



การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบสามมิติ
สำหรับการวัดปริมาณกรดกลูโคนิกในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

DEVELOPMENT OF 3D-MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES
FOR DETERMINATION OF GLUCONIC ACID IN SKINCARE PRODUCTS

โสภิกา ศรีหิรัญ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบสามมิติ
สำหรับการวัดปริมาณกรดกลูโคโนในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF 3D-MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES
FOR DETERMINATION OF GLUCONIC ACID IN SKINCARE PRODUCTS



SOPHIKA SRIHIRUN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบสามมิติ

สำหรับการวัดปริมาณกรดกลูโคสิคในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

ของ

โสภิกา ศรีหิรัญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลละอ อรรถนิมานวงศ์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้ง

ประเสริฐ)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบสามมิติ สำหรับการวัดปริมาณกรดกลูโคเนตในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว
ผู้วิจัย	โสภิกา ศรีหิรัญ
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลละออ รัตนวิมานวงศ์

กรดกลูโคเนตเป็นสารออกฤทธิ์เร่งการผลัดเซลล์ผิว ลดการเกิดริ้วรอย คงความชุ่มชื้น และเป็นบัฟเฟอร์ รักษา pH ที่เหมาะสมต่อสภาพผิวของมนุษย์ งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคเนต ด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบ 3 มิติ (3D-μPADs) ร่วมกับการตรวจวัดความเข้มสี โดยพัฒนา 3D-μPADs 2 รูปแบบ โดยรูปแบบแรกประกอบด้วย μPADs 2 ชั้น ชั้นบนไว้สำหรับเกิดปฏิกิริยาสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu₂ ชั้นล่างไว้สำหรับวัดความเข้มสีสารละลาย Cu-Glu₂ ที่ถูกชะลงมา จากวิธีการดังกล่าวช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 0.3 – 1.0 mol/L ของความเข้มข้นกลูโคเนต มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (n = 10, 3SD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (n = 10, 5SD) เท่ากับ 0.12 mol/L และ 0.20 mol/L ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคเนต 0.5 mol/L (10 ครั้ง) คือร้อยละ 4.80 รูปแบบที่สองประกอบด้วย μPADs 4 ชั้น ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ โดยตรวจวัดสารประกอบเชิงซ้อน Cu – 5-Br-PSAA แทนการตรวจวัด Cu-Glu₂ โดยตรง วิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคเนตได้ในช่วง 3 – 7 mmol/L มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ เท่ากับ 2.25 mmol/L และ 2.86 mmol/L ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของกลูโคเนต 4 mmol/L (10 ครั้ง) เท่ากับร้อยละ 3.68 วิธีการที่พัฒนาขึ้นถูกประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว โดยมีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 81 – 116

คำสำคัญ : กรดกลูโคเนต, อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ, μPADs, ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

Title	DEVELOPMENT OF 3D-MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICES FOR DETERMINATION OF GLUCONIC ACID IN SKINCARE PRODUCTS
Author	SOPHIKA SRIHIRUN
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Nuanlaor Ratanawimarnwong

Gluconic acid is an active substance for exfoliating, anti-aging, moisturizing and maintaining pH which is suitable for human skin. This study aims to develop analytical methods for the determination of gluconic acid using three-dimensional microfluidic paper-based analytical devices (3D- μ PADs) with color intensity detection. Two types of 3D- μ PADs were developed. The first 3D- μ PADs consisted of two layers of μ PADs. The top layer was for allowing the complexometric reaction of Cu-Glu₂ to occur, while the bottom layer was for color intensity detection obtained from an eluting solution containing Cu-Glu₂ complex. The use of method had a linear range of 0.3–1.0 mol/L of gluconate was attained with a limit of detection ($n = 10$, 3SD) and limit of quantitation ($n = 10$, 5SD) of 0.12 mol/L and 0.2 mol/L, respectively. The relative standard deviation of 0.5 mol/L of gluconate ($n=10$) was 4.80%. Later, the second 3D- μ PADs composed of four layers of μ PADs was developed in order to increase the sensitivity of analysis. The detection of Cu – 5-Br-PSAA complex was employed instead of the direct detection of Cu-Glu₂ complex. The developed method could detect amount of gluconate in a range of 3 to 7 mmol/L with a limit of detection and a limit of quantitation of 2.25 mmol/L and 2.86 mmol/L respectively. The relative standard deviation of 4 mmol/L ($n=10$) was 3.68%. The application of the proposed methods of gluconate determination in skin care products was studied and recoveries were found in the range of 81-116%

Keyword : Gluconic acid, Microfluidic paper-based analytical device, μ PADs, Skincare

products



กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์ช่วยเหลืออย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักของปริญญานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ แนวทางในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ชี้ให้เห็นข้อบกพร่อง เพื่อนำไปสู่การแก้ปัญหาและพัฒนางานวิจัยต่อไป รวมถึงให้ความช่วยเหลือในการเขียนปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยตระหนักถึงคุณค่าในงานวิจัย และได้รับประสบการณ์ที่ดีในการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยทราบบ้างและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ตรีบัณฑิต ที่ให้ความอนุเคราะห์มาเป็นประธานในการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะธิดา จิตรตั้งประเสริฐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แพน ทองเรือง และ ดร. ชัชฎาภรณ์ พิณทอง ที่ให้ความกรุณามาร่วมกรรมการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและชี้แนะเพื่อพัฒนาและดำเนินการวิจัยต่อไป

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น อาจารย์จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อการปรับปรุงพัฒนาวิทยานิพนธ์ต่อไป

ขอขอบคุณนางสาวนุชจรินทร์ สนิท นิสิตระดับปริญญาโท สาขาวิชาเคมี หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิวด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัยเพื่อใช้ในการดำเนินการวิจัยนี้ได้อย่างราบรื่น และมีประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ เอาใจใส่และให้ความช่วยเหลือเสมอมา ตลอดจนบุคลากร เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมี ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณทุก ๆ ท่านไว้ ณ โอกาสนี้

และขอขอบคุณเพื่อนนิสิต ตลอดจนครอบครัว และบุคคลรอบข้าง ที่คอยช่วยเหลือ

ผลักดัน ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีที่ดี ช่วยสนับสนุนให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณค่าและประโยชน์จากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อ
ครู อาจารย์ ครอบครัว บิดา มารดา และผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ทุก ๆ ท่าน

โสภิกา ศรีหิรัญ



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของงานวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการดกดูโคนิค	6
1.1 กรดกลูโคนิค	6
1.2 กรดกลูโคนิคในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิว	8
1.3 การตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิค	9
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μPADs)	13
2.1. ความเป็นมาของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	13
2.2. ความหมายและหลักการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	13

2.3 การขึ้นรูปอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	14
2.4. ประเภทของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	16
2.5. การตรวจวัดบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	19
2.6 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษในด้านเคมีวิเคราะห์	21
3. การตรวจวัดปริมาณทองแดง	24
4. ประเด็นของงานวิจัยที่พัฒนา	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	27
1. อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	27
1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	27
1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	28
1.3 การเตรียมสารละลาย	28
2. วิธีดำเนินการวิจัย	31
2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคนิก	31
2.2 การออกแบบและสร้าง μ PADs ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคนิก	33
2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกบน μ PADs	39
2.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกด้วย μ PADs ที่พัฒนาขึ้น	40
2.5 การประยุกต์ใช้ μ PADs ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรด กลูโคนิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง	42
1. การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคนิก	42
1.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2	42

1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเชิงซ้อน Cu – 5-Br-PSAA.....	46
2. การออกแบบและสร้าง μ PADs ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัด กรดกลูโคนิก .	48
2.1 ออกแบบอุปกรณ์ μ PADs	48
2.2 การขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs	50
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิก.....	50
3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu ₂	50
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ 3D- μ PADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA	56
4. การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกด้วย μ PADs ที่พัฒนาขึ้น	63
5. การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว	66
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	69
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	105

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ขั้นตอนการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2	31
ตาราง 2 ลำดับขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคโนคโดย 3D- μPADs 2 ชั้น สำหรับวัด Cu-Glu_2	34
ตาราง 3 ลำดับขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคโนคโดย 3D- μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้ม สีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-5-Br-PSAA	36
ตาราง 4 ขั้นตอนการขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs	38
ตาราง 5 ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี	45
ตาราง 6 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ด้วย 3D- μPADs 2 ชั้น ที่พัฒนาขึ้น สำหรับวัดความเข้มสี Cu-Glu_2 และ 3D- μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มสี Cu - 5-Br-PSAA	66
ตาราง 7 ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วย 3D- μPADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้ม สี Cu-Glu_2	67
ตาราง 8 ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วย 3D- μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้ม สี Cu - 5-Br-PSAA	68

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ (ก) กรดกลูโคนิก (D-Gluconic acid) (ข) กลูโคโนแลคโตน (Glucono-lactone).....	7
ภาพประกอบ 2 (ก) อุปกรณ์ไมโครชิปสำหรับตรวจวัดกลูโคนิก (ข) ปฏิกริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดกลูโคนิก	12
ภาพประกอบ 3 ปฏิกริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดกลูโคนิกบนผิวของอิเล็กโทรด ..	12
ภาพประกอบ 4 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μPADs).....	14
ภาพประกอบ 5 การขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs การพิมพ์ด้วยแสง	15
ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างการขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs การสกรีนด้วยแว็กซ์ (Wax screen printing)	16
ภาพประกอบ 7 ตัวอย่างการใช้ μPADs แบบ 2 มิติที่มีลักษณะเป็นวงกลม	17
ภาพประกอบ 8 ตัวอย่างการใช้ μPADs แบบ 2 มิติที่มีช่องทางการไหลของสารในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ	18
ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างการใช้ μPADs แบบ 3 มิติ เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการอย่างง่าย (Point of care testing)	18
ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างการใช้ μPADs ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเพื่อวิเคราะห์กลูโคสตัวอย่างเลือด	20
ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างการใช้ μPADs ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง (Distance-based μPADs) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณปรอท	21
ภาพประกอบ 12 การขึ้นรูป μPADs แบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ด้วยเครื่องพิมพ์แบบตัดเพื่อตรวจวัดทางการแพทย์.....	22
ภาพประกอบ 13 หลักการตรวจวิเคราะห์ด้วย μPADs แบบ 3 มิติ ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง	23
ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของ 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]aniline (5-Br-PSAA)	25

ภาพประกอบ 15 โครงสร้างของสารประกอบ Cu-Glu ₂	26
ภาพประกอบ 16 (ก) รูปแบบ 2D-μPADs 1 ชั้นสำหรับวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบ Cu-Glu ₂ (ข) การหดยาสารละลายที่ใช้ในการตรวจวัด.....	33
ภาพประกอบ 17 3D-μPADs 2 ชั้น เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบ Cu-Glu ₂	34
ภาพประกอบ 18 3D-μPADs 2 ชั้นเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของ Cu – 5-Br-PSAA.....	35
ภาพประกอบ 19 การพับ 3D-μPADs 4 ชั้นเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของ Cu – 5-Br-PSAA.....	36
ภาพประกอบ 20 สเปกตรัมของสารละลาย CuSO ₄ เริ่มต้นและสารละลาย Cu-Glu ₂ ที่เตรียมได้	43
ภาพประกอบ 21 สเปกตรัมของสารละลาย Cu-Glu ₂ เมื่อใช้สารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.05 - 0.50 mol/L	44
ภาพประกอบ 22 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Cu-Glu ₂ ที่ 660 nm ...	45
ภาพประกอบ 23 สเปกตรัมของสารละลาย 5-Br-PSAA ในบัฟเฟอร์แอสซิเตด pH 4 และสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่เกิดจากสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.05 – 0.25 mol/L.....	47
ภาพประกอบ 24 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ความยาวคลื่น 580 nm.....	47
ภาพประกอบ 25 ภาพถ่ายแสดงระยะทางการไหลของสารละลายตามช่องทางการไหลของอุปกรณ์ (ก) 2D-μPADs และ (ข) 3D-μPADs แบบ 2 ชั้น.....	49
ภาพประกอบ 26 ภาพถ่ายแสดงสี 5-Br-PSAA ที่ผ่านการทดสอบด้วยแบลงค์ 3 ซ้ำเมื่อใช้ (ก) 3D-μPADs แบบ 2 ชั้น และ (ข) 3D-μPADs แบบ 4 ชั้น.....	50
ภาพประกอบ 27 ตัวอย่างอุปกรณ์ 3D-μPADs แบบ 4 ชั้น ได้จากสกรีน (ก) ด้านหน้า และ (ข) ด้านหลังของ μPADs.....	50
ภาพประกอบ 28 ผลของความเข้มข้น CuSO ₄ ที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตด้วยการวัดความเข้มข้น Cu-Glu ₂	51
ภาพประกอบ 29 ผลของความเข้มข้น NaOH ที่มีต่อการตรวจวัดปริมาณกลูโคเนตด้วยการวัดความเข้มข้น Cu-Glu ₂	52
ภาพประกอบ 30 ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่มีต่อการตรวจวัดวัดความเข้มข้น Cu-Glu ₂	53

