

การตรวจวัดวิตามินซีในน้ำผลไม้อย่างง่ายด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

SIMPLE ANALYSIS OF VITAMIN C IN FRUIT JUICE SAMPLES

BY ELECTROCHEMISTRY

พัชรินทร์ กุนกิง ศิริรัตน์ แพทย์ไชโย พรธิดา แก้วทาสี อนุรักษ์ จิตต์บึงพร้าว

อัญชนา ปรีชาวรพันธ์ และ กุลวดี ปิ่นวัฒนะ*

Putcharin Kunking, Sirirat Padchaiyo, Porntida Kwawtasri, Anurak Chitbuengphrao,

Anchana Preechaworapun, and Kulwadee Pinwattana*

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

*corresponding author e-mail: pinwattana@hotmail.com

(Received: 26 July 2022; Revised: 27 November 2022; Accepted: 6 December 2022)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการหาวิตามินซีในน้ำผลไม้โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมตรีบนขั้วไฟฟ้ากลาสลิคาร์บอน ทำการศึกษาสภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีที่ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4 ถึง 8 จากการศึกษาพบว่า pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสมเท่ากับ pH 6 ซึ่งปรากฏพีคปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดแอสคอร์บิกขึ้นที่ศักย์ไฟฟ้า 0.44 โวลต์ ที่อัตราสแกน 0.1 โวลต์ต่อวินาที ด้วยการตรวจวัดของเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ทำการหาปริมาณวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี โดยการคนตลอดการทดลอง ด้วยศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5 โวลต์ พบช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดวิตามินซีที่กว้าง 10 ถึง 266 ไมโครโมลาร์ ด้วยความชันในการตรวจวัดเท่ากับ 4.78 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 1.39 ไมโครโมลาร์และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 4.62 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้ของน้ำมะนาวสด และน้ำส้มบรรจุกล่อง 100% ซึ่งแสดงผลความสัมพันธ์ของร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 80 ถึง 97

คำสำคัญ: วิตามินซี น้ำผลไม้ แอมเพอโรเมตรี ขั้วไฟฟ้ากลาสลิคาร์บอน

Abstract

In This research, we determined vitamin C in fruit juice using amperometry at glassy carbon working electrode. The mechanism of electrochemical oxidation of vitamin C was investigated by cyclic voltammetry in various pH 4 to 8 of phosphate buffers. The result showed that the optimum pH of an electrolyte solution is phosphate buffer pH 6, that appears oxidation peak at 0.44 V with scan rate 0.1 V/s using cyclic voltammetric detection. Amperometric technique was used for vitamin C quantitative by stirring throughout the experiment with optimum potential of 0.5 V. It displayed a wide dynamic calibration range 10 to 266 μM with high sensitivity of 4.78 $\mu\text{A}/\text{mM}$. The limit of detection and limit of quantification are 1.39 μM and 4.62 μM , respectively. Furthermore, the proposed method was successfully applied to analyze ascorbic acid in fruit juice samples of fresh lemon juice and 100% orange juice box. They exhibited a reasonable relative of the percent recovery in the range of 80–97.

Keywords: Vitamin C, Fruit juice, Amperometry, Glassy carbon electrode

บทนำ

วิตามินซี (Vitamin C) หรือกรดแอสคอร์บิก เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ เป็นวิตามินที่พบในระบบของร่างกาย และพบได้ในอาหาร ได้แก่ ผัก ผลไม้ วิตามินซีจัดเป็นสารที่มีความสำคัญในการสร้างคอลลาเจนเพื่อช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่างๆ ช่วยในการดูดซึมของธาตุเหล็ก กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน พร้อมทั้งมีส่วนร่วมในการช่วยรักษาบาดแผลและการสร้างกระดูก การขาดวิตามินซีอาจทำให้เกิดโรคเลือดออกตามไรฟัน (ฉัตรชัย, 2562) และคุณสมบัติที่ดีของวิตามินซีช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (LDL) วิตามินซีใช้ในทางด้านเภสัชกรรม เคมี คอสเมติก และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร วิตามินซีเป็นสารที่เกิดการย่อยสลายได้ง่ายจากเอนไซม์ และออกซิเจนในอากาศ กระบวนการออกซิเดชันจากการให้ความร้อน แสง และโลหะหนักบางตัวจะทำให้วิตามินซีเกิดการสลายตัว ดังนั้นวิตามินซีจึงจัดเป็นสารตัวหนึ่งที่ช่วยชี้บ่งบอกคุณภาพของอาหารและเครื่องดื่มในกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาที่ดี

