

การพัฒนาชุดตรวจสอบวิตามินซีในน้ำผลไม้

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

ดร.ศิริวรรณ ตีโก้ ดร.อมร ไชยสัตย์ นายปรีชา มั่นสลาย

บทนำ

วิตามินซี (vitamin C) หรือที่รู้จักกันในชื่อกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำได้ มีความจำเป็นต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย วิตามินซีเป็นวิตามินที่จำเป็นในการสังเคราะห์คอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างของหลอดเลือด เอ็น กระดูก และฟัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะปกติ ช่วยให้ร่างกายสามารถดูดซึมแร่ธาตุจากอาหารได้ดียิ่งขึ้น และเสริมภูมิคุ้มกันและช่วยบรรเทาอาการภูมิแพ้ เนื่องจากวิตามินซีมีคุณสมบัติช่วยต่อต้านสารที่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ได้ เป็นต้นซึ่งโดยปกติแล้วร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินซีขึ้นเองได้ แต่จะได้รับวิตามินซีจากอาหารที่รับประทานเข้าไปเท่านั้น แหล่งอาหารที่มีวิตามินซีสูง ได้แก่ พืช ผักและผลไม้ เช่น ส้ม ฝรั่ง มะละกอ มะนาว พริกหยวก ผักกาด มะเขือเทศ และหน่อไม้ฝรั่ง

ดังนั้นในปัจจุบันทำให้มีผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีส่วนผสมของวิตามินซี ผลิออกมาจำหน่ายในรูปของน้ำผลไม้บรรจุในกล่องหรือขวดพร้อมบริโภค ได้แก่ น้ำผลไม้กระป๋อง ที่ผลิตจากส้ม สับปะรด หรือฝรั่ง ในประเทศไทยธุรกิจผลิตน้ำผลไม้มีแนวโน้มขยายตัวค่อนข้างสูง เพราะเป็นประเทศเกษตรกรรม มีผลไม้ตามฤดูกาลหลากหลาย ทั้งผลิตเพื่อขายในประเทศและเพื่อส่งออกขายนอกประเทศ เช่น จีน ฮองกง และยุโรปทำให้มูลค่าทางการตลาดในน้ำผลไม้สูงถึง 6,000 ล้านบาทต่อปี โดยในจำนวนนี้แบ่งเป็นน้ำผลไม้ 100% มูลค่า 2,500 ล้านบาท น้ำผลไม้ผสมต่ำกว่า 40% มูลค่า 500 ล้านบาท และน้ำผลไม้ต่ำกว่า 25% มูลค่า 3,000 ล้านบาท ซึ่งสัดส่วนกว่าครึ่งหนึ่งเป็นน้ำส้ม ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพน้ำผลไม้พร้อมดื่ม จึงมีความจำเป็นและเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ทางสถาบันวิจัยโภชนาการมหาวิทยาลัยมหิดลจึงได้ทำการตรวจสอบปริมาณวิตามิน ซี จากการตรวจสอบวิตามินซี พบว่า น้ำส้ม 100% ที่ระบุตามข้างกล่องมีปริมาณวิตามินซีไม่ถึง 10 มิลลิกรัม ส่วนน้ำส้ม 30-40% มีบางตราสินค้าที่มีส่วนผสมวิตามินซี และบางยี่ห้อไม่พบเลย เช่นเดียวกับน้ำรสส้ม ส่วนน้ำส้มผสม 25% ไม่พบวิตามินซีเลย จากผลตรวจสอบนี้ จะเห็นได้ว่า ส่วนใหญ่ข้อมูลไม่ตรงกับฉลากที่ทางผู้ผลิตระบุ โดยจะพบว่าวิตามินซีอยู่ปริมาณน้ำมากหรือแทบจะไม่มีเลย

