ว. กรมวิทย. พ. 2541. 40 (3) : 347-357

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารบางชนิดโดยวิธี HPLC

Determination on Vitamin C in Some Kinds of Food by HPLC

นิภาภรณ์ ลักษณ์สมยา
กองอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Niphaporn Lakshanasomya
Division of Food
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาและทดสอบการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ที่ง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำและความถูกต้องสูง ในอาหารชนิดต่างๆ เช่นนมผงดัดแปลงสำหรับทารก อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และอาหารต่างๆที่เสริมวิตามินซี เช่น น้ำผลไม้ ลูกอม และไอศกรีม ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) จากการทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นช่วง 200-1400 ไมโครกรัมต่อกรัมในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก ที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อกรัมในน้ำผลไม้ ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อกรัมในอาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อกรัมในลูกอมกลิ่นผลไม้ ได้ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพวิธี (% recovery) ร้อยละ 96.67±2.76, 99.93±1.76, 103.23±2.09 และ 102.45±3.45 ร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%CV) มีค่า 2.85, 1.76, 2.02 และ 3.46 ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และพื้นที่พีคเป็นเส้นตรงในช่วงของความเข้มข้น 2.5-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ กับวิธีการไตเตรท ของ AOAC ค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คืออัตราส่วนของค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC กับวิธี AOAC มีค่าเท่ากับ 0.9314 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (pooled standard deviation,Sp) ของ วิธี HPLC และวิธี AOAC มีค่าเท่ากับ 1.49 และ 1.89 ตามลำดับ

ABSTRACT

Vitamin C in various food matrixes such as infant formula, supplementary food for infant and children, fortified juice, candies and ice cream is determined by reversed-phase liquid chromatography (HPLC) with UV detection. The method is simple, rapid and accurate. The percentage recoveries by adding the standard at the concentration of 200-1400 μg/g in infant formula 200 and 400 μg/g in fortified juice , 500 μg/g in supplementary food for infant and children and 1000 μg/g in fortified candy were 96.67±2.76, 99.93±1.76, 103.23±2.09 and 102.45±3.45, respectively . The coefficient of variation (%CV) were 2.85, 1.76, 2.02 and 3.46, respectively. The relationship between the concentration of vitamin C and peak area was linear in the range of 2.5-30 μg /ml (r = 0.9999).The comparison of results which analysed by HPLC method and AOAC titrimetric method showed good agreement. The pooled standard deviation (Sp) of HPLC method and AOAC titrimetric method were 1.49 and 1.89, respectively.

Keywords : vitamin C , food , HPLC

บทนำ

วิตามินซีนอกจากจะเป็นสารสำคัญในการป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน ยังมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็งพวกไนโตรซามีน ซึ่งเกิดในอาหารพวกเนื้อหมักด้วยเกลือไนเตรทและไนไตรท์ เช่น แหนม ไส้กรอก เนื้อแดดเดียว และอาจเกิดในกระเพาะอาหารได้โดยตรง โดยการรวมตัวของไนไตร์ทกับสารประเภทเอมีน[1] และเนื่องจากคุณสมบัติที่ดีของวิตามินซีในการเป็นสารป้องกันการอ๊อกซิไดซ์ จึงคอยกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) ที่จะไปทำลายเซลล์ และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ทำให้เซลล์นั้นถูกทำลาย หรือมีการเจริญเติบโตผิดปกติ ทำให้เกิดมะเร็งได้ ปกติร่างกายของเราจะมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระโดยมีเอนไซม์บางชนิดเช่น glutathione peroxidase, superoxide dismutase และวิตามินบางชนิดเช่น วิตามินซี วิตามินอี และ เบต้าแคโรทีน คอยกำจัดอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกาย แต่ในปัจจุบันโดยเฉพาะในเมืองใหญ่ มีปัจจัยหลายอย่างได้แก่ แสงแดด ความร้อน มลพิษต่างๆ เช่น ควันบุหรี่ ทำให้ร่างกายเราได้รับอนุมูลอิสระ ในปริมาณมากเกินกว่าระบบป้องกันของร่างกายจะกำจัดได้หมด การรับประทานอาหารที่มีวิตามินซีสูง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการเกิดมะเร็งอันมีสาเหตุมาจากอาหาร แสงแดด และมลพิษจากสิ่งแวดล้อม[2]

วิตามินซีพบมากในพืช ผัก และ ผลไม้ ต่างๆ เช่น ฝรั่ง ใบชา และผลไม้ตระกูลส้ม[2] แต่การเก็บรักษาและกรรมวิธีต่างๆในการผลิตและถนอมอาหาร ทำให้เกิดการสูญเสียวิตามินซี ประกอบกับผู้บริโภคสนใจในสุขภาพของตนเองมากขึ้น จึงเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ ที่มีคุณค่าทางอาหารซึ่งแสดงไว้ที่ฉลากโภชนาการ บริษัทผู้ผลิตจึงนิยมเติมวิตามินต่างๆ โดยเฉพาะวิตามินซีในขบวนการผลิต นอกจากนี้อาหารควบคุมบางชนิดเช่นนมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก อาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก ซึ่งเป็นอาหารควบคุมเฉพาะตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 156 (พ.ศ. 2537)[3] และฉบับที่ 157 (พ.ศ. 2537)[4] ตามลำดับ ได้กำหนดให้อาหารดังกล่าวต้องมีปริมาณวิตามินซีในรูปของ กรดแอล-แอสคอร์บิค ไม่น้อยกว่า 8 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 กิโลแคลอรี่ ดังนั้นผู้ผลิตจึงจำเป็นต้องเติมวิตามินซีในขบวนการผลิตเพื่อให้อาหารดังกล่าวได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