การตรวจวัดวิตามินซีในเชิงปริมาณมีหลากหลายวิธี ได้แก่ วิธีดั้งเดิม คือ การไทเทรต (Spínola et al., 2013; Suntornsuk et al., 2002) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) (Fontannaz, Kiling, & Heudi, 2006; Klimczak & Gliszczyńska-Świąto, 2015; Spínola et al., 2013; Uğur et al., 2020) โครมาโทกราฟีของเหลว

สมรรถนะสูงพิเศษ (Ultra Performance Liquid Chromatograph; UPLC) (Klimczak & Gliszczynska-Swiglo, 2015) มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้เร็ว สามารถรองรับแรงดันได้มากกว่า และใช้สารเคมีและเวลาน้อยกว่า HPLC อัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV spectrophotometry) (Garnero & Longhi, 2010) เคมีลูมิเนสเซนส์ (Chemiluminescence) (Li, Zhou, & Du, 2022) และสเปกโตรฟลูออโรเมตรี (Spectrofluorometry) (El-Malla et al., 2022) ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และต้องมีผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวัด เทคนิคที่นิยมอีกวิธี คือ การวัดสี (Saranchina et al., 2022) ในการตรวจวัดต้องหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการเกิดสีเพื่อตรวจวัดปริมาณสี สามารถตรวจวัดได้ความเข้มข้นไม่ต่ำมากอยู่ในระดับไมโครโมลาร์ และจะมีปัญหาต่อการตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีสี

นอกจากนี้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าจัดเป็นเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับมาใช้ในการตรวจวัด เพื่อหาปริมาณวิตามินซี เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ สามารถตรวจวัดได้ที่ความไวสูง ชัดจำกัดในการตรวจวัดต่ำ นอกจากนี้การตรวจวัดสามารถตรวจวัดในสารตัวอย่างที่มีสี และสารที่มีความขุ่นได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำขั้วไฟฟ้ากลาสลิคาร์บอนแบบเปลือย มาทำการตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ซึ่งเป็นการตรวจวัดที่ง่าย และสามารถนำไปประยุกต์ทำการตรวจวัดได้จริงในตัวอย่างน้ำผลไม้

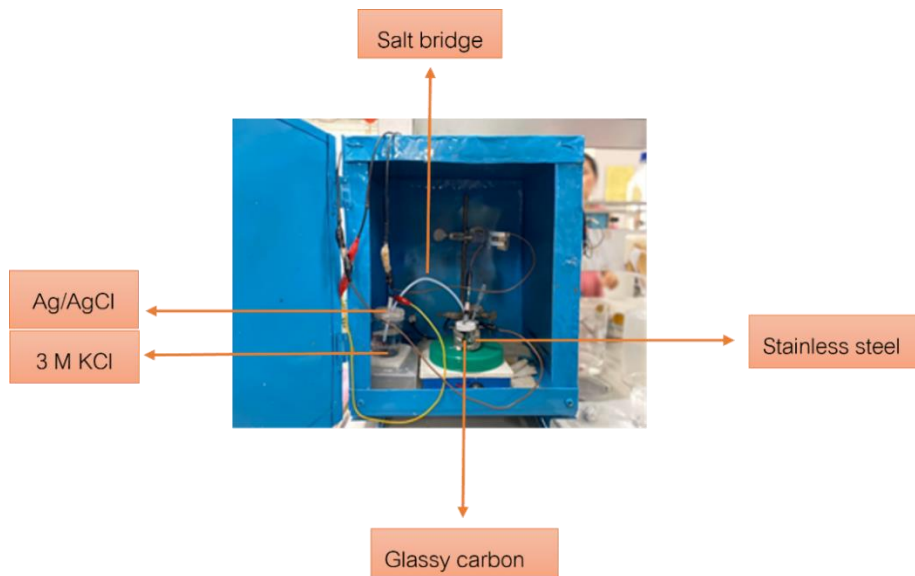
วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate 99.0%; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphate 99.0%; Na_2HPO_4) และวิตามินซี (L-Ascorbic acid 99.0%; AA, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) จากบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd กรดฟอสฟอริก (o-Phosphoric acids 85%; H_3PO_4) จากบริษัท RIC LABSCAN LIMITED น้ำปราศจากไอออน (DI water) ผลิตจากเครื่อง Ultrapure water จาก Adrona ประเทศลัตเวีย