เพราะฉะนั้นการตรวจสอบคุณภาพน้ำผลไม้พร้อมดื่มหลังกระบวนการผลิตจึงมีความสำคัญยิ่ง เพื่อควบคุมคุณภาพการผลิตให้ตรงตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ วิธีทั่วไปที่ใช้ในปัจจุบันคือ การไทเทรต แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีข้อด้อย เช่น ต้องอาศัยผู้ทำการวิเคราะห์ที่มีความชำนาญสูง ใช้สารเคมีในปริมาณมากและมีความเป็นพิษ ไม่สามารถวิเคราะห์ในภาคสนามได้ ต้องส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึง

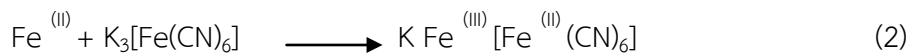
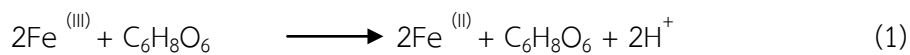
สนใจที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบวิตามินซี ให้มีความสะดวกรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ได้ในภาคสนาม มีราคาถูก และใช้งานง่ายสามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวเอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาแนวทางการสร้างชุดตรวจสอบวิตามินซี
2. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี
3. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้พร้อมดื่มด้วยชุดทดสอบ

หลักการการสร้างชุดทดสอบ

วิตามินซี มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิตามินซีเป็นตัวรีดิวซ์ เพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} ให้กลายเป็น Fe^{2+} จากนั้น Fe^{2+} ที่ได้จะไปทำปฏิกิริยาต่อกับ $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ ทำให้ได้สารละลายสีน้ำเงิน ($K_3Fe^{III}(CN)_6$; Prussian blue) ดังสมการ






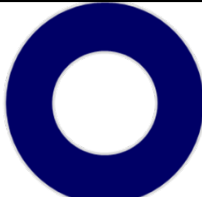


ถ้าในตัวอย่างมีวิตามินซีปริมาณมาก จะทำให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้มาก ซึ่งสามารถไปทำปฏิกิริยาต่อกับ $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Prussian blue มากด้วย ทำให้ได้สีน้ำเงินเข้ม แต่ในทางกลับกัน ถ้ามีปริมาณวิตามินซีน้อย Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้น้อย ส่งผลให้ไปทำปฏิกิริยาต่อกับ $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ ได้น้อยด้วย ทำให้ได้ Prussian blue ปริมาณน้อยลง ทำให้ได้สีน้ำเงินอ่อนลง ความเข้มของสีที่ได้แปรผันตรงตามความเข้มข้นของวิตามินซี ดังนั้นจึงใช้หลักการความสัมพันธ์ของสีของ Prussian blue ที่เกิดขึ้นกับปริมาณของวิตามินซี มาใช้ในการสร้างชุดทดสอบวิตามินซี

วิธีการทดลอง

การสร้างชุดทดสอบ

เติมตัวอย่างวิตามินซี 1 ml มาผสมกับ $FeCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^{-3} M จำนวน 1 ml และเติม $K_3[Fe(CN)_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบสีที่ได้กับแถบสีมาตรฐานที่สร้างขึ้น

แถบสีมาตรฐาน		
		
1 x 10 ⁻⁵ โมลาร์ (1.76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5 x 10 ⁻⁵ โมลาร์ (8.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	1 x 10 ⁻⁴ โมลาร์ (17.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
		
5 x 10 ⁻⁴ โมลาร์ (88 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	1 x 10 ⁻³ โมลาร์ (176 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5 x 10 ⁻³ โมลาร์ (880 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

รูปที่ 1 แถบสีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีด้วยชุดทดสอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