การวิเคราะห์วิตามินซีในอาหารนิยมใช้วิธี 2,6 dichloroindophenol titrimetric method [5] ซึ่งเป็นวิธีที่องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S.FDA) กำหนดให้เป็นวิธีหนึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีตามฉลากโภชนาการ [6] วิธีการไตเตรทนี้ ถึงแม้จะเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือการไตเตรทมองเห็นจุดยุติไม่ชัดเจน เนื่องจากจุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน และคงอยู่ภายใน 5 วินาที ทำให้การวิเคราะห์ได้ค่าที่ไม่ถูกต้อง โดยเฉพาะในตัวอย่างที่มีสี เช่น อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็กชนิดผักและผลไม้ และในอาหารรสผลไม้ต่างๆ ซึ่งผู้ผลิตจะเติม สีและกลิ่นเลียนแบบธรรมชาติ เช่น ไอศกรีม ลูกอม เป็นต้น นอกจากนี้การไตเตรทยังมีการรบกวนของ reducing agent ต่างๆเช่น phenolics sulphites และ divalent cations เช่น cuprous , ferrous และ stannous ions สารพวกนี้จะมีมากในพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช [7] ทำให้การไตเตรทได้ค่าสูงกว่าปกติ วิธีอื่นๆ ที่ใช้หาปริมาณวิตามินซีเช่น microfluorimetry[5], gas chromatography[8] และ การใช้ enzyme[9] มักจะเกิดปัญหาอย่างใดอย่างหนึ่งเช่น มีสารรบกวนในปฏิกิริยา การเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก และการวิเคราะห์ใช้เวลานาน สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ส่วนใหญ่จะใช้ระบบ reverse phase ion - pairing ที่ pH ต่างๆ เช่น วิธีของMoledina และคณะ[7], Kneifel และคณะ[10], Augustin และ คณะ[11] จากสภาวะเครื่องมือและวิธีการดังกล่าวยุ่งยาก ไม่เหมาะกับงานวิเคราะห์ที่ทำเป็นประจำโดยทั่วๆ ไป ประกอบ

กับผู้เขียนมีโอกาสฝึกงานด้านการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารของ Institute of Food Preservation เมือง Neumunster ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน เห็นว่าวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของสถาบันนี้ เป็นวิธีที่ง่าย โครมาโตแกรมที่ได้มีความจำเพาะสูง ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จึงได้ศึกษาและทดสอบวิธีวิเคราะห์ โดยทดสอบความแม่นยำ (precision) ประสิทธิภาพของวิธี (accuracy) ช่วงความเข้มข้นที่กราฟเป็นเส้นตรง (linearity) ความจำเพาะ (specificity) และเปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับวิธีไตเตรทของ AOAC เพื่อศึกษาถึงความเหมาะสมในการที่จะนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ ในงานประจำของกองอาหาร ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ 3% (w/v) meta phosphoric acid สกัดวิตามินซีออกจากอาหาร แทนการใช้ 3.5% (v/v) phosphoric acid และตัวตกตะกอน Carrez 1 (15% potassium hexacyanoferrate ในน้ำ), Carrez 2 (30% zinc sulphatte ในน้ำ) ตามวิธีของสถาบันแห่งนี้ เนื่องจากพบว่าการใช้ 3% meta phosphoric acid สกัดวิตามินซีออกจากอาหารที่ใช้ทดสอบนี้ ไม่จำเป็นต้องใช้สารละลาย carrez 1 และสารละลาย Carrez 2 ตกตะกอนตัวอย่าง ทำให้การเตรียมตัวอย่างง่าย สะดวกและรวดเร็วขึ้น

วัตถุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้เป็นชนิด Analytical Reagent Grade ได้แก่

3%(w/v) meta-phosphoric acid

0.35%(v/v) ortho-phosphoric acid

3mM potassium dihydrogen phosphate in 0.35%(v/v) ortho- phosphoric acid : ละลาย 0.408 g. KH_2PO_4 ใน 0.35%(v/v) ortho-phosphoric acid

สารมาตรฐาน : L- ascorbic acid (Sigma) ความบริสุทธิ์ มากกว่าร้อยละ 99 โดยวิธี Thin Layer Chromatography.

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph ของ Water ประกอบด้วย pump model 510, injector fixed volume 20 µl, UV detector model 481 , integrator : data module740

Column 5 µm Lichrocard Lichrospher 100 RP 18 (Mercks) ขนาด 125 x 4 mm

Ultrasonic bath

Calibrated volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

สภาวะเครื่องมือ

Mobile phase ใช้ 0.3 mM KH_2PO_4 ใน 0.35% (v/v) H_3PO_4, flow rate 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที , UV detector ที่ 248 นาโนเมตร

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างอาหารและการวิเคราะห์

1. ของแข็ง: ชั่งตัวอย่างอาหารซึ่งบดละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันประมาณ 2.5 กรัม (ให้มีวิตามินซีประมาณ 0.5-2.5 มิลลิกรัม) ละลายด้วย 3% m-phosphoric acid ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 2 นาที sonicate ใน ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย 3% m-phosphoric acid กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 4 แล้วกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์โดย HPLC

2. ของเหลว :ชั่งตัวอย่างซึ่งผสมเข้ากันดีแล้วประมาณ 2.5กรัม (ให้มีวิตามินซีประมาณ 0.5-2.5 มิลลิกรัม) ในvolumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 3% m-phosphoric acid กรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์โดย HPLC

การคำนวณ

ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{A_2 x C_1 x V}{A_1 x 10 x W}$$

A_1 = *พื้นที่พีค (peak area) ของสารละลายมาตรฐาน*
C_1 = *ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)*
A_2 = *พื้นที่พีค (peak area) ของตัวอย่าง*
V = *ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)*
W = *น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)*

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของวิตามินซี (L-ascorbic acid) โดยชั่งสารมาตรฐานวิตามินซี 0.1 กรัมใน calibrated volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 3% meta-phosphoric acid ปิเปตสารละลายมาตรฐานนี้มา 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร ลงในcalibrated volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 3% meta- phosphoric acid สารละลายนี้มีความเข้มข้นของวิตามินซี 2.5, 5.0, 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดย HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายวิตามินซีและพื้นที่พีค

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี (Accuracy)

