สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ (45499)

เรื่อง

การศึกษาสารสกัดที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาวิตามินซีจากผลไม้เขตร้อน

(A STUDY OF EXTRACTING MEDIA USE IN VITAMIN C DETERMINATION IN TROPICAL FRUITS)

T096832

โดย

นางสาวชนินทรา พงษ์พัว

ปพ.
ส15ก
2533

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96832.....
วัน,เดือน,ปี.....4 JUL 2533.....

เสนอ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ. 2533

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

894

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง การศึกษาสารสกัดที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาวิตามินซีจากผลไม้เขตร้อน

(A STUDY OF EXTRACTING MEDIA USE IN VITAMIN C DETERMINATION IN TROPICAL FRUITS)

โดย นางสาวชนินทรา พงษ์พัว

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 1 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ.ระดิพร หาเรือนกิจ)

..... 26/ ..... กรรมการของภาควิชา

(อาจารย์พอใจ ลิ้มพันธุ์อุดม)

..... 26/ ..... กรรมการของภาควิชา

(ผศ.เกษตร ตรงงามพิมล)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(อ.เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฐ์)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 26 เดือน ..... พ.ศ. 33

14094
24 S.A. 254
ฝพ.
ช154ท
2532

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัด โดยการนำตัวอย่างมาทำการสกัดในสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 3% , กรดออกซาลิก 0.5% , กรดไฮโดรคลอริก 1% และกรดซิตริก 3% แล้วนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่มีอยู่โดยวิธีการไตเตรชัน โดยการนำไปไตเตรทด้วยสารละลาย 2,6- ไดคลอโรฟินอลอินโดฟีนอล เมื่อนำผลการวิเคราะห์ไปทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง (99%) ซึ่งพบว่ากรดเมตาฟอสฟอริก 3% ให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี และพบว่ากรดออกซาลิก 0.5% และกรดไฮโดรคลอริก 1% สามารถนำมาใช้เป็นสารละลายที่ใช้ในการสกัดแทนกรดเมตาฟอสฟอริกได้ ซึ่งให้ผลการทดลองที่ดีเช่นกัน ส่วนกรดซิตริก 3% พบว่าทำให้กรดแอสคอร์บิกถูกทำลายไปในระหว่างการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาทำการสกัดกรดแอสคอร์บิกในการวิเคราะห์หาปริมาณ

การทดลองหาปริมาณกรอแอสคอร์บิกโดยวิธีดัลเลอร์ริเมตริก พบว่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่หาได้มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณที่นำมาตรวจสอบ ซึ่งสาเหตุอาจจะเกิดจากชุดสารเคมีที่นำมาทดสอบหมดอายุ ทำให้ผลการทดลองผิดพลาด จึงไม่สามารถนำผลการวิเคราะห์ไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ สำเร็จลงด้วยดีก็เนื่องจากสิ่งต่าง ๆ ที่ประกอบกัน ดิฉันขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ นับแต่คุณพ่อ คุณแม่ที่ให้ดิฉันรับการศึกษาจนได้มาจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ อาจารย์ที่เคยอบรมสั่งสอนมาทำให้มีความรู้ความสามารถทำให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี โดยเฉพาะอาจารย์ระดิพร หาเรือนกิจ ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาให้คำแนะนำต่าง ๆ ขอขอบคุณน้องศิริจันทร์ ปฏิภาณปรีชาวุฒิ และน้องฉัตรชัย บุศยพลากร ที่มาช่วยเตรียมการทดลองทำให้การทดลองนี้สำเร็จลงด้วยดี

ชนินทรา พงษ์พัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

หน้า

สารบาญตาราง	ก
สารบาญภาพ	ข
สารบาญตารางภาคผนวก	ค
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลการทดลองและวิจารณ์	36
สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก	31
2	ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก	36
3	การเจือจางความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง	37
4	การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ผสมมูลกับ 1 มิลลิลิตร กับสารละลายมาตรฐานอินโดฟินอล	38
5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่ทำการสกัดด้วยสารละลายต่าง ๆ	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชัน	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตารางภาคผนวก

ตารางที่		หน้า
1	การวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างมะนาว	53
2	การวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างกล้วย	53
3	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างมะละกอ	54
4	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างกระหล่ำปลี	54
5	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างละมุด	55
6	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างฝรั่ง	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี นั้น เป็นวิตามินที่พบว่ามีอยู่ในปริมาณมากน้อยในผักและผลไม้ต่างชนิด และสามารถถูกทำลายได้ง่ายโดยขบวนการให้ความร้อน แสง และเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดส ดังนั้นการนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณจะได้ค่า ที่ไม่ตรงกับปริมาณที่มีอยู่จริง เนื่องจากถูกทำลายไปได้มีผู้พยายามคิดค้นหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีการต่าง ๆ ซึ่งวิธีการที่สะดวกรวดเร็วคือวิธีการไตเตรชัน แต่เนื่องจากวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ จึงได้มีผู้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิธีใหม่ ๆ ขึ้นมา พบว่าวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีดัลเลอร์ริเมตริก เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่น่าจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

นอกจากนี้กรดแอสคอร์บิกที่ทำการสกัดออกมาจะมีความเสถียร เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรด เนื่องจากการที่กรดแอสคอร์บิกสามารถถูกทำลายได้ง่าย จึงมีการศึกษาถึงตัวสกัดที่มีประสิทธิภาพในการที่จะทำให้กรดแอสคอร์บิกคงอยู่ โดยไม่ถูกทำลายไปจากสิ่งต่าง ๆ ที่สามารถออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิกได้ ซึ่งส่วนใหญ่สารละลายที่ใช้ในการสกัด จะใช้กรดเมตาฟอสฟอริก ซึ่งพบว่าให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี แต่ว่าสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกนี้มีราคาแพงมาก การทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดโดยสารละลายต่าง ๆ เพื่อที่จะหาสารละลายที่สามารถนำมาใช้แทนกรดเมตาฟอสฟอริกได้ โดยมีประสิทธิภาพในการทำให้กรดแอสคอร์บิกมีความเสถียร และมีราคาถูก เพื่อประโยชน์ในทางเศรษฐกิจ และการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกจากวิธีการไตเตรชัน และวิธีดัลเลอร์ริเมตริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของการสกัดกรดแอสคอร์บิก ด้วยสารละลายที่ใช้ในการสกัดต่าง ๆ กัน เพื่อหาสารละลายที่สามารถนำมาใช้แทนกรดเมตา-ฟอสฟอริกในการสกัดได้

2. เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยวิธีคัลเลอร์-ริเมตริกและวิธีไตเตรชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ประวัติของวิตามินซี

โรคขาดสารอาหารจำพวกวิตามินซี ซึ่งเรียกว่าโรคลักปิดลักเปิด (Scurvy) โรคนี้เป็นที่รู้จักกันมานานหลายศตวรรษแล้วว่าเป็นโรคเกี่ยวกับภาวะโภชนาการ

ได้มีการบันทึกไว้ว่า ในการเดินทางไปในทะเลในระยะเวลาอันยาวนาน ปรากฏว่าลูกเรือส่วนใหญ่ได้ปรากฏอาการของการมีเลือดออกตามไรฟัน ซึ่งอาการนี้หายไปเมื่อเรือไปถึงฝั่ง เมื่อลูกเรือได้รับผักและผลไม้สด ในเรื่องนี้ทำให้เป็นเรื่องที่มีการบันทึกไว้เป็นสิ่งที่บอกต่อ ๆ มาสำหรับการรับประทานผักและผลไม้สด สำหรับการรักษาโรคเลือดออกตามไรฟัน ซึ่งวิทยาการสมัยใหม่ได้ตรวจสอบแล้วพบว่ามีวิตามินอยู่มากเป็นองค์ประกอบในผัก

ในตอนต้นศตวรรษที่ 19 Holst and Froehlich ใน Stepp (1938) ได้เสนอการทดลองที่ใช้หนูตะเภา ว่าสามารถที่จะเกิดโรคลักปิดลักเปิดได้โดยการที่ไม่ได้รับหญ้าสีเขียวสด และจำกัดอาหารพวก เพิร์ล บาร์เล่ย์ และขนมปัง หนูทดลองก็ได้แสดงอาการของโรคปรากฏให้เห็น ซึ่งอาการที่ปรากฏมีอาการคล้ายโรคลักปิด-ลักเปิดที่พบในคน แต่ไม่จำเป็นสำหรับสัตว์ทุก ๆ ชนิดที่จะต้องได้รับอาหารที่ประกอบด้วยวิตามินซี ซึ่งนอกจากหนูตะเภาแล้ววิตามินซี ก็จำเป็นสำหรับมนุษย์และลิง สัตว์ส่วนใหญ่จะสามารถยังคงมีชีวิตอยู่ได้ถึงแม้ว่าอาหารที่ใช้รับประทานจะไม่มีวิตามินซี ประกอบอยู่ เพราะว่ามันสามารถที่จะผลิตได้จากสารเฉพาะภายในตับ

Von Szent-Gyorgyi (1928) ได้ประสบความสำเร็จในการแยกวิตามินซี จากต่อมหมวกไตของวัว สารที่ค้นพบได้ใหม่นี้มีความสำคัญเป็นอย่างสูงสำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน สำหรับขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลพืช เขาได้ให้ชื่อสารที่แยกได้นี้ว่า กรดเฮซูโรนิก (hexuronic acid) ในภายหลังเมื่อมีการแยกกรดที่ประกอบด้วยวิตามินซี ได้อย่างแน่นอน จึงมีชื่อเรียกสารตัวใหม่นี้ว่า กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ซึ่งเป็นชื่อที่รู้จักกันดีในปัจจุบัน

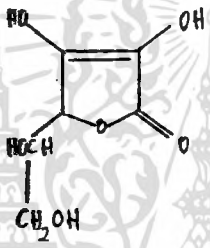
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางเคมี

กรดแอสคอร์บิก ซึ่งแต่ก่อนมีชื่อว่า วิตามินซี Drummond (1920) กรดซีวิตามิก (cevitamic acid) กรดเฮคซูโรนิค (hexuronic acid) Szent-Gyorgy) (1925) ใน Sebrell (1967) เป็นอนุพันธ์ของ 3-คีโตกูโลแอซิค แอนไฮไดรด์ (3-ketogulo acid anhydride)

สูตรอย่างง่ายคือ $C_6H_8O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 176.13

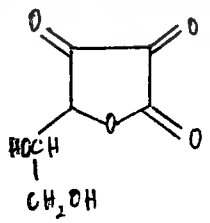
มีชื่อทางเคมีว่า L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxy-2-hexenoic acid-4-lactone



รูปรีดิวซ์

ผลึกบริสุทธิ์ของกรดแอสคอร์บิก เป็นผลึกละเอียดสีขาวสามารถละลายได้ง่ายในน้ำหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 192 องศาเซลเซียส

กรดแอสคอร์บิก ที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ คือดีไฮโดรแอสคอร์บิกแอซิด (dehydroascrbic acid) ซึ่งมีสูตรอย่างง่ายคือ $C_6H_6O_6$



รูปออกซิไดส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปฏิกิริยาเคมีที่เด่นชัด กรดแอสคอร์บิกจะมีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ ที่รุนแรง วิตามินซีที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ จะยังคงเป็นวิตามินซี ที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยา และถูกรีดิวส์ได้ง่ายกลับไปเป็นสารตั้งต้นโดยเนื้อเยื่อ อาจจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยขบวนการออกซิเดชัน

กรดแอสคอร์บิกจำเป็นสำหรับขบวนการในสิ่งมีชีวิตของเซลล์ ในสารละลายที่เป็นกลางและเป็นด่าง กรดแอสคอร์บิกจะถูกทำลายได้ง่ายโดยออกซิเจนในอากาศ ในสารละลายที่เป็นกรดอัตราการออกซิเดชันของกรดจะน้อยมาก

สิ่งที่น่าสนใจแต่ว่าไม่สามารถอธิบายได้เกี่ยวกับกรดแอสคอร์บิก ในเนื้อเยื่อพืช เช่น กรดแอสคอร์บิกในมะนาวจะมีความเสถียรมากกว่ากรดแอสคอร์บิกที่แยกออกมา ซึ่งอาจจะเป็นได้ว่าปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเป็นการกระทำของ protectins การสูญหายไปของกรดแอสคอร์บิก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลอย่างช้า ๆ L-rhamno-ascorbic acid จะไปแทนที่กลุ่ม $HOCH_2$ ในที่สุดกลุ่มของ $HOCH-CH_2$ จะมีคุณสมบัติที่ประมาณได้ว่าเป็นสารป้องกันโรคลักปิดลักเปิด