ภาพประกอบ 31 ผลของเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2	54
ภาพประกอบ 32 ผลของเวลาที่ใช้ในการถ่ายภาพที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2	55
ภาพประกอบ 33 ผลของปริมาตรตัวชะที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2	56
ภาพประกอบ 34 ผลของความเข้มข้น HCl ที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	57
ภาพประกอบ 35 ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	58
ภาพประกอบ 36 ผลของเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	59
ภาพประกอบ 37 ผลของเวลาในการถ่ายภาพที่มีต่อการวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	60
ภาพประกอบ 38 ผลของความเข้มข้น NaOH ที่ต่อการตรวจวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$...	61
ภาพประกอบ 39 ผลของความเข้มข้น 5-Br-PSAA ที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	62
ภาพประกอบ 40 ผลของความเข้มข้น CuSO_4 ที่มีผลต่อการตรวจวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	63
ภาพประกอบ 41 กราฟมาตรฐานสำหรับติดตามความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 .	64
ภาพประกอบ 42 กราฟมาตรฐานสำหรับติดตามความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$	65

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กรดกลูโคนิก (Gluconic acid, $C_6H_{12}O_7$) เป็นโพลีไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกแอซิด (Polyhydroxy carboxylic acid หรือ PHA) จัดเป็นกรดอินทรีย์อ่อนชนิดหนึ่ง ไม่ระเหย ไม่มีกลิ่น ไม่มีฤทธิ์กัดกร่อน และไม่มีพิษ สามารถพบได้มากในสารสกัดจากพืช ผลไม้ และอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ข้าว นํ้านมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไวน์ น้ำผึ้ง น้ำส้มสายชู เนื้อสัตว์ และเห็ดเหี่ยวไผ่ (Seeman & Wiemer, 2010; สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2561) กรดกลูโคนิก และอนุพันธ์ของกรดกลูโคนิกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง โดยในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางนั้น กรดกลูโคนิกซึ่งเป็นโพลีไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกแอซิดจะมีคุณสมบัติในการเร่งการผลิตเซลล์ผิว ลดการเกิดริ้วรอยได้คล้ายกับกรดผลไม้ประเภทแอลฟาไฮดรอกซีแอซิด (Alpha hydroxy acid หรือ AHA) เช่น กรดไกลโคลิก (Glycolic acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดกลูโคนิกยังมีผลต่อการระคายเคืองน้อยกว่ากรดแอลฟาไฮดรอกซีแอซิดอีกด้วย (Hira, 2017) และเนื่องจากกรดกลูโคนิกมีขนาดโมเลกุลใหญ่ และมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก จึงช่วยกักเก็บน้ำที่ผิวได้ดี ทำให้ผิวคงความชุ่มชื้นได้นาน ในปัจจุบันกรดกลูโคนิกจึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิวสำหรับผู้ที่มีผิวแพ้ง่ายหลายชนิด นอกจากนี้กลูโคนิกยังจัดเป็นกรดอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์เอเจนต์ (Buffer agent) ช่วยรักษาค่า pH ของเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิวให้อยู่ในช่วงกรดอ่อนๆ ประมาณ pH 4.50 – 5.75 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับสภาพผิวของมนุษย์ ช่วยกักเก็บความชุ่มชื้นของผิวและช่วยให้แบคทีเรียที่ผิวสามารถทำงานได้ดี ปกป้องผิวจากอันตรายอื่นจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Lambers, Piessens, Bloem, & Pronk, 2006) และยังช่วยลดการเสื่อมคุณภาพของเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย จึงสามารถเรียกได้ว่ากรดกลูโคนิกเป็นส่วนประกอบที่ทำหน้าที่หลายอย่าง (Multifunctional ingredients) ในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ดังนั้นการเลือกใช้ กรดกลูโคนิกในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจะช่วยให้ลดองค์ประกอบในเครื่องสำอางลงส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีราคาถูกลง

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ไม่ได้มีการกำหนดหรือควบคุมความเข้มข้นของการใช้สารประกอบจำพวกโพลีไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกแอซิด (PHA) ในเครื่องสำอาง แต่ได้มีการกำหนดค่าความเป็นกรด – เบสของเครื่องสำอางไม่ให้มีค่า pH ต่ำกว่า 3.5 ซึ่งการใช้กรดกลูโคนิก

ในปริมาณมากจะทำให้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีความเป็นกรดสูง ค่า pH ต่ำ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร PHA ควรอยู่ในช่วง 5 – 15 เปอร์เซ็นต์ (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2551) การตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกจึงมีความสำคัญเพื่อตรวจสอบและควบคุมคุณภาพการผลิต ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวให้ได้ตามมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น เทคนิคโครมาโทกราฟี เช่น liquid chromatography (LC), High-performance liquid Chromatography (HPLC) , Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) หรือ Enzymatic assays เช่น ในงานวิจัยของ Alt (1955) ที่ทำการตรวจวัดกรดกลูโคนิกด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) ได้รายงานว่าการตรวจวัดสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ เช่น ไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) ในสภาวะเบส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลูโคเนต-ทองแดง (Cu-Glu_2) ที่มีสีฟ้า สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 660 nm ปริมาณ Cu^{2+} ที่มากเกินไปเกิดเป็นตะกอนคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (Cu(OH)_2) และถูกกรองออกจากสารละลาย ก่อนนำสารละลายไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Alt, 1955) ซึ่งเทคนิคการตรวจวัดเหล่านี้มักมีความยุ่งยากและจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวัด รวมถึงต้องใช้เครื่องมือที่ขนาดใหญ่ มีราคาสูง ส่งผลให้ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์สูงขึ้นด้วย จึงมีนักวิจัยพยายามสังเคราะห์ตัวตรวจวัดที่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เช่น ตัวตรวจวัดประเภทโลหะอินทรีย์ (Organometallic) จากสารประกอบทริส-อะมิโน (tris-amino compound) กรดโบโรนิก (Boronic acid) ร่วมกับไอออนของโลหะแคดเมียม (Cd^{2+}) ซึ่งมีการรายงานว่าตัวตรวจวัดที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถจับกับกรดกลูโคนิกได้ดี และเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี ทำให้สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ (T. Zhang & Anslyn, 2006) นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยพัฒนาการตรวจวัดกรดกลูโคนิกโดยใช้ตัวตรวจวัดทางชีวภาพร่วมกับเทคนิคไฟฟ้าเคมี (Electrochemical Biosensing) เพื่อให้เกิดความสะดวกในการตรวจวัดมากยิ่งขึ้น โดยใช้เอนไซม์กลูโคเนตไคเนส (gluconate kinase) และเอนไซม์ 6-ฟอสโฟ-ดีกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (6-phospho-D-gluconate dehydrogenase) เป็นเอนไซม์ในการตรวจวัดบนอิเล็กโทรดคาร์บอน (screen-printed carbon electrodes) และวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ของสาร โดยตัวอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีขนาดเล็กเพียง 12.56 mm^2 (Del Torno-de Román, Alonso-Lomillo, Domínguez-Renedo, & Arcos-Martínez, 2013)

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices หรือ μPADs) เป็นอุปกรณ์ที่มีขนาดเล็ก ใช้สารปริมาณน้อยในการตรวจวัด มีราคาถูกกว่าการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ สามารถสร้างได้ง่าย และสะดวกต่อการใช้งาน

ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวัด อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษอาศัยการไหลของสารละลายและการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษซึ่งเป็นบริเวณที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic area) ที่อาจถูกกำหนดขอบเขตของบริเวณการไหลหรือการเกิดปฏิกิริยาด้วยสารที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) กันสารละลายไม่ให้ไหลออกนอกบริเวณที่กำหนด โดยเทคนิคที่ใช้ในการกำหนดขอบเขตลงบนกระดาษสามารถทำได้หลายวิธี เช่น พิมพ์สกรีน (Screen printing), พิมพ์ด้วยแว็กซ์ (Wax printing), พิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) หรือการประทับตรา (Stamping) ซึ่งอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ได้หลายวิธี ยกตัวอย่างเช่นการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical μ PADs) ซึ่งจำเป็นต้องต่อเข้ากับอุปกรณ์ต่อพ่วงภายนอก ได้แก่ ขั้ว อิเล็กโทรด และเครื่องวัดค่าทางไฟฟ้า เช่น ความต่างศักย์ไฟฟ้า ค่าการนำไฟฟ้า หรือ ค่ากระแสไฟฟ้า หรือการวัดระยะทาง (Distance-based μ PADs) โดยอาศัยการเกิดสารประกอบที่มีสีไปตามช่องการไหลของสารละลาย สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งระยะทางที่สารแพร่ไปได้หรือระยะทางเกิดสีจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด (Cai, Fang, Mo, & Huang, 2017; Tian et al., 2017) แต่วิธีที่ได้รับความนิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ คือ การติดตามการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric determination) ซึ่งสามารถติดตามได้จากการวัดค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไป สามารถทำได้ด้วยการอาศัยปฏิกิริยาที่มีสี หรือการเติมตัวชี้เรเจนต์ที่มีสีเพื่อใช้ในการติดตามปฏิกิริยา โดยอาจเทียบสีกับสีมาตรฐาน และวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรมในคอมพิวเตอร์ เช่น ImageJ และ Adobe Photoshop หรือการวัดความเข้มสีโดยใช้แอปพลิเคชันบนโทรศัพท์มือถือเพื่อให้สามารถตรวจวัดได้สะดวกมากยิ่งขึ้น ไม่ต้องใช้อุปกรณ์จำเพาะที่มีราคาสูง และผลการตรวจวัดมีความถูกต้อง (Puangbanlang, Sirivibulkovit, Nacapricha, & Sameenoi, 2019; จุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง, 2555)

ผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices, μ PADs) ร่วมกับการตรวจวัดเชิงสีที่แตกต่างกันสองปฏิกิริยา คือ การติดตามความเข้มสีสารละลายสีน้ำเงินของ Cu-Glu_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและกลูโคสในสภาวะเบส และการติดตามวัดความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนของ Cu^{2+} กับ 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]aniline (5-Br-PSAA) ซึ่ง 5-Br-PSAA สามารถจับกับ Cu^{2+} ใน Cu-Glu_2 เกิดเป็นสารเชิงซ้อน $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ ที่มีสีม่วงขึ้น (Ohno, Teshima, Sakai, Grudpan, & Polasek, 2006) สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของ

สีได้ด้วยตาเปล่า และทำการวิเคราะห์ความเข้มของสีของทั้ง Cu-Glu₂ และ 5-Br-PSAA ผ่านโปรแกรม ImageJ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้งานจริง นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษารูปแบบของอุปกรณ์ μ PADs ที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นและปริมาณของสารละลายรีเอเจนต์ระยะเวลาในการตรวจวัด เพื่อให้การวิเคราะห์กรดกลูโคนิกในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวสามารถทำได้ง่าย สะดวก ใช้สารปริมาณน้อย ลดต้นทุนและไม่สิ้นเปลืองในการตรวจวิเคราะห์

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษร่วมกับการตรวจวัดเชิงสีสำหรับตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิก
2. นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

ความสำคัญของงานวิจัย

1. อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ สำหรับตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกที่สามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก และประหยัด
2. วิธีการวัดปริมาณกรดกลูโคนิก ด้วยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษร่วมกับการวัดเชิงสี ที่เหมาะสมในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเบื้องต้น

ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบและพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษร่วมกับการวัดเชิงสีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิก โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu₂ และการตรวจวัดสีของ Cu – 5-Br-PSAA โดยมีขอบเขตการวิจัย 4 ประการดังนี้

1. การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคนิก
2. การออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคนิกในรูปของสารกลูโคเนต
 - 2.1 ออกแบบรูปแบบของ μ PADs
 - 2.2 ขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสบน μ PADs สำหรับวัดความเข้มข้นของ Cu-Glu_2 และ Cu-5-Br-PSAA

4. ตรวจสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้น

4.1 ช่วงความเข้มข้นของกลูโคสที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (Working range)

4.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวัดกลูโคส (Limit of detection, LOD)

4.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส (Limit of quantitation, LOQ)

4.4 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision, %RSD)

5. ประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยมุ่งพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ร่วมกับการตรวจวัดเชิงสี ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษา ทบทวนเอกสารวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกรดกลูโคนิกและอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกรดกลูโคนิก

1.1 กรดกลูโคนิก

1.2 กรดกลูโคนิกในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

1.3 การตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิก

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μPADs)

2.1 ความเป็นมาของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

2.2 ความหมายและหลักการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

2.3 การขึ้นรูปอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

2.4 ประเภทของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

2.5 การตรวจวัดบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

2.6 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษในด้านเคมีวิเคราะห์

3. การตรวจวัดปริมาณทองแดง

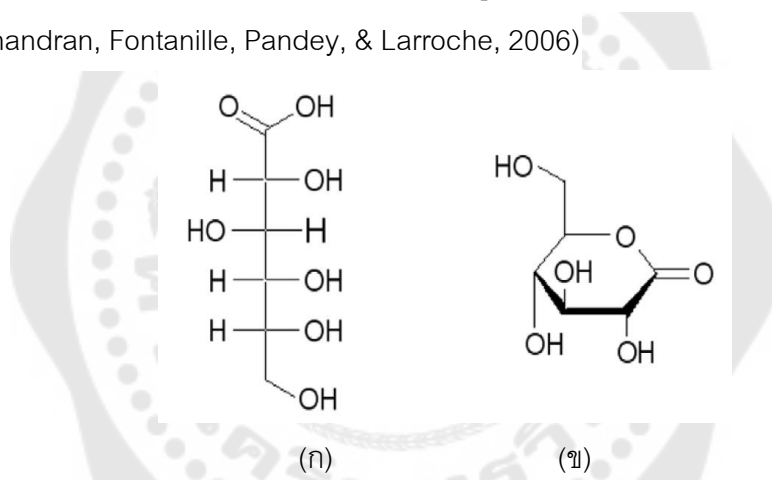
4. ประเด็นของงานวิจัยที่พัฒนา

1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกรดกลูโคนิก

1.1 กรดกลูโคนิก

กรดกลูโคนิก (Gluconic acid) หรือ กรดเพนตะไฮดรอกซีคาโปอิก (Pentahydroxycaproic acid) เป็นสารโพลีไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกแอซิด (Polyhydroxy acid ; PHA) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{12}O_7$ และมีโครงสร้างเป็นดังภาพประกอบ 1 กรดกลูโคนิกจัดเป็นกรด

อ่อนอินทรีย์ มีค่าคงที่การแตกตัว (pKa) เท่ากับ 3.86 เป็นสารไม่ระเหย ไม่มีฤทธิ์กัดกร่อน และไม่มีพิษต่อสิ่งมีชีวิต สามารถพบได้ในพืช ผลไม้ และอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ข้าว นํ้านมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไวน์ นํ้าผึ้ง นํ้าส้มสายชู เนื้อสัตว์ และเห็ดเหี่ยวไผ่ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2561) โดยกรดกลูโคนิกเป็นสารเมทาบอลไลต์ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส โดยหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) หรือเกิดจากการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกลูโคนแลกโตน (Glucono-lactone) นอกจากนี้กรดกลูโคนิกยังเป็นคีเลตติ้งเอเจนต์ที่ดี (Strong chelating agent) ในสารละลายต่าง เช่น สารละลายของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), อะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}), คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) หรือสารละลายโลหะหนักอื่น ๆ กรดกลูโคนิกละลายน้ำได้ดีมาก และยังสามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในโมเลกุลเป็นจำนวนมาก (Ramachandran, Fontanille, Pandey, & Larroche, 2006)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ (ก) กรดกลูโคนิก (D-Gluconic acid)

(ข) กลูโคนแลกโตน (Glucono-lactone)

ที่มา : Ramachandran et al. (2006)

กรดกลูโคนิก และอนุพันธ์ของกรดกลูโคนิกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลากหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และ เครื่องสำอาง (พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์, 2544) ในอุตสาหกรรมอาหารมักใช้ในรูปแบบกลูโคเนต เช่น โซเดียมกลูโคเนตถูกใช้เป็นสารให้ความเสถียรในการเกิดอิมัลชันระหว่างเนื้อมัดละเอียดกับไขมัน (meat emulsion) ควบคุมความเป็นกรดของไส้กรอกชนิดแห้ง (Salami-type sausages) หรือแฮม นอกจากนี้ โซเดียมกลูโคเนตยังช่วยลดความ

ชมของหญ้าหวานและสารทดแทนความหวาน และใช้เป็นสารบัฟเฟอร์รักษาสมดุลระหว่างความหวานและความเค็มในเครื่องดื่มหลายชนิด (AG, 2019)

1.2 กรดกลูโคนิกในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

เครื่องสำอาง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ใช้บนผิวหนัง หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย เพื่อทำความสะอาด หรือส่งเสริมให้เกิดความสวยงาม โดยเครื่องสำอางที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันสามารถจำแนกได้เป็นหลายประเภทตามวัตถุประสงค์การใช้งาน ได้แก่ เครื่องสำอางทำความสะอาด (Cleansing cosmetics) เช่น สบู่ แชมพู ยาสีฟัน โฟมล้างหน้า เครื่องสำอางบำรุงผิว (Skin care) เช่น ครีม โลชั่น ซีรัมบำรุงผิว ลิปปาล์มที่ไม่มีสี และเครื่องสำอางสำหรับตกแต่ง (Make up) เช่น ครีมรองพื้น ลิปสติก เป็นต้น โดยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีส่วนผสมอยู่หลายชนิด ทั้งสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ และสารสกัดจากธรรมชาติ โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ เช่น กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid), กรดกลูโคนิก (Gluconic acid), ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone), เรตินอลหรือวิตามินเอ (Retinol) ที่ทำหน้าที่ในการลดริ้วรอย และยกกระชับผิว ช่วยให้ผิวกระจ่างใส และ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic), สารกลุ่มกรดแอลฟาไลปิก (Alpha lipid acid) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยชะลอการเกิดริ้วรอยตามวัย นอกจากนี้ยังมีส่วนผสมของสารปรับแต่งอื่น ๆ เช่น สารปรับแต่งกลิ่น สี ความคงตัว สารกันเสีย และสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมค่า pH ของเครื่องสำอาง

กรดกลูโคนิก เป็นกรดอ่อนอินทรีย์จำพวก PHA ซึ่งช่วยเร่งการผลัดเซลล์ผิว ลดการเกิดริ้วรอยได้คล้ายกับกรดผลไม้ประเภทแอลฟาไฮดรอกซีแอซิด (Alpha hydroxy acid ; AHA) เช่น กรดไกลโคลิก (Glycolic acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) แต่ทำให้เกิดการระคายเคืองน้อยกว่า กรดแอลฟาไฮดรอกซีแอซิด (AHA) เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าทำให้มีข้อจำกัดในความสามารถของการทะลุผ่านผิวที่น้อยกว่า AHA (Hira, 2017; พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2551) และเนื่องจากกรดกลูโคนิกมีขนาดโมเลกุลใหญ่ และมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก จึงช่วยในการกักเก็บน้ำไว้ที่ผิวได้ดี ทำให้ผิวคงความชุ่มชื้นได้นาน ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการนำกรดกลูโคนิกมาใช้เป็นองค์ประกอบหนึ่งในการผลิตผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ที่มีผิวแพ้ง่ายหลายชนิด นอกจากนี้กลูโคนิกยังมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์เอเจนต์ (Buffer agent) ช่วยรักษาระดับ pH ของสารละลายให้คงที่อยู่ในช่วงกรดอ่อน ๆ ประมาณ pH 4.50 – 5.75 โดยส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจะมีค่า pH ประมาณ 5.5 ซึ่งเหมาะสมกับสภาพผิวของมนุษย์ (Lambers et al., 2006) นอกจากนี้คุณสมบัติบัฟเฟอร์ของกรดกลูโคนิกยังช่วยชะลอการเสื่อมคุณภาพของเครื่องสำอางได้อีกด้วย จึงสามารถเรียกว่ากรดกลูโคนิกเป็นส่วนประกอบที่ทำหน้าที่หลายอย่าง (Multifunctional ingredients) ใน

เครื่องสำอาง ดังนั้นการเลือกใช้บัพเฟอร์ไอออนต์ดังกล่าวจะช่วยให้องค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ลดลง ส่งผลให้มีราคาที่ถูกลง

ถึงแม้ว่าสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ยังไม่ได้มีการกำหนดหรือควบคุม ปริมาณการใช้สารประกอบพวก PHA ในเครื่องสำอาง แต่ได้มีการกำหนดค่า pH ของเครื่องสำอาง ไม่ให้ต่ำกว่า pH 3.5 ซึ่งการใช้กรดกลูโคโนในความเข้มข้นสูงจะทำให้มีค่า pH ที่ต่ำลงและอาจต่ำกว่าค่าที่มาตรฐานกำหนด ดังนั้นจึงต้องรักษาความเข้มข้นของ PHA ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม 5 – 15% (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2551)

1.3 การตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคโนค

1.3.1 การตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ในการตรวจวิเคราะห์กรดกลูโคโนคและอนุพันธ์ของกรดกลูโคโนคด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถทำได้โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว (Liquid Chromatography) (Sweeley, Wells, & Bentley, 1966) เช่น งานวิจัยของ (Chen, Imanari, Yamamoto, & Kwan, 1968) ได้ทำการวิเคราะห์ ดี-กลูโคเนต และ แอล-ไโดเนต โดยการฉีดสารผสมระหว่างกลูโคเนตและไโดเนตลงในคอลัมน์ Amberlite CG-120, H^+ เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปกรด ก่อนถูกเปลี่ยนให้เป็นแก๊สที่อุณหภูมิ 75 – 85 °C ภายใต้ความดันต่ำ แล้วจึงฉีดเข้าคอลัมน์ shimadzu chromatography CG1-1B ใช้อุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 190 °C โดยมีแก๊สไนโตรเจนทำหน้าที่เป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 90 mL/min