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง DY2013 POTENTIOSTAT จากบริษัท Digi-Ivy ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องกวนสารด้วยแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) จากบริษัท velp scientifica ประเทศอิตาลี ระบบขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้าทำงานกลาสลิคาร์บอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเป็นซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl (3 M KCl)) จากบริษัท BASi ประเทศสหรัฐอเมริกา และขั้วไฟฟ้าช่วยเป็นสแตนเลสสตีล (Stainless Steel) จากเซ็มนิตยา การติดตั้งเซลล์ไฟฟ้าในกล่องฟาราเดย์ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ระบบของเซลล์เคมีไฟฟ้า ประกอบด้วย 3 ขั้วไฟฟ้า โดยมีกลาสคาร์บอนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน สแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (3 M KCl) เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

3. การตรวจวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีเพื่อศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า และ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดวิตามินซี

ทำการตรวจวัดโดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 0.57 มิลลิโมลาร์ละลายในสารละลายความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH ตั้งแต่ pH 4-pH 8 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ทางเคมีไฟฟ้าที่ประกอบไปด้วยระบบขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วไฟฟ้า ดังภาพที่ 1

4. การหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี

ทำการหาค่าศักย์ไฟฟ้าโดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในเซลล์เคมีไฟฟ้าที่มีระบบขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วไฟฟ้า ตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าการตรวจวัดของขั้วไฟฟ้าทำงาน 0.25 0.35 0.40 0.45 0.50 และ 0.60 โวลต์ ตามลำดับ โดยสารละลายจะถูกกวนตลอดเวลาของการตรวจวัดวิตามินซี เมื่อสัญญาณเบสไลน์ (baseline) นิ่งที่เวลา 400 วินาที เติมสารมาตรฐานวิตามินซีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในเซลล์เคมีไฟฟ้า ด้วยไมโครปิเปต ดังภาพที่ 2 และเติมอีก 2 ครั้ง ที่เวลา 500 วินาที และ 600 วินาที หยุดการตรวจวัดที่เวลา 700 วินาที ทำการวัดความสูงของกระแสไฟฟ้าเมื่อกระแสนิ่งในแต่ละชั้น

ของการเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และหาค่าเฉลี่ยของความสูงของกระแสของแต่ละศักย์ไฟฟ้าของการตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี



ภาพที่ 2 การเติมวิตามินซีลงในเซลล์เคมีไฟฟ้า

5. การศึกษาช่วงของความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

ตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าทำงานเท่ากับ 0.5 โวลต์ โดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ตลอดการทดลองสารละลายจะถูกกวนเมื่อสัญญาณเบสไลน์นิ่งที่เวลา 400 วินาที จะทำการเติมสารมาตรฐานวิตามินซีปริมาณ 5 ไมโครลิตร และเติมครั้งถัดไปทุก 100 วินาที อีก 4 ครั้ง เติมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อทุก 100 วินาที จำนวน 5 ครั้ง และเติมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทุก 100 วินาที จนถึงจุดที่ความสูงของกระแสคงที่จึงหยุดเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

6. การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitative; LOQ)

โดยเติมสารละลายอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 อิเล็กโทรไลต์ปริมาตร 5 มิลลิโมลาร์ ใส่ในเซลล์เคมีไฟฟ้าระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ที่ 0.5 โวลต์ สารละลายจะถูกกวนตลอดการตรวจวัด เมื่อสัญญาณเบสไลน์นิ่งที่เวลา 300 วินาที เติมสารละลายอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (สารละลายเบสไลน์) และครั้งถัดไปทุก 100 วินาที อีกจำนวน 9 ครั้ง จากนั้นวัดความสูงของกระแสสัญญาณเบสไลน์ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ของสัญญาณกระแส และนำ 3 เท่าของ SD แทนค่า y ในสมการเส้นตรงของช่วงความสัมพันธ์