ทดสอบในตัวอย่าง 4 ชนิดคือ นมผงดัดแปลงสำหรับทารก น้ำผลไม้ อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และลูกอมกลิ่นผลไม้ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานของวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่ระดับความเข้มเข้น 200, 350, 700 และ 1400 ไมโครกรัมต่อกรัม ในนมผงดัดแปลงสำหรับทารกที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อกรัม ในน้ำผลไม้ ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อกรัม ในอาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อกรัมในลูกอมกลิ่นผลไม้ เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่กล่าวมา ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ รายงานค่า accuracy ในรูปของ % recovery ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$\%\text{recovery} = \frac{100\ (a-b)}{c}$$

a = ปริมาณวิตามินซีที่ตรวจพบในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ไมโครกรัมต่อกรัม)

b = ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างอาหาร (ไมโครกรัมต่อกรัม)

c = ปริมาณวิตามินซีที่เติมในตัวอย่างอาหาร (ไมโครกรัมต่อกรัม)

การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ทดสอบในตัวอย่างอาหาร 3 ชนิดคือ นมผงดัดแปลงสำหรับทารก ไอศกรีม และ น้ำผลไม้ เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามขั้นตอน 5 ซ้ำ รายงานผลในรูปของค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (coefficient of variation ,%CV)

ผล

จากการทำ linearity พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานระหว่าง 2.5 – 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงกับพื้นที่พีค ดังแสดงในรูปที่1 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เป็น 0.9999 และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ ในตัวอย่างนมผงดัดแปลงสำหรับทารกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้น 200, 350, 700 และ 1400 ไมโครกรัมต่อกรัม พบว่าค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพวิธี (% recovery) มีค่า 97.13±4.38, 97.47±2.98 , 95.67 ±2.77 และ 96.42±1.82 ร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation,%CV) มีค่า 4.51, 3.05, 2.90 และ 1.89 ตามลำดับ ประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ระดับความเข้มข้นของวิตามินซี ที่

เติม 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อกรัม มีค่า 99.40±2.16 และ 100.47±1.50 ร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน เท่ากับ 2.17 และ 1.49 ตามลำดับ ในอาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก ที่ระดับความเข้มข้นของวิตาซีที่เติม 500 ไมโครกรัมต่อกรัม และในลูกอมกลิ่นผลไม้ ที่ระดับความเข้มข้นของวิตามินซีที่เติม 1000 ไมโครกรัมต่อกรัม มีค่า 103.23±2.09 และ 102.45±3.45 ร้อยละสัมประสิทธิ์ ของความแปรปรวนเท่ากับ 2.02 และ 3.46 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ วิตามินซี ในอาหารที่ความเข้มข้นที่เติมต่างๆกัน โดยทำการวิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ชนิดอาหาร	สารละลายมาตรฐานที่เติม (ไมโครกรัมต่อกรัม)	% recovery (mean± SD)	%CV
นมผงดัดแปลงสำหรับทารก	200	97.13 ±4.38	4.51
	350	97.47± 2.98	3.05
	700	95.67± 2.77	2.90
	1400	96.42±1.82	1.89
	ค่าเฉลี่ย	96.67 ±2.76	2.85
น้ำผลไม้	200	99.40 ± 2.16	2.17
	400	100.47 ± 1.50	1.49
	ค่าเฉลี่ย	99.93 ± 1.76	1.76
อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก	500	103.23 ±2.09	2.02
ลูกอมกลิ่นผลไม้	1000	102.45 ±3.45	3.46

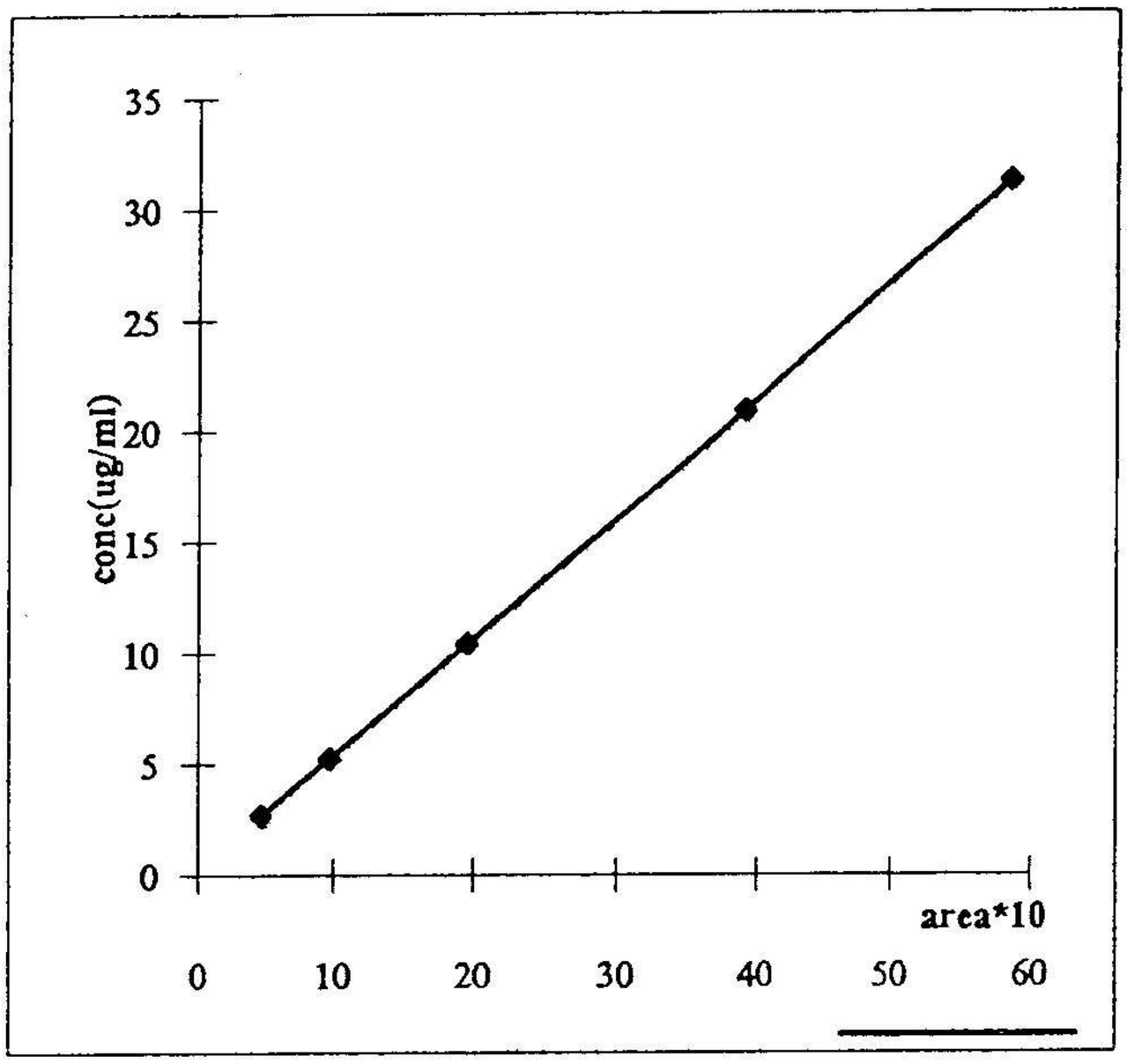
area *10^5	conc (ug/ml)
4.82	2.6
9.85	5.19
19.63	10.38
39.29	20.76
58.62	31.14