เนื่องจากกรดกลูโคโนคและอนุพันธ์ของกลูโคโนคเป็นสารประกอบที่มีขั้วค่อนข้างสูง ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวจึงนิยมใช้สารขั้วต่ำเป็นเฟสคงที่ (Reversed-phase column) เช่น Rakotomanga, Baillet, Pellerin, and Baylocq-Ferrier (1991) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์รวมที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีอาการแพ้นม (galactosemic patients) โดยใช้คอลัมน์ Brownlee Labs. ODS 224 RPI8 ให้ค่าความเป็นเส้นตรงของกรดกลูโคโนคในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 0.6 mg/mL และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0.05 – 0.10 mg/mL

นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange chromatography) ในการวิเคราะห์กรดกลูโคโนคได้ด้วย ยกตัวอย่างเช่น Rajakyla (1981) ได้เสนอวิธีการแยกกรดกลูโคโนคออกจากกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ด้วยคอลัมน์ Hamilton HC-XS.00 strong cation-exchange resin column, H^+ , Aminex HPX-87 strong cation-exchange resin column, H^+ และ Nucleosil 10 NH_2 ร่วมกับการตรวจวัดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 210 nm ซึ่งพบว่าสามารถวิเคราะห์กลูโคเนตได้ทั้งเชิง

คุณภาพและเชิงปริมาณ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.5 – 1.0 g/100 mL และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0.3 – 0.5 g/100 mL

Maquille et al. (2015) ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ใช้คอลัมน์สำหรับแลกเปลี่ยนไอออนลบ (Anion exchange column) ร่วมกับการตรวจวัดด้วยแมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry) เพื่อตรวจวัดกลูโคเนตในระบบการจัดการกากกัมมันตรังสี (Radioactive waste) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อยู่ที่ 2.6×10^{-5} mol/L

Andrew (1991) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์โซเดียมกลูโคเนตในตัวอย่างสารทำความสะอาดชนิดเบส (Alkaline cleaner) โดยทำการกำจัดไอออนบวกที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของตัวกรองด้วยการผ่านสารละลายลงในระบบ Ion exchange clean-up system หลังจากนั้นสารละลายออกจากคอลัมน์ แล้วผ่านลงในคอลัมน์สำหรับแยกไอออนลบ (Dionex AS-1 anion exclusion column) โดยมีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวชะ และวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 215 nm

การตรวจวิเคราะห์กลูโคเนตด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีมีความถูกต้องแม่นยำสูงทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ มีความรวดเร็วในการตรวจวัด และเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวัดด้วยเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีขนาดใหญ่ ราคาสูง จึงเป็นข้อจำกัดของการตรวจวัดที่ไม่สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว

1.3.2 การตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี

การตรวจวัดกรดกลูโคนิกโดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีร่วมกับการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometric method) ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกรดกลูโคนิกกับไอออนของโลหะ เช่น ทองแดง (Cu^{2+}) ในสภาวะเบส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลูโคเนต - ทองแดง (Cu-Glu_2) ที่มีสีน้ำเงิน สามารถละลายน้ำได้ดี และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm โดย Alt (1955) ได้เสนอวิธีการตรวจวัดกลูโคนิกโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร Cu-Glu_2 โดยอาศัยปฏิกิริยาดังสมการที่ (1) และ (2)



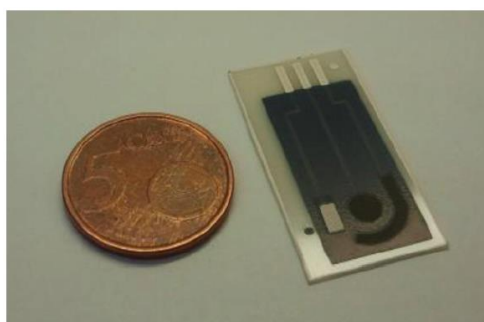
ในการศึกษาได้ทำการทดลอง 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 ผสมสารละลายตัวอย่างกลูโคเนตกับคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) เข้าด้วยกัน แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงไป ไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) ที่มากเกินไป จะทำปฏิกิริยากับ

ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) เกิดเป็นตะกอนคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) เพื่อแยกตะกอนออก นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง วิธีที่ 2 คือ ค่อย ๆ ผสมสารละลายเบส NaOH กับ CuSO_4 เพื่อให้เกิดตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลายตัวอย่างพร้อมกับคนสารตลอดเวลา เพื่อละลายตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ อีกครั้ง เพื่อให้ Cu^{2+} เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกลูโคเนต นำไปให้ความร้อนและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงกรองเอาตะกอนที่เหลือออก นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้ง 2 วิธีพบว่า วิธีที่ 2 สามารถเพิ่มความแม่นยำจาก $\pm 10\%$ เป็น $\pm 5\%$ และให้ค่าความเป็นเส้นตรงตาม Beer's law ที่ $1 - 10 \text{ mmol/L}$ ซึ่งกว้างกว่าวิธีที่ 1 ที่อยู่ในช่วง $1 - 6 \text{ mmol/L}$ นอกจากนี้การให้ความร้อนแก่สารละลายทำให้เกิดการรวมตัวของตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ทำให้สามารถกรองตะกอนออกได้ง่ายขึ้น ไม่มีตะกอนเหลือในสารละลายรบกวนการตรวจวัด รวมถึงสารประกอบเชิงซ้อนอื่น ๆ มีความเสถียรต่ำเมื่อได้รับความร้อนจึงเกิดการสลายตัวสามารถช่วยเพิ่มความจำเพาะของวิธีตรวจวัดด้วย

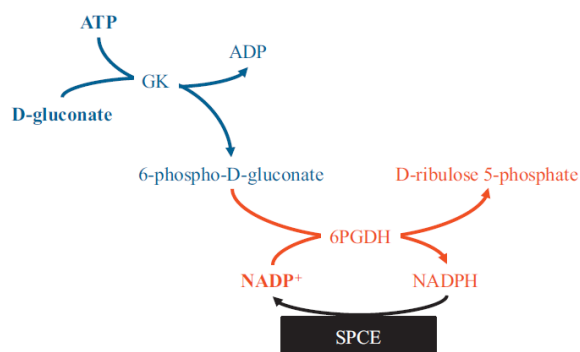
Tianzhi Zhang และทีมวิจัยได้ทำการพัฒนาตัวตรวจวัดเชิงสีที่สังเคราะห์จากกรดโบโรนิก สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลจำพวกคาร์บอกซีและฟอสโฟ (Carboxy and Phospho Sugars) และพบว่า ตัวตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นสามารถจับน้ำกลูโคสคาร์บอกซีได้ดี และสามารถจับกับกลูโคเนตได้ดีที่สุด โดยตัวเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อสังเคราะห์ร่วมกับไอออนของโลหะแคดเมียม (Cd^{2+}) เกิดเป็นตัวตรวจวัดเชิงโลหะอินทรีย์ (Organometallic sensor) และเกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อทำการทดสอบกับกรดกลูโคเนต (T. Zhang & Anslyn, 2006)

1.3.3 การตรวจวัดโดยใช้ตัวตรวจวัดทางชีวภาพหรือไบโอเซนเซอร์

ปี 2013 Lorena del Torno-de Romána และทีมวิจัยได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ไมโครชิป (Micro chip) ร่วมกับการวัดทางไฟฟ้าเคมีเพื่อวิเคราะห์กลูโคเนตในไวน์ ดังแสดงในภาพประกอบ 2 โดยใช้เอนไซม์กลูโคเนตไคเนส (Gluconate kinase; GK) ร่วมกับเอนไซม์ 6-ฟอสเฟต-ดี-กลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6-phospho-d-gluconate dehydrogenase; 6PGDH) ที่เชื่อมต่อนอยู่กับกลูตาไรอัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) และ โบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ที่บนขั้วอิเล็กโทรดคาร์บอนที่ได้จากการพิมพ์ (Screen-printed carbon electrode; SPCE) เมื่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เกิดขึ้น จะเกิด NADPH ที่ขั้วอิเล็กโทรด และกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณในการตรวจวัด (Del Torno-de Román et al., 2013)



(ก)

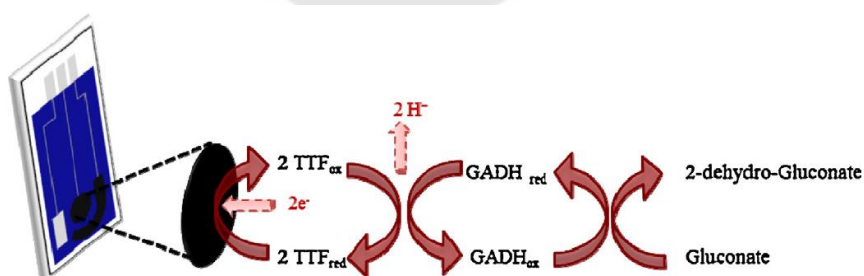


(ข)

ภาพประกอบ 2 (ก) อุปกรณ์ไมโครชิปสำหรับตรวจวัดกลูโคส (ข) ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดกลูโคส

ที่มา : Del Torno-de Román et al. (2013)

ในปี 2014 กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาตัวตรวจวัดทางชีวภาพที่ใช้เอนไซม์กลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (Gluconate dehydrogenase) เพื่อตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกในไวน์ โดยปราศจากการเตรียมตัวอย่าง การขึ้นรูปตัวตรวจวัดทางชีวภาพทำได้โดยการตรึงเอนไซม์กลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนสลงบนซัลคาร์บอนที่ได้จากการพิมพ์ในตัวกลางเตตระไทอะฟูลวาเลน (media-tor tetrathiafulvalene ; TTF) และวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่ขั้วอิเล็กโทรด ดังแสดงในภาพประกอบ 3 (Roman, Alonso-Lomillo, Dominguez-Renedo, Jaureguibeitia, & Arcos-Martinez, 2014)



ภาพประกอบ 3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดกลูโคนิกบนผิวของอิเล็กโทรด

ที่มา : Roman et al. (2014)

จากการทบทวนงานวิจัยและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์กรดกลูโคโนคิพบว่าสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งวิธีการตรวจวัดโดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี สามารถทำได้สะดวก ไม่ซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ และค่อนข้างมีความถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งยังสามารถติดตามการเปลี่ยนของสีได้ด้วยตาเปล่า ผู้วิจัยจึงสนใจนำปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีระหว่างกรดกลูโคโนคิกับสารละลายทองแดงในสภาวะเบส มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคิกที่มีความง่ายมากยิ่งขึ้น

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μPADs)

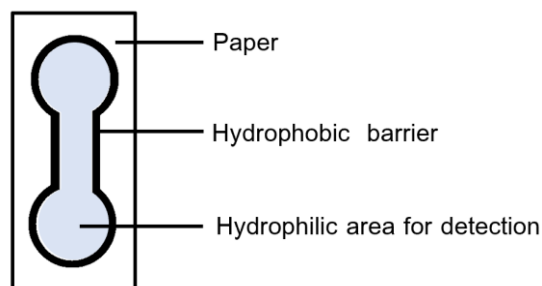
2.1. ความเป็นมาของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical device หรือ μPADs) เป็นอุปกรณ์ที่ถูกคิดค้นและพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดยกลุ่มวิจัยของ Whitesides (Martinez, Phillips, Butte, & Whitesides, 2007) เพื่อใช้ในการตรวจวัดทางชีวภาพ ซึ่งอุปกรณ์ที่กลุ่มผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมีราคาถูก ขนาดเล็ก สามารถพกพาได้สะดวก ใช้สารปริมาณน้อยในการตรวจวัด สะดวกต่อการวิเคราะห์ และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เครื่องมือใหญ่ในห้องปฏิบัติการในการตรวจวัด ทำให้อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษได้รับความสนใจจากผู้วิจัยท่านอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก และได้มีการนำเทคนิคการตรวจวัดที่หลากหลายมาประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษนี้เพื่อให้สะดวก และเหมาะสมกับสารตัวอย่างหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์มากที่สุด ยกตัวอย่างเช่น การตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยการวิเคราะห์เชิงสี (Colorimetric) การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) หรือการตรวจวัดระยะทางสารที่เคลื่อนที่บนกระดาษ (Distance-based analysis) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสามารถออกแบบรูปแบบและลักษณะของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษให้สอดคล้องกับปฏิกิริยา เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์มากยิ่งขึ้น