ที่เป็นเส้นตรงของการตรวจวัดวิตามินซี เพื่อกำหนดหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และ 10 เท่าของ SD แทนค่า y ในสมการเส้นตรงเพื่อหาค่าขีดจำกัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ) (Indrayanto, 2018; Konieczka, 2007)

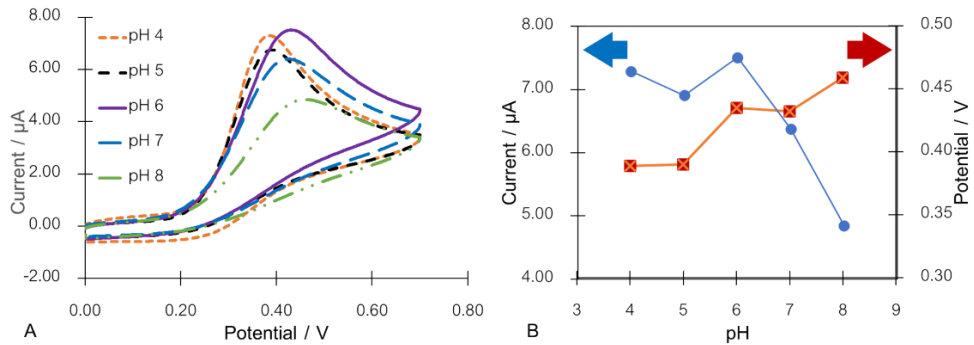
7. การเตรียมตัวอย่างและการตรวจวัดวิตามินซีในตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ น้ำมะนาวสดคั้นจากผลมะนาวสดที่สุ่มตัวอย่างจากตลาดบ้านคลอง ตำบลบ้านคลอง อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และน้ำส้มบรรจุกล่อง 100% จากร้านสะดวกซื้อ ทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมกับการตรวจวัด การตรวจวัดวิตามินซีในตัวอย่างโดยเติมสารละลายอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์เคมีไฟฟ้าที่ประกอบไปด้วย 3 ขั้วไฟฟ้า ตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าที่ขั้วไฟฟ้าทำงานเท่ากับ 0.5 โวลต์ ตลอดจนการทดลองกวนสารละลายตลอดเวลา เมื่อสัญญาณเบสไลน์นิ่งใช้เวลา 400 วินาที เติมน้ำผลไม้ที่เตรียมไว้ปริมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทุกๆ 100 วินาที (ทำซ้ำอีกจำนวน 2 ชุดต่อตัวอย่าง)

ผลการวิจัย

1. การตรวจวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีเพื่อศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า และ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดวิตามินซี

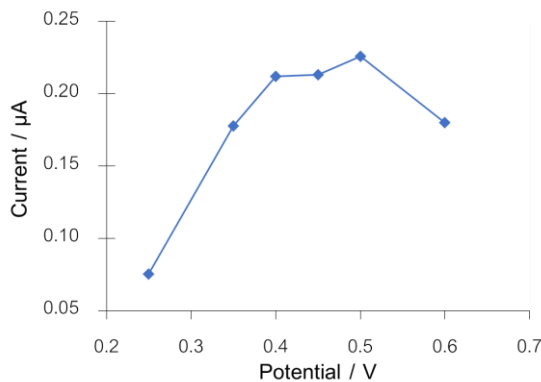
จากการศึกษาการวิเคราะห์กลไกการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของวิตามินซีในอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างกันตั้งแต่ pH 4.0 ถึง pH 8.0 ตรวจวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน จากภาพที่ 3(A) เป็นไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 0.57 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่างกันตั้งแต่ pH 4.0 ถึง pH 8.0 พบว่า วิตามินซีเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นส่งผลให้ ค่าตำแหน่งของศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 3(B) ค่าของความสูงของกระแสแอโนดิก พบว่า มีกระแสสูงสุดที่ pH 6.0 มีค่าเท่ากับ 7.51 ไมโครแอมแปร์ ตำแหน่งของศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ 0.44 โวลต์ ดังนั้นในงานวิจัยจึงใช้ pH ดังกล่าวในการตรวจวัดหาปริมาณวิตามินซีต่อไป



ภาพที่ 3 กราฟการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 0.57 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.0 ถึง 8.0 (A) ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของวิตามินซี และ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า pH ของอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์กับความสูงของกระแส และศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการตรวจวัดวิตามินซี

2. การหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี

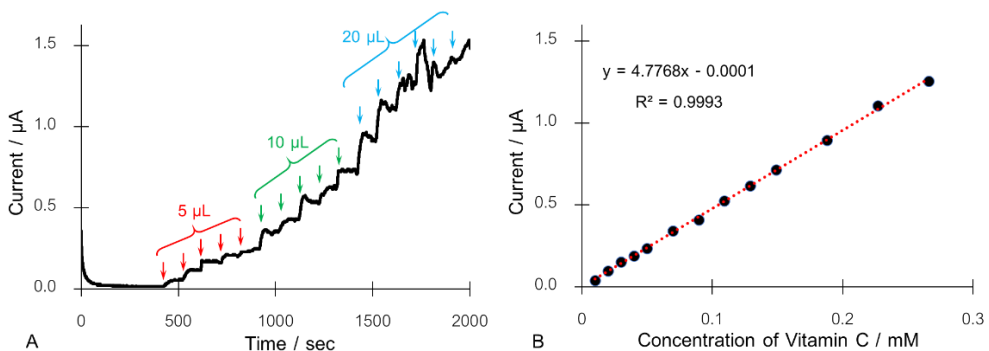
การตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงานค่าเดียวตลอดการทดลอง ในงานวิจัยได้ตั้งค่าศักย์ไฟฟ้า ตามลำดับ ดังนี้ 0.25 0.35 0.40 0.45 0.50 และ 0.60 โวลต์ เมื่อทำการวัดความสูงเฉลี่ยของกระแสไฟฟ้าแอโนดิกที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ได้ผลเป็นของความสัมพันธ์ระหว่างกระแสแอโนดิกกับค่าศักย์ไฟฟ้า ดังภาพที่ 4 พบว่า กระแสของการตรวจวัดวิตามินซีสูงสุดอยู่ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์ และได้กระแสแอโนดิกเฉลี่ยเท่ากับ 0.23 ไมโครแอมแปร์



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ของการตรวจวัดศักย์ไฟฟ้าและกระแสของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีจากเทคนิคแอมเพโรเมตรีโดยใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน

3. การศึกษาช่วงของความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของการตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี

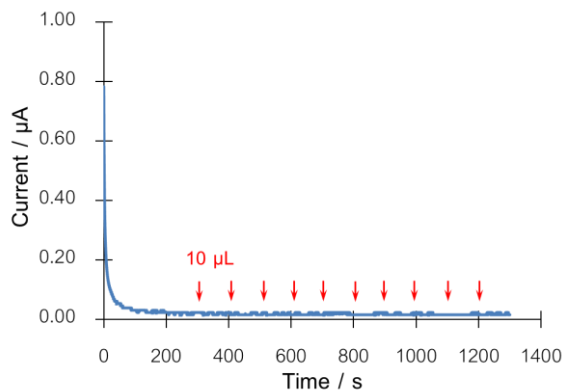
จากภาพที่ 5(A) เป็นแอมเพโรแกรมของการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินซีที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 6.0) ที่มีการคนตลอดเวลา พบว่า เมื่อเติมวิตามินซีลงในเซลล์ที่มีสารละลายอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของกระแสสูงขึ้นตามการเพิ่มความเข้มข้นวิตามินซีมีลักษณะเป็นขั้นบันไดจนกระทั่งที่เวลา 1,800 วินาที พบว่า เมื่อเติมวิตามินซีเพิ่มขึ้นกระแสที่ได้ไม่สูงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของกระแสเทียบกับความเข้มข้นของวิตามินซีที่เติมลงในเซลล์ ดังภาพที่ 5(B) พบช่วงของความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.010 ถึง 0.266 มิลลิโมลาร์ ด้วยสมการเส้นตรงเท่ากับ $y = 4.7768x - 0.0001$ ความชันหรือความไวในการตรวจวัดเป็น 4.78 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ($\mu\text{A}/\text{mM}$) เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Pisoschi และคณะ (Pisoschi, Danet, & Kalinowski, 2008) ตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีบนขั้วไฟฟ้าทำงานแพลทินัมได้ช่วงของความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงที่ 0.1–10 มิลลิโมลาร์ ด้วยความไวในการตรวจวัด 6.391 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์