<u>ความต้องการวิตามินซีของมนุษย์</u>

จากการทดลองกับหนูตะเภา จะแสดงให้เห็นถึงปริมาณกรดแอสคอร์บิก จำนวน 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อวัน ว่าเป็นปริมาณที่เพียงพอที่จะยับยั้งการลดลงของน้ำหนักของสัตว์ที่ไม่ได้รับวิตามินซี และป้องกันการตายของหนู แต่ภายหลังการได้รับกรดแอสคอร์บิก ในปริมาณ 1.0-1.5 มิลลิกรัมต่อวัน หนูทดลองก็ล้มเหลวต่อการเปลี่ยนแปลงที่แสดงออกมา

ปริมาณวิตามินซีที่ต้องการในแต่ละวันจะขึ้นกับขนาด รูปร่าง ซึ่งปริมาณอย่างน้อยสำหรับวัยเด็ก ได้มีการแนะนำให้ได้รับในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิก และในผู้ใหญ่ควรได้รับในปริมาณ 10-20 มิลลิกรัม ต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองเมื่อเร็ว ๆ มานี้ ได้พิสูจน์ว่า ค่าต่าง ๆ ข้างบนเป็นปริมาณที่น้อยเกินไป และได้แนะนำว่าปริมาณวิตามินซีที่ต้องการในแต่ละวันจะประมาณ 50 มิลลิกรัม เป็นที่น่าพิจารณาว่า ความต้องการวิตามินซีของมนุษย์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบต่าง ๆ กัน ถึงกระนั้นก็ตาม การถกปัญหายังคงดำเนินต่อไปภายใต้การใช้กรดแอส-คอร์บิก ในการรักษาโรค ซึ่งสำหรับมนุษย์ยังคงมีปัญหาเรื่องการขาดวิตามินซีจากการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่ามันจะแสดงอาการของโรคลักปิดลักเปิด ที่เป็นความสัมพันธ์ระหว่างสาเหตุของโรคกับปริมาณวิตามินซีที่ต้องการ พบว่าปริมาณวิตามินซีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เพียงพอในการรักษาโรคลักปิดลักเปิด

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินที่ต้องการในแต่ละวัน พบว่าเป็นความจำเป็นสำหรับร่างกายในการที่ต้องได้รับวิตามินซีในปริมาณที่มากเพียงพอ

<u>วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิก</u>

เราสามารถที่จะหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผักและผลไม้ได้ โดยวิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ

A. วิธีทางชีววิทยา

วิธีทางชีววิทยาสำหรับการประมาณค่าของกรดแอสคอร์บิก ที่เฉพาะสำหรับการป้องกันโรคลักปิดลักเปิดซึ่งสามารถยอมรับในการเป็นมาตรฐานสุดท้าย ในกรณีที่สงสัยเกี่ยวกับความถูกต้องของการประมาณค่าโดยวิธีทางเคมีและทางกายภาพ ที่อาจจะมีผลมาจากการมีสิ่งปลอมปน การทดสอบทางชีววิทยาเพื่อวัดหาปริมาณทั้งหมดของกรดแอสคอร์บิกที่ปรากฏอยู่ ทั้งกรดแอสคอร์บิกที่อยู่ในรูปรีดิวซ์และรูปออกซิไดส์ คือกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก ซึ่งพบว่ามีอยู่ในธรรมชาติในอาหารในปริมาณน้อย

หนูไม่สามารถนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองสำหรับการหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกได้ เพราะว่ามันสามารถที่จะสังเคราะห์วิตามินชนิดนี้ได้ แต่พบว่าหนูตะเภาให้ผลการทดลองที่น่าพอใจ วิธีการทดสอบหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก ทางชีววิทยานี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพิจารณาปริมาณของตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่จำเป็นสำหรับการป้องกันโรคลักปิดลักเปิด

Sherman และคณะ (1922) ใน Sebrell (1967) ได้แนะนำโดยการทดลองกับหนูตะเภาโดยจะให้อาหารกับสัตว์ทดลอง ซึ่งอาหารที่ให้จะประกอบด้วยสารอาหารทุกชนิด ยกเว้นวิตามินซีซึ่งจะเสริมให้ด้วยตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ จะมีกลุ่มหนึ่งที่เป็นกลุ่มควบคุมคือจะไม่ให้วิตามินซีเสริม เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 6 - 10 จะมีการพิจารณาความสามารถในการป้องกันโรคลักปิดลักเปิด ซึ่งดูถึงการมีชีวิตรอดและการผ่าชันสูตรศพ ปริมาณของสารอาหารที่พอเพียงสำหรับป้องกันโรคลักปิดลักเปิด จะมีค่าประมาณ 1 หน่วย Sherman หรือประมาณ 0.5-0.6 มิลลิกรัม แอสคอร์บิก

ต่อมาภายหลังวิธีการที่ถูกปรับปรุงแล้วหลายวิธีได้ถูกแนะนำ และวิธีที่ถูกใช้มากคือวิธีการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของฟัน และวิธีการศึกษาการเจริญเติบโต

วิธีทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของฟันถูกคิดขึ้นโดย Hojer (1926) ซึ่งได้อธิบายถึงระยะต่าง ๆ 10 ระยะในการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของฟันระหว่างการพัฒนาของโรคลักปิดลักเปิด แต่ละระยะจะอยู่ที่ปริมาณของการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้คุณสมบัติเดิมจองที่บุโพรงเนื้อฟันเสียไป (Prampton (1947) ใน Sebrell (1967) ได้ใช้ความยาวของเซลที่บุโพรงฟันที่แตกต่างกัน ความกว้าง ความผิดปกติ และโครงสร้างของฟันที่คลุมด้วยสารเคลือบ และปริมาณของการที่มีหินปูนจับอยู่ที่เนื้อฟันขณะที่เพิ่งเริ่มขึ้น

ต่อมาภายหลัง Key และ Elphick (1931) ใน Sebrell (1967) ได้แบ่งระยะของการขาดสารอาหารออกเป็น 4 ระยะ และระดับของการป้องกันโรคลักปิดลักเปิดจะถูกกำหนดโดยอ้างอิงมาตรฐานอันนี้

สำหรับขบวนการโดยทั่วไปของการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของฟัน Harris และ Olliver (1942) ได้นำหนูตะเภาเพศผู้จำนวน 50 ตัว มาเลี้ยงด้วย basal scurvy producing diet* เสริมให้ด้วยกระหล่ำปลีทุกวัน วันละ 15 กรัม จนกระทั่งมีน้ำหนักได้ 250-300 กรัม แบ่งหนูตะเภาออกเป็น 10 กลุ่ม หนึ่งกลุ่มจะถูกเก็บไว้เป็นกลุ่มควบคุม อีก 3 กลุ่มจะถูกให้กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ในปริมาณ 2.5,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.25, และ 0.6 มิลลิกรัม และในกลุ่มที่เหลือจะให้อาหารที่ต้องการทดสอบความสามารถในการป้องกันโรคลักปิดลักเปิด ในการทดลองนี้ได้ใช้ มันฝรั่ง และแบลคเคอเรนท์ ในปริมาณที่มีระดับของกรดแอสคอร์บิก เท่ากับปริมาณที่ให้ของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ซึ่งการคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก ในมันฝรั่ง และแบลคเคอเรนท์ ทำโดยการทดลองทางเคมี เมื่อสิ้นสุดเวลา 2 สัปดาห์ สัตว์ทดลองจะถูกฆ่า กระดูกที่ขากรรไกรจะแยกออก และตัดส่วนฟันหน้าที่ยังไม่มีหินปูนจับอยู่ออกเป็นชิ้น นำไป

"Radiostoleum" (สำหรับวิตามิน A และ D) 3 หยด 1 อาทิตย์ให้ 2 ครั้ง

ตรวจสอบในระดับจุลกายวิภาคของการป้องกันโรคลักปิดลักเปิด โดยเปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันโรคลักปิดลักเปิดของอาหารที่ต้องการตรวจสอบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน

วิธีการศึกษาการเจริญเติบโต Glazunov (1937) ใน Harris และ Olliver (1942) ได้เปรียบเทียบวิธีการศึกษาทางชีววิทยาในหลาย ๆ วิธี และพบว่าการศึกษาการเจริญเติบโตให้ผลที่ถูกต้องและสะดวก วิธีการทดลองโดยใช้หนูตะเภาเพศผู้ น้ำหนัก 300 กรัม นำมาเลี้ยงด้วย scurvy-producing diet เป็นเวลา 10 วัน และในวันที่ 11 ของการทดลองให้เพิ่มอาหารเสริมต่าง ๆ กัน และกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน และมีหนึ่งกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริมเป็นกลุ่มควบคุม การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักจะถูกบันทึกทุกวันเป็นเวลา 20-30 วัน ค่าทางชีววิทยาของตัวอย่าง จะถูกคำนวณจากการเปรียบเทียบผลของปริมาณของตัวอย่างที่ใช้กับปริมาณของกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน โดยใช้ความสัมพันธ์ของเส้นกราฟ

* basal scurvy producing diet ประกอบด้วย

ข้าวโอ๊ตบด	720	ส่วนโดยน้ำหนัก
รำข้าว	160	"
ไข่แดงผง	90	"
เกลือผสม	20	"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก ทางชีววิทยาในเวลาต่อมา ขึ้นอยู่กับการสังเกตระดับของ serum "alkaline" phosphatase เช่น เอนไซม์ที่มี activity ที่เหมาะสมที่ pH 8.6-9.0 จะลดลงเมื่อเป็นโรคลักปิดลักเปิด และระดับของเอนไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อได้รับกรดแอสคอร์บิก การรักษาโรคได้ถูกแนะนำมากกว่าขบวนการป้องกัน เนื่องจากพฤติกรรมต่าง ๆ ของสัตว์ ขบวนการขั้นแรกคือการลดระดับของ serum "alkaline" phosphatase ในสัตว์ทดลองประมาณ 4-5 หน่วย หลังจากนั้นจะให้ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในระดับต่าง ๆ กัน เช่นเดียวกับกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ป้อนให้กับสัตว์อีกกลุ่มเพื่อเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ จะพิจารณาระดับของเอนไซม์ฟอสฟาเตส ในช่วง 3 - 15 วัน ปริมาณกรดแอสคอร์บิกได้ถูกพิจารณาจากระดับพื้นฐานคือ 0.225 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณสำหรับการตอบสนองเป็นเวลา 5 วัน และ 0.2 มิลลิกรัมสำหรับการตอบสนองเป็นเวลา 10 วัน

B. วิธีการทดสอบทางกายภาพและทางเคมี

I. Dye Methods

ในการพิจารณาปริมาณของกรดแอสคอร์บิก โดยวิธีทางเคมี หลักใหญ่จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงสีของสารที่ได้จากการสกัด ซึ่งรีเอเจนท์ที่ใช้กันก็มี (Sebrell, 1967)

2,6-dichlorophenolindophenol (2,6-dichlorobenzeno-nin-dophenol)

2,4-dinitrophenylhydrazine

diazotized 4-methoxy-2-nitroaniline

methylene blue

potassium ferricyanide

ferri α,α' dipyridyl

phosphotungstic acid

diazotized sulfanilamide

silicomolybdic acid

thionine

phosphomolybdic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P-sulfophenylhydrazine

perinephthindenetrione hydrete

bromosuccinimide

titenium salt

uranium nitrate

osmic acid

chloramine T with Variamine blue

mercuric chloride

วิธีไตเตรชัน

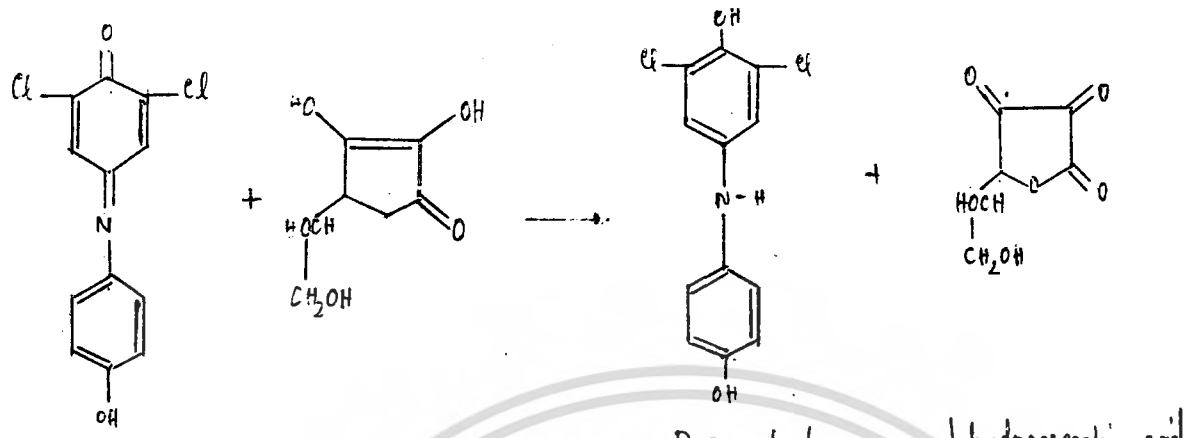
ถึงแม้ว่าจะมีวิธีหลาย ๆ วิธีในการหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก ซึ่งรีเอเจ้นท์ที่ใช้ก็ต่าง ๆ กัน แต่วิธีต่าง ๆ เหล่านี้มีการใช้ประโยชน์น้อย การประมาณค่ากรดแอสคอร์บิก ในอาหารส่วนใหญ่จะใช้ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล สำหรับการหากรดของแอสคอร์บิกในรูปรีดิวซ์ และจะใช้ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในรูปออกซิไดส์ และสำหรับการหาปริมาณของกรดแอสคอร์บิกทั้งหมด หลังการออกซิเดชัน