2.2. ความหมายและหลักการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (microfluidic paper-based analytical device ; μPADs) คือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดสารโดยอาศัยการไหลของสารละลายที่มีปริมาณน้อยในกระดาษที่มีความหนาในระดับไมโครเมตรด้วยแรงคัปิลารี (capillary action)

ในขอบเขตที่ถูกกำหนดขึ้นบนกระดาษ ซึ่งลักษณะที่สำคัญของอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษนั้นคือ การกำหนดขอบเขตหรือจำกัดพื้นที่ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของสารละลาย การทำปฏิกิริยาของสาร และพื้นที่สำหรับตรวจวัดสารบนกระดาษ ซึ่งบริเวณนี้จะต้องเป็นบริเวณที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic region) สารละลายจึงสามารถไหลบนกระดาษด้วยแรงคัปิลารี และเกิดปฏิกิริยาได้ ซึ่งบริเวณนี้อาจถูกกำหนดด้วยรูปร่างของกระดาษที่เกิดจากการตัด เช่น กระดาษลิทมัสที่มีลักษณะเป็นแผ่นสี่เหลี่ยม ซึ่งสารละลายสามารถเคลื่อนที่และเกิดปฏิกิริยาได้ทั่วทั้งบริเวณบนกระดาษ หรือ การกำหนดขอบเขตด้วยสารที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) ซึ่งสารละลายไม่สามารถไหลผ่านขอบเขตนี้ออกไปนอกบริเวณที่กำหนดได้ (กนกวรรณ พิสน์เทียะ & ยุภาพร สมิน้อย, 2557; จุฬาลักษณ์ น้อยพวง, 2555)



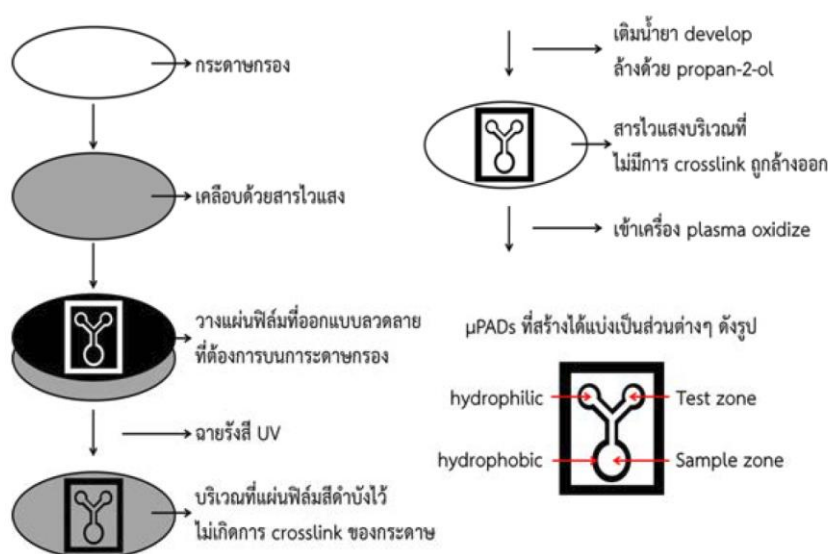
ภาพประกอบ 4 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μPADs)

อุปกรณ์ μPADs นี้สามารถใช้วิเคราะห์สารได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ และมีการใช้งานอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่ใช้งานได้อย่างสะดวก ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาไม่นานในการตรวจวิเคราะห์ เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารในปริมาณน้อย ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น อีกทั้งตัวอุปกรณ์ยังมีขนาดเล็ก พกพาได้สะดวก และสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบบภาคสนามได้ด้วยเช่นกัน เช่น การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ ได้นำอุปกรณ์ μPADs นี้มาใช้ในการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วย เรียกว่า Point-of-care testing (Tian et al., 2017)

2.3 การขึ้นรูปอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

ในปัจจุบันได้มีนักวิจัยสนใจพัฒนาวิธีการในการขึ้นรูปอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษ เพื่อใช้ในการกำหนดขอบเขตหรือรูปแบบของบริเวณตรวจวัดบนกระดาษ โดยวิธีที่ใช้ในการขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs ที่นิยมกันอย่างแพร่หลายมีหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น

การพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) เป็นวิธีการขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs ที่พัฒนาขึ้นโดยเคลือบสารที่ไวต่อแสง (photoresist) ไว้ทั่วทั้งกระดาษ แล้วทำการฉายแสง UV ผ่านแผ่นฟิล์มที่มีลวดลาย สารเคลือบในบริเวณที่ได้รับแสง UV จะเกิดการเชื่อม (Crosslink) กับกระดาษ เกิดเป็นสารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำทำหน้าที่เป็นขอบเขต (Hydrophobic barrier) และเมื่อทำการเติมน้ำยาดีเวลอป (develop) และล้างด้วยโพรพานอล (propan-2-ol) ลงไปจะทำให้สารเคลือบที่อยู่ในบริเวณที่ไม่สัมผัสกับอัลตราไวโอเลตถูกชะออกจากกระดาษดังแสดงในภาพประกอบ 5

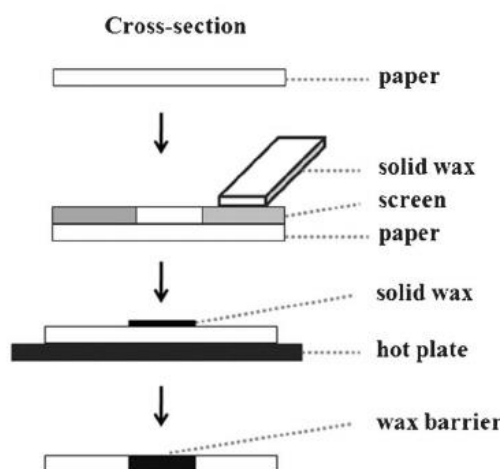


ภาพประกอบ 5 การขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs การพิมพ์ด้วยแสง

ที่มา : จุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง (2555)

การพิมพ์ด้วยแว็กซ์ (Wax printing) เป็นการขึ้นรูปที่สะดวก ง่าย โดยสามารถออกแบบรูปแบบในโปรแกรมคอมพิวเตอร์แล้วสั่งพิมพ์ลงบนกระดาษกรองผ่านเครื่องพิมพ์ จากนั้นนำกระดาษที่ได้ไปให้ความร้อน เพื่อให้หมึกพิมพ์ที่เป็นแว็กซ์ซึมลงในกระดาษ (Karita & Kaneta, 2014)

การสกรีนด้วยแว็กซ์ผ่านบล็อกสกรีน (Wax screen printing) เป็นการสร้างรูปแบบบนกระดาษโดยใช้สารจำพวกที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสกรีนผ่านแบบที่อยู่บนบล็อกสกรีน ลงไปบนกระดาษกรอง (Yetisen, Akram, & Lowe, 2013) สารจะผ่านรูขนาดเล็กของบล็อกสกรีน ลงไปยังกระดาษตามรูปแบบที่ปรากฏในบล็อกสกรีน



ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างการขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs การสกรีนด้วยแว็กซ์ (Wax screen printing)

ที่มา : Yetisen et al. (2013)

การจุ่มลงในแว็กซ์ (Wax dipping) เป็นวิธีการสร้างรูปแบบบนกระดาษโดยใช้แม่แบบที่ปิดทับกระดาษไว้แล้วจุ่มลงในแว็กซ์ที่หลอมเหลว หลังจากนั้นจึงให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วกำจัดแว็กซ์ส่วนเกินออก

การประทับตรา (Stamping) เป็นการขึ้นรูปอุปกรณ์ที่ค่อนข้างสะดวกและรวดเร็วโดยใช้แม่แบบจุ่มลงในของเหลวที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น พาราฟินหลอมเหลว หมึกกันน้ำ เป็นต้น แล้วประทับลงบนกระดาษ (Y. Zhang et al., 2014)

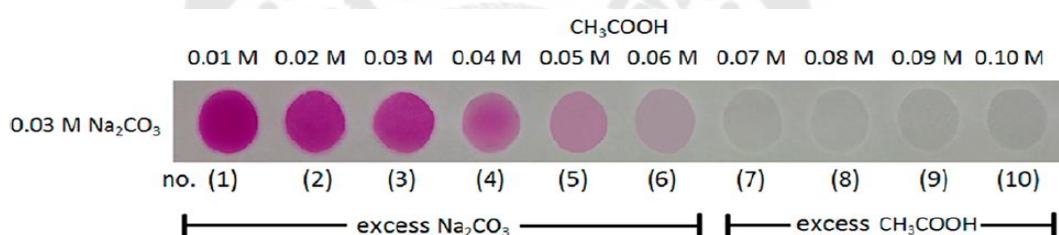
จากเอกสารข้างต้น พบว่าการขึ้นรูป μ PADs ด้วยการสกรีนด้วยวิธี Wax screen printing สามารถทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อนเช่นเดียวกับการพิมพ์ด้วยแสง และสามารถกำหนดขอบเขตของบริเวณตรวจวัดได้ดีกว่าการจุ่มลงในแว็กซ์ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการกำหนดขอบเขตบริเวณตรวจวัดจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าการขึ้นรูป μ PADs โดยใช้การพิมพ์ด้วยแว็กซ์ (Wax printing) แต่ก็มีราคาที่ถูกกว่า และสามารถสร้าง μ PADs จำนวนมากได้ในการสกรีนหนึ่งครั้ง เช่นเดียวกับการพิมพ์ด้วยแว็กซ์

2.4. ประเภทของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

อุปกรณ์ μ PADs มักถูกพัฒนาขึ้นให้มีความสอดคล้องกับการใช้งาน สารที่ต้องการวิเคราะห์ ปฏิกริยาและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ หรืออาจรวมไปถึงชนิดของตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง โดยสามารถจำแนก μ PADs ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

2.4.1 อุปกรณ์ μ PADs แบบ 2 มิติ

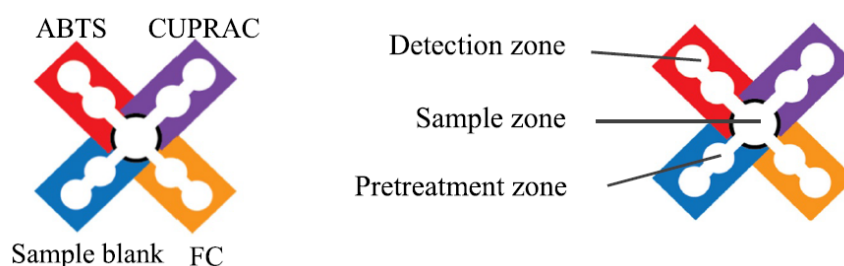
อุปกรณ์ μ PADs แบบ 2 มิติ (2 Dimensional μ PADs หรือ 2D μ PADs) เป็นอุปกรณ์ที่อาศัยการไหลของสารละลายไปตามความยาวและความกว้างของขอบเขตที่กำหนดบนกระดาษกระดาษเพียงระนาบเดียว ซึ่งถือเป็นลักษณะพื้นฐานของ μ PADs และอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์แต่ละชิ้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของขอบเขตบริเวณตรวจวัดที่ผ่านการขึ้นรูปแล้วให้เหมาะสมกับการใช้งาน ยกตัวอย่างเช่น การออกแบบ μ PADs ให้มีลักษณะเป็นวงกลมเพื่อใช้เป็นบริเวณสำหรับหยดสารละลายและทำการตรวจวัด เช่น Namwong, Jarujamrus, Amatongchai, and Chairam (2018) ทำการพัฒนาและออกแบบ μ PADs เพื่อใช้ในการเรียนวิชาเคมี เรื่องสารกำหนดปริมาณในปฏิกิริยากรดแอสติก (CH_3COOH) และโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ดังภาพประกอบ 7 แล้ววัดค่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสี



ภาพประกอบ 7 ตัวอย่างการใช้ μ PADs แบบ 2 มิติที่มีลักษณะเป็นวงกลม

ที่มา : Namwong et al. (2018)

อีกทั้งยังมีการออกแบบ μ PADs แบบ 2 มิติ ให้มีช่องทางการไหล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และความสะดวกในการวิเคราะห์ เช่น สามารถตรวจวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน หรือสามารถใช้วิธีการตรวจวัดหลายวิธีในการตรวจวัดเพียงครั้งเดียว ซึ่งทำให้เกิดความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลา และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้ดีอีกด้วย เช่น Puangbanlang et al. (2019) ได้ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS assay, CUPRAC assay และ FC assay พร้อมกันในตัวอย่างเครื่องดื่ม ร่วมกับการตรวจวัดเชิงสี โดยอุปกรณ์ μ PADs ที่พัฒนาขึ้นถูกออกแบบให้มีบริเวณตรวจวัดถึง 4 บริเวณ กระจายออกจากบริเวณหยดสารตัวอย่าง ดังแสดงในภาพประกอบ 8

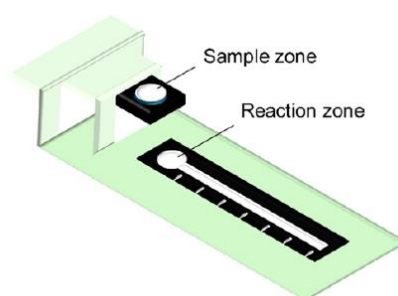


ภาพประกอบ 8 ตัวอย่างการใช้ μ PADs แบบ 2 มิติที่มีช่องทางการไหลของสารในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : Puangbanlang et al. (2019)

2.4.2 อุปกรณ์ μ PADs แบบ 3 มิติ

อุปกรณ์ μ PADs แบบ 3 มิติ (3 Dimensional μ PADs หรือ 3D- μ PADs) เป็นอุปกรณ์ที่มีการดัดแปลงเพิ่มเติมมาจาก μ PADs แบบ 2 มิติ โดยเพิ่มทิศทางการไหลของสารให้มีการไหลในแนวดิ่งจากกระดาษแผ่นหนึ่งสู่กระดาษอีกแผ่นหนึ่ง ซึ่งอาจจะมี 2 ชั้นหรือมากกว่าก็ได้ ซึ่งการใช้ μ PADs แบบ 3 มิติมีข้อดีหลายประการ คือ อาจช่วยลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างลง สามารถเตรียมตัวอย่างได้บนอุปกรณ์ชิ้นเดียวกัน สามารถกรองตะกอนที่ปนอยู่ในสารละลายก่อนทำการตรวจวัด ซึ่งช่วยลดความคลาดเคลื่อนได้ ยิ่งไปกว่านั้น การเพิ่มมิติการไหลให้มากขึ้นยังช่วยให้สารละลายไหลได้ดีและเร็วขึ้นด้วย (De Oliveira, Camargo, Pesquero, & Faria, 2017)



ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างการใช้ μ PADs แบบ 3 มิติ เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการอย่างง่าย (Point of care testing)

ที่มา : Tian et al. (2017)

2.5. การตรวจวัดบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

2.5.1 อุปกรณ์ μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดเชิงสี (Colorimetric μ PADs)

โดยทั่วไปการตรวจวัดความเข้มข้นของสีในอุปกรณ์ μ PADs ใช้ระบบสี RGB (Red-Green-Blue system) หรือ สเกลสีเทา (Gray scale) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สี เช่น ImageJ หรือ Adobe Photoshop หรืออาจเทียบสีกับสารละลายมาตรฐานหรือสีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ (Namwong et al., 2018; Puangbanlang et al., 2019)

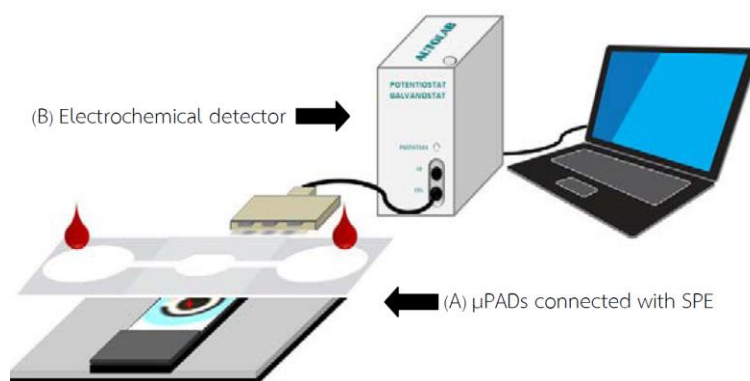
ปี 2557 ได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ μ PADs เพื่อตรวจวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยอาศัยการตรวจวัดทางเอนไซม์ร่วมกับการวิเคราะห์เชิงสี ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคการสกรีนพอลิเมอร์พอลิสไตรีน ผ่านบล็อกสกรีน คล้ายกับการใช้เว็ทซ์ และใช้เอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) และเอนไซม์ฮอร์สราดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase) เปลี่ยนสีสารตั้งต้น 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) ที่บริเวณตรวจวัดจากไม่มีสีเป็นสีเขียว น้ำเงิน และตรวจวัดค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยการถ่ายภาพอุปกรณ์และวิเคราะห์ความเข้มของสีโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50-1,000 $\mu\text{mol/L}$ และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 1.50 $\mu\text{mol/L}$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ และสามารถนำไปใช้งานได้จริง (กนกวรรณ พิณเพ็ญ & ยุภาพร สมิน้อย, 2557)

2.5.2 อุปกรณ์ μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical μ PADs)

อุปกรณ์ μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า จะติดตามปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในบริเวณตรวจวัด โดยบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์จะต้องต่ออยู่กับขั้วไฟฟ้าเพื่อวัดกระแสไฟฟ้าหรือความต่างศักย์ที่เกิดขึ้น

ปี พ.ศ. 2555 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือดด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า ซึ่งบริเวณขอบน้ำที่ใช้ในการไหลของสารละลาย (Hydrophobic region) ของ μ PADs นี้ ถูกออกแบบเป็นรูปดัมเบลและขึ้นรูปด้วยการจุ่มลงในเว็ทซ์ โดยที่ปลายทั้งสองข้างและตรงกลางเป็นวงกลมสำหรับวัด เชื่อมต่อกับขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการถ่ายเทอิเล็กตรอน และสำหรับแยกเลือดสองบริเวณ เมื่อนำอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบกับตัวอย่างเลือด พบว่า ใช้เวลาในการแยกพลาสมาออกจากเลือดภายใน 4 นาที และไหลไปเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) ที่ถูกตรึงไว้ที่บริเวณตรวจวัดก่อนทำการหยดตัวอย่างเลือด และเกิดผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ซึ่ง H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะกับขั้วอิเล็กโทรดที่ใช้ใน

การวัดค่าการนำไฟฟ้า และเปรียบเทียบผลที่ได้จากอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานที่พบว่าทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (จุฬาลักษณ์ น้อยพวง, 2555)



ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างการใช้ μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเพื่อวิเคราะห์กลูโคส
ตัวอย่างเลือด

ที่มา : จุฬาลักษณ์ น้อยพวง (2555)

2.5.3 อุปกรณ์ μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง (Distance-based μ PADs)

μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารที่อาศัยการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์แล้วเกิดสารประกอบที่เป็นตะกอนและมีสี สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยปริมาณตะกอนสีที่เกิดขึ้นจะต้องแปรผันตามความเข้มข้นของสารและแสดงเป็นระยะทางไปตามช่องทางที่กำหนด หรืออาจกล่าวได้ว่า ระยะทางของสีที่เกิดขึ้นควรแปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด ซึ่งการตรวจวัดด้วยระยะทางนี้ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เสริมอื่น ๆ ในการวิเคราะห์

Cai et al. (2017) ได้ทำการพัฒนา μ PADs เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยการวัดระยะทางการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีและละลายน้ำระหว่างไดไทโซนและปรอท (Dithaizone-Hg) โดยผู้วิจัยได้ออกแบบ μ PADs ให้มีช่องทางไหลของสารละลายและหยดไดไทโซนไว้ จากนั้นหยดสารละลายปรอทลงในวงกลม ปล่อยให้สารละลายแพร่ไปตามช่องทางดังกล่าว และเปลี่ยนสีไดไทโซนจากเหลืองเป็นชมพู โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ $0.93 \mu\text{g/mL}$ หรือ 1.395 mg/kg



ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างการใช้ μ PADs ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง (Distance-based μ PADs) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณปรอท

ที่มา : Cai et al. (2017)

2.6 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษในด้านเคมีวิเคราะห์

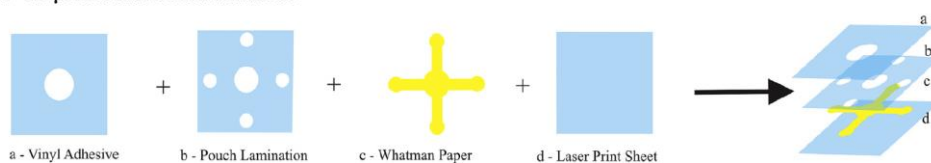
ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการขึ้นรูปอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) และนำอุปกรณ์ μ PADs มาใช้ในงานเคมีวิเคราะห์แทนการใช้เครื่องแก้ว เครื่องมือ หรือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดอย่างแพร่หลาย เนื่องจากอุปกรณ์ μ PADs มีราคาไม่แพง สามารถตรวจสอบสารได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ สะดวกต่อการใช้งานเนื่องจากมีขนาดเล็ก สามารถพกพาได้อย่างสะดวก ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ขนาดใหญ่ ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ รวมถึงอุปกรณ์ μ PADs มีขนาดเล็ก และใช้เวลาน้อยในการทดสอบ ยิ่งไปกว่านั้น μ PADs ยังเหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารในปริมาณน้อย ใช้สารละลายตัวอย่างและสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ในปริมาณที่น้อยในระดับไมโครลิตร จึงส่งผลให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการตรวจวิเคราะห์ในหลอดทดลองหรือห้องปฏิบัติการจริง ซึ่งผู้ทำการวิเคราะห์สามารถออกแบบ μ PADs ได้ ซึ่งการประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษนี้มีอยู่อย่างแพร่หลายทั้งต่างประเทศและนอกประเทศ ดังนี้

Y. Zhang et al. (2014) ทำการพัฒนาวิธีการขึ้นรูปและลักษณะของอุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) เพื่อตรวจวัดปริมาณของสารโดยไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เสริมอื่น ๆ ในการตรวจวัด โดยผู้วิจัยทำการขึ้นรูปอุปกรณ์หรือกำหนดขอบเขตของบริเวณตรวจวัดด้วยการใช้เทคนิคประทับแม่พิมพ์ที่มีแว็กซ์หลอมเหลวบนกระดาษ คล้ายกับการประทับตัวอักษรของจีนแบบโบราณ (Chinese movable-type printing) และนำกระดาษที่ผ่านการประทับแม่พิมพ์แล้วไปให้ความร้อนเพื่อให้แว็กซ์เกิดการหลอมเหลวอีกครั้งและซึมลงกระดาษ ทำให้ขอบเขตที่สร้างขึ้นสามารถกั้นสารละลายได้อย่างสมบูรณ์ ไม่เกิดการรั่วไหล และผู้วิจัยได้ทำการออกแบบรูปแบบของอุปกรณ์หลายรูปแบบเพื่อวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