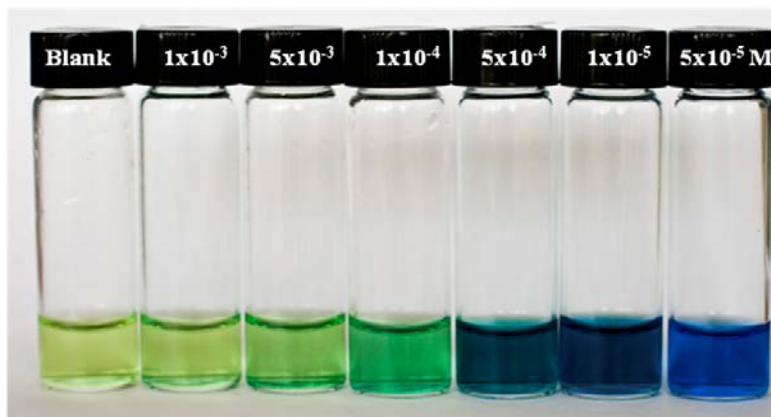
ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ เพื่อให้ชุดทดสอบมีประสิทธิภาพสูงสุด เหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างจริง ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ เป็นดังตารางที่ 1 จึงเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ไปสร้างชุดทดสอบต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

ปัจจัยที่ศึกษา	การทดลอง				สภาวะที่เหมาะสม
1. ความเข้มข้นของ FeCl ₃ (M)	0.1x10 ⁻³	0.5x10 ⁻³	1x10 ⁻³	1.5x10 ⁻³	1x10 ⁻³
2. ความเข้มข้นของ K ₃ [Fe(CN) ₆] (M)	3x10 ⁻³	5x10 ⁻³	7x10 ⁻³	9x10 ⁻³	5x10 ⁻³
3. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)	5	10	20	30	10

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบวิตามินซี

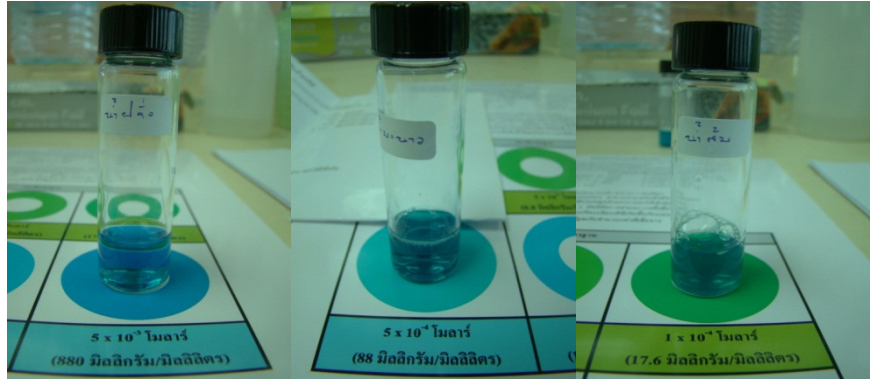
ผลการทดลองพบว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาสามารถตอบสนองต่อวิตามินซีที่มีความเข้มข้นต่างๆคือ 5×10^{-3} 1×10^{-3} 1×10^{-4} 5×10^{-4} 5×10^{-5} และ 1×10^{-5} M ดังรูปที่ 2 ความเข้มของสีน้ำเงินสัมพันธ์กับความเข้มข้นของวิตามินซี โดยความเข้มของสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของวิตามินซีที่เพิ่มขึ้นสามารถแยกสีได้ด้วยตาเปล่า แสดงว่าชุดทดสอบนี้มีประสิทธิภาพสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างจริงได้