สมการเส้นตรง y = 0.03+1.88x

r = 0.9999

intercept = 0.03

slope = 1.88



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีและพีนทีของพีค

เมื่อนำนมผงดัดแปลงสำหรับทารก ไอศกรีมรสผลไม้ผสมวิตามินซี และน้ำผลไม้ มาทดสอบความแม่นยำ ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เท่ากับ 0.55, 1.26 และ 0.08 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน เท่ากับ 1.24 , 3.91 และ 0.87 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่2

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์วิตามินซีในอาหาร โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

ชนิดอาหาร	ปริมาณวิตามินซี(มก./100ก.) mean±SD	%CV
นมผงดัดแปลงสำหรับทารก	44.33 ±0.55	1.24
ไอศกรีมรสผลไม้ผสมวิตามินซี	32.33±1.26	3.91
น้ำผลไม้	8.89± 0.08	0.87

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารต่างๆ 14 ตัวอย่าง โดยวิธี HPLC เทียบกับวิธี ไตเตรทตามวิธีของ AOAC พบว่าอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยของวิธี HPLC กับวิธีไตเตรทมีค่าเท่ากับ 0.9314 โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient , r) เท่ากับ 0.9870 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (pooled standard deviation, Sp) ของวิธี HPLC และ วิธีไตเตรท มีค่าเท่ากับ 1.49 และ 1.89 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์วิตามินซีในอาหารโดย HPLC ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้อย จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 96.67±2.76, 99.93±1.76, 103.23 ±2.09 และ 102.45/3.45 ร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation,%C V) มีค่า 2.85, 1.76, 2.02 และ 3.46 ในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก น้ำผลไม้ อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และในลูกอมกลิ่นผลไม้ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 แสดงว่าวิธีนี้มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ไม่มีการรบกวนของสารอื่นโดยพิจารณาจากโครมาโตแกรมของวิตามินซีในอาหารต่างๆ ดังแสดงในรูปที่2