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยใช้ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล

การใช้ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล เป็นตัวชี้ถึงเทคนิคของการใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิก ในผักและผลไม้สด พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และสามารถยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ทางชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการทำปฏิกิริยาที่จุดยุติจะเป็นสีชมพูอ่อน คงอยู่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 วินาที ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้



ในการใช้ 2,6-dye solution ในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิกจะต้องมีการ Standerdizetion สารละลายนี้ทุกวัน Lorenz และ Arnold (1938) ได้แนะนำการ Standerdizetion 2,6-dye solution ด้วยสารประกอบเฟอรัส และได้ทำการทดลองไตเตรต 2,6-dye solution กับสารละลายของกรดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นที่ให้ pH 3.0 และมี Mohr's salt solution (1 กรัมต่อลิตร) อยู่ 5 ml พบว่าสารละลายทุกชนิดให้สารละลายสีชมพูอ่อนที่จุดยุติ แต่มีเพียงกรดแอสคอร์บิกและกรดเมตาฟอสฟอริกที่ให้ผลการทดลองที่มีคุณภาพ โดยจุดยุติที่ถูกต้องจะเป็นสีชมพูครั้งแรกที่เกิดขึ้นและคงอยู่เป็นเวลา 30 วินาที

ในตัวอย่างที่ต้องการนำมาหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นวัสดุทางชีววิทยา ซึ่งจะมีสารอื่นที่ไม่ใช่กรดแอสคอร์บิกปนเปื้อนลงมาด้วย มี 2 วิธีที่ได้มีการแนะนำให้มีการใช้ในการแก้ปัญหา วิธีแรกคือการไตเตรตตัวอย่างที่สกัดได้ก่อนหน้าและหลังจากที่วิตามินจะถูกทำลายไปโดยแอสคอร์บิกออกซิเดส อีกวิธีหนึ่งคือการแก้ไขหรือยับยั้งการทำงานของสารที่รบกวน

ก. สารที่ปนเปื้อน

i. แทนนิน, ซิสทีน, ซัลไฟด์, ไธโอซัลเฟต และสารประกอบซัลไฮดริล Van Fekelen and Emmerie (1936) แยกแทนนิน, ซิสทีน, ไธโอซัล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟต และสารประกอบซัลไฮดริล ด้วยเมอคิวริค อะซีเตต โดยการตกตะกอนเกลือเมอคิวรีที่เหลือด้วยไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งทำให้เกิดการประมาณค่า dehydroascorbic acid แทนที่จะกำจัดสีจากสิ่งปนเปื้อน

Owen และคณะ (1954) ใน Sebrell (1967) ได้ใช้ p-Chloromercuribenzoic acid ในการกำจัด sulhydryl ions และใช้ indophenol-xylene ในการประมาณค่า ascorbic acid ในถั่วเหลือง

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารสามารถรีดิวซ์ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล เป็นสาเหตุให้เกิดการผิดพลาดอย่างรุนแรงในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิก

Mapson(1942) ได้แนะว่ามีอยู่ 2 วิธีที่ใช้ในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างที่สกัดออกมาที่มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ประกอบอยู่

a. แยก SO_2 ออกจากสารที่สกัดได้ด้วย การไล่อากาศใน vacuo ในบรรยากาศของกาซ N_2

b. แยก SO_2 โดยการเติมอะซีโตนที่ความเข้มข้น 20% ไปที่ HPO_3 ก่อนหน้าที่จะมีการไตเตรต เพื่อที่จะทำให้เกิดอะซีโตน-ไบซัลไฟด์ คอมเพล็กซ์ ซึ่งไม่สามารถรีดิวซ์ 2,6-dye solution ข้อควรระวังคืออัตราเร็วในการไตเตรต ควรจะสิ้นสุดการไตเตรตในเวลาไม่น้อยกว่า 40 วินาที และไม่ควรเกิน 60 วินาที

การใช้ทั้ง 2 วิธีข้างต้นในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิก ในผักและผลไม้ที่มี SO_2 ประกอบอยู่ทำให้เกิดข้อผิดพลาดไม่เกิน 1%

การใช้วิธีทดสอบโดยอะซีโตนจะให้ผลที่เชื่อถือได้เช่นเดียวกับการทดลองปกติ ยกเว้นในกรณีที่มีซิสตีนหรือกลูตาไธออน ปรากฏอยู่ในความเข้มข้นที่พอ ๆ กับกรดแอสคอร์บิก

ii. ทองแดง, เหล็กและดีบุก สารปนเปื้อนจากอิออนของโลหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำปฏิกิริยากับ dye solution ซึ่งสามารถป้องกันได้ด้วยการใช้สารในการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งจะกล่าวถึงการสกัดในตอนต่อไป โดยการผ่านกรดออกซาลิก ไปใน column ของ ion-exchange resin หรือโดยการ treat ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือฟอร์มาลดีไฮรด์ ก่อนการไตเตรตของสารละลายที่สกัดด้วยกรดออกซาลิกหรือกรดเมตาฟอสฟอริก

L. Rao และคณะ (1959) ได้แนะนำถึงการใช้ disodium salt of ethylenediamine tetraacitic acid ในปริมาณเล็กน้อย ในการป้องกันสารละลายกรดแอสคอร์บิก จากการปนเปื้อนของทองแดง และไปรบกวนต่อปฏิกิริยาของ dye solution แต่สารละลายนี้ที่มากเกินไปจะทำให้กรดแอสคอร์บิกเกิดการออกซิไดส์มากขึ้น

iii. Pigments การปรากฏของแอนโธไซยานิน และสารให้สีอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อของสารที่จะนำมาสกัดทำให้การปรากฏของสีที่จุดยุติของการไตเตรตไม่เด่นชัด

Bessey (1938) ได้ใช้วิธีโฟโตเมตริก ในการวิเคราะห์หากรดแอสคอร์บิกจากสารที่มีสีอยู่ในปริมาณสูง

ออกซิไดส์ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล สามารถที่จะแยกจากสารละลายกรดโดยไซลีน และตัวทำละลายอื่น ๆ ซึ่ง pigments ที่ละลายน้ำไม่สามารถละลายได้ และใช้การทดสอบโดยการดูหรือวิธีโฟโตเมตริก สำหรับการหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในสารละลายที่มีสี Robinson และ Stotz (1945) ได้ทำการทดลองโดยใช้การสกัดอินโดฟีนอล-ไซลีน ในการหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดย 1 ถึง 5 ml. ของตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ที่ประกอบด้วยกรดแอสคอร์บิกอยู่ประมาณ 0.02 ถึง 0.15 mg. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 150 x 18 mm. เติมอะซีเตตบัฟเฟอร์ในปริมาณที่เท่ากัน ซึ่งทำให้ได้ pH ประมาณ 3.6 ถึง 3.8 เติม 2 ml. ของ dye แล้วเขย่า หลังจากนั้นเติมไซลีน 10 ml ปิดจุกด้วยฝาคอร์ก แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 6 ถึง 10 นาที เนื่อสกัด dye ส่วนเกินออก หลอดที่สอง "total dye"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วเขย่า หลังจากนั้นเติมไซลีน 10 ml ปิดจุกด้วยฝาคอร์ก แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 6 ถึง 10 นาที เพื่อสกัด dye ส่วนเกินออก หลอดที่สอง "total dye" เพื่อหาปริมาณ dye ทั้งหมดที่เติม เตรียมเช่นเดียวกับหลอดตัวอย่าง แต่ไม่มีตัวอย่าง และหลอดมาตรฐานเตรียมโดยการใช้ 0.100 mg. กรดแอสคอร์บิก หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับหลอดตัวอย่าง แต่ละหลอดให้นำมาปั่นเพื่อที่จะแยกชั้นของไซลีน ซึ่งอยู่ด้านบนออกมาวัดโดยใช้เครื่องโฟโตอีเล็คตริกที่ 500 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายไซลีนเป็นแบลงค์

บางทีการทดลองอาจเกิดการผิดพลาด เนื่องจากการปรากฏของสารที่เป็นตัวออกซิไดส์ Nelson และ Somers (1945) ได้กล่าวถึงสารที่เป็นตัวออกซิไดส์ในไซลีน ว่าทำให้ค่าที่อ่านได้ (% transmission) ลดน้อยลง เมื่อเวลาผ่านไป

Hughes (1964) ได้ประสบความสำเร็จในการแยกสารที่มีสีในยูรีนออกโดยการใช้ cation exchange resin ก่อนหน้าที่จะมีการไตเตรตด้วย 2,6-dye solution

และยังสามารถใช้อีเล็คโตรเมตริกไตเตรชันในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิก ในงานที่ต้องวิเคราะห์บ่อย ๆ สำหรับ น้ำผลไม้ที่มีสี

iv. Reductones and allied substances โกโก้, เบียร์, ยีสต์, สารที่สกัดได้จากมอลท์ โมลาส และน้ำผลไม้ ผักและผลไม้ตากแห้ง น้ำผึ้ง วอลนัท พบว่าสามารถรีดิวซ์ 2,6-dye ภายใต้สภาวะปกติของการทดลอง ซึ่งจะให้ค่าที่ไม่สัมพันธ์กับปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่มีอยู่จริง ตัวอย่างสารปนเปื้อนพวกนี้ส่วนใหญ่จะเชื่อว่าเป็นรีดักโตน ซึ่งรีดักโตนสามารถถูกสร้างขึ้นจากการให้ความร้อนกับสารละลายน้ำตาลด้วยด่างในสภาวะที่ไม่มีอากาศ หรืออาจจะเป็นกรดรีดักติค ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นจากการให้ความร้อน กรดกาแลคตูโลนิค เพคติน หรือไซโลสด้วยกรดแร่

การแยกความแตกต่างของกรดแอสคอร์บิก จากสารปนเปื้อน Lugg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1942) ได้ใช้ความจริงที่ว่าวิตามินจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับฟอร์มาลดีไฮรด์ ที่ pH 3.5 แต่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นช้าที่ pH 1.5 สารอื่น ๆ ที่สามารถรีดิวซ์ dye เช่น ซัลไฟด์ และซีสตีน ทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับฟอร์มาลดีไฮรด์ ทั้งที่ pH 3.5 และ 1.5 ซึ่งที่สภาวะนี้รีดักโตน, ไธโอยูเรีย และเกลือเฟอรัส ไม่พบว่าทำปฏิกิริยาที่สภาวะนี้ ได้มีการแนะนำให้มีการไตเตรตก่อนหน้าและหลังการทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮรด์ ที่ pH 3.5 และ 1.5

Robinson and Stotz (1945) ได้ทำการทดลองโดยขบวนการ formaldehyde Modification ที่จะแก้ไขการทำปฏิกิริยาของรีดักโตน ความสามารถในการรีดิวซ์กรดแอสคอร์บิก ได้ถูกกำจัดโดยการกระทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮรด์ ที่ pH 3.6-3.8 เป็นเวลา 10 นาที โดยจะพิจารณาจากหลอดทดลอง 2 หลอด โดยหลอดที่ 1 จะบรรจุสารที่ได้จากการสกัด หลอดที่ 2 บรรจุสารที่ได้จากการสกัดปริมาตรที่เท่ากับในหลอดที่ 1 และเติมอะซีเตตบัฟเฟอร์ในปริมาตรที่เท่ากัน ตามด้วย 40% ฟอร์มาลดีไฮรด์ ในปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรสารที่ต้องการทดสอบ หลอดทั้งสองจะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ที่สิ้นสุดของช่วงเวลานี้ นำหลอดที่ 1 มาเติมอะซีเตตบัฟเฟอร์ในปริมาตรที่เท่ากัน และทำให้มีปริมาตรเท่ากับในหลอดที่ 2 ด้วยการเติมน้ำ หลังจากนั้นเติม 2 ml ของ dye ผสมให้เข้ากัน และแยก dye ที่เกินออกโดยการสกัดด้วย 10 ml. xylene ความแตกต่างระหว่างปริมาณของ dye reduced ในทั้งสองหลอดทดสอบจะสัมพันธ์กับปริมาตรกรดแอสคอร์บิกที่มีอยู่จริง

