สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานโครงการวิจัย ปี 2533

เรื่อง

การวิเคราะห์หาวิตามินซีในผักสดและผลไม้โดยใช้ HPLC

T100889

โดย

รุจิรา ตาปราบ

ระติพร หาเรือนกิจ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RC
QP
772
.A6
ร661ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....100889
วัน,เดือน,ปี.....25 JUN 2009

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ห้องสมุด
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC เมื่อใช้คอลัมภ์ Spherisorb 10 ODS 2 อัตราการไหลของ mobile phase คือ 1 ml/min. โดยทดลองใช้ mobile phase 2 ชนิด คือ 0.02 M แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต - อะซิโตไนโตร (30:70, V/V) pH 4.4 และการตรวจวัดโดย Ultraviolet detector ที่ความยาวคลื่น 214, 254 และ 268 นาโนเมตร พบว่า mobile phase และ ความยาว - คลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิก คือ 0.02 M แอมโมเนียมไดไฮโดรเจน - ฟอสเฟต และ 254 นาโนเมตร ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ในตัวอย่างถั่วฝักยาว กะหล่ำปลี ข้าวโพดอ่อน และฝรั่ง ที่นำมาสกัดด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 6 % พบว่าปริมาณกรด - แอสคอร์บิกที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC มีค่าเท่ากับ 9.6, 20.0, 6.4 และ 79.0 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไตเตรชัน พบว่ามีค่า 7.76, 13.80, 2.30 และ 43.12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ซึ่งวิธีไตเตรชันนี้จะให้ค่าน้อยกว่าวิธี HPLC โดยเฉลี่ย 19 % ในถั่วฝักยาว, 31 % ในกะหล่ำปลี, 64 % ในข้าวโพดอ่อน และ 45 % ในฝรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ห้องสมุด
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบาญ

หน้า

สารบาญตาราง	(1)
สารบาญภาพ	(2)
สารบาญตารางผนวก	(3)
สารบาญภาพผนวก	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ท้องสมุด สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล	21
2	ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีไตเตรชั่น	22
3	แสดงค่า absorbance ของกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214, 254 และ 268 นาโนเมตร	23
4	แสดงค่า absorbance ของกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบ mobile phase 2 ชนิด	24
5	แสดงปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างเมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC	25
6	ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับวิธีไตเตรชั่น	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC	8
2	ส่วนฉีดสารตัวอย่างที่ใช้ใน HPLC	9
3	ลักษณะการทำงานของ Ultraviolet detector	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตารางผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
1	Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ที่ 214 nm	37
2	Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ที่ 254 nm	40
3	Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ที่ 268 nm	43
4	Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง ฝักแก่ะผลไม้	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 214 nm	35
2	โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 214 nm	36
3	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 254 nm	38
4	โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 254 nm	39
5	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 268 nm	41
6	โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 268 nm	42
7	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานเปรียบเทียบ 3 ความยาวคลื่น	44
8	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานเมื่อเปลี่ยน mobile phase ที่ 254 nm	45
9	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานเมื่อเปลี่ยน mobile phase ที่ 268 nm	46
10	โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างผักและผลไม้	47
11	โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างผักและผลไม้	48
12	โครมาโตแกรมของกรดซิตริก, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาลิกที่ 214 nm	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ หน้า

13 โครมาโตแกรมของกรดซิตริก, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาลิก ที่ 254 nm 51

14 โครมาโตแกรมของกรดซิตริก, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาลิก ที่ 268 nm 52

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

กรดแอสคอร์บิก หรือ วิตามินซีนั้นเป็นวิตามินที่พบในผักและผลไม้สดทั่วไป และเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของผลิตผลได้เป็นอย่างดี ผักและผลไม้เมื่อเก็บเกี่ยวจากต้นเพื่อรอการจำหน่ายหรือบริโภคจะสูญเสียวิตามินซีโดยความร้อน แสง และ เอนไซม์แอสคอร์เบสออกซิเดส ซึ่งหมายถึงการสูญเสียคุณภาพของผักผลไม้ การพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักผลไม้ ย่อมมีวัตถุประสงค์เพื่อสงวนคุณค่าทางโภชนาการของผักและผลไม้ การตรวจหาวิตามินซีในผักผลไม้จึงมีความสำคัญ การที่จะทราบถึงปริมาณที่มีอยู่ในผักและผลไม้สดนั้นสามารถทำได้โดยวิธีที่นิยมกันมานานแล้ว คือ วิธีการไตเตรชั่น เพื่อหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic) แต่ปริมาณดังกล่าวมีอยู่ในปริมาณน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบอื่นในผักและผลไม้ คือสารจำพวกน้ำตาล เช่น glucose , fructose เป็นต้น ดังนั้นวิธีไตเตรชั่น จึงพบว่ามีข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์อยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปริมาณวิตามินซีมีจำนวนน้อย วิธีการนี้จะไม่สามารถให้ค่าที่ถูกต้องได้ การวิเคราะห์หาวิตามินซีโดยใช้ HPLC (High Performanance Liquid Chromatography)น่าจะเป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็วสำหรับหาค่าสารที่มีปริมาณน้อยๆ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. เพื่อศึกษาถึงเงื่อนไขที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หากรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC
2. เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC และวิธีไตเตรชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ประวัติของวิตามินซี

เป็นที่ทราบกันมานานหลายศตวรรษแล้วว่า การขาดสารอาหารจำพวกวิตามินซีเป็นเวลานานๆจะทำให้เกิดโรคลักปิดลักเปิด (Scurvy)

ในศตวรรษที่ 18 ได้มีการบันทึกว่า กลาสีที่เดินทางออกทะเลเป็นเวลานานๆจะเสียชีวิตเป็นจำนวนมากด้วยโรคลักปิดลักเปิดนี้ และ ได้มีการค้นพบว่า ผักและผลไม้สดสามารถรักษาโรคนี้ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผลไม้ตระกูลส้ม ทหารเรืออังกฤษจึงได้ใช้สารที่สกัดจากมะนาวบริโภคเพื่อป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน และ ให้ชื่อสารนี้ว่า "limeys" Brownsell และ คณะ(1989) กล่าวว่า วิตามินซีมีความจำเป็นต่อการสร้างคอลลาเจนในร่างกายและการขาดวิตามินซีนี้จะทำให้เกิดการแตกหักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้งทำให้เกิดโรคลักปิดลักเปิด สำหรับเด็ก Braverman (1963) กล่าวว่า เมื่อขาดสารนี้การพัฒนาของกระดูกและฟันในเด็กจะผิดปกติ

เป็นที่น่าสนใจว่า วิตามินซีสามารถถูกสังเคราะห์ได้ในพืชและสัตว์ส่วนใหญ่ เช่น สุนัข, ไก่ และ หนู เป็นต้น แต่สำหรับมนุษย์ และ ลิง ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้ จึงต้องได้รับจากอาหารเพื่อป้องกันภาวะการขาดวิตามินซี โดยความต้องการวิตามินซีในแต่ละวันสำหรับผู้ใหญ่ คือ 30 มิลลิกรัม และ เพิ่มเป็น 60 มิลลิกรัม ขณะตั้งครรภ์ (Brownsell และคณะ , 1989) โดยค่าต่างๆนี้สามารถเพิ่มอีกได้ แม้ว่าจะบริโภคในปริมาณสูงเนื่องจากร่างกายจะขับสารนี้ออกทางปัสสาวะภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง แต่ผู้ที่บริโภคในปริมาณสูงแล้วกลับมาบริโภคปริมาณปกติก็อาจจะเป็นโรคลักปิดลักเปิดได้

Szent-Gyorgyi ใน Braverman(1963) ได้ประสบความสำเร็จในการแยกวิตามินซีและได้ตั้งชื่อสารที่ได้จากการแยกนี้ว่า กรดเฮซูโรนิก (hexuronic) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_8O_6$ ในเวลาต่อมา นักวิทยาศาสตร์ต่างๆก็สามารถศึกษาถึงโครงสร้างที่แน่นอนตลอดจนวิธีที่ใช้สังเคราะห์ และได้เรียกวิตามินนี้ว่า กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ซึ่งใช้เรียกอยู่ถึงปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางเคมี

กรดแอสคอร์บิก , L-ascorbic acid หรือ วิตามินซี ลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 190-192 องศาเซลเซียส มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย สามารถละลายได้ดีในน้ำ (1 กรัมในน้ำ 3 มิลลิลิตร) และแอลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป

มีชื่อทางเคมีว่า L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxy-2-hexanoic acid - 4-lactone น้ำหนักโมเลกุล 176.13

กรดแอสคอร์บิก เมื่อถูกออกซิไดส์จะอยู่ในรูปกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก (dehydro-ascorbic acid)

L-ascorbic acid dehydroascorbic acid

การออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิก จะเกิดขึ้นเมื่อมีโมเลกุลของออกซิเจน และปฏิกิริยานี้จะถูกเร่งอย่างรวดเร็วเมื่อมีโลหะโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทองแดง ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นยังสามารถถูกเร่งได้จากเอนไซม์ แอสคอร์บิเนส (ascorbinase) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ polyphenolase และมีทองแดงเป็นองค์ประกอบด้วย

ในขั้นแรกของปฏิกิริยาออกซิเดชั่น กรดแอสคอร์บิกในผลิตภัณฑ์อาหารเช่นน้ำผลไม้ จะเกิดสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ดี ถ้าปรับสภาวะให้อยู่ในสภาพไร้อากาศ และ ทำให้เอนไซม์แอสคอร์-บิเนสอยู่ในสภาพไม่เหมาะสม ก็จะทำให้การออกซิไดส์เกิดได้ช้าลง

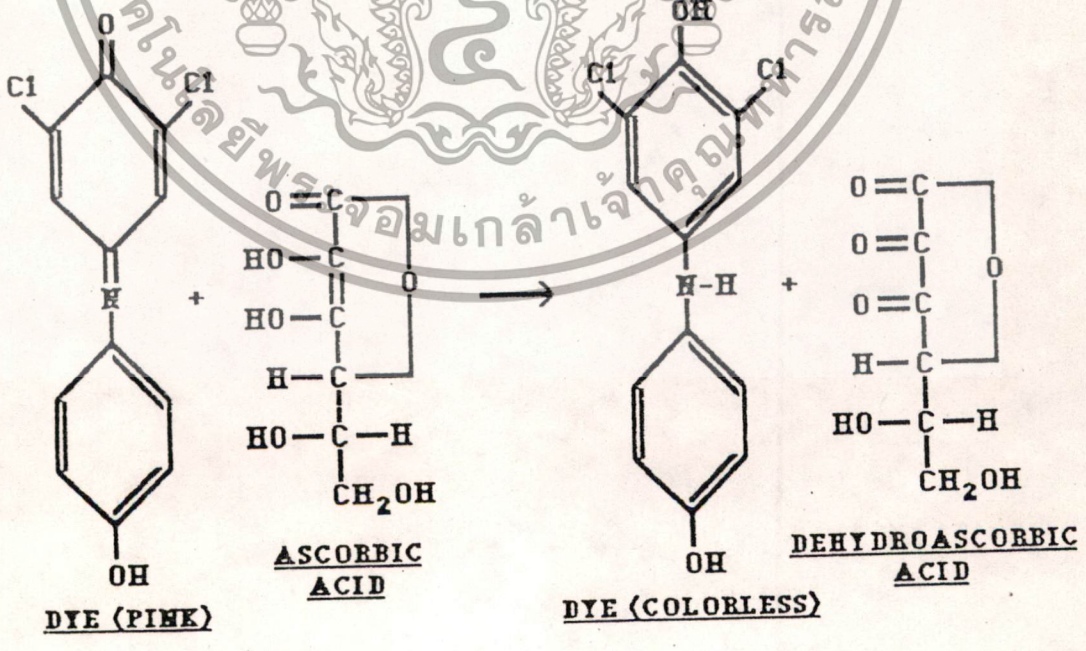
วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่เป็นองค์ประกอบในผัก และ ผลไม้ สามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. วิธีไตเตรชั่น

วิธีวิเคราะห์ทางเคมีสมัยใหม่ จะอาศัยหลักการที่ว่า กรดแอสคอร์บิกสามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่าย และวิธีที่นิยมกันมากที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในผลิตภัณฑ์อาหาร ก็คือ การใช้2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ทำกรดแอสคอร์บิกในรูปรีดิวซ์

สารละลาย dye ในสภาพไม่ถูก รีดิวซ์ มีสีชมพู (rose-pink) ในสารละลายกรด (มีสีน้ำเงินในสารละลาย $NaHCO_3$ และไม่มีสีในสภาพรีดิวซ์ เมื่อ dye ถูกรีดิวซ์กรดแอสคอร์บิกจะถูกออกซิไดส์เป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก end point จะเป็นสีชมพูอย่างถาวร ปฏิกิริยาที่เกิดเป็นดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี โดยส่วนมากจะมีสารประกอบต่างๆที่สามารถรีดิวซ์สารละลายdyeได้ ดังนั้นต้องมีการปรับปรุงหรือใช้วิธีอื่น เช่น เปลี่ยนกรดแอสคอร์บิกเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก แล้วทำปฏิกิริยากับ o-phenylenediamine ตรวจผลโดยใช้ polarography หรือ fluorescence เป็นต้น ถ้ามีเอ็นไซม์แอสคอร์บิกแอซิดออกซิเดสเกิดขึ้นก็จำเป็นที่จะต้องทำให้อยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมเสียก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้เอ็นไซม์ไปออกซิไดส์กรดแอสคอบิก

สารประกอบที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกรดแอสคอร์บิกได้ดีได้แก่สารประกอบฟีนอล, ซัลไฟท์, เฟอร์รัส(Fe^{2+}), แสทนัส(Sn^{2+}) และคูพรัส(Cu^{+}) ไอออน จึงต้องมีการกำจัดสารประกอบเหล่านี้ เช่น การใช้อะซิโตน 20% กำจัดซัลไฟท์ (Mapson,1942) และการใช้กรดเมตาฟอสฟอริกในการสกัด จะให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกที่เสถียรในสภาวะที่มีไอออนของทองแดง (Bessey ,1938) เป็นต้น อาหารบางชนิดมีการใส่ กรดไอโซแอสคอร์บิก (isoascorbic acid) เพื่อเป็น antioxidant สารตัวนี้มีคุณสมบัติเป็นวิตามิน อีกทั้งยังรบกวนปฏิกิริยาอีกด้วย ข้อจำกัดอีกข้อก็คือ ในพืชบางชนิดอาจมีเมล็ดสีซึ่งทำให้การตรวจสอบเป็นไปได้ยาก ได้มีการแนะนำให้ใช้อีเล็คโตรเมตริกไตเตรชั่นสำหรับปัญหานี้ (Hadziyev,1988)