ภาพที่ 5 กราฟการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินซีในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0) ด้วยขั้วไฟฟ้าทำงานกลาสคาร์บอน ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลังจากการเสถียรทุกๆ 100 วินาที (A) แอมเพโรแกรม และ (B) กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงที่ได้จากความสูงของกระแสของการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรีกับความเข้มข้นรวม

4. การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitative; LOQ)

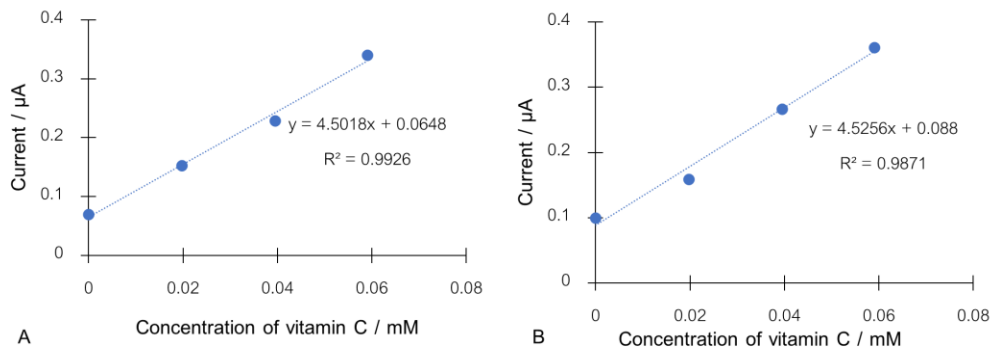
โดยตรวจวัดสัญญาณของแบลงค์ หรืออิเล็กโตรไลต์ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0) โดยทำการเติมปริมาตร 10 ไมโครโมลาร์ ทุกๆ 100 วินาที ลงในเซลล์เคมีไฟฟ้าที่มีอิเล็กโตรไลต์ในเซลล์ ไดแอมเพโรแกรม ดังภาพที่ 6 สามารถคำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด และขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดย SD มีค่าเท่ากับ 0.00221 ค่า m มีค่าเท่ากับ 4.78 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ จะได้ LOD และ LOQ เท่ากับ 1.41 และ 4.65 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ



ภาพที่ 6 แอมเพโรแกรมของสัญญาณแบลงค์หรืออิเล็กโตรไลต์ที่ใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสลิคาร์บอน เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์

5. การตรวจวัดวิตามินซีในตัวอย่าง

การตรวจวัดวิตามินซีในตัวอย่างน้ำผลไม้ ได้แก่ น้ำมะนาวสดและน้ำส้มบรรจุกล่อง 100% พร้อมดื่ม ซึ่งตรวจวัดด้วยการเติมสารมาตรฐานวิตามินซีในตัวอย่าง (Standard addition) ความเข้มข้นสุดท้ายของวิตามินซีในเซลล์เป็น 20 39 และ 59 ไมโครโมลาร์ และทำการตรวจวัดเทคนิคแอมเพโรเมตรีที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์ เมื่อวัดความสูงของกระแสเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซีที่เติมในตัวอย่าง ดังภาพที่ 7 เมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณจากสมการเส้นตรง พบว่า ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างเท่ากับ 14 และ 19 ไมโครโมลาร์ ในตัวอย่างน้ำมะนาวคั้นสด และน้ำส้มบรรจุกล่อง 100% พร้อมดื่มที่เจือจาง 501 เท่า ตามลำดับ และเมื่อคำนวณย้อนกลับจะได้ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างเท่ากับ 123.45 และ 167.53 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในตัวอย่างน้ำมะนาวคั้นสด และน้ำส้มบรรจุกล่อง 100% พร้อมดื่ม ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 การตรวจวัดและหาค่าร้อยละการกลับคืนของวิตามินซีในน้ำมะนาวคั้นสดและ น้ำส้มบรรจุกล่อง 100% พร้อมดื่ม โดยเติมสารมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้นสุดท้ายในเซลล์เป็น 20 39 และ 59 ไมโครโมลาร์ พบร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 80–97 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้