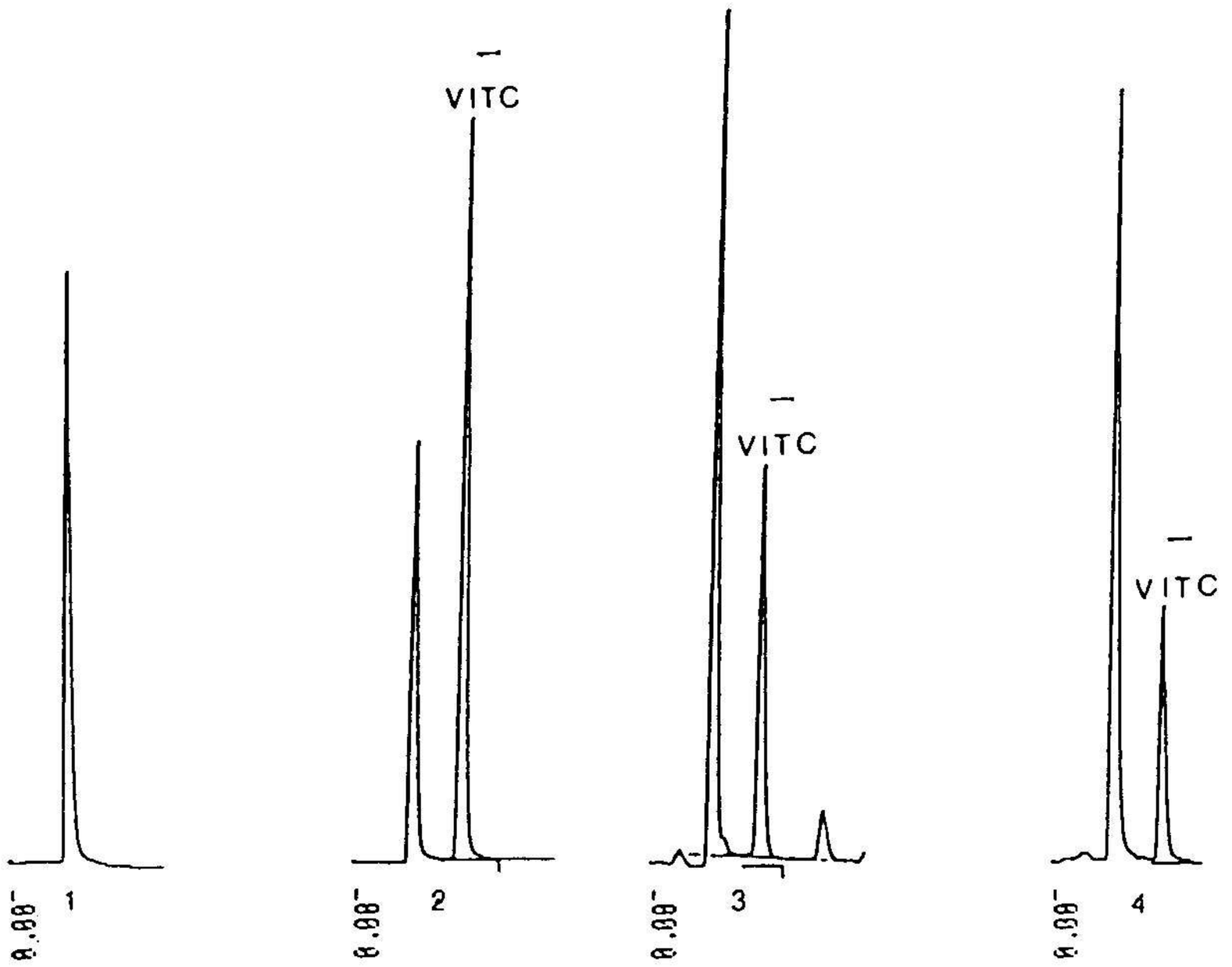
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในอาหารต่างๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC และวิธีไตเตรทของ AOAC ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 3 พบว่าวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กันสูง คือมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9870 อัตราส่วนค่าเฉลี่ยวิตามินซีของวิธี HPLC และวิธี AOAC มีค่า 0.9314 โดยที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (pooled standard deviation, Sp) ของวิธี HPLC และวิธีไตเตรทของ AOAC มีค่าเท่ากับ 1.49 และ 1.89 ตามลำดับ แสดงว่าค่าที่ได้จากวิธี HPLC เชื่อถือได้และมีความแม่นยำสูงกว่าวิธีไตเตรทของ AOAC เมื่อพิจารณาตามชนิดอาหาร จะเห็นว่าปริมาณวิตามินซีในอาหารเมื่อตรวจโดยวิธี HPLC จะได้ค่าต่ำกว่า วิธีของ AOAC ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moledina และคณะ[7] สาเหตุที่ทำให้การไตเตรทได้ค่ามากคือการมองเห็นจุดยุติไม่ชัดทำให้การไตเตรทเกินจุดยุติ (over titration) และในตัวอย่างมี reducing agent ตัวอื่นที่ทำปฏิกิริยากับ 2,6 dichloroindophenol เช่นเดียวกับวิตามินซี สำหรับตัวอย่างซอสพริกเขียว (jalapeno sauce) ปริมาณวิตามินซีโดยวิธี HPLC ต่ำกว่าวิธี AOAC ประมาณ 20% ทั้งนี้คงเนื่องมาจากในตัวอย่างนี้มี reducing agent ต่างๆ อยู่มาก เช่น sulphydryls, phenolics, sulphites และ diva-

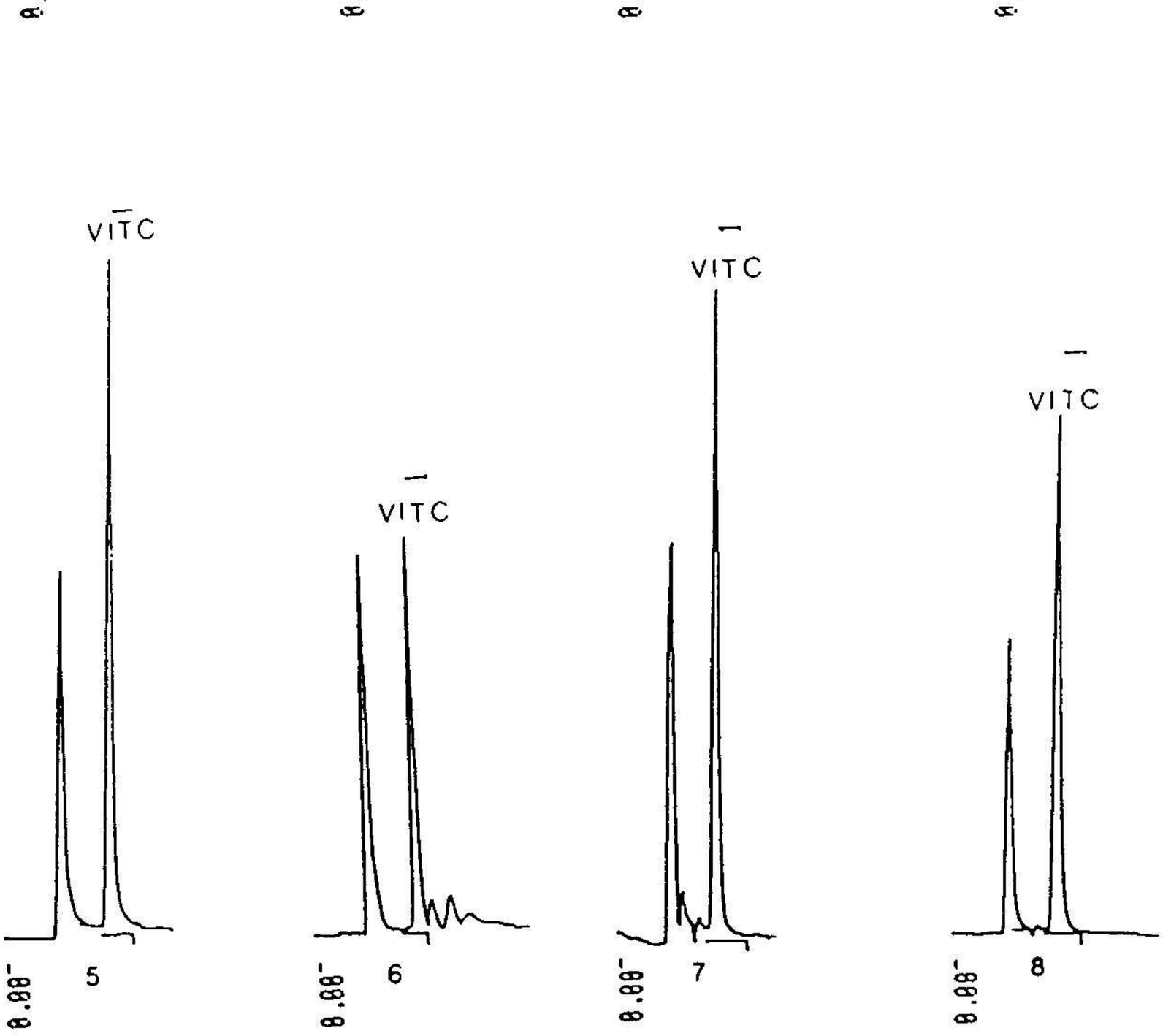
lent cations เช่น cuprous, ferrous และ stannous ion ซึ่งมีอยู่มากในพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช[7] สารพวกนี้ถูกสกัดออกมาพร้อมกับวิตามินซีทำให้การไตเตรทได้ค่ามากกว่าปกติ ปริมาณวิตามินซีที่คำนวณได้จึงสูงกว่าความเป็นจริง