การยับยั้งสารปนเปื้อนนี้ ทำได้2ลักษณะคือ ควบคุมสภาวะต่างๆไม่ให้มีการปนเปื้อนและการกำจัดสารเหล่านั้นให้เหลือน้อยที่สุด การไตเตรตนั้นปกติจะทำในช่วง pH 1-3 และต้องใช้เวลาในการไตเตรตให้น้อยที่สุด การสกัดกรดแอสคอร์บิกโดยใช้สารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก จะให้สภาพความเป็นกรดที่เหมาะสมสำหรับการไตเตรต และ ยังยับยั้งการออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิกที่มักจะเกิดที่ pH สูงๆได้อีกด้วย นอกจากนี้กรดเมตาฟอสฟอริกในสารละลายที่ใช้สกัดจะจับกับโลหะซึ่งรบกวนการไตเตรตและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกรดแอสคอร์บิกอีกด้วย (AOAC Method,1990)

จากที่กล่าวข้างต้น การปนเปื้อนของ Fe^{2+}, Sn^{2+} และ Cu^{2+} ไอออน , SO_2 ,ซัลไฟท์ หรือ ไทโอซัลไฟท์ จะรบกวนการไตเตรตสารละลายอินโดฟีนอลได้ วิธีตรวจสอบสารปนเปื้อนเหล่านี้ทำได้โดยหยดสารละลายเมธิลีนบลู 0.05% สองหยด ลงในสารละลายตัวอย่าง 10 ml โดยอัตราส่วนตัวอย่างกับสารละลาย HPO_3-HOAc ที่ใช้สกัดคือ 1:1 ถ้าสีจางหายไปภายใน 5-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วินาที แสดงว่ามีสารปนเปื้อนอยู่ในปริมาณที่มาก แต่วิธีนี้ใช้กับ Sn^{2+} ไม่ได้ ดังนั้นจึงใช้สารละลาย 0.05%indigo carmine หยด ลงในสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ที่มีอัตราส่วนตัวอย่างกับสารละลาย HCl ที่ใช้สกัดเป็น 1:3 ถ้าสีจางหายใน 5-10 วินาที แสดงว่ามี Sn^{2+} ไอออน (Hadzeyev, 1988)

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีไตเตรชั่น จะสะดวก ง่าย ใช้อุปกรณ์ไม่ซับซ้อน แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น ไม่สามารถวิเคราะห์สารสกัดที่มีสีปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูงหรือสารละลายที่ขุ่น อันจะทำให้สังเกต end point ผิดพลาด จึงได้มีการศึกษาถึงวิธีต่างๆเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ให้ถูกต้องมากขึ้น

2. วิธีโฟโตเมตริก

วิธีนี้ได้พัฒนาขึ้นเพื่อแก้ไขข้อผิดพลาดในการใช้ตำสังเกต end point ของวิธีไตเตรชั่น โดย Bessey (1938) ได้นำการทดลองโดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3.5-3.7 เติมสารละลาย อินโดฟีนอลที่มากเกินพอ ทำการวัดสีที่เหลือโดยโฟโตอิเล็กทริกคัลเลอร์ริมิเตอร์อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงสารปนเปื้อนที่สามารถรีดักชั่นสารละลาย dye ได้ และได้สรุปว่าวิธีนี้สามารถใช้หากรดแอสคอร์บิกได้

3. วิธีคัลเลอร์ริเมตริก

มีหลักการดังนี้คือ กรดแอสคอบิก (L-ascorbic acid) จะสามารถรีดิวซ์ tetrazolium salt MTT ในสภาวะที่มีตัวนำอิเล็คตรอน PMS ที่ pH 3.5 ได้เป็น formazan แล้วนำสารที่ได้ทั้งหมดจากการรีดิวซ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของตัวอย่างลบด้วยค่าความแตกต่างของการดูดกลืนคลื่นแสงของแบลงค์ จะสมมูลกับปริมาณของ L-ascorbic ในตัวอย่าง โดย MTT-formazan จะเป็นตัวที่ถูกวัดค่าโดยการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร (Boehringer, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีอิเลคโตรคัลเลอร์ริเมตริก

ใช้กับสารละลายที่มีสีหรือมีลักษณะขุ่นมัวที่ไม่สามารถใช้วิธีไตเตรตสารละลาย dyeไม่ได้ โดยจะมี electrode จุ่มลงในสารละลายเพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้า เมื่อเติม dye solutionลงไป นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟเพื่อหาจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงของกราฟมากที่สุดซึ่งเป็น end point

5. วิธีโครมาโตกราฟริก

-Gas-Liquid Chromatography (GLC)

ในช่วงปี คศ. 1963-1967 การใช้ GLC ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีเป็นแค่เพียงการสาธิตเท่านั้น ต่อมา ในปี คศ. 1974 (แม้มีผู้ศึกษามากขึ้น แต่ก็มีเอกสารเพียง3แห่งเท่านั้นที่บันทึกไว้โดยแห่งแรกได้ทำการสาธิตแยกกรดแอสคอร์บิก และกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิกออกจากผลิตภัณฑ์ได้โดยใช้ GLC อีก 2 แห่งได้ลงเพิ่มอีกอย่างคือ การใช้ GLC สามารถประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ด้วย

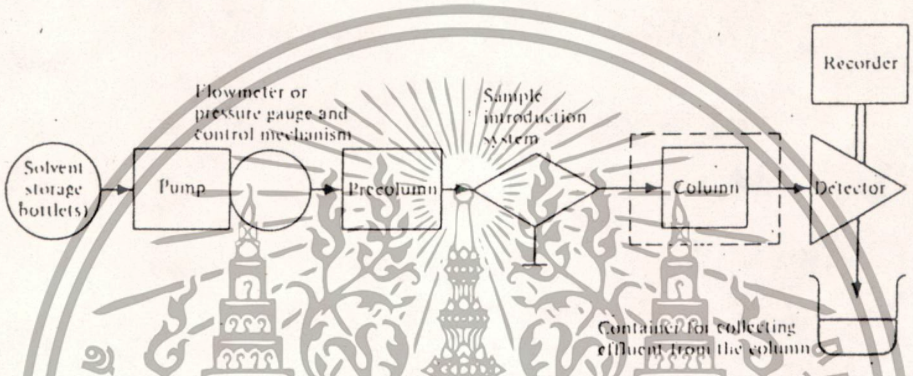
Christie และ Wiggins(1978)ได้กล่าวว่า สามารถสกัดกรดแอสคอร์บิกจากอาหารได้โดยใช้เอธานอล ใช้คอลัมน์ SE-30 มี retention time 20 นาที พบว่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่วิเคราะห์ได้ มีความถูกต้องถึง 100%

-การใช้High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยการไตเตรตสารละลาย dye นั้น พบว่ามีข้อผิดพลาดใหญ่ๆ 2 ข้อ คือ (1) ผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะผักสด และ ผลไม้ จะประกอบไปด้วยสารประกอบมากมายซึ่งสามารถreduceสารละลาย dye ได้ และ (2) การสังเกต end point ทำได้ยากโดยเฉพาะในสารละลายที่มีสีตลอดจนปริมาณวิตามินซีในผักและผลไม้มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับองค์ประกอบอื่นๆในผักและผลไม้ คือ สารจำพวกน้ำตาล การใช้ HPLC จึงถูกนำมาใช้วิเคราะห์มากขึ้น เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆ แต่ก่อนที่จะกล่าวถึงการใช้ HPLC ในการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิก จะขอกล่าวถึงหลักการและส่วนประกอบของ HPLC ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HPLC เป็นเทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่สามารถแยกได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพราะใช้ความดันช่วยและของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มีขนาดเล็ก ส่วนประกอบของเครื่องมือต่างๆที่ช่วยในการวิเคราะห์จะรวมเข้าเป็น 1 ชุดของ HPLC ซึ่งสรุปเป็นแผนภาพได้ดังนี้



ภาพที่1 ส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง HPLC

ส่วนประกอบต่างๆ แต่ละส่วนทำหน้าที่ดังต่อไปนี้

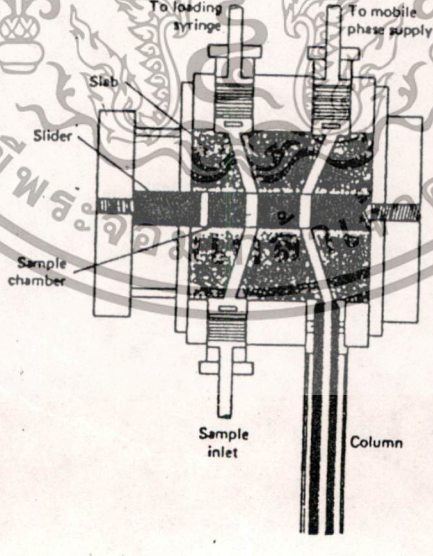
ก) ถังใส่ตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (Solvent reservior) ถังใส่ตัวทำละลายจะทำด้วยแก้วหรือสแตนเลสก็ได้ โดยปกติควรต่อกับตัวทำลายก๊าซ (degrassing system) เพื่อดูดก๊าซออกซิเจน หรือ ไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองก๊าซในคอลัมน์ หรือ อาจรบกวนเครื่องวัดดีเทคเตอร์ ตัวทำลายก๊าซประกอบด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศ ส่วนให้ความร้อน ตัวคนสารละลาย และ ส่วนทำการกลั่น ถ้าการวิเคราะห์ใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว เครื่องมือก็มีถังใส่ตัวทำละลาย และ ตัวทำลายก๊าซเพียงชุดเดียว แต่ถ้าใช้ตัวทำละลายผสมในการทำอีลูท ก็ต้องมีเครื่องมือสองชุดต่อเชื่อมกัน เพื่อทำให้ตัวทำละลายสามารถผสมกัน และ เปลี่ยนโพลาริตี้ได้อย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งเรียกว่า การโปรแกรมตัวทำละลาย (solvent programming)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) เครื่องปั๊ม (pump) ทำหน้าที่ปั๊มตัวทำละลายเข้าคอลัมน์ด้วยความดันอย่างน้อย 1000 psi ความดันที่เหมาะสมและใช้ได้ดี คือ 4000 ถึง 6000 psi ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลของตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 3 ลบ.ซม./นาที อัตราการไหลควรควบคุมให้คงที่ เนื่องจากการไหลมีผลโดยตรงต่อเวลาที่ใช้ในการแยก ถ้าเพิ่มความเร็วของการไหลของตัวทำละลายจะทำให้สารตัวอย่างถูกอีลูทได้เร็วขึ้น

ค) Precolumn เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มอีก 1 อัน เรียกว่า precolumn มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งาน แต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่า เพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทินที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือ ทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวอีลูทบริสุทธิ์ขึ้น

ง) ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (Sample injection) ส่วนฉีดสารตัวอย่างที่ใช้ใน HPLC มีลักษณะดังภาพที่ 2 วาวล์ที่ใช้คือ สไลเดอร์วาวล์ (slider valve) สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าทางวาวล์โดยเข็มฉีดยา จากนั้นตัวสไลเดอร์จะเคลื่อนจากซ้ายมือไปขวามือ จนกระทั่งสารตัวอย่างอยู่ในทิศทางการไหลของตัวอีลูท สำหรับขนาดของวาวล์ที่ใช้ฉีดสารตัวอย่างมีหลายขนาด ตั้งแต่ 2 ไมโครลิตร ถึง 100 ไมโครลิตร



ภาพที่2 ส่วนฉีดสารตัวอย่างที่ใช้ใน HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ) คอลัมน์ (column) คอลัมน์ที่ใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC ทำด้วยหลอดแก้วอย่างหนาหรือ สแตนเลส โดยมีขนาดความยาว 15 ถึง 150 เซ็นติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2-3 มิลลิเมตร คอลัมน์ที่มีขนาดยาวเป็นเมตรก็สามารถใช้ได้เช่นกันโดยขดเป็นวงกลม

สารที่บรรจุในคอลัมน์มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นของแข็งดูดซับ ซึ่งต้องมีขนาดเล็กมาก และมีได้หลายขนาด มีชื่อเรียกทางการค้าต่างๆกัน อีกชนิดหนึ่ง เป็นของเหลวฉาบบนของแข็งซัพพอท ซึ่งมีทั้งแบบ ธรรมดา และ กลับเฟส (reverse phase)

ของแข็งตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน HPLC คือ ซิลิกา และ อะลูมินา การเลือกใช้สามารถจัดแบ่งตามประเภทของสารที่นำมาวิเคราะห์ได้ดังนี้

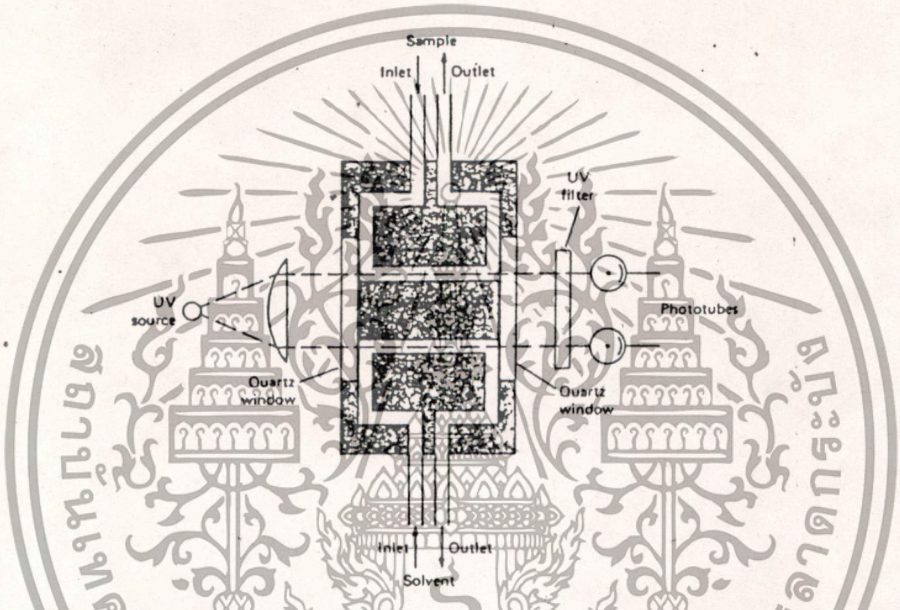
-ถ้าเป็นสารประเภทกรด ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
-ถ้าเป็นสารที่เป็นเบสเล็กน้อย pH 6 น้อยกว่า 5 ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ
-โมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว เช่น Olefinic และ Aromatic ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
-สารที่ไวต่อกรด ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
-สารที่ไวต่อเบส ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ

สำหรับการแยกเฟสที่อยู่กับที่ ซึ่งเป็นของเหลวที่ฉาบบนของแข็งซัพพอท ให้พิจารณาเลือกตามโพลาริตี้ของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ เฟสที่อยู่กับที่ยังสามารถใช้เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ (ion-exchange resin) เรซินที่นำมาใช้ใน HPLC ต้องเป็นชนิด Strong Cation หรือ Strong Anion Exchange ซึ่งมีหลายชนิด