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดยใช้ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน

วิธีนี้ใช้กันทั่วไปอย่างกว้างขวางสำหรับการประมาณค่า dehydroascorbic acid ในอาหาร ในปี 1943 Ros และ Kuether ได้ใช้สารละลายนี้สำหรับการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิกทั้งหมด ในเลือดและในปัสสาวะ โดยในตอนแรกจะทำการออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิกที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ ให้กลายเป็น dehydroascorbic acid และ dehydroascorbic acid ที่มีอยู่ในตอนเริ่มต้น จะถูกนำมาหาปริมาณโดยใช้ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน ได้เป็นโอซาโซน เป็นสารละลายที่มีสีแดงเข้ม สามารถนำมาวัดโดยใช้สเปคโตรโฟโตเมตริก หรือโฟโตเมตริกคัลเลอร์ริมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้ความยาวคลื่นแสงในช่วง 510-540 นาโนเมตร

Mapson (1961) ได้ชี้ให้เห็นถึงความยากของการที่จะใช้วิธีนี้ต่อเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากมีปริมาณของ dehydroascorbic acid ที่ปรากฏเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกทั้งหมด และได้แนะนำถึงการหาความเข้มข้นของโอซาโซน ที่เกิดขึ้นโดยโครมาโตกราฟี บน acid alumina เพื่อที่จะแยกโอซาโซนที่ต้องการจากไฮดราโซนของกรดคีโต ซึ่งจะเป็นสิ่งรบกวนในการประมาณค่า

Guild (1948) ใน Sebrell (1967) ได้แนะนำว่าวิธีการ Roe and Kuether เหมาะที่จะใช้ในการพิจารณากรดแอสคอร์บิก ในสารละลายของผักและผลไม้ที่สกัดด้วยกรดออกซาลิก

อาหารที่มีการเก็บรักษาหรืออาหารที่ผ่านขบวนการจะมีปริมาณของ dehydroascorbic acid เพิ่มขึ้นและสารอื่น ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นจากการออกซิไดส์ของกรดแอสคอร์บิก วิธีที่ปรับปรุงสำหรับการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิกในรูปออกซิไดส์และรูปรีดิวซ์ แยกจากกันและแยกจากในรูปทางชีววิทยาที่ inactive คือ 2,3-diketogulonic acid ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน ในขั้นแรกคือการใช้ stannous chloride ในการที่จะทำให้กรดแอสคอร์บิกคงอยู่ ในขั้นที่สองคือการรีดิวซ์ dehydroascorbic acid ด้วย ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และขั้นสุดท้ายคือการปฏิบัติด้วยโบรมีน เพื่อที่จะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปออกซิไดส์ทั้งหมด ประมาณค่าด้วย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน เมื่อสิ้นสุดการทดลองในแต่ละขั้นเพื่อที่จะได้ข้อมูลมาใช้ในการคำนวณ อย่างไรก็ตาม กรดแอสคอร์บิกในพืชที่อยู่ในรูปของ dehydroascorbic acid และ diketogulonic acid อาจจะสูญเสียได้ในระหว่างการรีดักชันด้วยไฮโดรเจนซัลไฟด์

โบรมีนถูกใช้เป็นตัวออกซิไดส์ ใน 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน สำหรับการพิจารณากรดแอสคอร์บิก มีข้อดีตรงที่ว่าง่ายต่อการแยกออกโดยกระแสอากาศ และ Norite ใช้เป็น clarifying agent สำหรับการสกัด pigment ไธโอยูเรียได้มีการแนะนำให้ใช้กันมากกว่า stannous chloride ในการที่จะทำให้กรดแอสคอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิก็เป็นเรื่องที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์โดย 2,4-ไดไนโตรฟีนิล ไฮดราซีน ซึ่งได้แนะนำให้ใช้ที่อุณหภูมิ 37 ซ เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงในการที่จะผลิตสารอื่นนอกเหนือจากกรดแอสคอร์บิก สารรบกวนที่อาจจะก่อให้เกิดการผิดพลาดในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิกในอาหาร โดยวิธีนี้คือกลูโคส, รีดักโตน, กรดรีดักติค, ฟรุคโตส, กรดกลูคูโรนิค และ ไกลโคเจน

Roe (1961) ใน Sebrell (1967) ได้แนะนำให้ใช้ paper chromatography เพื่อการแยกและการชะกรดแอสคอร์บิกที่แยกได้ สำหรับอาหารที่ปรากฏว่ามีรีดักโต และ กรดรีดักติก อยู่สิ่งรบกวนจากสารอื่น ๆ สามารถจะกำจัดออกจากตัวอย่างได้ โดยในตัวอย่างที่ประกอบด้วยกลูโคส หรือไกลโคเจน ในปริมาณที่น้อยกว่า 5% หรือมีฟรุคโตส อยู่น้อยกว่า 3% ถ้าอุณหภูมิคงอยู่ที่ 37 C และเจือจางสารที่สกัดได้ด้วยอัตราส่วน 1:10 สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่านี้ การเจือจางในอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นเป็นสิ่งจำเป็น และมันเป็นข้อจำกัดของวิธีนี้ต่อแยมหรืออาหารอื่น ๆ ที่มีน้ำตาลอยู่สูง

วิธีโฟโตเมตริก

ถึงแม้ว่าวิธีไตเตรชัน จะมีประโยชน์มากและให้ผลการทดลองที่น่าพอใจ แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดอยู่มาก และมีสารรบกวนที่เกี่ยวข้องในการใช้ทั่วไป วิธีการไตเตรชันด้วยการสังเกตจุดยุติด้วยการดู ทำให้ค่าที่ได้ไม่ถูกต้องแน่นอนสำหรับกรดแอสคอร์บิกในปริมาณเล็กน้อย และไม่อาจจะวิเคราะห์ได้ในสารที่สกัดได้ที่มีสีปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง เช่นสารที่สกัดได้จากบีทและเบอร์รี่ สารละลายที่ขุ่นจะทำให้จุดยุติที่ได้สูงขึ้น สารที่ปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อที่นอกเหนือจากกรดแอสคอร์บิก อาจจะรีดิวซ์ dye ได้อย่างช้า ๆ ทำให้จุดยุติสูงขึ้นและไม่ชัดเจน และอุปสรรคที่สำคัญคือความยากในการที่จะหาสภาวะในการสกัด และรีเอเจนท์ที่เหมาะสมที่จะทำให้เสถียรที่สุด และการที่ต้อง Stenderdizetion dye solution บ่อย ๆ นั้นเป็นการที่ไม่สะดวก

96832
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการที่จะหาสภาวะในการสกัด และรีเอเจนท์ที่เหมาะสมที่จะทำให้เสถียรที่สุด และการที่ต้อง Standardizetion dye solution บ่อย ๆ นั้นเป็นการที่ไม่สะดวก

วิธีโฟโตเมตริก ได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อแก้ไขข้อผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นจากการที่ต้องใช้ตาดูจุดยุติของการไตเตรต

Beesey (1938) ทำการทดลองกับเนื้อเยื่อพืช พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ถึงแม้จะมีแอนโธไซยานินปรากฏอยู่หรือในสารละลายที่ขุ่น โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3.5-3.7 โดยการเติม 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่มากเกินพอ วัดสีที่เหลืออย่างรวดเร็วในโฟโตคัลเลอร์ริมิเตอร์ เพื่อหลีกเลี่ยงสารรบกวนที่สามารถรีดิวซ์ dye และได้สรุปว่าวิธีโฟโตเมตริก อินโดฟีนอล สามารถใช้ในการหากรดแอสคอร์บิก และ dehydroascorbic acid ที่มีอยู่ในปริมาณเล็กน้อย (6-20 ไมโครกรัม) และวิธีนี้ยังมีความเหมาะสมสามารถใช้ได้อย่างกว้างขวางกับผักผลไม้ทั่วไปและสารละลายที่เป็นของเหลวต่าง ๆ

II. วิธีโครมาโตกราฟริก

การวิเคราะห์โดยวิธีนี้จะแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. Column chromatography ซึ่งแบ่งได้เป็น

- Liquid chromatography (LC) Ashoor และคณะ (1984) ได้พัฒนาวิธี LC ที่ใช้ในการหาปริมาณของกรดแอสคอร์บิก เพื่อให้มีความไวและความจำเพาะในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ทำโดยการสกัด ascorbic acid ด้วยสารละลายของ K_2SO_4 ที่มี EDTA อยู่ด้วย และใช้คอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วย Aminex HPX-87 ในวิธีนี้ EDTA จะไปช่วยเพิ่มพื้นที่ใต้ peak ของ ascorbic acid ได้ถึง 3 เท่า และเพิ่มความคงตัวของ ascorbic acid ด้วย เนื่องจาก EDTA มีคุณสมบัติเป็น chelating agent จะทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะป้องกันการเกิดออกวิเดชัน ของกรดแอสคอร์บิกได้ นอกจากนี้ยังถูก elute ออกมาที่ retention time สั้นกว่าของกรดแอสคอร์บิกด้วย พบว่าจะให้ผลเป็นเส้นตรงในช่วง 50-500 นาโนกรัมของกรดแอสคอร์บิก เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ปริมาณเป็นนาโนกรัมได้ แสดงว่ามีความไวสูง วิธีนี้มี recovery เท่ากับร้อยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97.5 ± 3.7 กับร้อยละ 103.6 ± 2.8 โดยสรุปคือวิธี LC เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แม่นยำ เฉพาะเจาะจงต่อกรดแอสคอร์บิก d และไม่มีการรบกวนจากสารรบกวนอื่น ๆ เช่น pigment ในสารละลายตัวอย่างที่มีสี

- High performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณวิตามิน C มีทั้งหมด 8 วิธี โดยจะแตกต่างกันไปในการสกัด stationary phase หรือ mobile phase หรือการตรวจวัด

วิธี HPLC ที่ใช้ UV-detector มี 3 วิธีด้วยกัน วิธีแรกเป็นวิธีที่ใช้การสกัดด้วย HPO_3 จึงใช้หาปริมาณได้แต่เฉพาะกรดแอสคอร์บิก ใช้ Partisil 10 SAx เป็น Stationary phase และ 0.1 M sodium acetate buffer solution (pH 4.25) เป็น mobile phase นั้น ตรวจวัดที่ 250 นาโนเมตร วิธีนี้มีความจำเพาะดี เร็ว เชื่อถือได้ ในช่วงความเข้มข้น 0.04-1% ของกรดแอสคอร์บิก ส่วนวิธีที่สองให้หาปริมาณได้ทั้งกรดแอสคอร์บิก และ dehydroascorbic acid นั้น เป็นการนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับไอโอดีน, ไธโอยูเรีย และ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน เมื่อได้ผลิกสีแดงจึงนำมาละลายและวิเคราะห์โดยใช้ Lichrosorb RP-18 (10 ไมโครเมตร) เป็น stationary phase และ 50% อะซีโตไนไตร์ล ใน 0.01 M โซเดียม อะซีเตต บัฟเฟอร์ (pH 4.1) เป็น mobile phase ตรวจวัดที่ 497 นาโนเมตร วิธีนี้มีค่า recovery เท่ากับร้อยละ 100 ± 2 และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 2 มิลลิกรัม/ลิตร วิธีนี้นำไปดัดแปลงใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารอื่นนอกจากยีสต์ได้ ส่วนวิธีที่สามใช้แยกกรดแอสคอร์บิก และ dehydroascorbic acid ออกจากกันได้ดี อาศัยการสกัดด้วยสารละลายของกรดซิตริค ซึ่งจะมีข้อดีในสารละลายนี้กรดแอสคอร์บิกจะคงตัว จึงใช้แทน HPO_3 ได้ดี HPO_3-มีข้อเสียคือมี retention time เท่ากับ dehydroascorbic acid หลังจากนี้จึงกำจัดสารรบกวนโดยใช้คอลัมน์สั้น ๆ ของ Bondepak C_{18} สำหรับคอลัมน์ที่ใช้คือ Bondepak/carbohydrate โดยมีสารละลายของ 70% อะซีโตไนไตรต์ ในน้ำที่มี 0.01 M $NH_2H_2PO_4$ (pH 4.3) อยู่ ตรวจวัดกรดแอสคอร์บิกที่ 254 หรือ 214 นาโนเมตร และ dehydroascorbic acid ที่ 214 นาโนเมตร recovery ของกรดแอสคอร์บิก และ dehydroascorbic acid เท่ากับร้อยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