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในอาหาร (มก./100ก) โดยวิธี HPLC และวิธีAOAC(ไตเตรท) วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

No	ชนิดอาหาร	ปริมาณวิตามินซี,มก./100ก.(mean±SD)		(HPLC/AOAC) ×100
		HPLC	AOAC	
1	นมผงดัดแปลงสำหรับทารก เบอร์1	42.1 ± 0.70	46.12± 0.43	91. 71
2	นมผงดัดแปลงสำหรับทารก เบอร์2	87.87 ± 0.60	91.67± 0.35	95.86
3	นมผงดัดแปลงสำหรับทารก เบอร์3	56.31± 0.08	65.60±0.53	85.75
4	นมผงดัดแปลงสำหรับทารก เบอร์4	53.73± 0.65	60.30 ±1.07	89.11
5	นมผงดัดแปลงสำหรับทารก เบอร์5	44.01± 0.24	45.00 ±0.72	97.80
6	นมผงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารก	74.93 ±1.68	74.77±1.30	100.21
7	ลูกอมอัดเม็ดกลิ่นสับปะรดผสมวิตามินซี	67.53 ±2.55	73.08 ±2.12	92.41
8	ลูกอมอัดเม็ดกลิ่นบ๊วยผสมวิตามินซี	43.90 ±3.08	52.18± 3.31	84.13
9	ลูกอมอัดเม็ดกลิ่นเลมอนผสมวิตามินซี	46.24± 2.32	55.97± 3.73	82.61
10	ลูกอมอัดเม็ดกลิ่นสตรอเบอร์รี่ผสมวิตามินซี	44.60± 0.74	44.31± 3.85	100.66
11	ซอสพริกเขียว(Jalapeno sauce)	11.22± 0.12	14.23± 0.15	78.84
12	แยมผสมวิตามินซี	40.26 ±1.47	39.64± 0.43	101.56
13	น้ำผลไม้ผสมวิตามินซีเบอร์ 1	70.15 ±1.62	70.51 ±1.24	99.48
14	น้ำผลไม้ผสมวิตามินซีเบอร์ 2	6.26± 0.20	6.41 ±0.15	97.61
	mean± Sp* =	49.24± 1.49	52.85 ±1.89	93.14
Correlation coefficient, r = 0.9870				