ฉ) ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (Temperature Control) โดยปกติการทำลิควิด-โครมาโตรกราฟีทั่วๆไปนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น ส่วนควบคุมอุณหภูมิอาจใช้เป็นถังน้ำหุ้มคอลัมน์ไว้เพื่อให้อุณหภูมิคงที่แต่ถ้าต้องการให้รีเทนชั่นไทม์ของสารตัวอย่างสั้นขึ้น อาจเพิ่มอุณหภูมิให้คอลัมน์ได้โดยใช้เตา(oven)ที่ควบคุมอุณหภูมิได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช) ดีเทคเตอร์ (Detector) ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC ไม่มีชนิดที่มีความไวสูงแบบ GC แต่จะเป็นชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง โดยต้องสามารถวัดปริมาณของสารได้ตามคุณสมบัติของสารนั้น สำหรับดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต หรือ แสงวิสิเบิล (UV.Spectophotometer) มีลักษณะการทำงานดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่3 ลักษณะการทำงานของ Ultraviolet detector

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยใช้ HPLC ในอาหาร ได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ใหญ่ๆ คือ

(1) ion exchange chromatography

(2) seperation using bonded amino functional groups

(3) reverse phase chromatography

(4) reverse phase ion pair chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bui-nguyen(1980)ได้ทดลองแยกกรดแอสคอร์บิกออกจากกรดไอโซแอสคอร์บิก โดยใช้ คอลัมน์ Lichrosorb NH_2 (particle size 10 ไมโครเมตร) คอลัมน์ทำด้วยสแตนเลส ขนาด 250 * 4.6 mm ID mobile phase ใช้ 75% acetonitrile ในสารละลาย 0.005M KH_2PO_4(pH 4.4-4.7) flow-rateที่ใช้คือ 3 ml/min. อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตรวจวัดที่ 268 นาโนเมตร chart speed คือ 1.5 Cm/min. พบว่า ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ส่วนการใช้คอลัมน์ C_{18} reversephase ชนิดที่มีและไม่มี ion pairing ให้ผลไม่ดี

นิรนาม (1987) ได้วิเคราะห์หากรดแอสคอร์บิกโดยใช้คอลัมน์ขนาด 250 mm ที่มีขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร ของ Bondapak RP-C18 ODS ใช้ 50:50 ของ MeOH - 0.1M KH_2PO_4 buffer (pH 4.2) เป็น mobile phase flow-rate 1ml/min ใช้ UV. detector พบว่าได้ผลใกล้เคียงกับวิธีไตเตรทสารละลาย 2,6-dichlorophenol indophenol

Shaw และ Wilson (1983) ได้ใช้ HPLC วิเคราะห์หากรดอินทรีย์ในน้ำส้ม น้ำเชอรี่ และน้ำเกรปฟรุต โดยตรวจวัดโดย UV. detector ที่ 206 นาโนเมตร ทดลอง 2 ลักษณะคือ (a) คอลัมน์ 150 * 4.1 mm I.D. Hamilton 10 ไมโครเมตร PRP-1 neutral resin mobile phase คือ 0.02 N $HClO_4$ (pH 1.7) flow-rate คือ 0.5-1.5 ml/min ;(b) คอลัมน์ 250 * 4.6 mm. I.D. Dupont Zorbax NH_2 (propylamine) mobile phase คือ 0.075 M NaH_2PO_4(pH 4.4) flow-rate 1.1 ml/min พบว่าสามารถแยกกรดได้ 2 ชนิด คือ กรดมาลิค และ กรดซิตริค ส่วนกรดแอสคอร์บิกไม่พบ เนื่องจากไม่ได้เติมสารที่ทำให้กรดนี้เสถียร เช่น กรดเมตาฟอสฟอริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MedlicottและThompson (1985) ได้วิเคราะห์หากรดอินทรีย์ในมะม่วงโดยใช้ HPLC คอลัมน์ที่ใช้ คือ Waters Radial-Pak C18 cartridge (100 * 8 mm I.D.) mobile phase คือ 0.2 M KH_2PO_4 ($_PH$ 2.4 ปรับโดย H_3PO_4) flow-rate คือ 2 ml/min ตรวจวัดโดยใช้ UV.detector ที่ 214 นาโนเมตร พบว่า กรดอินทรีย์ที่พบมาก คือ กรดซิตริก และ กรดทาร์ทาลิก วิธีนี้ยังพบพีคของกรดแอสคอร์บิกที่แยกอย่างชัดเจนอีกด้วย

Rizzlo และ คณะ (1984) ได้ใช้ HPLC วิเคราะห์กรดแอสคอร์บิกในผักและผลไม้สด และ ที่ผ่านการแปรรูป โดยใช้ 6% กรดเมตาฟอสฟอริกเป็นตัวสกัด คอลัมน์ที่ใช้คือ Particil 10 SAX (Strong anionic pellicular) mobile phase คือ 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.25 ตรวจวัดโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 250 nm พบว่าที่สภาวะนี้ จะให้ผลดีเมื่อมีปริมาณกรดแอสคอร์บิกในช่วง 0.04% - 1 %

Russell (1986) ศึกษาการใช้ HPLC วิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในมะเขือเทศสด เปรียบเทียบกับวิธีไตเตรชั่น โดยใช้ 6% กรดเมตาฟอสฟอริก เป็นตัวสกัด และใช้ 1.5mM pyrogallol เพื่อป้องกันการออกซิเดชั่น คอลัมน์ที่ใช้คือ 250 * 4.6 mm I.D. Vydac 201 HS 10 ไมโครเมตร particle size mobile phase ที่ใช้คือ 0.5 mM tridecylamoniumformat in 60+40+1 methanol + water + acetonitrile $_PH$ 4.25 ปรับโดยกรดฟอร์มิก อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวัดที่ 247 นาโนเมตร flow-rate 3 ml/min พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก โดยวิธี HPLC จะให้ค่าที่มากกว่าวิธีไตเตรชั่นประมาณ 2-4%

Christie และ Wiggins (1978) ได้กล่าวว่า การสกัดกรดแอสคอร์บิกด้วย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก ใช้ Bondapak C18 column mobile phase คือ tridecyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ammonium formate solution in methanol และ ตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร จะให้ผลของปริมาณกรดแอสคอร์บิกน้อยกว่าวิธีไตเตรชั่น

Wimalasiri และ Wills (1983) ได้วิเคราะห์กรดแอสคอร์บิก และกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก ในผักและผลไม้ โดยใช้คอลัมน์ μ Bondapak (30 cm * 4 mm I.D.) ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 และ 214 นาโนเมตร mobile phase ที่ใช้คือ acetonitrile-water with 0.01M $NH_4H_2PO_4$ (pH 4.3 ปรับโดย orthophosphoric acid) flow-rate คือ 2 ml/min. พบว่ากรดแอสคอร์บิกสามารถตรวจวัดได้ทั้งสองความยาวคลื่น แต่ที่ 254 นาโนเมตร จะตรวจวัดได้ดีกว่า ส่วนกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิกนั้นพบว่าสามารถตรวจวัดได้ที่ 214 นาโนเมตร เท่านั้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์ และ วิธีการ

I การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีไตเตรชั่น (AOAC , 1990)

1. วัตถุดิบ

1.1 ถั่วฝักยาว

1.2 กะหล่ำปลี

1.3 ข้าวโพดอ่อน

1.4 ฝรั่ง

2. สารเคมี

2.1 กรดเมตาฟอสฟอริก 6% (Russell , 1986)

2.2 กรดอะซิติกเข้มข้น

2.3 โซเดียมไบคาร์บอเนต

2.4 กรดแอสคอร์บิก

2.5 2,6- ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล

2.6 น้ำกลั่น

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องปั่น (Homogenizer MSE)

3.2 เครื่องปั่นแยก (Centrifuge)

3.3 อุปกรณ์เครื่องมือ และ เครื่องแก้วสำหรับการไตเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายที่ใช้สกัด : 6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก

ละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 60 กรัมในกรดอะซิติก 160 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร สารละลายสามารถเก็บได้ 7 วันในที่เย็น (HPO_3 จะเปลี่ยนเป็น H_3PO_4 อย่างช้าๆ) (Hadziyev ,1988)

1.2 สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานมา 50 มิลลิกรัม อย่างแน่นอน นำมาละลายด้วยสารละลาย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก ในขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

ละลาย2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลโซเดียม 250 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 210 มิลลิกรัม เขย่าแรงๆจนสีละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา และ ใช้ในที่เย็นจนกว่าจะใช้

2. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างผัก และ ผลไม้มา 50 กรัม สกัดด้วย6% กรดเมตา-ฟอสฟอริก-กรดอะซิติก 50 มิลลิลิตร 2 ครั้งโดยใช้เครื่องปั่นนำส่วนของสารละลายไป centrifuge เพื่อแยกส่วนที่ใสออกมาจากกาก นำส่วนใสมาทำการวิเคราะห์

3. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

3.1 ดูดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ดูดสารละลาย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด

3.3 ไตเตรตแต่ละขวดด้วยสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล จนกระทั่งเกิดสีชมพู (rose-pink) อย่างถาวรเป็นเวลา 5 วินาที (Hadziyev ,1988)

3.4 ดูดสารละลาย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก 7 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับเมื่อถึง end point ของการไตเตรตข้อข้างต้น แล้วไตเตรตทำนองเดียวกันเพื่อเป็นแบลงค์

3.5 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล ในรูปมิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตร อินโดฟีนอล

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1 ดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 2 มา 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด ใส่สารละลาย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก 5 มิลลิลิตร นำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล จนถึงจุด end-point คือ มีสีชมพูอย่างถาวรอย่างน้อย 5 วินาที

4.2 ทำแบลงค์เช่นเดียวกับข้อ 3 อย่างน้อย 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100889

II. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC

1. วัตถุดิบ

   1.1 ถั่วฝักยาว

   1.2 กะหล่ำปลี

   1.3 ข้าวโพดอ่อน

   1.4 ฝรั่ง

2. สารเคมี

   2.1 กรดเมตาฟอสฟอริก 6% (Russell , 1986)

   2.2 กรดอะซิติกเข้มข้น

   2.3 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.02 M (ดัดแปลงจาก Wilson และ คณะ, 1982)

   2.4 อะซิโตไนไตร์

   2.5 กรดแอสคอร์บิก

   2.6 กรดออโธ-ฟอสฟอริก (Vimalasiri and Will,1983)

   2.7 น้ำกลั่น

3. อุปกรณ์

   3.1 เครื่องปั่น (Homogenizer MSE)

   3.2 เครื่องปั่นแยก (Centrifuge)

   3.3 อุปกรณ์เครื่องแก้ว สำหรับการเตรียมสารเคมี

   3.4 เครื่อง HPLC

   3.5 filter membrane unit

   3.6 column ที่ใช้คือ Spherisorb 10 ODS2 ขนาด 250*4.6mm I.D. (Phenomenex,USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม mobile phase

1.1 สารละลายแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.3 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2 สารละลาย 0.02M แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-อะซิโตไนไตร (30:70 , v/v) เตรียมโดยนำสารละลายในข้อ 1.1 มา 300 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรโดยอะซิโตไนไตร

1.3 ปรับ pH ของสารละลายทั้งสองข้อข้างต้น ด้วยกรดออโธ-ฟอสฟอริก จนมี pH=4.4 (Bui-nguyen,1980)

1.4 กรองผ่าน Millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

1.5 ทำการกำจัดอากาศ (Deaerate) โดยใช้สูญญากาศ หรือ ใช้เครื่องอุลตราโซนิคสั่นสะเทือนประมาณ 15 นาที หรือ จนหมดฟองอากาศ

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

ชั่งกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานมา 2,4,6,8 และ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร 5 ขวด กรองผ่าน Millipore filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 จากสารละลายตัวอย่างที่เตรียมขึ้นในวิธีไตเตรชั่น นำมากรองด้วย Sep Pak C18

3.2 นำมากรองอีกครั้งผ่าน Millipore filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

3.3 จะได้สารละลายที่ใสสะอาดพร้อมฉีดเข้าเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์

4.1 สภาวะต่างๆที่ใช้คือ flow rate 1 มิลลิลิตร/นาที mobile phase คือ 0.02M แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 4.4 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 (Wimalasiri และ Wills,1983), 254 (Wimalasiri และ Wills,1983;Christie และ Wiggins,1978;Bui-nguyen,1980) และ 268 นาโนเมตร (Bui-nguyen,1980) column ที่ใช้คือ Spherisorb 10 ODS2

4.2 ผ่าน mobile phase เข้าเครื่อง HPLC จนความดันที่ pump ค่อนข้างคงที่ จึง inject สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่างๆ

4.3 ทำ Calibration Curve จาก Chromatogram ที่ได้ โดยเขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้ peak กรดแอสคอร์บิก กับ มิลลิกรัมแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ inject เข้าไป จะได้กราฟเส้นตรง

4.4 inject สารละลายตัวอย่างผักและผลไม้ทั้ง 4 ชนิด พื้นที่ใต้ peak ที่แน่ใจว่า เป็นกรดแอสคอร์บิก นำมาคำปริมาณมิลลิกรัม จาก Calibration Curve รายงานผลเป็นมิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิก ต่อ 100กรัมตัวอย่าง

4.5 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 ความยาวคลื่น แล้วเปลี่ยน mobile phase เป็นสารละลาย 0.02M แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-อะซีโตไนไตร(30:70,v/v) pH 4.4 (Wimalasiri และ Wills,1983) ทำการทดลองโดยใช้สภาวะอื่นๆดังเดิม

4.6 หลังการทดลองทุกครั้ง ล้างcolumnด้วย 50% methanol ประมาณ 15-30 นาที แล้วเก็บcolumnใน 95% methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง และ วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีไตเตรชั่น

จากการทดลองโดยนำตัวอย่างชนิดต่างๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยใช้ 6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก เป็นตัวสกัด ทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีไตเตรชั่น โดยการนำสารละลายตัวอย่างมาไตเตรตกับ 2,6 - ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่ end-point จะเป็นสีชมพูคงอยู่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 5 วินาที

ในขั้นแรกจะวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่สมมูล กับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

สารละลายที่ใช้สกัด	มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตรสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล
6% กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก	0.115

หมายเหตุ : ค่าในตารางที่ 1 เป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างต่างๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีไตเตรชั่น (มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อ 100 กรัมตัวอย่าง)

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแอสคอร์บิก
ถั่วฝักยาว	7.76
กะหล่ำปลี	13.80
ข้าวโพดอ่อน	2.30
ฝรั่ง	43.13

หมายเหตุ : ค่าในตารางที่ 2 เป็นค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง

จากตารางที่ 2 เป็นตารางแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างถั่วฝักยาว, กะหล่ำปลี, ข้าวโพดอ่อน และฝรั่ง ที่ทำการสกัดโดย 6% กรดเมตาฟอสฟอริก -กรดอะซิติก ซึ่งผลการทดลองนี้จะนำไปเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยวิธี HPLC

Column ที่ใช้ : Spherisorb 10 ODS2

Flow-rate : 1 ml / min.