ภาพที่ 7 กราฟการตรวจวัดการเติมสารมาตรฐานวิตามินซีในตัวอย่าง (A) น้ำมะนาวสด และ (B) น้ำส้มบรรจุกล่อง 100% ด้วยการตรวจวัดเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

ตารางที่ 1 ผลของการตรวจวัดและหาค่าร้อยละการกลับคืนของวิตามินซีในตัวอย่างผลไม้ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี

ตัวอย่าง	เติมสารมาตรฐาน วิตามินซี (µM)	ความเข้มข้นวิตามินซี ที่ตรวจพบ (µM) (±SD for n=3)	Recovery%
น้ำมะนาว คั้นสด	–	14±0.13	–
	20	32±0.17	90
	39	48±0.15	87
	59	64±0.19	85
น้ำส้มบรรจุ กล่อง 100%	0	19±0.11	–
	20	35±0.09	80
	39	56±0.17	95
	59	76±0.13	97

อภิปรายผล

ในงานวิจัยได้ทำการตรวจวัดวิตามินซีด้วยขั้วไฟฟ้ากลาสลิคาร์บอน ซึ่งวิธีการตรวจวัดง่ายและไม่ยุ่งยากในการประยุกต์ตรวจวัดในตัวอย่างน้ำผลไม้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์โพสเฟตบัฟเฟอร์ pH ที่ใช้ในการตรวจวัดให้ผลของกระแสในการตรวจวัดสูงสุด คือ pH 6.0 ตรงกับงานวิจัยของ Razmi & Bahadori (Razmi & Bahadori, 2021) ซึ่งใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าในการตรวจวัดวิตามินซีเช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดกับผลงานวิจัยที่ผ่านมา ดังตารางที่ 2 พบว่า การตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีที่รวมกับการคนสารละลายตลอด การตรวจวัดบนขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน พบว่า มีความไวในการตรวจวัดที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าชนิดเดียวกันของงานวิจัยของกลุ่มนักวิจัยสุนันทา (Thakthuang et al., 2021) ที่ตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี เหตุผลเนื่องมาจากการกระแสที่ได้จากการตรวจวัดของงานวิจัยนี้มาจากการแพร่ (Diffusion current) รวมกับกระแสจากการคนสารละลาย (Convection current) เพื่อพาวิตามินซีเข้ามาผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ามากขึ้นส่งผลเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวิตามินซีมีการให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ทำให้เกิดกระแสแอโนดิกได้มากกว่าเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี ซึ่งกระแสแอโนดิกที่ได้จะมีเพียงกระแสจากการแพร่ของวิตามินซีเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ทำให้ความไวของการตรวจวัดวิตามินซีด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีที่มีการคนสารละลายตลอดเวลาสูงกว่าเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง ความไว และขีดจำกัดในของ การตรวจวัดวิตามินซีของงานวิจัยที่ผ่านมา

ขั้วไฟฟ้า	เทคนิคการตรวจวัด	ช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง	ความไวในการตรวจวัด	ขีดจำกัดในการตรวจวัด	อ้างอิง
Pt disc	CV	0.1–10 mM	6.391 $\mu\text{A}/\text{mM}$	–	(Pisoschi et al., 2008)
GCE/CNO– $\text{NiMnO}_4 \cdot \text{MnWO}_4$	DPV	1–100 μM	0.1768 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0.33 μM	(Saleh Mohammadnia et al., 2020)
CFYM/OCPE	DPV	9.9–280.5 μM	2.1969 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	5.95 μM	(Razmi & Bahadori, 2021)
GCE	Chronoamperometry	10 – 340 μM	1.72 $\mu\text{A}/\text{mM}$	3 μM	(Thakthuang et al., 2021)
GCE	Amperometry	10 – 266 μM	4.78 $\mu\text{A}/\text{mM}$	1.41 μM	งานวิจัยนี้

หมายเหตุ CFYM คือ The chicken feet yellow membrane
 OCPE คือ The over-oxidized carbon paste electrode
 GCE คือ Glassy carbon electrode
 CNO คือ Carbon nanoonions
 DPV คือ Differential pulse voltammetry
 CV คือ Cyclic voltammetry