*** Sp = pooled standard deviation**

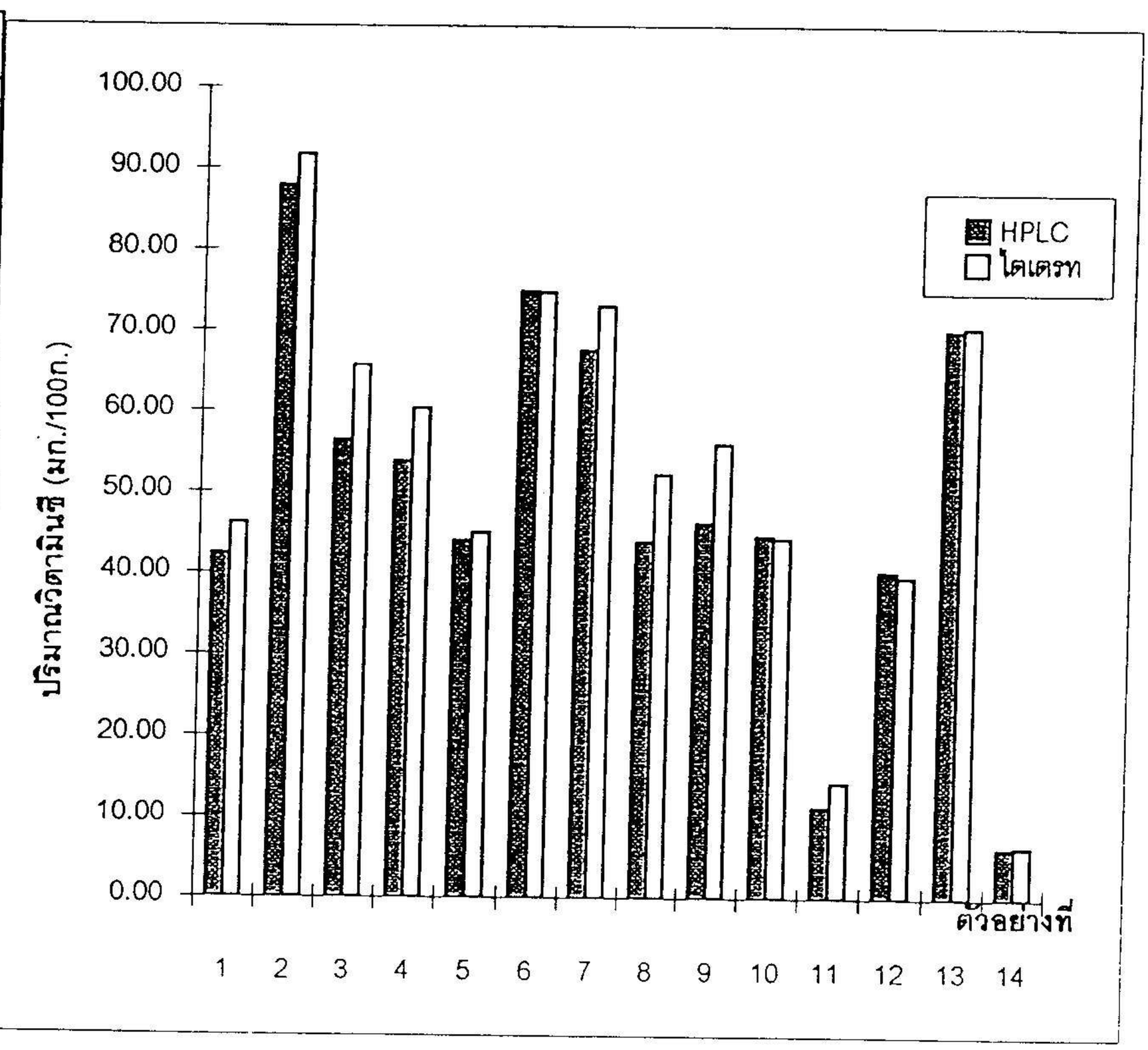




รูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของวิตามินซีในอาหารต่างๆ 1. Mobile phase (3% metaphosphoric acid) 2. Standard L-ascorbic 3. นมผงดัดแปลงสำหรับทารก 4. อาหารเสริมสำหรับเด็ก (สูตรถั่วเหลือง) 5. อาหารเสริมชนิดผลไม้สำหรับเด็ก 6. ซอสพริก (Jalapeno sause) 7. แยมผลไม้ 8. ไอศกรีมรสผลไม้

HPLC	ไตเตรท
42.30	46.12
87.87	91.67
56.31	65.66
53.73	60.30
44.01	45.00
74.93	74.77
67.53	73.08
43.90	52.18
46.24	55.97
44.60	44.31
11.22	14.23
40.26	39.64
70.15	70.51
6.26	6.41

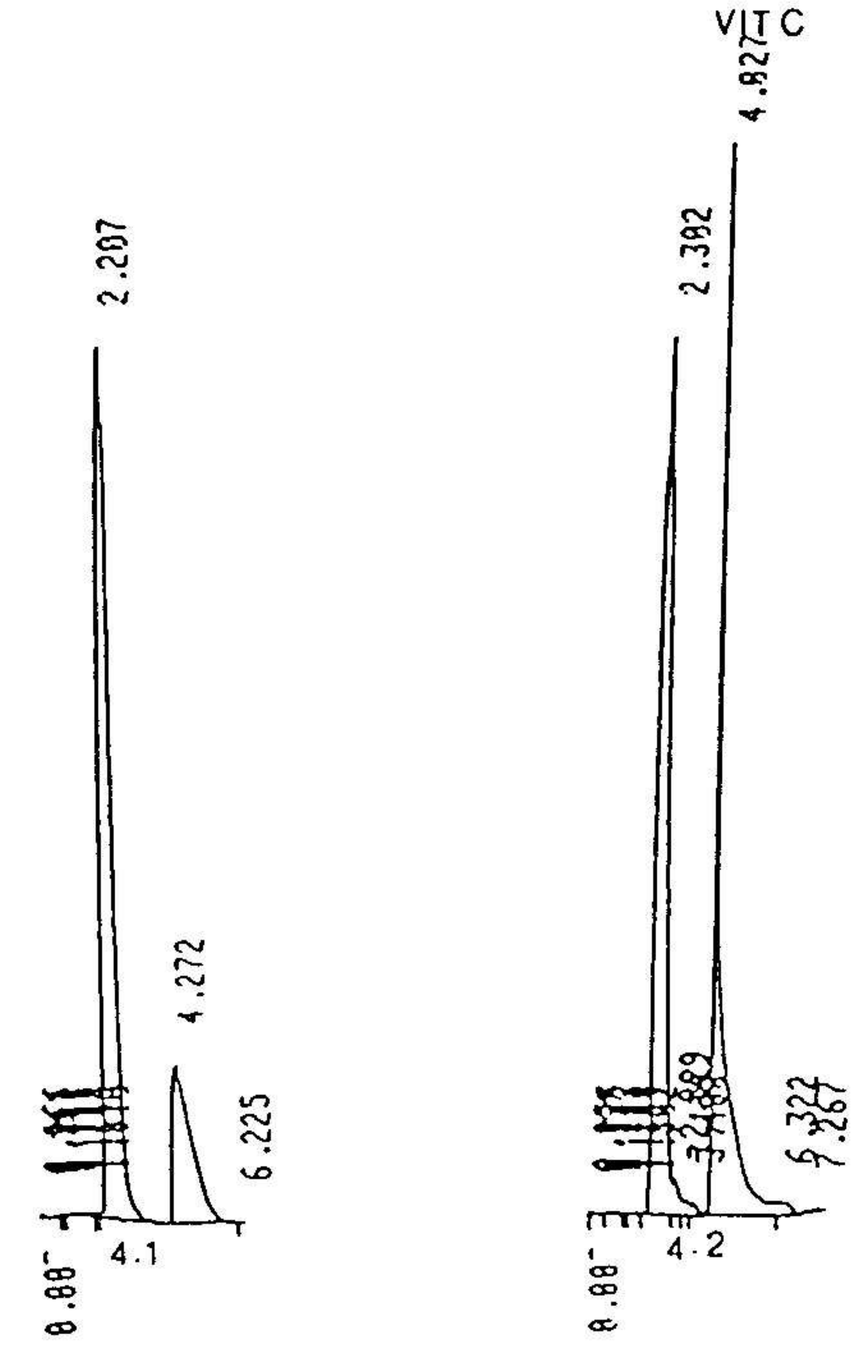
r=0.9870



รูปที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีในอาหาร (มก./100 ก.) โดยวิธี HPLC และวิธีไตเตรท