1. การหาค่า Maximum Absorption ของกรดแอสคอร์บิก

จากการวิเคราะห์ค่า Maximum Absorption ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน โดยใช้ 0.02 M $NH_4H_2PO_4$ pH 4.4 เป็น mobile phase ตรวจวัดโดย UV detecter ที่ความยาวคลื่น 214, 254 และ 268 นาโนเมตร ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในภาพผนวกที่ 1 ถึง 7 แสดงผลค่า absorbance ของความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิกต่างๆ กับความยาวคลื่น ในตารางที่ 3

ตารางที่3 แสดงค่า absorbance ของกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่างๆที่ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214, 254 และ 268 นาโนเมตร

absorbance / นาโนเมตร	ความเข้มข้น 2 %	4 %	6 %	8 %	10 %
214	0.0998	0.0693	0.0963	0.1494	0.1005
254	0.1868	0.4013	0.5192	0.5933	0.6757
268	0.1192	0.3834	0.5189	0.5715	0.6444

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะสามารถตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก ได้ค่า absorbance ที่สูงที่สุด ในทุกความเข้มข้น นั่นคือ ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะให้ค่า maximum absorption ของกรดแอสคอร์บิก

2. การเปรียบเทียบความแตกต่างของ mobile phase

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะต่างๆดังเดิม ตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร แต่เปลี่ยน mobile phase เป็น 0.02M $NH_4H_2PO_4$-CH_3CN (30:70 , V/V) pH 4.4 ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในภาพผนวกที่ 8 จะเห็นได้ว่า พีคที่ได้นั้นแยกไม่ชัดเจน ไม่สามารถทราบได้ว่าพีคใดเป็นพีคของกรดแอสคอร์บิก ซึ่งทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกต่อไปได้ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับเมื่อใช้ 0.02M $NH_4H_2PO_4$ pH 4.4 เป็น mobile phase ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่4 แสดงค่า absorbance ของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยเปรียบเทียบ mobile phase 2 ชนิด

absorbance / mobile phase	ความเข้มข้น 2 %	4 %	6 %	8 %	10 %
0.02M $NH_4H_2PO_4$	0.1868	0.4013	0.5192	0.5933	0.6757
0.02M $NH_4H_2PO_4$: CH_3CN (30:70 , V/V)	unresulted peaks				

หมายเหตุ : ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบ mobile phase ทั้งสองชนิด พบว่า 0.02M $NH_4H_2PO_4$:CH_3CN (30 : 70 , V / V)นั้น ไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิก เพราะไม่สามารถแยกกรดแอสคอร์บิกออกเป็นพีคเดี่ยวได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของ $NH_4H_2PO_4$ และ CH_3CN ไม่เหมาะสม หรืออาจเป็นเพราะmobile phase นี้ไม่เหมาะกับ column ส่วนสารละลาย 0.02M $NH_4H_2PO_4$ นั้นสามารถใช้เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิกได้ เพราะให้พีคที่ชัดเจน ทำให้การวิเคราะห์เป็นไปอย่างถูกต้อง ทั้งนี้ในการตรวจวัดจำเป็นต้องเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้ 0.02M $NH_4H_2PO_4$ เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์ต่อไป

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง โดยใช้ HPLC

จากการทดลอง 2 ข้อข้างต้นทำให้เลือกใช้ 0.02M $NH_4H_2PO_4$ pH 4.4 เป็น mobile phase และเลือกใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ในการตรวจวัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยใช้กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซิติก เป็นสารละลายที่ใช้สกัด (AOAC,1990) โครมาโตแกรมที่ได้แสดงในภาพผนวกที่10 นำค่าพื้นที่ใต้พีคจากโครมาโตแกรม มาคำนวณหาค่าปริมาณกรดแอสคอร์บิก แสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่5 แสดงปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC
(มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิก ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง)

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแอสคอร์บิก
ถั่วฝักยาว	9.6
กะหล่ำปลี	20.0
ข้าวโพดอ่อน	6.4
ฝรั่ง	79.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเปรียบเทียบปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC กับวิธีไตเตรชั่น

จากผลการทดลองที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก ในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับวิธีไตเตรชั่น ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับวิธีไตเตรชั่น

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแอสคอร์บิก (mg AA /100 g sample)		
	วิธี HPLC	วิธีไตเตรชั่น	% ความแตกต่าง
ถั่วฝักยาว	9.6	7.76	19.8
กะหล่ำปลี	20.0	13.80	31.0
ข้าวโพดอ่อน	6.4	2.30	64.1
ฝรั่ง	79.0	43.13	45.0

จากตารางที่ 6 พบว่า ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่วิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชั่น มีค่าน้อยกว่าที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ในทุกตัวอย่าง มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างค่อนข้างสูง และมีค่าที่แตกต่างกันมากโดยเฉพาะข้าวโพดอ่อน มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเท่ากับ 64.1 ซึ่งเป็นค่าที่สูงมาก อาจเป็นเพราะในข้าวโพดอ่อนมีปริมาณกรดแอสคอร์บิกน้อยเกินกว่าที่การไตเตรตจะตรวจได้ หรืออาจเนื่องมาจากมีสารปนเปื้อนที่สามารถออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิกอยู่ในสารละลายตัวอย่าง ทำให้ค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง สำหรับตัวอย่างอื่น ๆ ก็สามารถอธิบายได้ด้วยเหตุผลทำนองเดียวกัน คือ มีสารปนเปื้อนในปริมาณมาก อีกสาเหตุที่สำคัญก็คือ การมอง end point อาจคลาดเคลื่อนได้ โดยเฉพาะในสารละลายตัวอย่างข้าวโพดอ่อนที่มีลักษณะขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนวิธี HPLC มีค่ามากกว่าอาจเป็นเพราะมีสารปนเปื้อนน้อยกว่าเนื่องจากมีการกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถกรองอนุภาคที่เล็กมากได้แก่ เอนไซม์และแบคทีเรีย เป็นต้น ตลอดจนการใช้ UV detector ก็ช่วยตรวจวัดได้แน่นอนยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถนำผลการทดลองทั้ง 2 วิธีมาเปรียบเทียบกันได้ และไม่อาจกล่าวได้ว่า วิธี HPLC เป็นวิธีที่สามารถใช้แทนวิธีไตเตรชันได้ เพราะจำนวนครั้งและเงื่อนไขต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองน้อยเกินไป

จากการทดลองสามารถเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธี HPLC และวิธีไตเตรชันได้ดังนี้

วิธี HPLC

ข้อดี
- มีความถูกต้องสูงในการตรวจวัดสารปริมาณน้อย เพราะสามารถเลือกชนิดของ detector ให้เหมาะสมกับชนิดของสารได้
- มีสารปนเปื้อนน้อย เนื่องจากมีการกรองหลายขั้นตอนจนถึงขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำให้ค่าที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น
- การวิเคราะห์ปริมาณต่าง ๆ ทำได้ถูกต้องและง่ายขึ้น เนื่องจากปัจจุบันมีการนำคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย

ข้อเสีย
- อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้กับเครื่องมีราคาสูงมาก ทำให้ไม่สามารถใช้ได้แพร่หลาย
- ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยุ่งยาก เนื่องจากต้องผ่านการกรองหลายครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีไตเตรชัน

ข้อดี
- การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากเท่าวิธี HPLC
- ใช้อุปกรณ์ง่าย ๆ ในห้องปฏิบัติการ
- วิธีการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก
- อุปกรณ์และสารเคมีราคาถูกกว่าวิธี HPLC มาก

ข้อเสีย
- ถ้าสารละลายตัวอย่างมีสีหรือขุ่น จะทำให้การสังเกต end point เป็นไปได้ยาก
- ถ้าปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างมีน้อย โอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดก็จะสูงขึ้น
- สารละลาย dye นั้นต้องทำการ standardize บ่อย ๆ ซึ่งทำให้ไม่สะดวก
- indicator ที่ใช้มีช่วง pH ของการเปลี่ยนสีแคบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC พบว่าเงื่อนไขที่เหมาะสม คือ ใช้สารละลายแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.02 M เป็น mobile phase และตรวจสอบโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อใช้คอลัมน์ Spheri - sorb 10 ODS 2 แต่ยังไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่า เงื่อนไขนี้เป็นเงื่อนที่ดีที่สุด เนื่องจากข้อมูลจากการทดลองอาจจะไม่เพียงพอที่จะกล่าวเช่นนั้น

2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธี HPLC มีค่ามากกว่าวิธีไตเตรชัน คิดเป็น 19.8 % ในถั่วฝักยาว, 31 % ในกะหล่ำปลี, 64.1 % ในข้าวโพดอ่อน และ 45 % ในฝรั่ง แต่ก็ยังไม่สามารถกล่าวได้ว่า วิธี HPLC สามารถใช้แทนวิธีไตเตรชัน ทั้งนี้เพราะขึ้นอยู่กับเงื่อนไขของการทดลอง ซึ่งวิธีไตเตรชันและวิธีวิเคราะห์โดยใช้ HPLC นั้นมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ทั้งสองวิธีดังได้กล่าวไว้ในบทผลการวิเคราะห์การทดลอง ดังนั้น การศึกษาจึงเป็นเพียงแนวทางที่จะหาวิธีวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิกโดยใช้ HPLC เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2532. เคมีวิเคราะห์ 2. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง,กรุงเทพ. 607-655 น.

A.O.A.C. 1990. Vitamin C (Ascorbic Acid) -Official Final Action. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.

Bessey, O.A. 1938. A Method for the Determination of Smell Quantities of Ascorbic acid and Dehydroascorbic Acid in Turbid and Colored Solution in the presence of other Reducing Substances. J. Biol. Chem. 126:771-784.

Boehringer Mannheim GMBH. 1986. L-Ascorbic Acid. Colorimetric Method, Methods of Enzymmatic Food Analysis. p 12-14.

Braverman J.B.S. 1963. Introduction to the Biochemistry of Foods. Elsevier publishing Com.:205-211.

Brownsell V.L., C.J. Griffith and E.Jones. 1989. Applied Science for Food Studies. Longman Scientific and Technical:92-94.

Bui-nguyen M.H. 1980. Application of High performance liquid chromatography to the seperation of ascorbic acid from isoascorbic acid. J, chro. 196:163-165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Charalambous G. 1979. Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages. Academic press Inc, London:161-177.

Charalambous G. 1984. Analysis of Food and Beverages-Modern Techniques Acadamic press Inc. London:118-138.

Christie A.A. and R.A. Wiggins 1978. Developments in Food Analysis Techniques-1, Applied Science Publishers. London. 18-23.

Hadziyer D. 1989. Vitamin C Titration. Laboratory Manual Dept. of Food Science U. of Alberta:1-4.

Jacobs M.B. 1958. The Chemical Analysis of Food and Food Products. D. Van Nostrand Com. Inc. New Jersey:724-734.

Kenney B.F. 1990. Applications of HPLC for the Flavor Research and Quality Control Laboratories in the 1990s. Food Tech. 44:76-84.

Kissinger P.T. and L.A. Pachla. 1987. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid Using LC with UV and Electrochemical Detection. Food Tech. Nov:108-111.

Medlicott A.P. and A.K. Thompson 1985. Analysis of Sugars and Organic Acid in Ripening Mango Fruits (*Mangifera indica* L.var Keitt) by HPLC. J. Sci Food Agric. 36:561-566.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rizzolo A., E. Forni and A. Polesello 1984. HPLC Assay of Ascorbic Acid in Fresh and Processed Fruit and Vegetables. Food Chem. 14:189-199.

Russen L.F. 1986. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Vitamin C in Fresh Tomatoes. J. Food Sci 51:1567-1568.

Shaw P.E. and C.W. Wilson. 1983. Organic Acids in Orange, Grapefruit and Cherry Juices Quantified by HPLC Using Neutral Resin or Propylamine Columns. J. Sci. Food Agric. 34:1285-1288.

Wilson C.W., P.E. Shaw and C.W. Campbell 1982. Determination of Organic Acids and Sugars in Guava (*Psidium guajava* L.) Cultivars by HPLC. J. Sci Food Agric. 33:777-780.