93.8 ± 2 และร้อยละ 92.4 ± 1.3 ตามลำดับ โดยมีขีดจำกัดของการวิเคราะห์ของกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 0.05 กรัม ที่ 254 นาโนเมตร และ 0.2 กรัมที่ 214 นาโนเมตร และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ ของ dehydroascorbic acid เท่ากับ 0.1 กรัม ที่ 214 นาโนเมตร Wimalasiri และ Wills (1983)

สำหรับวิธี HPLC ที่ใช้ fluorometry ในการตรวจวัดนี้มีอยู่ 2 วิธี วิธีแรกอาศัยการสกัดด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก และเปลี่ยนกรดแอสคอร์บิก ไปเป็น dehydroascorbic acid โดยใช้เอนไซม์แอสคอร์เบสออกซิเดส เมื่อเปลี่ยนไปเป็น fluorophor ด้วย o-phenylene diamine แล้วจึงใช้ RP-18 certridge เป็น precolumn แยกสสาร fluoresence ออกจากกัน โดยมี stationary phase คือ ODS-hypersil และ 0.08 M KH_2PO_4 ซึ่งมี methanol อยู่ 20% (pH 7.8) และตรวจวัดที่ที่ 418 นาโนเมตร วิธีนี้เร็ว มีความไวดี หาปริมาณรวมของวิตามิน C ปริมาณรวมของ isovitamin C และปริมาณรวมของ dehydroascorbic acid ได้ วิธีนี้เหมาะกับการวิเคราะห์จำนวนมาก มี revovery และความแม่นยำสูง และขีดจำกัดของการหาปริมาณ isovitamin C และวิตามินเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม/กรัม สำหรับวิธีที่สองนี้นำไปผ่าน HPLC 2 ครั้ง คือ reverse phase ion pair และคอลัมน์ Bondapak CN โดยมีสารละลายของ aq. 60% methanol ในขนาดความเข้มข้น 0.25 M ใน hexadecyl trimethyl ammonium bromide และสารละลายของ 2% กรดอะซีติก : เมธานอล (19:1) ในน้ำเป็น mobile phase ตามลำดับ วิธีนี้ตรวจวัด fluorophor ที่ 348 นาดนเมตร และกรดแอสคอร์บิกที่ 290 นาโนเมตร หาปริมาณได้ทั้งกรดแอสคอร์บิก และ dehydroascorbic acid Speek และคณะ (1984)

นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์โดยใช้ HPLC อื่น ๆ อีก 3 วิธี โดยอาศัยการตรวจวัดด้วย Amperometric detector,electrochemical detector และ conductometer ซึ่งใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีน้ำตาลและแลคโตน ในตัวอย่างที่มีกรดยูริก และ catecholamine อยู่ด้วย และในอาหารกระป๋องที่มีกรดแอสคอร์บิก ในปริมาณต่ำได้ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Peper chromatography เป็นวิธี micro method โดย Rymal (1985) ได้พัฒนาวิธีนี้ขึ้นมาเพื่อใช้แทนวิธีไตเตรตซึ่งตัดสินจุดยุติได้ยาก ในกรณีตัวอย่างที่มีสี โดยใช้สารไตเตรตในวิธีไตเตรตคือ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ในการจุ่ม chromatographic paper เมื่อ sport ตัวอย่างแล้ว หาปริมาณวิตามินซี โดยการเปรียบเทียบขนาดบรรจุสีขาว และความกว้างของวงแหวนสีชมพูของ spot กับสารละลายมาตรฐาน วิธีนี้มีความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.3 ส่วนวิธี AOAC มีความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.9 ข้อดีของวิธีนี้คือลดเวลาการวิเคราะห์ลง ความละเอียดสูง สีของตัวอย่างจะไม่รบกวนการวิเคราะห์และไม่ต้องอาศัยความชำนาญมาก

III. วิธีสเปคโตรโฟโตเมตริก

มีหลักการที่สำคัญคือการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง

Johnson (1936) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโดยการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง ก่อนหน้าและหลังการทำลายกรดแอสคอร์บิก โดยการออกซิเดชันในสภาวะที่มีทองแดง

วิธีสเปคโตรโฟโตเมตริก มีข้อจำกัดตรงที่ว่าความเข้มของการดูดกลืนแสงไม่ค่อยตรงกับความเข้มข้นที่มีอยู่ และในช่วงคลื่นที่ทำการวัดการดูดกลืนแสงนั้นมีปัญหาคือการรบกวนจากสารต่าง ๆ Deglish (1951) ได้ใช้การเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วง ที่มีผลมาจาก pH จะไม่มีผลต่อสารที่รบกวน ซึ่งต่อมาก็ได้มีการแนะนำหลักการนี้ในการประมาณค่า

บางวิธีใช้วิธีการหาปริมาณ โดยการดูดกลืนคลื่นแสง ก่อนหน้าและหลังการทำลายกรดแอสคอร์บิกโดย irradiation หรือแอสคอร์บิกออกซิเดส

IV. วิธีอิเลคโตรดัลเลอร์ริเมตริก

เพื่อที่จะแก้ไขในเรื่องการพิจารณาจุดยุติของวิธีไตเตรตใน 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่อาจเกิดการขุ่นมัวหรือสารละลายตัวอย่างมีสีอยู่เองโดยธรรมชาติ ทำให้การพิจารณาจุดยุติเป็นไปอย่างยากลำบาก และไม่แน่นอน

ข้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kirk และ Pressler (1939) ได้ใช้อิเลกโตรเมติก ไตตริมิเตอร์ ด้วย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล เพื่อพิจารณาจุดบน titretion curve โดยมี plstinum-tungten electode stirrer แล้วอ่านค่าบนไตตริมิเตอร์ ทุก 4 วินาทีหลังจากที่เติม dye solution ลงไป นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟและพบค่าความเปลี่ยนแปลงของกราฟที่เปลี่ยนแปลงไปมากที่จุด ๆ หนึ่ง พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ได้ดีกับสารละลายที่มีสีเข้ม ๆ

Harris และคณะ (1942) ได้วิจารณ์วิธีของ Kirk and Tresler ไว้ว่าการใช้อีเลกโทรด จุ่มอยู่ตลอดเวลาเพื่อดูความเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้า ในการไตเตรตนั้นเป็นไปไม่ได้ที่จะให้จุดยุติที่ถูกต้อง และได้ทำการทดลองโดยใช้แพลทตินัม และเมอร์คิวรี่ อิเล็กโทรดว่าจะให้จุดยุติที่แน่นอนและชัดเจนกว่า

วิธีคูลอมเมตริก ซึ่งพิจารณาปริมาณของกรดแอสคอร์บิก ที่ออกซิไดส์ไปที่แพลทตินัม อาโนด Santhanam and Krishnan (1961) ทำการวิเคราะห์ค่าของกรดแอสคอร์บิก โดยการควบคุม Potential Caulometry โดยควบคุม anode potential ที่ 1.090 โวลท์ ระหว่าง S.C.E. ที่ pH 6.03 ปริมาณของกรดแอสคอร์บิก ที่นำมาหาควรอยู่ในช่วง 15-100 มิลลิกรัม โดยศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการลดลงของ pH วัดกระแสไฟฟ้าและเป็นเวลา 1 ชั่วโมงสำหรับกรดแอสคอร์บิก 112 มิลลิกรัม โดยกระแสไฟฟ้าจะมีค่า 0 เมื่อกรดแอสคอร์บิกถูกออกซิไดส์ไปหมด และได้แสดงว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น 100% เป็นผลมาจากขบวนการคูลอมป์เมตริก ออกซิเดชัน

วิธีโพลาโรกราฟริก

Gilliam (1945) ได้อธิบายถึงวิธีการนี้ซึ่งใช้กับการตรวจสอบในผักและผลไม้จำนวนมาก แต่พบว่าล้มเหลวในการทดลองกับสารที่ประกอบด้วยสารรบกวนในปริมาณสูง เช่นในผลิตภัณฑ์ที่นำมาทำแห้ง McKenzie (1948) ใน Sebrell (1967) ทำการแก้ไขสารที่รบกวนโดยการเปลี่ยนความหนืดซึ่งเกิดโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารที่มีอยู่ในสารละลายนั้นจริง ๆ

ในภายหลังได้มีการพัฒนาวิธีการนี้ให้มีความจำเพาะยิ่งขึ้น การศึกษาในสารที่รบกวน เช่น ตับบุก เพคติน และโปรตีน ซึ่งจะเป็นข้อจำกัดของวิธีการนี้ในการทดสอบในอาหาร

กรดแอสคอร์บิก ที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ที่มีอยู่ในอาหารตามธรรมชาติไม่สามารถหาค่าได้โดยวิธีนี้

ถึงอย่างไรก็ตามวิธีโพลาโรกราฟริกนี้ จะมีการใช้ประโยชน์กันอย่างทั่วไปในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิกในอาหาร

v. วิธีคัลเลอร์ริเมตริก

สำหรับการประมาณค่า escorbic acid ในอาหาร

โดย Boehringer (1986) ได้แนะนำวิธีการทดลองในการประมาณค่ากรดแอสคอร์บิก โดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก ไว้มีหลักการดังนี้คือ L-Ascorbic acid (L-escorbate) และสารอื่นซึ่งมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ ($X-H_2$) จะสามารถรีดิวซ์ tetrazolium salt MTT [3,-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrozolium bromide] ในสภาวะที่มีตัวนำอิเลคตรอน PMS (5-methyl-phenazinium methyl sulfate) ที่ pH 3.5 ไปเป็น formazan นำสารที่ได้จากการรีดิวซ์ทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

$$\text{L-Ascorbate } (X-H_2) + \text{MTT} \xrightarrow{\text{PMS}} \text{dehydroascorbate } (X) + \text{MTT-formazan}^- + H^+$$

สำหรับการพิจารณาเฉพาะ L-escorbate โดยใน semple blank จะมี L-escorbate เพียงตัวเดียวเท่านั้นในสารที่สามารถรีดิวซ์ จะถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกออกโดยการออกซิเดชันโดย ascorbate oxidase (AAO) ในสภาวะที่มีออกซิ-เจน dehydroascorbate จะไม่ทำปฏิกิริยากับ MTT/PMS

$$\text{L-Ascorbate} + 1/2\ O_2 \xrightarrow{\text{AAO}} \text{dehydroascorbate} + H_2O$$

ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ลบด้วยค่าความแตกต่างของการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างแบลงค์ จะสมมูลกับปริมาณของ L-ascorbate ในตัวอย่าง โดย MTT-formazen จะเป็นตัวที่ถูกวัดค่าโดยการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่น 578 nm.