รูปที่ 2 การตอบสนองของชุดทดสอบต่อวิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างจริงทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำผลไม้คั้นสด จำนวน 3 ตัวอย่าง คือน้ำฝรั่ง น้ำมะนาว และน้ำสับปะรด และน้ำผลไม้พร้อมดื่มบรรจุกล่อง จำนวน 5 ตัวอย่าง กรณีที่ตัวอย่างมีลักษณะขุ่นจะนำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองก่อน หลังจากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในกรณี que ตัวอย่างมีปริมาณวิตามินซีมากกว่าความเข้มข้นที่ชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้ จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 ml มาผสมกับ FeCl_3 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M จำนวน 1 ml และเติม $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ความเข้มข้น 5×10^{-3} M ปริมาตร 1 ml ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบสีที่ได้กับแถบสีมาตรฐานที่สร้างขึ้น ดังรูปที่ 3 อ่านค่าปริมาณของวิตามินซีที่ได้และเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีไทเทรตแบบรีดอกซ์ ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 2 จากการทดลองศึกษาการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้ ทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดทดสอบกับวิธีไทเทรต ผลการทดลองพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน สรุปได้ว่าชุดทดสอบที่สร้างขึ้นมา มีความถูกต้องสูง และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไทเทรต ชุดทดสอบมีข้อดีกว่าคือมีขั้นตอนการทดลองที่ง่าย ใช้สารเคมีน้อย ค่าใช้จ่ายน้อยและให้ผลรวดเร็ว



รูปที่ 3 การหาปริมาณของวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยชุดทดสอบ

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยชุดทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีไทเทรต

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของวิตามินซี (M)	
	ชุดทดสอบ	ไทเทรต
น้ำฝรั่งคั้นสด	$1 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-3}$	4.57×10^{-3}
น้ำมะนาวคั้นสด	$1 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-3}$	2.25×10^{-3}
น้ำสับปะรดคั้นสด	$1 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-3}$	1.55×10^{-3}
น้ำผลไม้พร้อมดื่ม 1	$1 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-3}$	6.04×10^{-3}
น้ำผลไม้พร้อมดื่ม 2	ไม่พบวิตามินซี	ไม่พบวิตามินซี
น้ำผลไม้พร้อมดื่ม 3	$1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$	5×10^{-5}
น้ำผลไม้พร้อมดื่ม 4	$5 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$	8.97×10^{-4}
น้ำผลไม้พร้อมดื่ม 5	$1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$	1.5×10^{-5}

สรุปผลการทดลอง

ชุดทดสอบวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีที่ได้พัฒนาขึ้นมาี้ใช้หลักการเกิดสีของ Prussian blue วิตามินซีจะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ Fe^{3+} ให้กลายเป็น Fe^{2+} เพื่อทำปฏิกิริยากับ $Fe[(CN)_6]^{4-}$ ได้เป็นสารละลาย Prussian blue ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำเงิน และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 709 นาโนเมตร ศึกษาหาสภาวะต่างๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดทดสอบ เช่น ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ความเข้มข้นของ $Fe[(CN)_6]^{4-}$ และเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้ชุดทดสอบที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงคือ $1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$ M มีความเที่ยง และความแม่นยำสูง เมื่อนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้คั้นสดและน้ำผลไม้พร้อม

ดีม ผลการทดลองที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีไทเทรตพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน โดยที่ชุดทดสอบมีข้อดีกว่าคือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 10 นาที ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ราคาถูกและสามารถนำไปหาปริมาณวิตามินซีในภาคสนามได้

เอกสารอ้างอิง

1. Koncki R. 2002. Chemical Sensors and Biosensors Based on Prussian Blues *Critical Reviews in Analytical Chemistr*, 32:79–96.
2. Koncki R.; Wolfbeis O. 1998. Optical chemical sensing based on thin films of Prussian Blue. **Sensors and Actuators B: Chemical** 51: 355-358.
3. Kumar G. K., Indrasenan P. 1990. Titrimetric methods for the determination of vitamin C in some pharmaceutical preparations by use of two N-bromoimides. **Talanta** 37: 269-271.
4. Odriozola-Serrano I., Hernández-Jover T., Martín-Belloso O. 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. **Food Chemistry** 105: 1151-1158.
5. Pournaghi-Azar M. H., Ojani R. 1997. A selective catalytic voltammetric determination of vitamin C in pharmaceutical preparations and complex matrices of fresh fruit juices. **Talanta** 44: 297-303.