Wimalasiri P. and R.B.H. Wills 1983. Simultaneous Analysis of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Fruit and Vegetable by HPLC. J. Chro. 256:368-371.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่วิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชั่น

สามารถหาได้จากสมการข้างล่างนี้

$$\text{มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิก} = \frac{(X - B) * F * E * 100}{S * V}$$

X = ปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอลที่ได้จากการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่าง

B = ปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอลที่ได้จากการไตเตรตกับสารละลายแบลงค์

F = จำนวนมิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายอินโดฟีนอล

E = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง

S = น้ำหนักของสารละลายตัวอย่าง

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่นำมาไตเตรต

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 1 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 214 nm

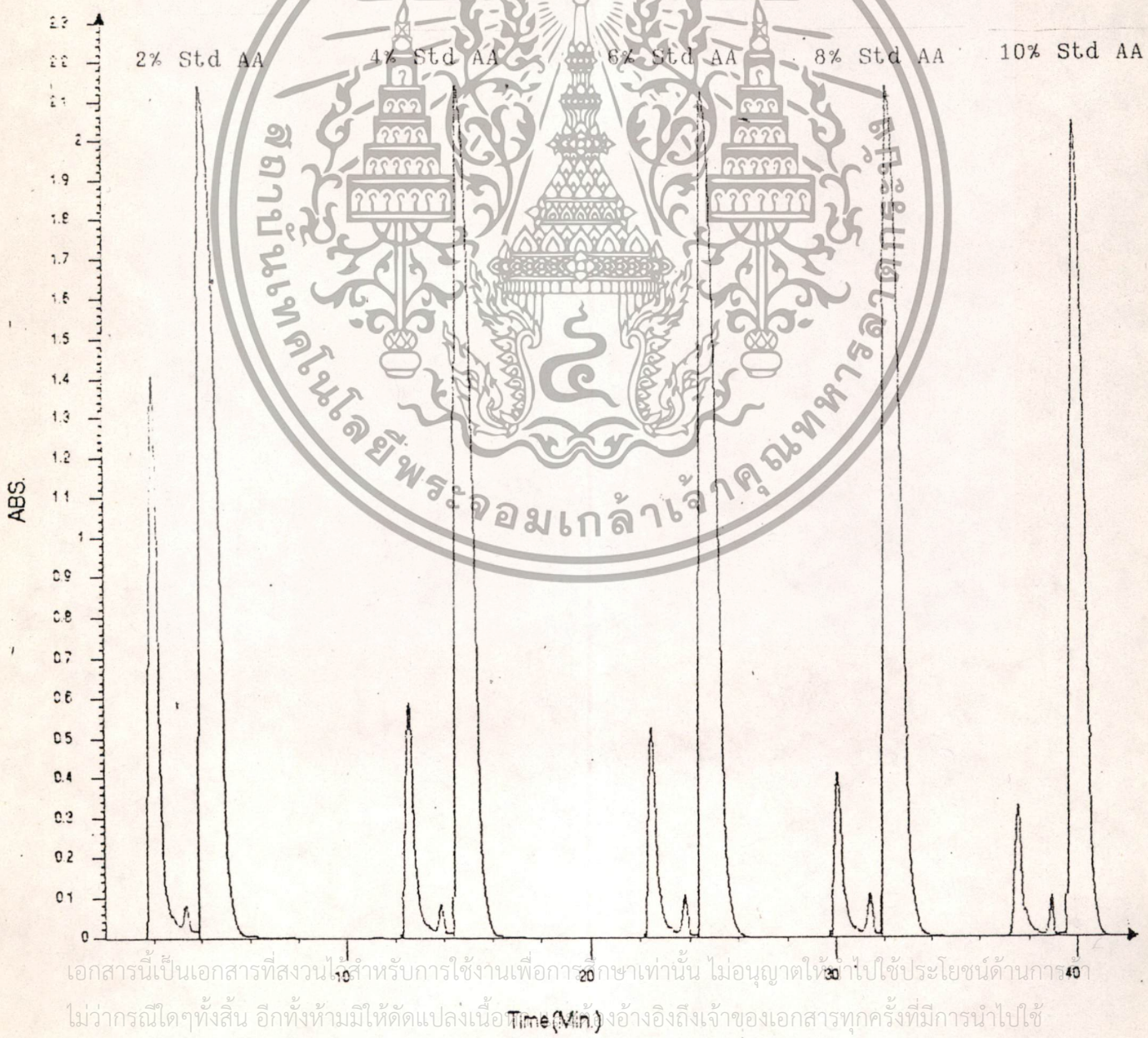
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml /min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 214 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 214 nm

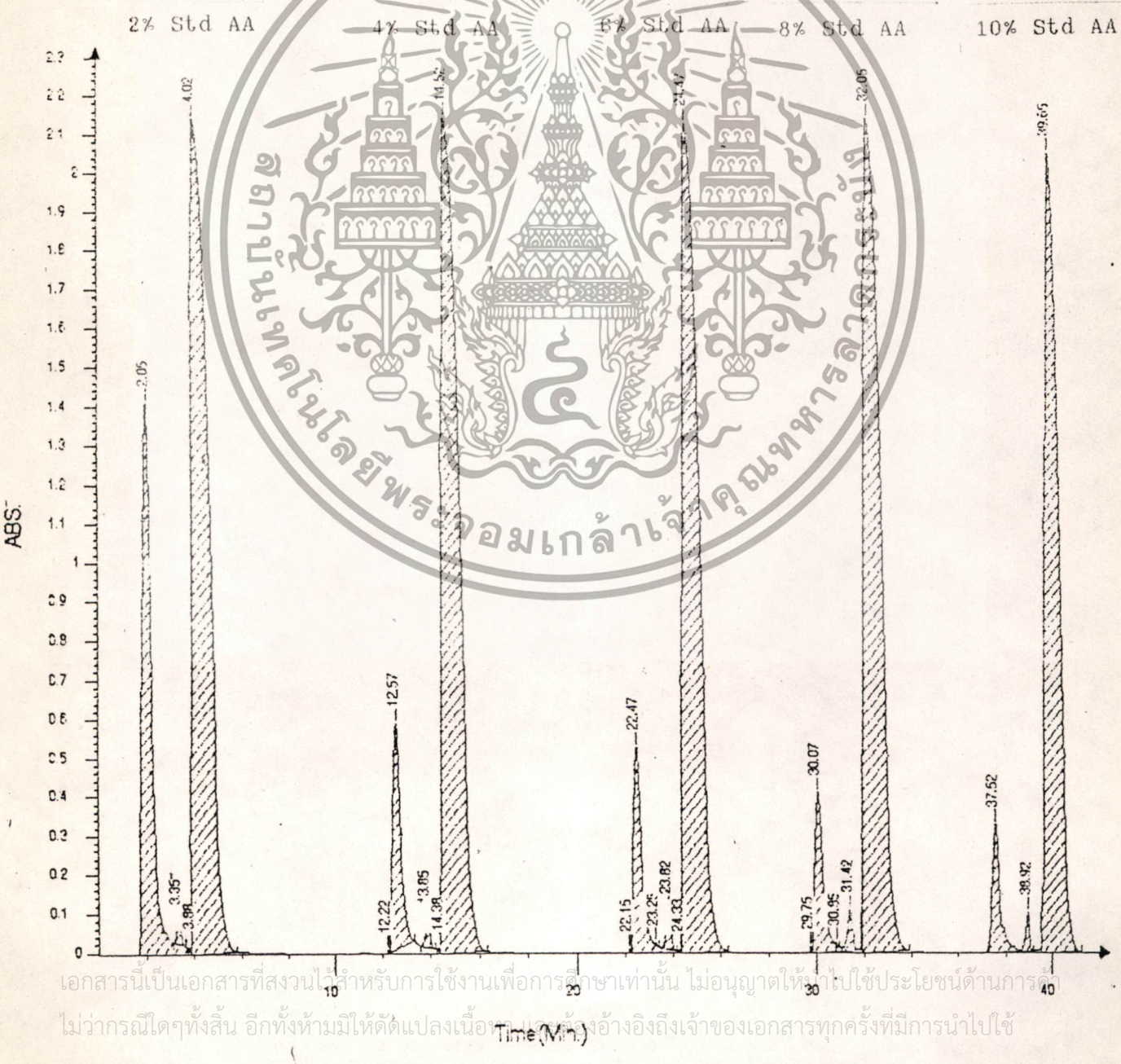
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml /min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 214 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 214 nm

PEEK REPORT

#	T. Start	RT	Hight	Width	Type	Area	%Area	Plate N
1	0.00	2.05	1.4367	0.406	BB	4803549	7.69	141
*2		3.35	0.0598	0.184	T	68383	0.11	1839
3		3.88	0.1621	0.099	T	88506	0.14	8539
4		4.02	2.2916	0.813	BB	11067607	17.72	135
5	10.50	12.22	0.0277	0.110	BB	17442	0.03	68058
6		12.57	0.6012	0.362	BB	1429610	2.29	6679
*7		13.85	0.0693	0.195	BB	84737	0.14	27923
8		14.38	0.1132	0.097	BB	60757	0.10	122741
9		14.52	2.2495	0.810	BB	10777531	17.25	1778
10	20.43	22.15	0.0331	0.106	BB	21120	0.03	242017
11		22.47	0.5558	0.360	BV	1473586	2.36	21566
12		23.25	0.0047	0.095	T	2744	0.00	333094
*13		23.82	0.0963	0.217	T	131288	0.21	66703
14		24.38	0.1422	0.102	VB	80035	0.13	318363
15		24.47	2.2711	0.791	BB	10694612	17.12	5305
16	28.02	29.75	0.0396	0.097	BB	24491	0.04	518370
17		30.07	0.4344	0.364	BV	1105152	1.77	37813
18		30.85	0.0045	0.091	T	2494	0.00	632444
*19		31.42	0.1494	0.322	VB	437152	0.70	52873
20		32.05	2.2348	0.804	BB	10668221	17.08	8804
21	35.50	37.52	0.3302	0.301	BV	718020	1.15	86314
*22		38.92	0.1005	0.161	VB	106079	0.17	325243
23		39.65	2.1843	0.657	BB	8599831	13.77	20150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 3 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 254 nm

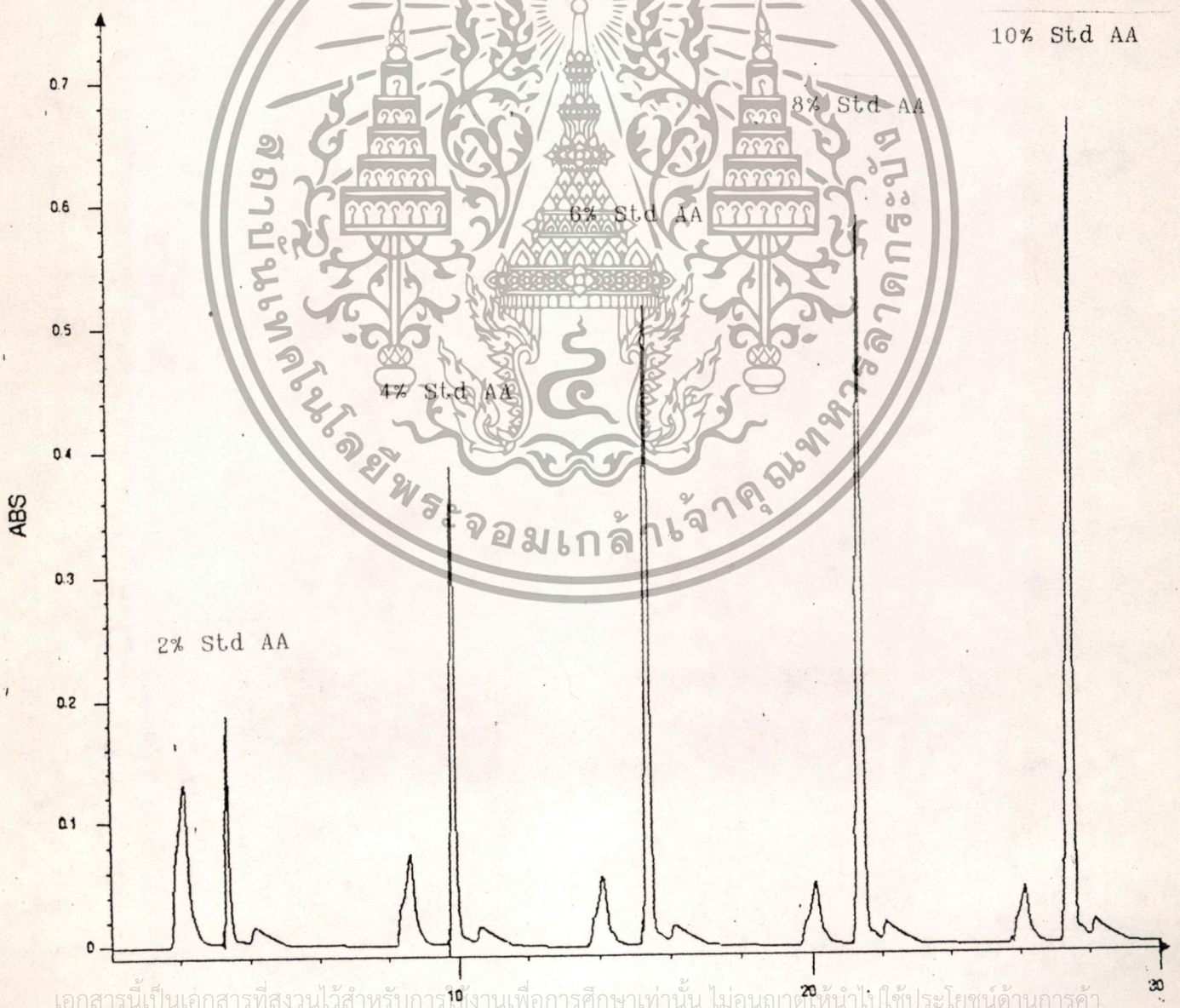
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$. pH 4.4

UV detector : 254 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 4 โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 254 nm

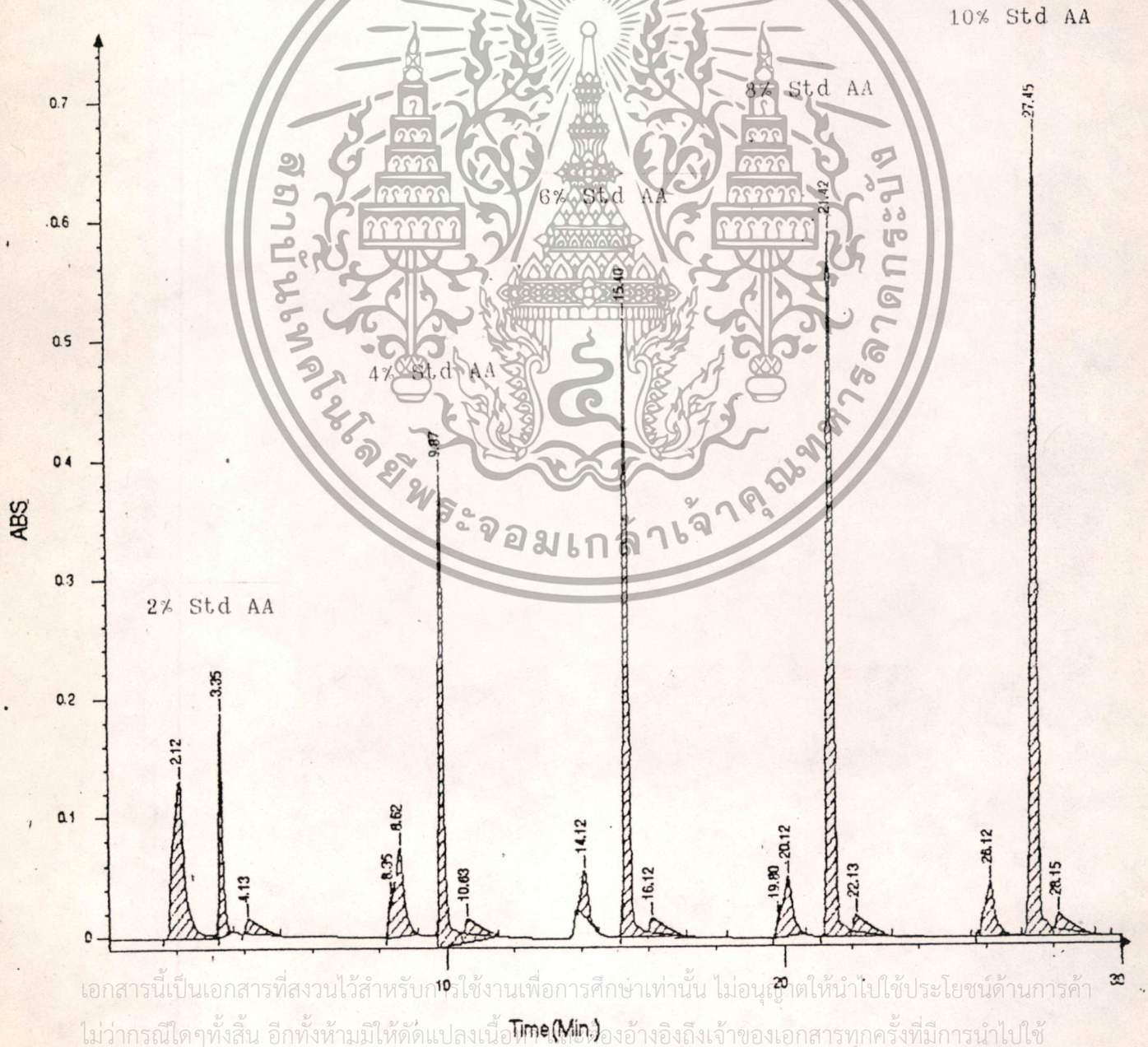
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml /min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_2H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 254 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 254 nm