สาเหตุที่จะทำให้เกิดการผิดพลาดในการประมาณค่าโดยวิธีนี้ คือ พบว่าน้ำตาลซึ่งส่วนใหญ่จะพบในอาหารและจะไม่รบกวนปฏิกิริยา จนกระทั่งมีปริมาตรมากกว่า 30 mg. ต่อ 1 cuvette

ในน้ำตาลอัลกอฮอล์ มีเพียงซอร์บิทอลเท่านั้นที่รบกวนปฏิกิริยา ในปริมาณที่มากกว่า 20 mg/cuvette โดยจะไปยับยั้งการทำงานของแอสคอร์บิก ออกซิ-เดส

อัลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ จะยับยั้งการทำงานของ ascorbic oxidase เช่น มากกว่า 100 mg/cuvette

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในปริมาณสูง ๆ (> 50 mg SO_2/cuvette) จะทำปฏิกิริยากับ MTT และ PMS จะทำให้การประมาณค่าของ L-ascorbate ต่ำกว่าความเป็นจริง

ไอออนของโลหะต่าง ๆ ในปริมาณที่ > 100 ug/cuvette จะยับยั้งการทำงานของ ascorbate oxidase

ไนไตร์ทจะทำให้เกิดการสลายตัวของ L-ascorbic acid

ออกซาเลทจะยับยั้งการทำงานของแอสคอร์เบสออกซิเดส ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/cuvette

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

ความสำคัญประการหนึ่งในการประมาณค่า ascorbic acid โดยวิธีทางเคมี คือการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ โดยการสกัด การสกัดที่สมบูรณ์เป็นสิ่งที่จำเป็น และต้องคอยระวังการเกิดออกซิเดชัน ภายใต้การทดลองสารที่ได้จากการสกัดจะเป็นตัวแทนของอาหารชนิดนั้น ซึ่งในปริมาณเพียงเล็กน้อยของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ความผันแปรในช่วงกว้างของความเข้มข้นของ ascornbic acid ภายในแต่ละส่วนประกอบของพืช หรือความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิดหรือผลไม้แต่ละชนิด ดังนั้นการใช้เครื่องที่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น Waring Blender ซึ่งมีความสะดวกมากกว่าการบดด้วยมือ ในกรณีที่ต้องการสกัดหลาย ๆ ครั้ง ซึ่ง Loeffler และ Ponting (1942) ได้เขียนไว้ว่าการบดโดยใช้ Waring blender ไม่ได้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียกรดแอสคอร์บิก Davis (1942) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการบดด้วยเครื่อง กับการบดด้วยมือ พบว่าการบดด้วยเครื่องให้ผลที่น่าพอใจ และต้องการเวลาน้อยกว่าในการสกัด

การผ่านอากาศเข้าไปในสารละลายที่ได้จากการสกัด จะเร่งอัตราการเกิดออกซิเดชั่น Vavich (1945) จึงได้แนะนำให้ทำการสกัดในสภาวะของกาซเฉื่อย

ในสภาวะที่มีไอออนของโลหะ เช่นทองแดงที่ละลายมาจากส่วนของเครื่องบด จะต้องหลีกเลี่ยงเพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชั่น Roe และคณะ (1948) ได้บันทึกไว้ว่า การใช้เครื่องมือในการบดหรือปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะทำให้มีปริมาณของออกซิเจนเข้าไปในสารละลายมากขึ้น Lamden (1950) ได้ศึกษาถึงผลการทดลองของการใช้เครื่องบด ที่ได้มีผู้ทำการทดลองมาแล้วซึ่งให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน จึงทำการทดลองในสารละลายแต่ละชนิดที่ทำการบดในภาชนะที่แตกต่างกัน ซึ่งได้ผลการทดลองที่มีความผันแปรของการสูญเสียกรดแอสคอร์บิก อยู่ในช่วงกว้าง และพบว่าผลของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจากการปั่น ที่มีค่าเฉลี่ยประมาณ 8.7 องศาเซลเซียส ไม่มีผลในการทดลอง Musulin และ King (1936) ให้ใช้น้ำกลั่นและสารที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์อื่น ๆ ปราศจากทองแดง และกรดแอสคอร์บิก สามารถทำให้บริสุทธิ์จากไอออนของโลหะชนิดนี้โดยการทำการสกัดก่อนด้วย diphenylthiocarbazone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในคาร์บอนเตตระคลอไรด์

ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดแอสคอร์บิก ในระหว่างขั้นตอนการสกัดกรดจะถูกใช้ในความเข้มข้นที่สูงเพียงพอที่จะหยุดยั้งการทำงานของออกซิเดทีฟเอน-ไซม์ซึ่งโดยปกติจะใช้กรดเมตาฟอสฟอริก โดยตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะนำมาบดภายใต้สภาวะที่มีกรดที่เหมาะสม ซึ่งสารละลายที่ใช้ในการสกัดก็มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีผู้ทำการทดลองหลายท่านได้ศึกษาถึงการสกัดด้วยสารละลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งผู้ทำการทดลองแต่ละท่านก็ได้ให้ผลสรุปที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่อาจจะเลือกตัวทำละลายที่ได้มีผู้ทำการศึกษาไว้ ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการที่จะทำให้กรดแอสคอร์บิก ทั้งหมดลงอยู่มาอยู่ในสารละลายที่สกัดออกมาได้

Harris และ Ray (1933) ได้แนะนำให้ใช้กรดไตรคลอโรอะซีติกในการสกัด ซึ่งเป็นกรดชนิดแรกที่ได้มีการแนะนำให้ใช้ ต่อมาภายหลังได้มีการแนะนำให้ใช้กรดเมตาฟอสฟอริก (HPO_3) ซึ่งจะได้สารละลายที่ใสกว่า และทำให้กรดแอสคอร์บิกมีความเสถียรมากกว่า โดยเฉพาะในสภาวะที่มีไอออนของทองแดง Bessey (1938) ทำการศึกษาโดยการสกัดด้วยสารต่าง ๆ กันและสรุปว่าไม่มีสิ่งใดที่มาชี้ให้เห็นว่าการสกัดด้วย HPO_3 นั้นไม่สมบูรณ์

โดยทั่วไปในการสกัดกรดแอสคอร์บิก จะใช้กรดเมตาฟอสฟอริก ซึ่งทำให้กรดแอสคอร์บิก มีความเสถียรมาก AOAC Methods (1980) ให้ใช้กรดเมตาฟอสฟอริก, กรดอะซีติก ในการสกัดหรือใช้ กรดเมตาฟอสฟอริก-กรดอะซีติก-กรดซัลฟูริก

กรดอินทรีย์อื่น ๆ ที่ได้มีการแนะนำให้ใช้ในการสกัดกรดแอสคอร์บิก คือ อะซีติก, ออกซาลิก, ซัลโฟซาลิไซลิก, ไฮโดรคลอริก ฯลฯ

กรดออกซาลิก ได้ถูกพิจารณานำมาเป็นสารที่ใช้ในการสลัดแทน HPO_3 ซึ่งมีราคาแพง Wokes (1947) ได้บันทึกไว้ว่าสารละลายของกรดออกซาลิก มีประ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซซน์มากกว่า HPO_3 หรือกรดไตรคลอโรอะซีติก เพราะว่ามีราคาถูกกว่าและมีความเสถียรมากกว่า และยังสามารถหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของโปรตีน ทั้งยังสามารถยับยั้งเอนไซม์แอสคอร์เบสออกซิเดส แต่ว่ามันไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีการละลายของเหล็กและดีบุก Huelin (1950) ความสำคัญของการเก็บรักษากรดออกซาลิกในที่มืด เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสามารถทำลายกรดแอสคอร์บิก ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าที่ pH 1.7 กรดแอสคอร์บิกจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ภายใต้สภาวะที่มีการแผ่รังสีอุลตราไวโอเลต, อากาศที่มีมากเกินพอ, ออกซาเลทไอออนหรือเกลือของเหล็ก แต่ว่าในสภาวะที่ไม่มีการปรากฏขององค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่ง ออกซิเดชั่นจะถูกยับยั้ง แต่ถ้าในสภาวะที่มีไอออนของเหล็กปรากฏอยู่ในตัวอย่างที่ทำการทดสอบ กรดออกซาลิก หรือ HPO_3 ที่ใช้จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของโลหะหนัก 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ดังนั้นจึงต้องใช้สารสกัดที่เป็นส่วนผสมของ 10% กรดอะซีติก กับ 0.1% กรดออกซาลิก ทำให้ pH เท่ากับ 0.4 ก่อนหน้าการไตเตรตกับ dye เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการทำปฏิกิริยาของโลหะนี้ และสำหรับเหตุผลเดียวกันโซเดียมอะซีเตตไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์จะใช้ในการสกัดกรดแอสคอร์บิก ของพวกอาหารกระป๋อง

ได้มีการแนะนำให้ใช้กรดแร่ในการสกัดตัวอย่างที่มีการรบกวนจากไอออนของเหล็กแต่ว่าผลการทดลองที่ให้ค่าที่ถูกต้องสูง ๆ จะเป็นการสกัดโดยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดอะซีติก ซึ่งเทียบได้กับสารสกัดด้วยกรดเมตาฟอสฟอริก Reedman และ McHenry (1938)

ในสภาวะที่มีสารรบกวนในตัวอย่างที่สกัดได้ จะต้องนำมาทำการปฏิบัติด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะกำจัดข้อผิดพลาดต่าง ๆ เหล่านี้ให้หมดไป ก่อนหน้าที่จะนำไปทำการไตเตรต

อัตราส่วนของสารที่ใช้ในการสกัดต่อตัวอย่างที่ใช้ก็มีความสำคัญ Leoffler และ Ponting (1942) แนะนำให้ใช้ในอัตราส่วนตัวสกัดต่อตัวอย่างในปริมาณ 7:1 Godblith และ Harris (1948) ได้แนะนำให้ใช้ในอัตราส่วน 4:1 และต้องพิจารณาลักษณะของตัวอย่างด้วย เช่น อาหารแห้งจะต้องการอัตราส่วนของตัวสกัดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงกว่าตัวอย่างที่มีลักษณะนิ่ม

หลังจากการบดหรือการปั่นตัวอย่างด้วยตัวสกัด สารละลายที่ได้จะถูกนำมากรองโดยใช้ filter หรือ centrifuge โดยจะนิยมใช้ Centrifuge มากกว่า เพราะให้ความสะดวกรวดเร็วในการแยกเอาคอลลอยด์ออก ซึ่งขั้นตอนนี้ก็เป็นสิ่งจำเป็น เพื่อที่จะทำให้สารละลายที่ได้มีความใส Freebairn (1959) ได้แนะนำให้ทำการ centrifuge ที่อุณหภูมิต่ำ Bessey (1938) ทำให้การสกัดสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยการล้างส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยสารละลายที่ใช้ในการสกัด

สำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว ไม่จำเป็นจะต้องมีขั้นตอนการสกัดโดยการปั่นนี้ สามารถนำไปทำการทดลองขั้นต่อไปได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

I การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก (Boehringer, 1986)

1. วัตถุดิบ

1.1 มะนาว

2. สารเคมี เป็นชุดสำเร็จสำหรับการหาวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

2.1 สารละลายที่ 1 ประกอบด้วย disodium hydrogen phosphate citric acid เป็นบัฟเฟอร์ pH 3.5; MTT; stabilizers เป็นสารละลายสำเร็จรูปในขวดที่ 1 นี้จะมีปริมาตรประมาณ 43 ml.

2.2 ascorbate oxidase Spatule

2.3 PMS solution (5 - methylphenazinium methyl sulfate) สารละลายที่ 3 นี้ จะมีปริมาตรอยู่ 4 ml.

สารละลายที่ใช้ในการสกัด

2.4 กรดเมตาฟอสฟอริก 3% (Bessey, 1938)

2.5 กรดซิตริก 3% (Wimalasiri และ Wills, 1983)

สารละลายมาตรฐาน

2.6 สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 2 mg/ml

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Hg)

3.2 เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

3.3 เตาไฟฟ้าสำหรับต้มน้ำ

3.4 ไมโครปิเปต 1.00 ml, 0.10 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างที่จะนำมาทำการวิเคราะห์

นำมะนาวมาล้างน้ำสะอาด ผ่าออกแล้วนำมาคั้นน้ำโดยใช้มือ

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1 ชั่งกรดแอสคอร์บิกมาตฐาน 20 มิลลิกรัม

2.2 นำมาละลายในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตรโดยในขวดที่ 1 ใช้ HPO_3 เป็นตัวทำละลายในขวดที่ 2 ใช้กรดซิตริกเป็นตัวทำละลาย ทำปริมาตรให้ได้ถึงขีดที่คอขวดแล้วปิดขวดไว้ด้วยพาราฟิล์ม

3. วิธีการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง

ในตอนแรกทำการทดสอบถึงประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ โดยใช้สารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ได้เตรียมไว้

3.1 นำเซลสำหรับใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงมา 2 หลอด ให้หลอดหนึ่งเป็นตัวอย่างและอีกหลอดหนึ่งเป็นแบลงค์ โดยใช้เซลขนาด 1 cm.