ในการวิจัย พบว่า สามารถตรวจวัดวิตามินซีในตัวอย่างที่เป็นน้ำผลไม้ได้ดี แนวทางในการพัฒนาการตรวจวัดตัวอย่างควรนำตัวอย่างชนิดอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดวิตามินซีต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการตรวจวัดวิตามินซีอย่างง่ายด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์ มีขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน สามารถตรวจวัดได้ในช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10–266 ไมโครโมลาร์ ด้วยความไวในการตรวจวัด 4.78 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ และสามารถประยุกต์ตรวจวัดวิตามินซีได้ในตัวอย่างน้ำผลไม้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประเภทรายการวิจัยเพื่อพัฒนาการเรียนการสอนวิธีใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2564 สัญญาทุนเลขที่ RDI-2-64-5 ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ฉัตรชัย ยมศรีเคน. (2562) การวินิจฉัยและการรักษาภาวะอ่อนแรงผู้ป่วยโรคขาดวิตามินซี (โรคลักปิดลักเปิด): รายงานผู้ป่วย 2 ราย ในโรงพยาบาลมหาสารคาม. **วารสารโรงพยาบาลมหาสารคาม**, 16(2), 62–71.
- El-Malla, S.F., Elattar, R.H., Kamal, A.H., & Mansour, F.R. (2022). A highly sensitive switch-on spectrofluorometric method for determination of ascorbic acid using a selective eco-friendly approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 270, 120802.
- Fontannaz, P., Kiling, T., & Heudi, O. (2006). HPLC–UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. **Food Chemistry**, 94(4), 626–631.
- Garnero, C., & Longhi, M. (2010). Development of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine as photostabilizing agents. **Analytica Chimica Acta**, 659(1), 159–166.
- Indrayanto, G. (2018). Validation of chromatographic methods of analysis: application for drugs that derived from herbs. **Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol**, 43, 359–392.
- Klimczak, I., & Gliszczynska-Swiglo, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, 175, 100–105.

- Konieczka, P. (2007). The role of and the place of method validation in the quality assurance and quality control (QA/QC) system. **Critical Reviews in Analytical Chemistry – CRIT REV ANAL CHEM**, **37**, 173–190.
- Li, H., Zhou, Y., & Du, J. (2022). Ascorbic acid as an alternative coreactant for luminol reaction and sensitive chemiluminescence determination of ascorbic acid in soft drinks. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, **429**, 113945.
- Pisoschi, A.M., Danet, A.F., & Kalinowski, S. (2008). Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, **2008**, 937651.
- Razmi, H., & Bahadori, Y. (2021). Chicken feet yellow membrane/over-oxidized carbon paste electrodes: A novel electrochemical platform for determination of vitamin C. **Microchemical Journal**, **168**, 106442.
- Saleh Mohammadnia, M., Marzi Khosrowshahi, E., Naghian, E., Homayoun Keihan, A., Sohoul, E., Plonska-Brzezinska, M. E., Ali-Sobhani, N., Rahimi, M., & Ahmadi, F. (2020). Application of carbon nanooxide–NiMoO₄–MnWO₄ nanocomposite for modification of glassy carbon electrode: Electrochemical determination of ascorbic acid. **Microchemical Journal**, **159**, 105470.
- Saranchina, N.V., Damzina, A.A., Gavrilenko, N.A., Volgina, T.N., Ermolaev, Y.E., Polonskaya, M.S., & Gavrilenko, M.A. (2022). Rapid colorimetric determination of ascorbic acid by solid phase extraction of iodine into a polymethacrylate matrix. **Mendeleev Communications**, **32**(1), 136–138.
- Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J.S., & Castilho, P.C. (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC–PDA vs iodometric titration as analytical methods. **LWT – Food Science and Technology**, **50**(2), 489–495.
- Suntornsuk, L., Gritsanapun, W., Nilkamhank, S., & Paochom, A. (2002). Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **28**(5), 849–855.
- Thakthuang, S., Sopaporn, P., Meksun, S., Chitbuengphrao, A., Pinwattana, K., & Preechaworapun, A. (2021). Determination of ascorbic acid in juices using the chronoamperometry. **PSRU Journal of Science and Technology**, **6**(1), 1–12.
- Uğur, H., Çatak, J., Mızrak, Ö.F., Çebi, N., & Yaman, M. (2020). Determination and evaluation of in vitro bioaccessibility of added vitamin C in commercially available fruit-, vegetable-, and cereal-based baby foods. **Food Chemistry**, **330**, 127166.