PEAK REPORT

#	T.Start	RT	Hight	Width	Type	Area	%Area	Plate N
1	0.00	2.12	0.1315	0.385	BB	321197	9.38	168
*2		3.35	0.1868	0.087	BB	115001	3.36	8170
3		4.13	0.0125	0.501	BB	39231	1.15	377
4	6.50	8.35	0.0074	0.107	T	5678	0.17	33497
5		8.62	0.0741	0.321	BB	155479	4.54	3997
*6		9.87	0.4013	0.126	BB	410534	11.99	33906
7		10.63	0.0125	0.482	T	38057	1.11	2692
8	12.00	14.12	0.0388	0.199	BB	50180	1.47	27830
*9		15.40	0.5192	0.144	BB	518941	15.16	63211
10		16.12	0.0128	0.421	T	40024	1.17	5965
11	18.00	19.80	0.0042	0.091	T	2217	0.06	260845
12		20.12	0.0489	0.295	BB	106620	3.11	25760
*13		21.42	0.5933	0.163	BB	659968	19.28	95793
14		22.13	0.0136	0.473	T	41697	1.22	12118
15	24.00	26.12	0.0455	0.301	T	98067	2.86	41807
*16		27.45	0.6757	0.168	BB	781946	22.84	148086
17		28.15	0.0132	0.449	T	39011	1.14	21798

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 5 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 268 nm

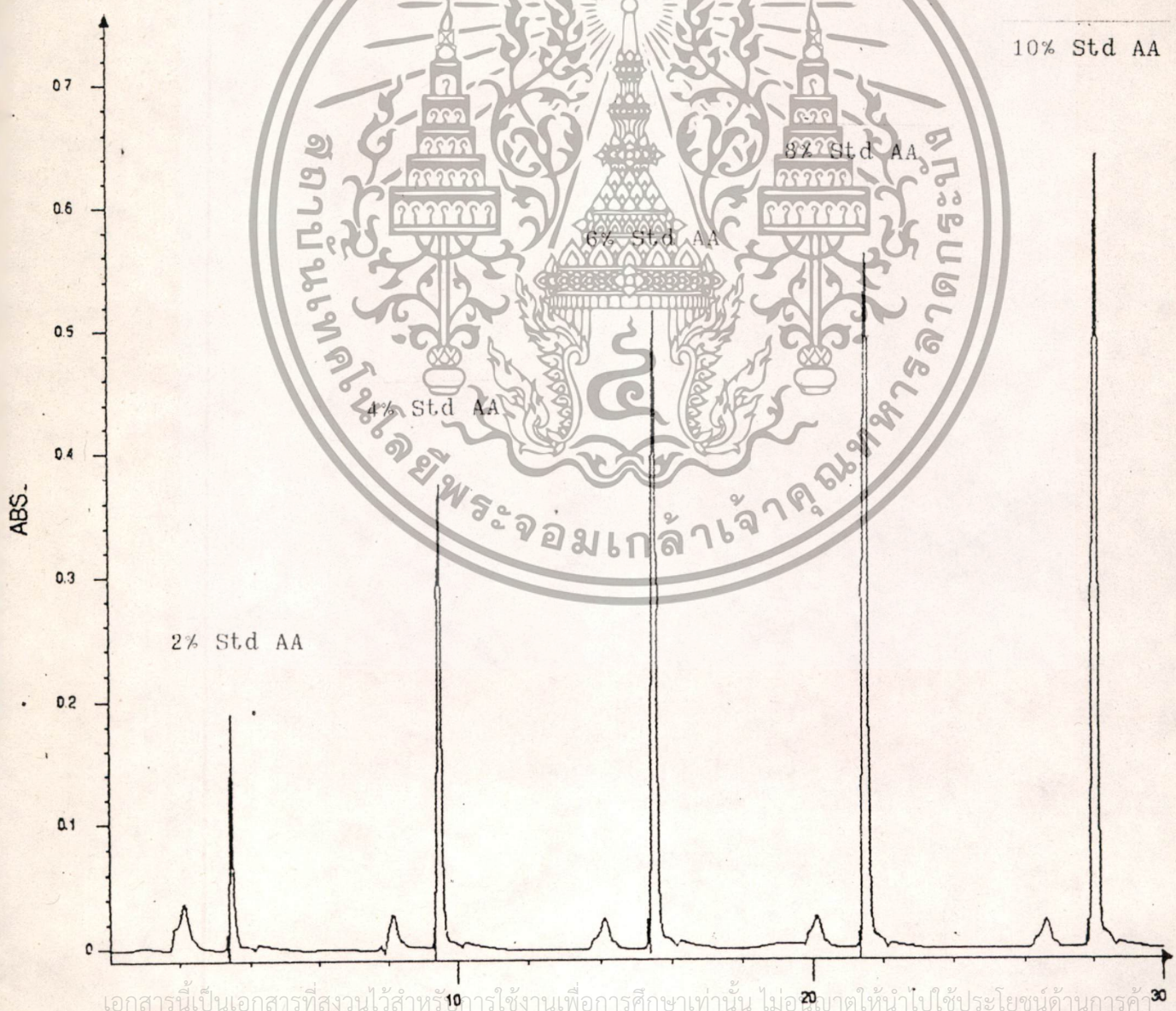
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml /min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 268 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 6 โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่พีคของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ 268 nm

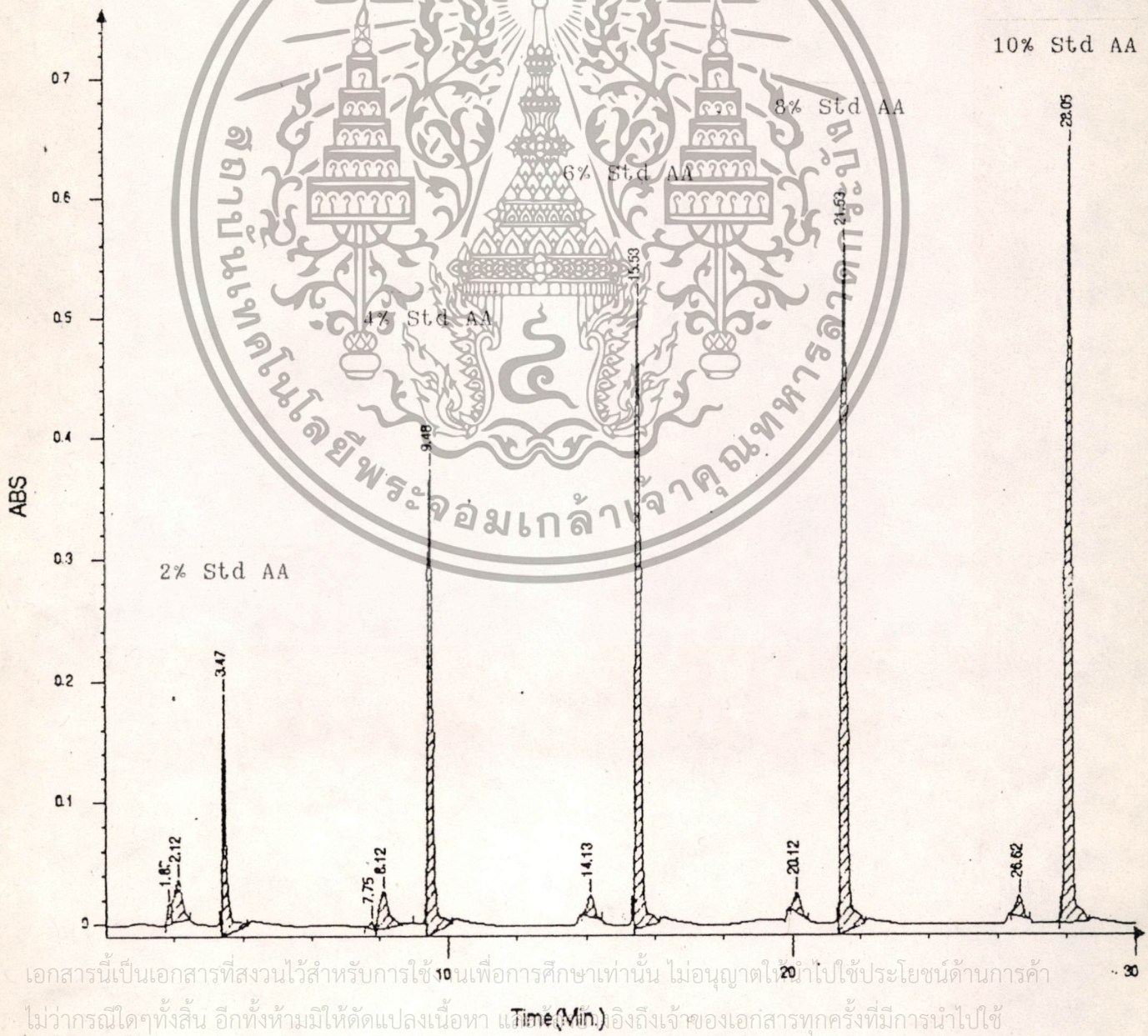
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 268 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ที่ 268 nm

PEAK REPORT

#	T.Start	RT	Hight	Width	Type	Area	%Area	Plate N
1	0.00	1.83	0.0166	0.132	BV	13316	0.53	1072
2		2.12	0.0332	0.312	VB	54669	2.18	256
*3		3.47	0.1992	0.090	BB	142202	5.67	8310
4	6.00	7.75	0.0056	0.105	BB	4044	0.16	30236
5		8.12	0.0300	0.303	BB	61986	2.47	3963
*6		9.48	0.3834	0.134	BB	352597	14.05	27833
7	12.00	14.13	0.0178	0.211	BB	24037	0.96	24895
*8		15.53	0.5139	0.150	BB	499676	19.91	59428
9	18.00	20.12	0.0157	0.203	BB	19850	0.79	54439
*10		21.53	0.5715	0.172	BB	618864	24.66	86670
11	24.00	26.62	0.0162	0.214	BB	21688	0.86	85622
*12		28.05	0.6444	0.172	BB	696616	27.76	148111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 7 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานเปรียบเทียบ 3 ความยาวคลื่น

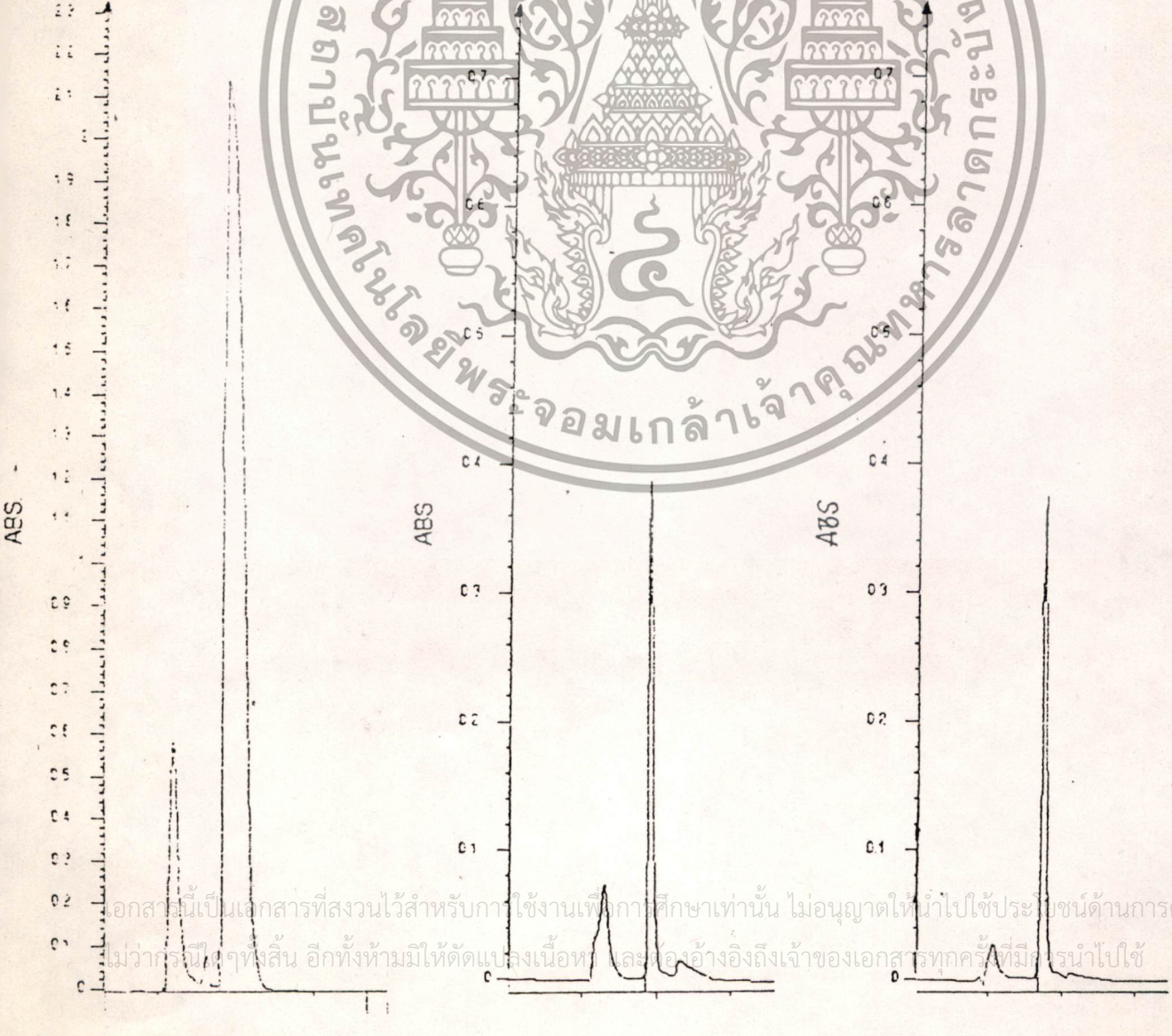
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 214 nm, 254 nm and 268 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 8 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานเมื่อเปลี่ยน mobile phase ที่ 254 nm