3.2 นำสารละลายที่ 1 มาอุ่นที่ 37 ซ ใส่ในเซลทั้งสองเซลละ 1.00 ml โดยใช้ไมโครปิเปต

3.3 ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำกลั่นใส่ในแต่ละเซล เซลละ 1.50 ml

3.4 ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ทำละลายด้วย HPO_3 3% ใส่ในทั้งสองเซล เซลละ 0.10 ml

3.5 ใส่แท่งเอนไซม์แอสคอเบส ออกซิเดส ในเซลของสารละลายแบลงค์ ผสมให้เข้ากัน ปิดด้วยพาราฟิล์มนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 ซ เป็นเวลา 6 นาที ขณะที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ซ นั้น สำหรับเซลของแบลงค์ ให้คนสารละลายทุก 2 นาทีด้วยแท่งเอนไซม์ ประมาณ 5 ครั้ง เมื่อครบ 6 นาที ให้แยกแท่งเอนไซม์แอสคอเบสออกซิเดส ออกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและของแบลงค์ที่ 578 นาโนเมตร ให้ค่าที่อ่านได้เป็น A_1 แล้วนำมาทำการทดลองต่อโดย

3.6 เติมสารละลายที่ 3 0.10 ml ในแต่ละเซลโดยใช้ไม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครปิเปตผสมให้เข้ากันและตั้งสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่ 37 ซ ซึ่งหลังจากใส่สารละลายที่ 3 ลงไปแล้วจะไวต่อแสง จึงต้องทำการตั้งไว้ในที่มืด

3.7 เมื่อครบเวลา 15 นาที แล้วให้นำแต่ละเซลมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 578 นาโนเมตร ในทันทีที่นำออกมา ค่าที่อ่านได้ให้เป็น A_2

ทำเช่นเดียวกันนี้กับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่เตรียมได้จากกรดซิตริก

ตารางที่ 1 ตารางโดยสรุปของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก

ปิเปตใส่ในเซลวัดการดูดกลืนแสง	ตัวอย่าง	สารละลายแบลงค์
สารละลายที่ 1 (อุ่นที่ 37 ซ)	1.00 ml	1.00 ml
น้ำกลั่น	1.50 ml	1.50 ml
สารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ	0.10 ml	0.10 ml
แท่งเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดส ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 ซ เป็นเวลา 6 นาที	–	1 แท่ง คนด้วยแท่งเอนไซม์ทุก 2 นาที
นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 578 นาโนเมตร	A_1	A_1
สารละลายที่ 3	0.10 ml	0.10 ml
ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ที่ 37 ซ		
นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 578 นาโนเมตร	A_2	A_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

I I การศึกษาผลของการสกัดด้วยสารละลายชนิดต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีโดยวิธีไตเตรชัน (AOAC, 1980)

1. วัตถุดิบ

1.1 มะนาว

1.2 ฝรั่ง

1.3 ละมุด

1.4 กล้วย

1.5 มะละกอ

1.6 กระหล่ำปลี

2. สารเคมี

2.1 กรดเมตาฟอสฟอริก 3% (Bessey 1938)

2.2 กรดไฮโดรคลอริก 1% (Bessey 1938)

2.3 กรดออกซาลิก 0.5% (Goldblith และ Harris 1948)

2.4 กรดซิตริก 3% (Wimalasiri และ Wills 1983)

2.5 โซเดียมไบคาร์บอเนต

2.6 กรดแอสคอร์บิก

2.7 น้ำกลั่น

2.8 2,6- ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องปั่น (Homogenizer MSE)

3.2 เครื่องปั่นแยก (Centrifuge)

3.3 อุปกรณ์เครื่องมือและเครื่องแก้วสำหรับการไตเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายที่ใช้ในการสกัด กรดเมตาฟอสฟอริก 3%, กรดไฮโดรคลอริก 1% Bessey(1938) กรดออกซาลิก 0.5% Goldblith และ Herris (1948), กรดซิตริก Wimalasiri และ Will (1983)

1.2 สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม /มิลลิลิตร

ชั่งกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานมา 50 mg. นำมาละลายด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 3% ในขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ทำเช่นเดียวกันนี้แต่เปลี่ยนเป็นใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก, กรดออกซาลิก และกรดซิตริก

1.3 สารละลายมาตฐานอินโดฟีนอล

ละลาย 50 mg ของ 2,6- ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่เก็บในเดซิเคเตอร์ ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไบคาร์เนต 42 มิลลิกรัมเขย่าอย่างแรง จนกระทั่ง dye ละลายหมด นำมาเจือจางด้วยน้ำจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

2. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

สำหรับผักและผลไม้ ให้ชั่งมา 10 กรัม ดูดสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 3% ใส่ลงไป 40 มิลลิลิตร ไปปั่นใน Waring blender ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที Loeffler และ Ponting (1942) เมื่อปั่นเสร็จแล้วนำออกมาปั่นแยกเอาส่วนที่ใสออกมา และทำการสกัดกากอีกครั้งด้วยสารละลายตัวเดียวกับที่นำไปปั่น เพื่อทำการสกัดกรดแอสคอร์บิกออกมาให้หมด Bessey (1938) นำมาใส่ในขวดวัดปริมาตรให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ทำเช่นเดียวกันนี้ แต่เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นกรดออกซาลิก, กรดซิตริกและกรดไฮโดรคลอริก ตามลำดับ

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 ดูดสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่เจือจางด้วยกรดฟอสฟอริก มา 2 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่

3.2 ปิเปตสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 3% ใส่ลงไป 5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล ที่มีสีฟ้าเข้มอยู่ในบิวเรต จนกระทั่งเกิดสีชมพู (rose pink) อย่างถาวรเป็นเวลามากกว่า 15 วินาที

3.4 นำสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 3% 7 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอลจนกระทั่งเกิดสีชมพูคงอยู่เป็นเวลามากกว่า 15 วินาที เพื่อเป็นแบลงค์

ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.1 ถึง 3.4 อย่างน้อย 3 ครั้ง และทำเช่นเดียวกันนี้กับสารละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอื่น ๆ

3.5 ดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 2 ใส่ในขวดรูปชมพู่ 2 มิลลิลิตร ใส่สารละลายตัวเดียวกับที่ใช้ในการสกัด 5 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล จนกระทั่งถึงจุดยุติคือมีสีชมพู คงอยู่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 วินาที ทำเช่นเดียวกันนี้กับที่ใช้ในการสกัดตัวอื่น ๆ

ในทุกตัวอย่างทำเช่นเดียวกันหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชัน

สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน 2 มิลลิลิตร

+

สารละลายที่ใช้ในการสกัด 5 มิลลิลิตร

|ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

จุดยุติสีชมพู

แบลงค์ สารละลายที่ใช้ในการสกัด 7 มิลลิลิตร

|ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

จุดยุติสีชมพู

สารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร

+

สารที่ใช้ในการสกัด 5 มิลลิลิตร

|ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

จุดยุติสีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีดัลเลอร์ริเมตริก

จากการนำกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน มาทำการวิเคราะห์ ถึงประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ โดยนำมาทำละลายด้วยกรดเมตาฟอสฟอริก 1.5 % ปรับให้ได้ PH 3.5 - 4.0 ด้วย KOH (10 mol/l) (Boehringer, 1986) และอีกตัวอย่างนำมาทำละลายด้วย กรดเมตาฟอสฟอริก 3% (Bessey, 1938)ทำให้ได้ความเข้มข้น 2 กรัม /ลิตร ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีดัลเลอร์ริเมตริก

สารละลายที่ใช้ในการสเตบิไลซ์	ปริมาณกรดแอสคอร์บิก (กรัม / ลิตร)
กรดเมตาฟอสฟอริก 1.5% ปรับ PH ด้วย KOH	0.70
กรดเมตาฟอสฟอริก 3%	1.20

การที่ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิก พบว่าค่าความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่คำนวณได้ มีความแตกต่างจากความเข้มข้นเริ่มต้นอย่างมากมาย สาเหตุอาจจะเกิดชุดสารละลายที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์นั้น อยู่ในสภาพที่เกือบจะหมดอายุ คือชุดสารละลายนี้จะมีความเสถียรเป็นเวลา 1 ปี เมื่อเก็บรักษาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 ซ รวมทั้งแท่งเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดสด้วย ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้การทำงานของแท่งเอนไซม์ลดลง หรือแท่งเอนไซม์เสื่อมสภาพ ไม่สามารถจะทำการออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิกได้ ทำให้ความเข้มข้นที่หาได้มีความแตกต่างจากความเข้มข้นที่นำมาวิเคราะห์มาก

แต่อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์นี้ ยังไม่สามารถยืนยันถึงความถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องได้เพราะทำการวิเคราะห์ในจำนวนที่น้อยครั้ง เนื่องจากสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์เหลืออยู่ในปริมาณน้อยมาก และไม่สามารถจัดหามาเพิ่มได้เนื่องจากมีราคาแพง ทำให้ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ต่อไปได้

ตารางที่ 3 การเจือจางความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง

ค่าประมาณของกรดแอสคอร์บิก (กรัม / ลิตร)	เจือจางด้วยน้ำจำนวน	Factor F
< 0.20	-	1
0.20 - 2.0	1 + 9	10
2.0 - 20	1 + 99	100
> 20	1 + 999	1000

7. ก่อนหน้าที่จะนำสารละลายที่ 1 มาใช้ ต้องนำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ซ

8. เพื่อที่จะเป็นการประหยัดสารละลายที่ 1 อาจจะเตรียมได้โดยการนำมาเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน สารละลายที่ 1 ต่อน้ำ เท่ากับ 2 ต่อ 3

9. ในตัวอย่างแบลงค์ ที่ใส่แท่งเอนไซม์ลงไป จะต้องมีการคนให้เพียงพอ มิฉะนั้นค่าที่ได้อาจจะมีการผิดพลาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาผลของการสกัดด้วยสารละลายที่ใช้ในการสกัดชนิดต่าง ๆ

จากการทดลองนำตัวอย่างชนิดต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยใช้สารละลายที่นำมาสกัดต่าง ๆ กัน ทำการวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชัน โดยการนำสารละลายตัวอย่างมาไตเตรท กับ 2,6- ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่จุดยุติจะกลายเป็นสีชมพู (rose pink) คงอยู่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 วินาที

ขั้นแรกจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล

สารละลายที่ใช้ในการสกัด		มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานอินโดฟีนอล
กรดเมตาฟอสฟอริก	3%	0.117
กรดไฮโดรคลอริก	1%	0.113
กรดออกซาลิก	0.5%	0.103
กรดซิตริก	3%	0.110

หมายเหตุ ค่าในตารางที่ 4 เป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างต่าง ๆ กัน เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการสกัด พบว่าผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน (มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิก / 100 กรัมของตัวอย่าง)

ตัวอย่าง	สารละลายที่ใช้ในการสกัด	กรดเมตา-ฟอสฟอริก	กรดไฮโดร-คลอริก	กรดออก-ซาริก	กรดซิตริก
มะนาว		205.37	201.97	196.05	174.09
ฝรั่ง		45.62	43.12	49.97	40.81
มะละกอ		38.77	38.45	40.39	35.60
กระหล่ำปลี		77.25	80.70	73.42	69.38
กล้วย		2.05	21.04	17.96	7.42
ละมุด		34.64	38.27	41.11	31.34

หมายเหตุ ค่าในตารางที่ 5 เป็นค่าเฉลี่ยจาก 20 การทดลอง

จากตารางที่ 5 เป็นตารางแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง มะนาว ฝรั่ง มะละกอ กระหล่ำปลี กล้วย และละมุด ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กันคือ 3% กรดเมตาฟอสฟอริก 1% กรดไฮโดรคลอริก 0.5% กรดออกซาลิก และ 3% กรดซิตริก

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสารละลายต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง (99%) ยกเว้นจากตัวอย่างมะละกอที่พบว่าค่าที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุอาจจะเนื่องจากสารละลายที่ทำการสกัดออกมาจากมะละกอ เป็นสารละลาย ที่มีสีออกส้ม ทำให้การพิจารณาจุดยุติผิดพลาดไป

และพบว่าสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก 3% มีประสิทธิภาพในการสกัดมาก สามารถทำให้กรดแอสคอร์บิกมีความเสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายนี้ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดส แต่พบว่าสารละลายกรดเมตา-ฟอสฟอริก ไม่มีประสิทธิภาพในการทำให้กรดแอสคอร์บิกที่สกัดได้จากสารละลายที่มีแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่มาก มีความเสถียรได้

จากการทดลองจะพบว่าสารละลายที่สามารถนำมาใช้แทนสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก ได้คือ กรดไฮโดรคลอริก 1% และกรดออกซาลิก 0.5% เพราะมีประสิทธิภาพในการทำให้กรดแอสคอร์บิกคงอยู่และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบสออกซิเดสได้เช่นเดียวกับสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก แต่พบว่าสารละลายกรดซิตริก 3% มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบสน้อยกว่า ทำให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิกถูกทำลายไปมากกว่า

ซึ่งสารละลายที่สามารถนำมาใช้ได้นี้ จะต้องมีความเป็นกรดเพียงพอที่จะสามารถรักษากรดแอสคอร์บิกเอาไว้ได้ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดสได้ และไม่ทำให้ PH สูงเกินกว่า 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก พบว่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ได้นั้นมีค่าน้อยกว่าปริมาณที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งการทดลองยังไม่สมบูรณ์ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้จึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ วิธีการหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีคัลเลอร์ริเมตริก และวิธีไตเตรชันได้

