D., Gallo M., Riso, P., Fogliano, V., & Porrini, M. (2010). Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and Frozen Brassica Vegetables [Abstract]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 4310.

ภาคผนวก

การคำนวณ

การคำนวณความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ผ่านการออกซิไดซ์ด้วยผงถ่านกัมมันต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วเติม thiourea 5 กรัม เจือจางด้วย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จำนวน 500 มิลลิลิตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค} = \frac{(1\text{mg/mL})(10\text{mL})}{500\text{mL}}$$

$$= 0.02 \text{ mg/mL}$$

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคจากข้อ 1. จำนวน 5, 10, 15, 25, 30 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลาย thiourea เข้มข้น 1 % จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นที่ 1 ปิเปตมา 5 มิลลิลิตร เตรียมให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค} = \frac{(0.02\text{mg/mL})(5\text{mL})}{100\text{mL}}$$

$$= 1 \text{ } \mu\text{g/L}$$

สำหรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ปริมาตรต่างๆคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค} = \frac{(0.02\text{mg/mL})(V\text{mL})}{100\text{mL}}$$

V คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ปิเปตมา

การคำนวณความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคในสารละลายผักตัวอย่าง

จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค

$$y = 0.0121x + 0.0044$$

y = ค่าการดูดกลืนแสง

x = ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิค (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ตัวอย่างการวัดค่าการดูดกลืนแสงของคะน้าของสารละลายเจือจางที่ 1 ได้ 0.350 แทนค่าในสมการเส้นตรง

$$y = 0.0121x + 0.0044$$

$$0.350 = 0.0121x + 0.0044$$

$$x = 29.536 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}$$

ความเข้มข้นที่ได้นี้ นำไปคำนวณหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดที่มีอยู่ในผักตัวอย่างที่นำมาวิจัย

การคำนวณหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในสารละลายผักตัวอย่าง

สารละลายเจือจางที่ 1

1. เมื่อผสมผักตัวอย่าง 30 กรัม และสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 10% จำนวน 60 กรัม เจือจางด้วยกรดผสมจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายผสมที่มีความเข้มข้นคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายผสม} = \frac{w_1 \times w_2}{100mL}$$

w_1 คือ เศษส่วนน้ำหนักของผักตัวอย่างกับสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 10%

w_2 คือ น้ำหนักของของผสม (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำหนักคะน้าสดที่ชั่งได้เท่ากับ 30.4762 กรัม

น้ำหนักสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 10% ที่ชั่งได้เท่ากับ 60.3259 กรัม

$$\text{เศษส่วนน้ำหนักของคะน้า } (w_1) \text{เท่ากับ} \quad \frac{30.4762g}{30.4762g + 60.3259g} = 0.336$$

น้ำหนักของผสม (w_2) ที่ชั่งได้เท่ากับ 31.0014 กรัม

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายผสม} = \frac{0.336 \times 31.0014g}{100mL}$$

$$= 0.104 \text{ กรัม/มิลลิลิตร}$$

2. การออกซิไดส์สารละลายให้เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิค

นำสารละลายจากข้อ 1. จำนวน 50 มิลลิลิตร เติมผงถ่านกัมมันต์ กรองด้วย Buchner funnel แล้วปิเปตสารละลาย 10 แล้วเติมสารละลาย thiourea เข้มข้น 2% จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลาย Metaphosphoric acid เข้มข้น 5% จนแต่ละสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นที่ได้คำนวณได้ดังนี้

$C_1V_1 = C_2V_2$

$(0.104\ g/mL)(10\ mL) = C_2(50\ mL)$

$C_2 = 0.0208$ กรัม/มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของวิตามินซีในคะน้าเท่ากับ 0.0208 กรัม/มิลลิลิตร

สำหรับสารละลายเจือจางที่ 2 คำนวณด้วยวิธีเดียวกัน โดยเปลี่ยนปริมาณที่ปิเปตเป็น 20 มิลลิลิตร

3. การหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในหน่วย มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด

จากการหาค่า x ในกราฟของสารละลายมาตรฐานทำให้ได้ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคเท่ากับ 28.536 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และน้ำหนักของคะน้าที่เป็นเศษส่วนน้ำหนักได้เท่ากับ 0.0208 กรัม ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร คำนวณหาปริมาณวิตามินซีต่อน้ำหนัก 100 กรัม ของผักสดได้ดังนี้

คะน้าตัวอย่าง 0.0208 กรัมจะมีปริมาณวิตามินซี 28.536×10^{-3} มิลลิกรัม

คะน้าตัวอย่าง 100 กรัมจะมีปริมาณวิตามินซี $\dfrac{28.536 \times 10^{-3} \times 100}{0.0208}$ มิลลิกรัม

$= 130.32$ มิลลิกรัม

ดังนั้นในคะน้า 100 กรัมจะมีปริมาณวิตามินซีทั้งหมด 130.32 มิลลิกรัม

การศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (Jame N. Miller & Jane C. Miller, 2000)

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ใช้ข้อมูลจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ หาได้จากข้อมูลที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$LOD = y = y_B + 3S_B$$

y_B คือค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการเส้นตรงในการสร้างกราฟมาตรฐาน

S_B คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

นำข้อมูลจากตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-2 มาหาค่า S_B จากสูตร

$$S_B = S_{y/x} = \{\Sigma(y_i - \hat{y})^2 / n-2\}^{1/2}$$

$S_B = S_{y/x}$ คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

y_i คือค่า y ที่ได้จากการทดลอง (ค่าการดูดกลืนแสง)

$\hat{y}$ คือค่า y ที่ได้จากการแทนค่าลงในสมการเส้นตรง $y = 0.0121x + 0.0044$

n คือจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางการคำนวณหาค่า $\hat{y}$, $y_i - \hat{y}$ และ $(y_i - \hat{y})^2$

ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิค (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (y_i)	$\hat{y}$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$
1.00	0.017	0.0165	0.00047544	0.000000226
2.00	0.026	0.0286	-0.0026509	0.000007027
3.00	0.039	0.0407	-0.0019629	0.000003853
5.00	0.069	0.0649	0.00364213	0.000013265
6.00	0.081	0.077	0.00374753	0.000014044
10.00	0.123	0.1254	-0.0023872	0.000005699
	n = 6			Σ = 0.000044114

แทนค่าลงในสูตร $S_B = S_{y/x} = \{\Sigma(y_i - \hat{y})^2 / n-2\}^{1/2}$

$= (0.000044114/ 4)^{1/2}$

$= 0.003321$

y_B (ค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน) = 0.0121

หาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด

แทนค่าลงในสูตร $y = y_B + 3S_B$

$= 0.0044 + 3(0.003321)$

$= 0.01436$

จากสมการเส้นตรง y = 0.0121x + 0.0044

Limit of detection x = (0.01436 – 0.0044) / 0.0121

= 0.823 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การหา Limit of Qualntitation (LOQ)

แทนค่าลงในสูตร y = $y_B + 10S_B$

= 0.0044 + 10(0.003321)

= 0.03761

จากสมการเส้นตรง y = 0.0121x + 0.0044

Limit of Qualntitation x = (0.03761 – 0.0044) / 0.0121

= 2.7445 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum\left(X_i - \bar{X}\right)^2}{n-1}}$$

เมื่อ X_i แทน ค่าที่วัดได้ในแต่ละครั้ง

$\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ยของการวัด n ครั้ง

n แทน จำนวนครั้งของการวัด

เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD)

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ SD แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ย