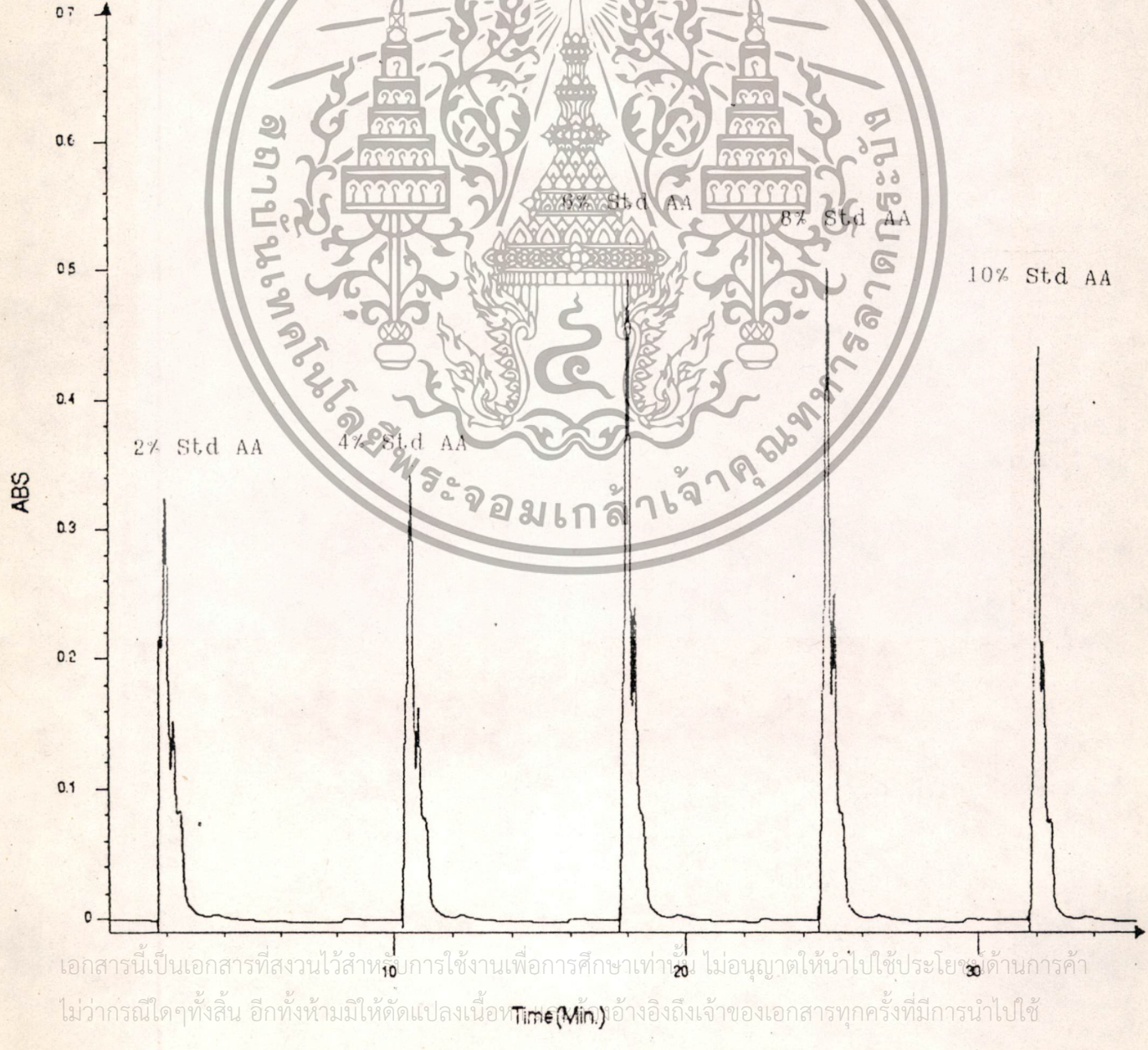
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$: CH_3CN (30:70, v/v) pH 4.4

UV detector : 254 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 9 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานเมื่อเปลี่ยน mobile phase ที่ 268 nm

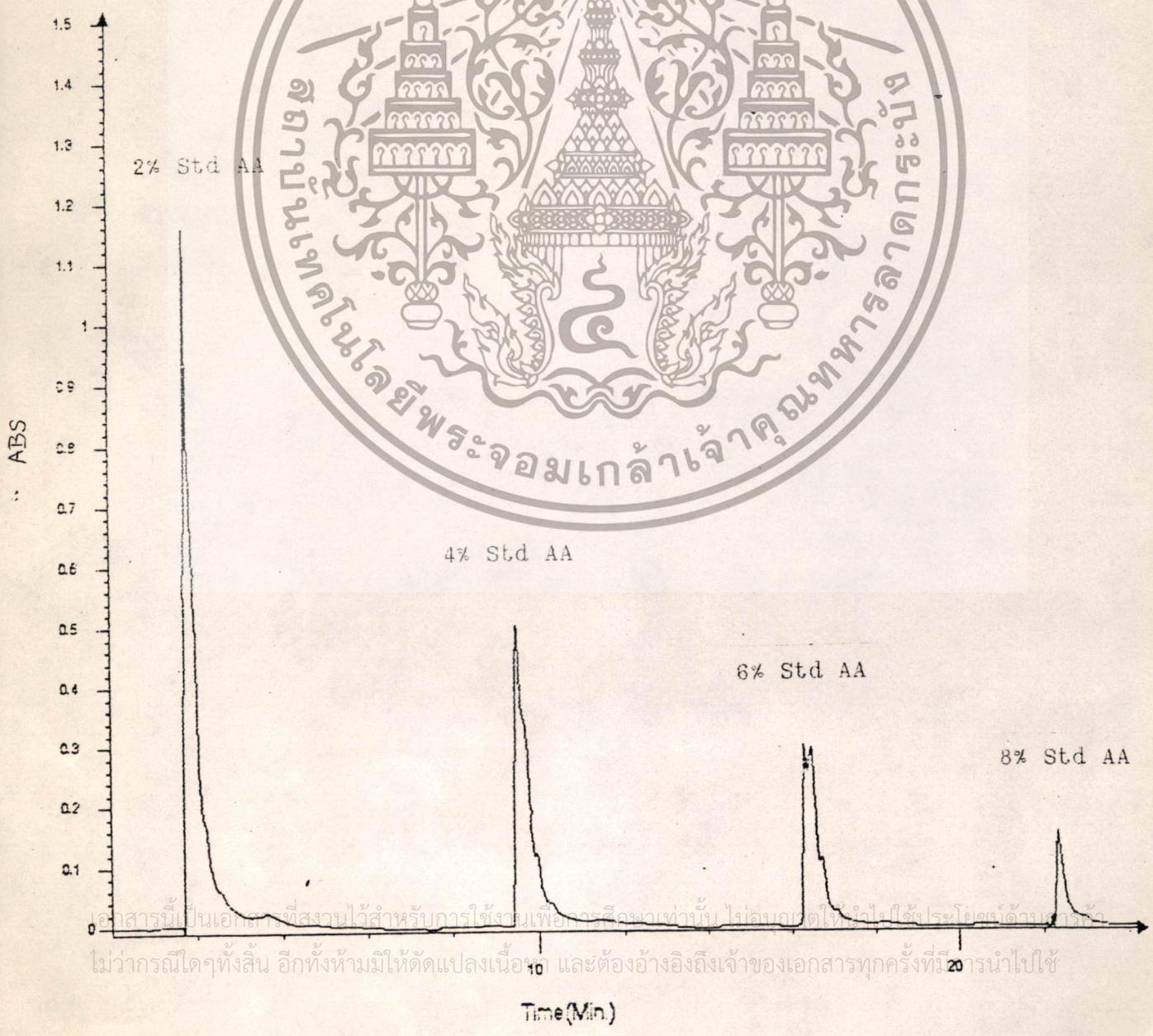
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$: CH_3CN (30:70,v/v) pH 4.4

UV detector : 268 nm

Inj# : Standard Ascorbic Acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 10 โครมาโตแกรมของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างผักและผลไม้

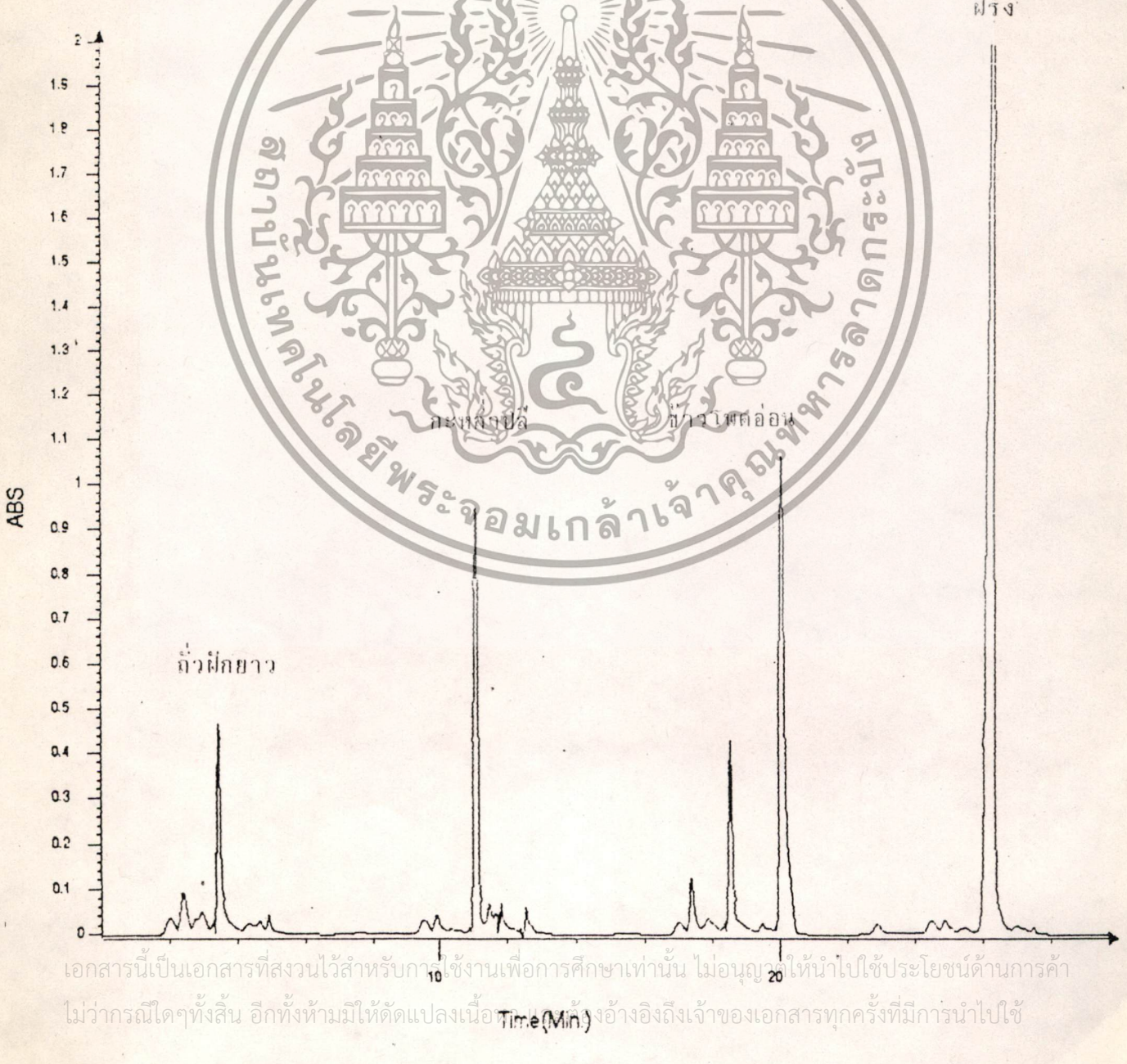
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 254 nm

Inj# : Fruit & Vegetable Samples



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 11 โครมาโตแกรมแสดงการอินทิกรัลพื้นที่ยอดของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างผักและผลไม้

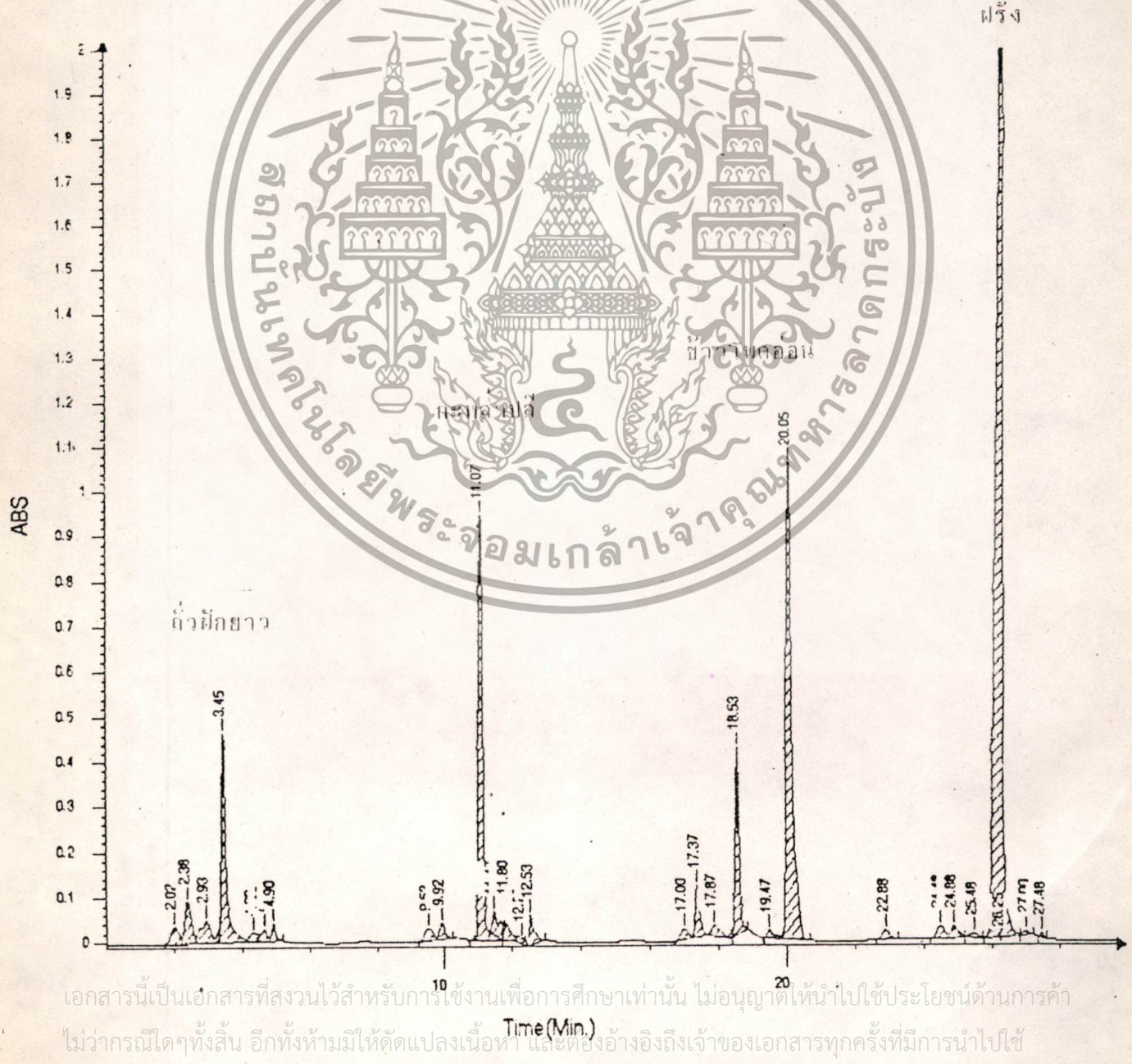
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 254 nm