2. การศึกษาถึงประสิทธิภาพของการสกัดโดยสารละลายที่ใช้ในการสกัด คือ กรดเมตาฟอสฟอริก 3 % กรดไฮโดรคลอริก 1% กรดออกซาลิก 0.5 % และกรดซิตริก 3 % พบว่ากรดเมตาฟอสฟอริก 3 % มีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี สามารถทำให้กรดแอสคอร์บิกมีความเสถียรได้ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดสได้ และพบว่าสามารถนำกรดออกซาลิก 0.5 % และกรดไฮโดคลอริก 1 % มาทำการสกัดแทนกรดเมตาฟอสฟอริก ที่มีราคาแพงได้ เพื่อเหตุผลในแง่เศรษฐกิจ ซึ่งสารละลายทั้งสองตัวนี้มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับกรดเมตาฟอสฟอริก แต่กรดซิตริก 3 % ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบส ออกซิเดสได้ จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการสกัดแทนกรดเมตาฟอสฟอริกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

ข้อแนะนำสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีดัลเลอร์ริเมตริก

1. ควรจะทำการล้างปิเปต ที่ใช้ในการดูดสารละลายที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ ด้วยการละลายตัวมันเองก่อน

2. แท่งเอนไซม์ที่นำมาใช้ ควรจะใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น ไม่ควรจะนำกลับมาใช้ใหม่

3. ภายหลังจากที่ทำการเติมสารละลายที่ 3 ลงไปแล้ว ปฏิกิริยาจะไวต่อแสงมาก ดังนั้นจึงไม่ควรตั้งไว้ในที่มีแสง

4. ภายหลังจากการเติมสารละลายตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ลงไปควรจะนำมาปิดด้วยพาราฟิล์ม

5. ปริมาณของกรดแอสคอร์บิกที่อยู่ในเซลวัดแสง ควรจะอยู่ในช่วง 1-20 ไมโครกรัม

6. ถ้าปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่มีอยู่มีความเข้มข้นมากเกินไป ต้องนำมาเจือจางด้วยน้ำ ซึ่งอัตราส่วนของน้ำที่ใช้เจือจางดังแสดงในตารางที่ 3

ข้อแนะนำสำหรับการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกโดยวิธีไตเตรชัน

1. สารละลายที่ใช้ในการสกัดถ้าหากทำการเตรียมไว้ก่อน ควรทำการเก็บในที่อุณหภูมิต่ำ เพราะกรดเมตาฟอสฟอริก มีอัตราการเปลี่ยนไปเป็นออร์โธเมตาฟอสฟอริกได้สูงที่อุณหภูมิสูง

2. สารละลายอินโดฟินอลที่เตรียมไว้ ต้องทำการเก็บในที่มืด ไม่ถูกแสง เพราะแสงจะสามารถทำให้สีของสารละลายจางลงได้

3. กากของสารตัวอย่างที่เหลือจากการขั้นตอนการกรอง ถือว่าละทิ้งได้ ไม่ต้องนำมาคิดเป็นปริมาตรรวมในสารละลาย

4. เมื่อทำการสกัดสารละลายตัวอย่างแล้ว ควรจะนำมาทำการวิเคราะห์ทันที มิฉะนั้นแสงและเอนไซม์แอสคอร์เบส จะสามารถออกซิไดส์กรดแอสคอร์บิกได้ ทำให้ค่าที่หาได้น้อยกว่าความเป็นจริง

5. เวลาที่ใช้ในการไตเตรท ไม่ควรจะนานเกินกว่า 30 วินาที เพราะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เวลาผ่านไปสีของสารละลายอินโดฟินอลสามารถจางลงเรื่อย ๆ ทำให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่ได้มากกว่าความเป็นจริง

6. ขณะทำการไตเตรท ควรจะปล่อยสารละลายอินโดฟินอลลงใกล้ ๆ กับสารละลายตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ เพื่อป้องกันการสัมผัสกับอากาศที่จะทำให้กรด-แอสคอร์บิคออกซิไดส์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ฐาปนีย์ แสนยานิสิน 2530 วิธีใหม่ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในอาหาร วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพ. 14:75-86

A.O.A.C. 1980. Vitamin C (Ascorbic acid) - Official Final Action. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. USA. 756 p.

Ashoor, S.H., W.C. Monte, and J. Weltz. 1984. Liquid Chromatography Determination of Ascorbic Acid in Foods. J. Assoc. off Anal. Chem. 67(1) : 78-80

Bessey, O.A. 1938. A Method for the Determination of Small 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 Enzymatic Food Analysis. p 12-14.

Deglish, C. 1951. The Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid in Tissue Extracts, Particularly those of the Walnut. J. Biochem. 635-639.

Davis, W.B. 1942. Extraction of Ascorbic Acid from Plant Tissue. Ind. Eng. Chem. 34:127P.

Gilliam, W.S. 1945. Polarographic Determination of Vitamin C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

in Fruits and Vegetables. Ing. Eng. Chem., Anal. Ed. 17:217-221.

Goldblith, S.A. and R.S. Harris. 1948. Estimation of Ascorbic Acid in Food Preparations. Analyt. Chem., 20: 649P.

Gyorgy, P. 1951. Vitamin Methods, Academic Press, Inc., New York. USA. 774P.

Glazynov, M.F. 1937. Bull. Appl. Bot. etc., ใน Harris, L.J. and M. Olliver. 1942. Vitamin Methods. Biochem. J. 36: 158-173.

Harris, L.J. and S.N. Ray. 1933. Loss of Potency of Guinea-Pig Supra renals in Scurvy. Biochem. J. 27:303-304.

Harris, L.J., L.W., Meppsin and Y.L. Wang. 1942. A Simple Potentiometric Method for Determining Ascorbic Acid Suitable for Use with Coloured Extracts Biochem. J. 36:183P.

Harris, L.J. and N. Olliver. 1942. Vitamin Methods. Biochem. J. 36:158-173.

Holst and Froehlich ใน Sebrell, W.H., J.R. and R.S. Harris. 1967. Estimation The Vitamins Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. Academic Press, New York. U.S.A. 338-359.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huelin, F.E. 1950. Use of Oxalic Acid in the Determination of Ascorbic Acid. Analyst. 75:391P.

Johnson, S.W. 1936. Cataract and Ascorbic Acid in the Guinea-Pig. Biochem.J. 30:1430P.

Key, K.M. and G.K. Elphick. 1931. A Quantitative Method for the Determination of Vitamin C. Biochem. J. 1931. 25:288P.

Kirk, M.M. and D.K. Tressler. 1939. Determination of Ascorbic Acid Ing. Eng. Chem., Anal. Ed. 11:322P.

Lamden, M.P. 1950. Copper Contemination and Ascorbic Acid Loss in Waring Blender Analyt. chem. 22; 1139P.

Liebmann, H. and A.D. Ayres. 1945. Electrometric Determination of Ascorbic Acid. Analyst. 70:411-412.

Loeffler, H.J. and J.D. Ponting. 1942. Ascorbic Acid Rapid Determination in Fresh, Frozen or Dehydrated Fruits and Vegetables. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 14:846P.

Lorenz, A.J. and L.J. Arnold. 1938. Standerdization of 2,6-Dichlorophenol indophenol with Ferrous Compounds. Ing. Eng. Chem., Anal. Ed. 10:687P.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mapson, L.W. 1961. A Note on the Estimation of Dehydro-L-Ascorbic Acid in Plant Tissues by the Roe and Kuether Procedure. Biochem. J. 80:459-461.

Morell, S.A. 1941. Rapid Photometric Determination of Ascorbic Acid in Plant Material. Ing. Eng. Chem., Anal. Ed. 13:793-794.

Nelson, W.L. and G.F. Somers. 1945. Determination of Ascorbic Acid Application of the Indophenol-Xylene Extraction Method of Determination in Large Numbers of Tomato and Juice Samples. Ing. Eng. Chem., Anal. Ed. 17:754-756.

Ponting, Z.D. 1943. Extraction of Ascorbic Acid from Plant Materials. Ing. Eng. chem., Anal. Ed. 15:389-391.

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

Robinson, W.B. and E. Stotz. 1945. The Indophenol-Xylene Extraction Method for Ascorbic Acid and Modifications for Interfering Substances. Biochem. J. 160:217P.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Roe, J.H. and C.A. Kuether. 1943. The Determination of Ascorbic Acid in Whole Blood and Urine through the 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivative of Dehydroascorbic Acid. J. Biol. Chem. 147:399-407.

Senthenam, K.S.V. and V.R. Krish. 1961. Estimetionof Ascorbic Acid by Controled Potential Coulometry. anal. Chem. 33:1493P.

Sebrell, W.H., J.R. and R.S. Harris. 1967. Estimation The Vitemins Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. 2nd ed. V. 1. Academic Press, New York. U.S.A. 338-359.

Speek, A.J., J. Schrijver and W.H.P. Schreurs. 1984. Fluorometric Determinations of Total Vitamin C and Total Isovitamin C in Food stuffs and Beverages by HPLC with Precolumn Derivetization. J. Agri. Food. Chem. 32: 352-355.

Stepp, W., Dr. Kuhnau and H. Schroeder. 1938. Vitamin C. The Vitemins and Their Clinical Applications. The Vitamin Product Co., U.S.A. 67-70

Vevich, M.G. and R.M. Stern. 1945. Nutritive Value of Canned Foods Determination of Ascorbic Acid of Fresh Green Peas. Ing. Chem., Anal. Ed. 17:531P.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Van Fekelen and A. Emmerie. 1936. Some Critical Remarks on the Determination of Ascorbic Acid. Biochem. J. 30:25P.

Verma, K.K., A. Jain and R. Rawat. 1984. Titrimetric Determination of Ascorbic Acid Using Chloramil. J. Assoc off Anal. Chem. 67:261-265

Wimalasiri, P. and R.B.H. Wills. 1983. Simmultaneous analysis of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Fruit and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. 256:369-371.

Wokes, F. 1947. Oxalic Acid Extractant in Vitamin C Assay. Analyst. 72:63P.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณปริมาณกรดแอสคอร์บิกตามวิธี Colorimetric method

ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสง ($A_2 - A_1$) ของตัวอย่างให้เป็น A ของตัวอย่าง

ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสง ($A_2 - A_1$) ของสารละลายแบลงค์ให้เป็น A ของแบลงค์

และ $A = A_{ตัวอย่าง} - A_{แบลงค์}$

จะสามารถคำนวณความเข้มข้นได้จาก

$$C = \frac{V * MW}{E * d * v * 1000} * A \quad (กรัม / ลิตร)$$

C = ความเข้มข้นของ L - ascoribic (กรัม / ลิตร)

V = ปริมาตรสุดท้ายที่นำไปวัดการดูดกลืนแสง = 2.70 มิลลิลิตร

v = ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ = 0.10 มิลลิลิตร

d = ความกว้างของเซล = 1 (เซนติเมตร)

E = สัมประสิทธิของการดูดกลืนแสงสำหรับ MTT-formazen ที่ 578 นาโนเมตร = 16.9 (ลิตร * มิลลิโมล$^{-1}$ * เซนติเมตร$^{-1}$)

$$C = \frac{2.70 * 176.13}{16.9 * 1 * 0.10 * 1000} * A$$

$$= 0.2814 * A$$

(g L - ascorbic acid / l ของสารละลายตัวอย่าง)

สำหรับตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำ นำค่า F factor มาคูณกับค่า C ที่ได้จะได้เป็นความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณปริมาณกรดแอสคอร์บิก ในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชัน สามารถหาได้จากสมการข้างล่างนี้

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

X = ปริมาตรของสารละลายอินโดฟินอลที่ได้จากการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง

B = ปริมาตรของสารละลายอินโดฟินอลที่ได้จากการไตเตรทกับสารละลายแบลงค์

F = จำนวนมิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกที่สมมูลกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายอินโดฟินอล

E = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง

S = น้ำหนักของสารละลายตัวอย่าง

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่นำมาไตเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างมะนาว

ANOVA TABLE

SOV	SS	df	MS	F
Treatment	0.295	3	0.098	92.23*
Error	0.017	16	1.068×10^{-3}	
Total	0.312	19		

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างกล้วย

ANOVA TABLE

SOV	SS	df	MS	F
Treatment	1186.109	3	395.369	448.976*
Error	14.091	16	0.8806	
Total	1200.20	19		

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างมะละกอ

ANOVA TABLE

SOV	SS	df	MS	F
Treatment	59.59	3	19.86	1.254*
Error	253.267	16	15.83	
Total	312.857	19		

* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างกระหล่ำปลี

ANOVA TABLE

SOV	SS	df	MS	F
Treatment	357.44	3	119.146	50.213*
Error	37.965	16	2.373	
Total	395.405	19		

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างละมุด

ANOVA TABLE

SOV	SS	df	MS	F
Treatment	217.862	3	90.62	7.114*
Error	203.81	16	12.738	
Total	475.672	19		

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ในการสกัดของตัวอย่างฝรั่ง

ANOVA TABLE

SOV	SS	df	MS	F
Treatment	230.568	3	76.856	18.306*
Error	67.172	16	4.198	
Total	297.740	19		

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้