เนื่องจากวิตามินซีในอาหาร เป็นสารที่สลายตัวได้ง่าย อัตราเร็วของการสลายตัวขึ้นกับ ปริมาณอ๊อกซิเจน อุณหภูมิของการเก็บรักษา และองค์ประกอบของอาหารชนิดนั้นๆ [2] จึงควรทำการวิเคราะห์ให้เร็วที่สุดหลังจากได้รับตัวอย่าง อาหารทั่วๆไปเช่น น้ำผลไม้ แยม ซอสพริก และลูกอมอัดเม็ด sample holding time ไม่ควรเกิน 1 สัปดาห์ อาหารที่มีการบรรจุภายใต้แก๊สไนโตรเจน เช่นนมผงดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก อาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก sample holding time ไม่ควรเกิน 3 สัปดาห์ ตัวอย่างควรห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้ถูกแสง เก็บในตู้เย็นและไม่เปิดภาชนะบรรจุจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ควรทำอย่างรวดเร็ว จากการทดลองของ Moledina และคณะ[7] พบว่าสารสกัดของสารมาตรฐานวิตามินซีใน meta-phosphoric acid เมื่อเก็บในตู้เย็นจะคงตัวอยู่ประมาณ 6 ชั่วโมง แต่สารสกัดวิตามินซีของตัวอย่างจะคงตัวอยู่ได้ประมาณ 4 ชั่วโมง ดังนั้นในการวิเคราะห์เมื่อสกัดวิตามินซีออกจากอาหารแล้วควรทำการวิเคราะห์ต่อทันที

ในกรณีที่ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ต่อได้ทันที ให้เก็บสารสกัดวิตามินซีไว้ในตู้เย็นไม่เกิน 4 ชั่วโมง Dodson และคณะ[12] รายงานว่าการใช้ 3% meta-phosphoric acidใน 8% acetic acid สกัดวิตามินซีจากอาหารตามวิธีการไตเตรทของ AOAC[5] วิตามินซีในสารสกัดนี้เมื่อเก็บในตู้เย็นจะคงตัวอยู่ประมาณ 24 ชั่วโมง แต่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า acetic acid จะรบกวนโครมาโตแกรมของวิตามินซีในการตรวจวัดด้วย UV detector ดังแสดงในรูปที่4 ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ 3% meta- phosphoric acid สกัดวิตามินซีออกจากอาหาร และควรหลีกเลี่ยงการใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารที่มี acetic acid เป็นส่วนประกอบหลัก



รูปที่4 โครมาโตแกรมของ 4.1 Solvent 3% meta-phosphoric acid ใน 8% acetic acid , 4.2 สารมาตรฐาน L-ascorbic acid ใน 3% meta-phosphoric acid in 8% acetic acid

สรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหาร โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Institute of Food Preservation เมือง Neumunster ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความแม่นยำ และความถูกต้องสูง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้อย ประสิทธิภาพของวิธีมีค่าเฉลี่ยถึงร้อยละ 96.67±2.76, 99.93±1.76, 103.23±2.09 และ 102.45± 3.45 ในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก น้ำผลไม้อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และลูกอมกลิ่นผลไม้ ตามลำดับ กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 2.5-30 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (pooled standard deviation, Sp) ของวิธี HPLC มีค่า 1.49 ในขณะที่วิธีวิเคราะห์ด้วยการไตเตรทของ AOAC มีค่า 1.89 แสดงให้เห็นว่า การตรวจวิเคราะห์วิตามินซีในอาหารโดยวิธี HPLC ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือแม่นยำและถูกต้องสูง ควบคุมคุณภาพได้ง่ายกว่า เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในงานประจำของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณอมร วงศ์รักษ์พานิช ที่ให้คำปรึกษา ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Berger,I., Berger,M.R. and Schmahl,D. 1988. The Role of Vitamins in the Prophylaxis and Therapy of Cancer. F.Hoffmann La Roche Co, Ltd., Basle, Switzerland. P.10.
2. Ottaway,P.B. 1993. The Technology of Vitamins in Food. Hartnolls Ltd, Cornwall, Great Britain. P. 14-16,100-101.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 156 (พ.ศ.2537)

เรื่องนมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนพิเศษ 54 ง. ลงวันที่ 16 พฤศจิกายน 2537

4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 157 (พ.ศ.2537) เรื่องอาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนพิเศษ 54 ง.ลงวันที่ 16 พฤศจิกายน 2537
5. Helrich,S.ed. 1990. Official method of analysis of the Association of Official Analytical Chemists,15th ed. Association of Official Analytical Chemists Inc., USA. P.1108-1109.
6. Sullivan,D.M. and Carpenter,D.E. 1993. Methods of Analysis for Nutrition Labelling. AOAC International ,USA. P.567-568.
7. Moledina,K.H.and Flink, J.M. 1982. Determination of ascorbic acid in plant food products by high performance liquid chromatography. J. Lebensm.Wiss.u.Technol. 15(6):351-358.
8. Schlack,J.E., 1974 .Quantitative determination of L-ascorbic acid by gas-chromatography, J.Assoc. Off. Anal. Chem. 57(6) :1346-1348.
9. Anonymous. 1989. Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis using Single Reagents. Boehringer Mannheim GmbH., Germany.P18.
10. Kneifel,W. and Sommer,R. 1985. HPLC-methode zur bestimmung von vitamin C in milch, molke and molkegetranken. Z Lebensm Unters Forsch. 181:107-110. (in German).
11. Augustin,J., Beck,C. and Marousek,G.I. 1981. Quantitative determination of ascorbic acid in potatoes and potato products by high performance liquid chromatography. J Food Science. 46 : 132-136.
12. Dodson,K.Y.,Young,E.R. and Soliman,M.A. 1992. Determination of total vitamin C in various food matrixes by liquid chroma - tography and fluorescence detection. J. AOAC . 75(5):887-890.