Inj# : Fruit & Vegetable Samples



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 Peak Report ของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างผักและผลไม้

PEAK REPORT

#	T.Start	RT	Hight	Width	Type	Area	%Area	Plate N
1	0.00	2.02	0.0375	0.286	BV	62556	0.94	275
2		2.38	0.0930	0.214	W	122581	1.83	684
3		2.93	0.0502	0.375	W	118778	1.78	339
♦4		3.45	0.4644	0.124	W	443818	6.64	4304
5		4.32	0.0194	0.322	W	35702	0.53	994
6		4.65	0.0276	0.209	W	30582	0.46	2735
7		4.90	0.0375	0.113	VB	30997	0.46	10381
8	7.50	9.53	0.0295	0.273	BV	48198	0.72	6735
9		9.92	0.0349	0.173	VB	40261	0.60	18241
♦10		11.07	0.9419	0.126	BB	782169	11.70	42945
11		11.47	0.0496	0.317	T	71160	1.06	7246
12		11.80	0.0825	0.074	BV	48942	0.73	140543
13		12.28	0.0268	0.326	VB	45557	0.68	7859
14		12.53	0.0862	0.144	BB	91218	1.36	41962
15	15.00	17.00	0.0242	0.247	BV	35878	0.54	26176
16		17.37	0.1146	0.138	W	110368	1.65	87197
17		17.87	0.0247	0.287	VB	50272	0.75	21486
♦18		18.53	0.4171	0.121	BB	327238	4.90	129020
19		19.47	0.0169	0.171	T	23841	0.36	71531
20		20.05	1.0593	0.161	BB	1227132	18.36	86269
21		22.88	0.0218	0.224	BB	31299	0.47	57808
22	22.50	24.48	0.0261	0.277	BV	43341	0.65	43201
23		24.88	0.0268	0.197	VB	38176	0.57	88804
24		25.48	0.0090	0.266	BB	13488	0.20	50733
♦25		26.25	2.1866	0.199	BB	2794912	41.82	96815

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 12 โครมาโตแกรมของกรดซิตริก, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาลิค ที่ 214 nm

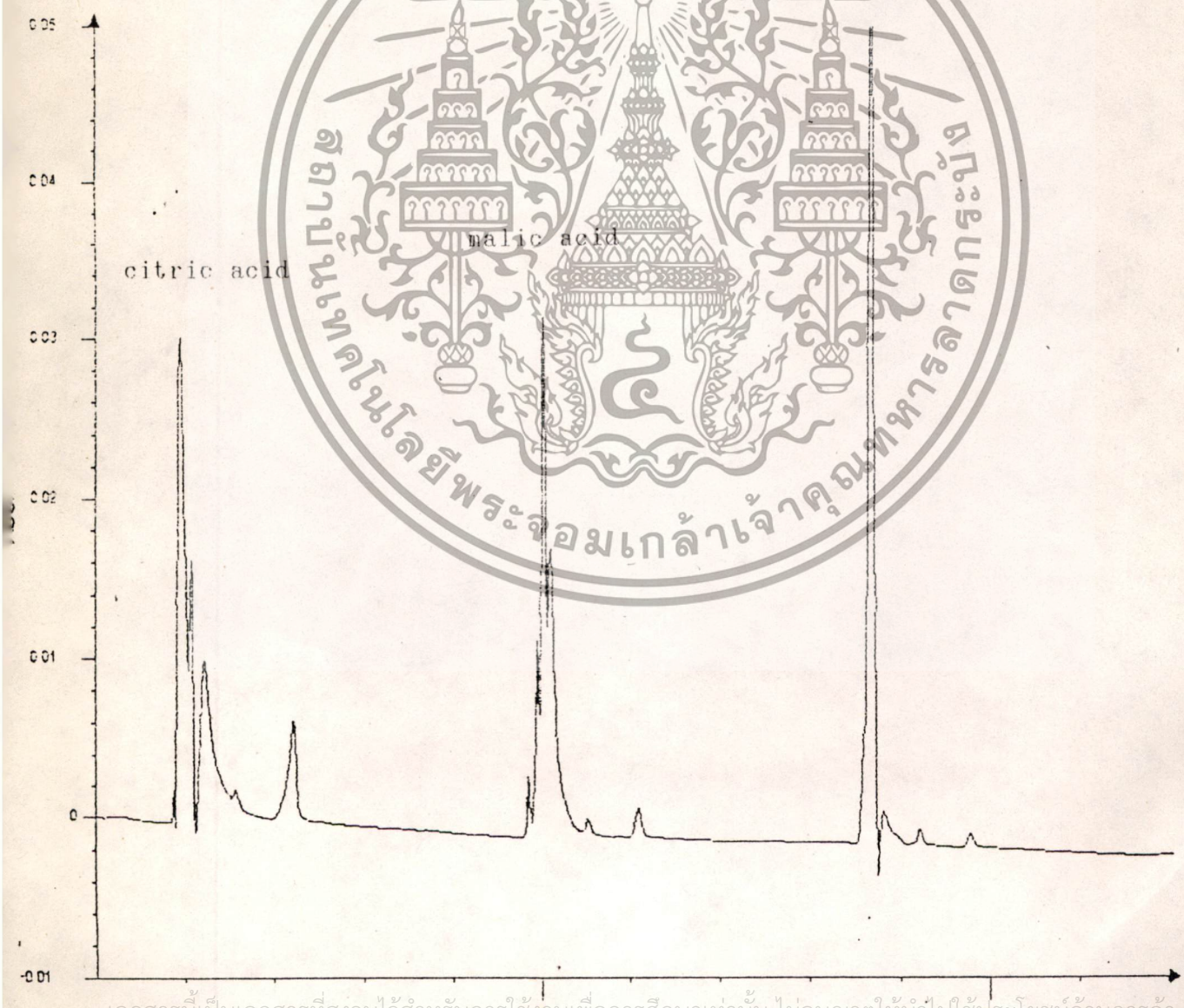
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 214 nm

Inj# : Organic Acid Samples



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 13 โครมาโตแกรมของกรดซิตริก, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาลิค ที่ 254 nm

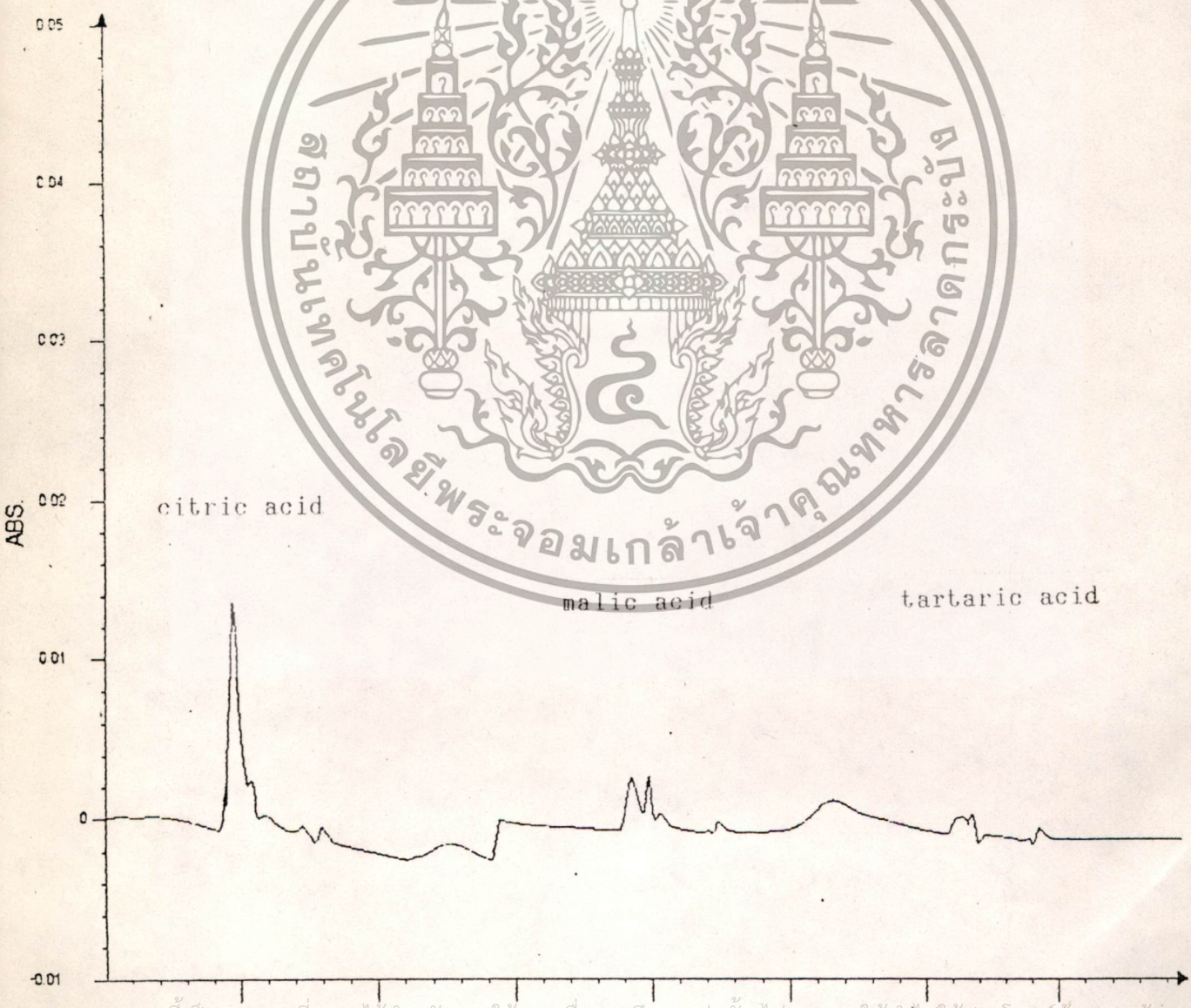
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 254 nm

Inj# : Organic Acid Samples



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 14 โครมาโตแกรมของกรดซิตริก, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาลิค ที่ 268 nm

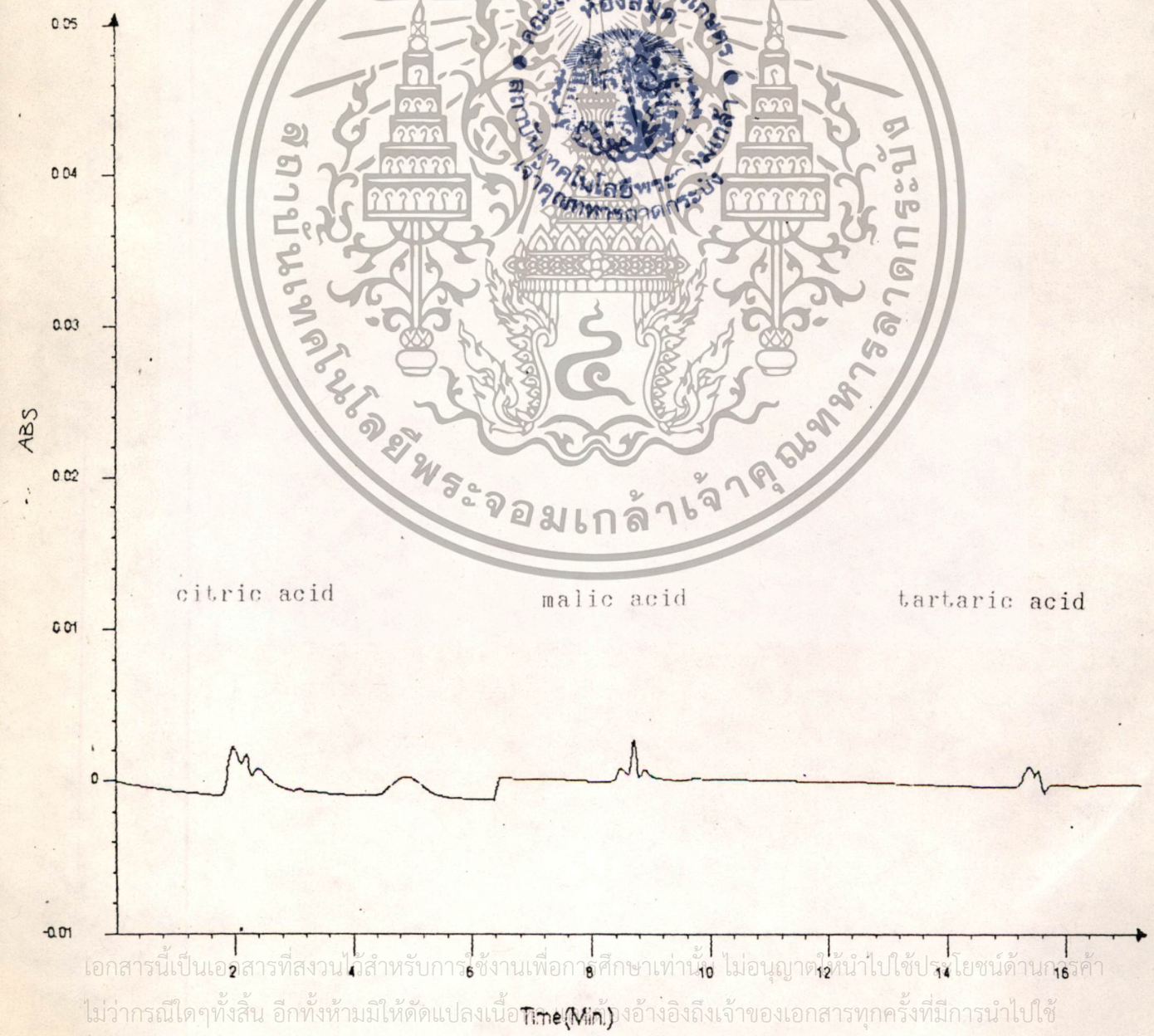
Column : Spherisorb 10 ODS 2

Flow rate : 1 ml / min.

Mobile phase : 0.02 M $NH_4H_2PO_4$, pH 4.4

UV detector : 268 nm

Inj# : Organic Acid Samples



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้