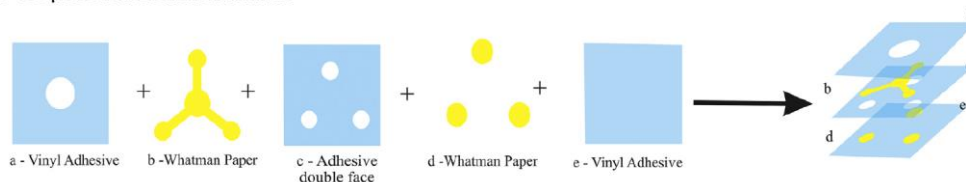
ปี ค.ศ. 2015 ได้มีการพัฒนาการขึ้นรูปอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษให้ง่าย โดยใช้ฟาราฟิล์มเป็นขอบเขตที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) และใช้กับการตรวจวัดเชิงสี (Colorimetry) ได้อย่างหลากหลาย โดยทำการวัดความเข้มสีที่เป็นแม่สีของแสง (RGB) ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยถ่ายรูปบริเวณตรวจวิเคราะห์บนอุปกรณ์ที่เกิดปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้ว และวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สี ศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มสีและปริมาณสารที่ต้องการวัด ซึ่งผู้วิจัยได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นร่วมกับเทคนิคการตรวจวัดเชิงสีมาประยุกต์ใช้กับการเรียนการสอนในระดับมัธยมศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไอออนของโลหะ ได้แก่ เหล็กไอออน (Fe^{2+}) กับ ทองแดงไอออน (Cu^{2+}) (Koesdjojo et al., 2015)

De Oliveira et al. (2017) ได้นำเสนอวิธีการที่ง่ายต่อการขึ้นรูป μPADs ทั้งแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส โปรตีน และไนไตรท์ในเลือดและปัสสาวะ โดยใช้เครื่องพิมพ์แบบตัด (home cutter printer) ที่ราคาไม่แพงในการตัดกระดาษกรองให้ได้บริเวณตรวจวัด (hydrophilic region) และพลาสติกเพื่อใช้ติดลงบน μPADs เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและสะดวกต่อการหยิบใช้งาน ดังแสดงในภาพประกอบ 12 ซึ่ง μPADs ทั้ง 2 แบบถูกออกแบบให้มีบริเวณตรวจวัด 3 บริเวณสำหรับการตรวจวัดเชิงสี ซึ่งผู้วิจัยประยุกต์ใช้ μPADs แบบ 2 มิติ ในการตรวจปัสสาวะ และมีขีดจำกัดการตรวจวัดเมื่อใช้ μPADs แบบ 2 มิติ อยู่ที่ 0.54, 5.19 และ 2.34 mmol/L สำหรับกาตรวจวัดกลูโคส โปรตีน และไนไตรท์ ตามลำดับ ส่วน μPADs แบบ 3 มิติถูกนำมาใช้กับการตรวจสารเติมแต่งในเลือด มีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.44, 1.26 และ 4.35 mmol/L ตามลำดับ

A - 2D μPADs fabrication schematic



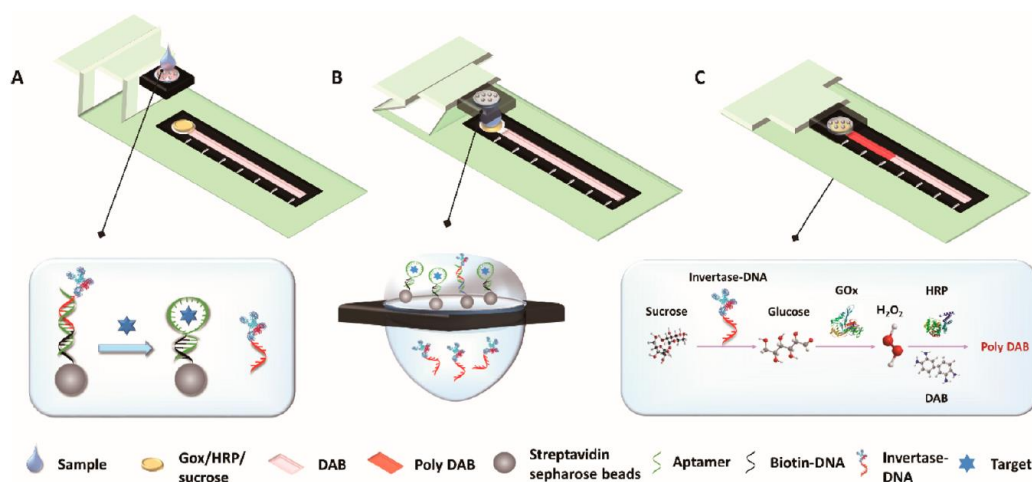
B - 3D μPADs fabrication schematic



ภาพประกอบ 12 การขึ้นรูป μPADs แบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ด้วยเครื่องพิมพ์แบบตัดเพื่อตรวจวัด
ทางการแพทย์

ที่มา : De Oliveira et al. (2017)

Tian et al. (2017) ออกแบบ μ PADs แบบ 3 มิติ โดยการพับกระดาษ (Origami) ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลอย่างง่าย ณ จุดดูแลผู้ป่วย (Point of care testing) โดยมีบริเวณสำหรับหยดสารละลาย 2 ชั้น ชั้นบนเป็นวงกลมสำหรับเตรียมตัวอย่าง ส่วนชั้นล่างเป็นช่องทางการไหลเพื่อใช้ในการวัดระยะทาง หลักการการตรวจวัดดังแสดงในภาพประกอบ 13 เมื่อหยดสารที่ต้องการตรวจวัดลงบน μ PADs ชั้นบน สารจะจับกับ aptamer ที่จับอยู่กับเม็ดปิด แล้วปลดปล่อยเอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase-DNA conjugate) ออกมา หลังจากนั้นพับ μ PADs ชั้นบนให้ลงมาสัมผัสกับชั้นล่าง เอนไซม์อินเวอร์เทสถูกปลดปล่อยออกจะแพร่ผ่านกระดาษกรองลงมาสู่ชั้นล่างและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ aptamer และเม็ดปิด จะติดอยู่ชั้นบนของกระดาษกรอง หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์หะยะทางสีน้ำตาลของ 3,3'-diaminobenzidine (poly DAB) ซึ่งระยะทางจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด



ภาพประกอบ 13 หลักการตรวจวิเคราะห์ด้วย μ PADs แบบ 3 มิติ ร่วมกับการตรวจวัดระยะทาง

ที่มา : Tian et al. (2017)

Wu et al. (2019) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Cu^{2+} โดยใช้ μ PADs ร่วมกับ Solid phase extraction (SPE) column โดยใช้พอลิสไตรีน - ไดไวนิลเบนซีน (poly(styrene-divinylbenzene)) ในการดูดซับไอออนของโลหะหนักชนิดอื่นที่รบกวนต่อการตรวจวัด หลังจากนั้น Cu^{2+} ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์จะเกิดสารประกอบกับแพน (1-(2-pyridylazo)-2-naphthol; PAN) ที่

หยดอยู่บน μ PADs และเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีแดง วิธีที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ $0.340 \mu\text{mol/L}$ ซึ่งต่ำกว่าค่าความเข้มข้นมาตรฐานของ Cu^{2+} ที่มีได้ในน้ำดื่มตามที่กฎหมายกำหนด

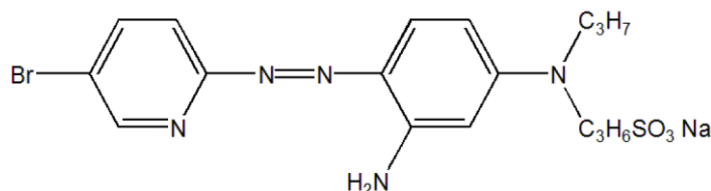
จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้น พบว่าอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์สารได้อย่างหลากหลาย เนื่องจากสามารถออกแบบและขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs และสามารถใช้กับการตรวจวัดได้อย่างหลากหลาย เช่น วัดค่ากระแสไฟฟ้า วัดความเข้มข้นของสี หรือวัดระยะของตะกอนที่เกิดขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นอุปกรณ์ μ PADs ยังถูกใช้อย่างแพร่หลายในหมู่นักวิจัยในปัจจุบัน เนื่องมาจากข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น อุปกรณ์มีขนาดเล็ก สะดวกต่อการตรวจวิเคราะห์ ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีขนาดใหญ่และราคาสูง ส่งผลให้ประหยัดต้นทุนในการตรวจวัด

3. การตรวจวัดปริมาณทองแดง

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโคนิกโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างกลูโคเนตและ Cu^{2+} นั้น จะติดตามความเข้มข้นสีฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 ที่เกิดขึ้น ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว (Alt, 1955) และยังสามารถนำสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 ไปทำปฏิกิริยาต่อ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสีมากขึ้น เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Cu^{2+} โดยการตรวจวัดเชิงสี ซึ่งพบว่า Cu^{2+} สามารถเกิดสารประกอบที่มีสีกับสารหลายชนิด เช่น ในงานของ Gouda and Amin (2010) ใช้สาร neocuproine (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) ทำปฏิกิริยากับ Cu^{2+} ในสถานะที่เป็นกรดอ่อน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $\text{Cu(II)-neocuproine}$ ให้สีฟ้าอ่อน และทำการตรวจวัดแคปโทพริล โดยแคปโทพริลสามารถวัด Cu^{2+} เปลี่ยนเป็น Cu^+ ซึ่ง Cu(I)-neocuproine จะให้สีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 448 nm นอกจากนี้ Cu^{2+} ยังเกิดสารประกอบกับ 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol; PAN) แล้วเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีแดง (Puangbanlang et al., 2019; Thakur & Deb, 1999)

นอกจากนี้ Cu^{2+} ยังสามารถเกิดสารประกอบกับ 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]aniline (5-Br-PSAA) แล้วเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีม่วง ในสภาวะกรด สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 nm โดยมีค่า molar absorptivity ของ Cu-5-Br-PSAA เท่ากับ $6.5 \times 10^4 \text{ l/mol.cm}$ (Makino, 1989; Ohno et al., 2006; Sakai & Teshima, 2008) 5-Br-PSAA เป็นรีเอเจนต์ที่สะดวกต่อการใช้งานมากกว่ารีเอเจนต์ที่เป็น

สารอินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าสารอินทรีย์ชนิดอื่น (Rinda, Uraisin, Sabarudin, & Nacapricha, 2018)



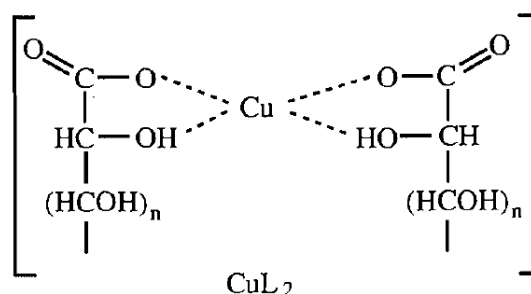
ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของ 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]aniline (5-Br-PSAA)

ที่มา : Rinda et al. (2018)

Ohno et al. (2006) ได้เสนอวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบการไหลแบบ sequential injection (SI) เพื่อตรวจวัดทองแดงและเหล็กในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยรายงานว่า Cu^{2+} สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ 5-Br-PSAA ที่ pH 4.6 แล้ววัดค่าการดูดกลืนที่ 580 nm ในขณะที่ Fe^{3+} ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาที่สภาวะนี้ได้ จำเป็นต้องเปลี่ยน Fe^{3+} ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} ก่อน แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนที่ 558 nm ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพบว่าช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้สำหรับ Cu^{2+} อยู่ในช่วง 0.1 – 2.0 mg/L และมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 50 $\mu\text{g/L}$

4. ประเด็นของงานวิจัยที่พัฒนา

จากการทบทวนวรรณกรรม และศึกษาเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเครื่องสำอางโดยใช้ μPADs เนื่องจากสะดวก มีขนาดเล็ก และใช้สารปริมาณน้อย เหมาะสำหรับการวิเคราะห์กลูโคสในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบและควบคุมคุณภาพการผลิต โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและ Cu^{2+} ในสภาวะเบสเกิดเป็น Cu-Glu_2 ที่สามารถละลายน้ำได้ สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตา



ภาพประกอบ 15 โครงสร้างของสารประกอบ Cu-Glu₂

การตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ วิธีที่หนึ่ง ตรวจวัดความเข้มสีฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นด้วยใช้โปรแกรม ImageJ โดยความเข้มสีจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกลูโคเนต และอีกวิธีหนึ่งคือการตรวจวัดความเข้มของสีสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Cu^{2+} และ 5-Br-PSAA ที่เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง โดยความเข้มสีม่วงจะขึ้นอยู่กับการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกลูโคเนต ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษารูปแบบของอุปกรณ์ μPADs ที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด ความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด และขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs โดยใช้การสกรีนผ่านบล็อกสกรีน (Wax screen printing)

ผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นจะสามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ มีความถูกต้องแม่นยำ และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อย ในราคาที่เหมาะสมกว่าการใช้เครื่องมือใหญ่ ซึ่งจะช่วยทำให้การตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกซึ่งทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวสามารถทำได้สะดวกมากขึ้น และเหมาะสมต่อการใช้ในการตรวจวัดเบื้องต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาเพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) สำหรับตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ด้วยการตรวจวัดเชิงสี ประกอบด้วยหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

1. อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
2. วิธีดำเนินการวิจัย ประกอบด้วย
 - 2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกลูโคนิก
 - 2.2 การออกแบบและสร้าง μ PADs ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคนิก
 - 2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกบน μ PADs
 - 2.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกด้วย μ PADs ที่พัฒนาขึ้น
 - 2.5 การประยุกต์ใช้ μ PADs ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

1. อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ จากบริษัท Mapada ประเทศจีน
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง จากบริษัท Mettler Toledo, ประเทศไทย
- ชุดบลิ๊กล็อกสกรีน จากบริษัท Silkcut LP., ประเทศไทย
- ไมโครปิเปตต์ ขนาด 10-100 μ L จากบริษัท Boeco, ประเทศ Germany
- ไมโครปิเปตต์ ขนาด 0.5-10 μ L จากบริษัท Boeco, ประเทศ Germany
- ตัวกรอง Nylon syringe filter ขนาด 0.45 μ m จากบริษัท KIMA, ประเทศ China
- กระดาษกรอง เบอร์ 1 จากบริษัท Whatman, ประเทศ UK
- กระดาษกรอง เบอร์ 4 จากบริษัท Whatman, ประเทศ UK
- แท่นให้ความร้อน
- เทปพลาสติกใส

- ชุดกล้องสำหรับถ่ายภาพรูป
- โทรศัพท์สมาร์ทโฟน รุ่น Galaxy S8 จากบริษัท Samsung
- คอมพิวเตอร์ รุ่น Surface Pro new จากบริษัท Microsoft

1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- โซเดียมกลูโคเนต (99%, $C_6H_{11}NaO_7$) จากบริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA
- คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (98%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) จากบริษัท CARLO ERBA reagents, ประเทศ France
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (98.5%, NaOH) จากบริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA
- กรดแอซติก (99.7%, CH_3COOH) จากบริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA
- โซเดียมแอซิเตตไตรไฮเดรต ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) จากบริษัท Merck, ประเทศ Germany
- กรดHCl (37%, HCl) จากบริษัท CARLO ERBA reagents, ประเทศ France
- 5-Br-PSAA ($C_{17}H_{21}BrN_5NaO_3S$) จากบริษัท Dojindo, ประเทศ Japan
- สีฟ็อกซี
- เรซิน
- ฮาร์ดเดนเนอร์
- สีส้มอาหาร

1.3 การเตรียมสารละลาย

1.3.1 สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 mol/L

ชั่งโซเดียมกลูโคเนต 1.09, 2.73, 5.45 และ 10.09 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนเป็น 50 mL โดยใช้ขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 mol/L

1.3.2 สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.3 และ 0.7 mol/L

ปิเปตต์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1.0 mol/L จากข้อ 1.3.1 ปริมาตร 12.5 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.3 สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.05 mol/L

ปิเปตต์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.1 mol/L จากข้อ 1.3.1 ปริมาตร 12.5 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.4 สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 10 mmol/L

ปิเปตต์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.1 mol/L จากข้อ 1.3.1 ปริมาตร 2.5 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.5 สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 mmol/L

ปิเปตต์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 10 mmol/L จากข้อ 1.3.4 ปริมาตร 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 mmol/L ตามลำดับ

1.3.6 สารละลาย CuSO_4 1.0 mol/L

ชั่ง CuSO_4 จำนวน 24.95 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนเป็น 100 mL โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL

1.3.7 สารละลาย CuSO_4 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 และ 0.7 mol/L

ปิเปตต์สารละลาย CuSO_4 1.0 mol/L จากข้อ 1.3.6 ปริมาตร 1, 2, 3, 5 และ 7 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย CuSO_4 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 และ 0.7 mol/L ตามลำดับ

1.3.8 สารละลาย CuSO_4 0.05 mol/L

ปิเปตต์สารละลาย CuSO_4 0.1 mol/L จากข้อ 1.3.7 ปริมาตร 25 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 mL หลังจากนั้นปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.9 สารละลาย NaOH 1.0, 2.0 และ 2.5 mol/L

ชั่ง NaOH 2.0, 4.0 และ 5.0 ลงในปิ๊กเกอร์ ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 50 mL ในปิ๊กเกอร์ ได้สารละลาย NaOH 1.0, 2.0, 2.5 และ 3.0 mol/L ตามลำดับ

1.3.10 สารละลาย NaOH 1.5 mol/L

ตวงสารละลาย NaOH 2.5 mol/L จากข้อ 1.3.9 ปริมาตร 30 mL ด้วยกระบอกตวง ลงในขวดปิ๊กเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 mL

1.3.11 สารละลาย NaOH 0.1, 0.2 และ 0.5 mol/L

ตวงสารละลาย NaOH 1.0 mol/L จากข้อ 1.3.9 ปริมาตร 1, 2 และ 5 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL แล้วเติมน้ำเพื่อปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.12 สารละลาย CH_3COOH 1 mol/L

เจือจาง CH_3COOH เข้มข้น ปริมาตร 5.7 mL ลงน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL

1.3.13 สารละลายบัฟเฟอร์แอสิตีต pH 4 เข้มข้น 0.5 mol/L

ซิงโครเดียมแอสิตีต 0.5 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อยประมาณ 15 mL แล้วเติมกรดแอสิติกเข้มข้น 1 mol/L จากข้อ 1.3.12 ปริมาตร 21 mL ปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 4 หลังจากนั้นเทสารละลายผสมลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.14 สารละลายบัฟเฟอร์แอสิตีต pH 4 เข้มข้น 0.1 mol/L

ซิงโครเดียมแอสิตีต 0.204 g แล้วเติมกรดแอสิติกเข้มข้น 1 mol/L จากข้อ 1.3.12 ปริมาตร 8.5 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 mL หลังจากนั้นเทสารละลายผสมลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.15 สารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 1 mmol/L

ซิง 5-Br-PSAA 0.0120 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 mL โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

1.3.16 สารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 mmol/L

ปิเปตต์สารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 1 mmol/L จากข้อ 1.3.14 ปริมาตร 200 , 300 และ 400 μ L ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์แอสิตีต pH 4.0 ความเข้มข้น 0.5 mol/L จากข้อ 1.3.13 ปริมาตร 60 μ L และน้ำปริมาตร 240, 140 และ 40 μ L ตามลำดับ

1.3.16 สารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 0.03 mmol/L

ปิเปตต์สารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 1 mmol/L จากข้อ 1.3.14 ปริมาตร 750 μ L ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL และปรับปริมาตรด้วย สารละลายบัฟเฟอร์แอสิตีต pH 4.0 ความเข้มข้น 0.1 mol/L จนถึงขีดบอกปริมาตร

1.3.18 สารละลาย HCl เข้มข้น 1.0 mol/L

ตวง HCl เข้มข้น 12 mol/L 4.2 mL ใส่ลงในปิเกตอร์ที่มีน้ำอยู่เล็กน้อย และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนได้ 50 mL

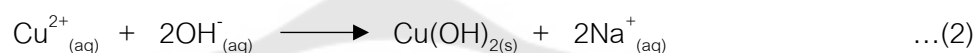
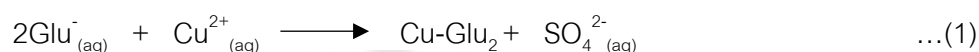
1.3.19 สารละลาย HCl เข้มข้น 0.2, 0.5 และ 0.7 mol/L

ปิเปตต์สารละลาย HCl เข้มข้น 1.0 mol/L จากข้อ 1.3.17 ปริมาตร 2, 5 และ 7 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย HCl เข้มข้น 0.2, 0.5 และ 0.7 mol/L ตามลำดับ

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคโนค

การศึกษาศึกษาปฏิกิริยาการตรวจวัดกรดกลูโคโนค อาศัยปฏิกิริยาการแทนที่ของกรดกลูโคโนคใน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Cu-Glu_2 ที่ละลายน้ำได้ หลังจากทำการกรองเพื่อแยกตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ที่เหลืออยู่ออกไป จะสามารถวัดปริมาณกรดกลูโคโนคได้โดยการติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Cu-Glu_2 ซึ่งมีสีน้ำเงิน ปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคโนค แสดงในสมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ (Alt, 1955)



2.1.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการวัดปริมาณกรดกลูโคโนค โดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 ที่ได้จากความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานกลูโคโนตในช่วงความยาวคลื่น 400 – 900 nm และเปรียบเทียบสเปกตรัมของ Cu-Glu_2 กับสเปกตรัมของสารละลาย CuSO_4 ในน้ำที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เท่ากัน โดยผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจากการทดลองของ Alt (1955) ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองโดยละเอียดดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ขั้นตอนการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2

ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
1	ปิเปตต์สารละลาย NaOH 2.5 mol/L ปริมาตร 5 mL ลงในปิเปเกอร์ขนาด 50 mL
2	ค่อย ๆ เติมสารละลาย CuSO_4 เข้มข้น 0.5 mol/L ปริมาตร 7.5 mL จากบิวเรตต์ เขย่าตลอดเวลาขณะเติมสารละลาย
3	ปิเปตต์สารละลายกลูโคโนตมาตรฐานเข้มข้นต่าง ๆ (0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 mol/L) ปริมาตร 2.5 mL ลงในปิเปเกอร์
4	นำสารละลายที่ผสมแล้วไปให้ความร้อนจนเดือด เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น ปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
5	กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และล้างตะกอนด้วยสารละลาย NaOH 0.1 mol/L
6	ปรับปริมาตรสารละลายที่กรองได้ด้วยน้ำในขวดปรับปริมาณขนาด 25 mL
7	กรองสารละลายที่ได้ด้วยตัวกรอง (nylon syringe filter) ขนาด 0.45 μ m ปริมาตร ประมาณ 2 mL
8	เจือจางสารละลายที่ได้จากการกรองผ่านตัวกรอง 2 เท่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง สแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 400 – 900 nm

หลักจากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ในการวัดปริมาณกลูโคเนต และประยุกต์ใช้วิธีการนี้ในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว จำนวน 4 ชนิด

2.1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเชิงซ้อน Cu – 5-Br-PSAA

เนื่องจากมีงานวิจัยของ Ohno et al. (2006) พบว่า Cu^{2+} สามารถทำปฏิกิริยากับ 5-Br-PSAA เกิดเป็น Cu – 5-Br-PSAA ที่มีค่า molar absorptivity สูง และมีความไวในการวิเคราะห์ที่ดี ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะนำ 5-Br-PSAA มาใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิก โดยนำ 5-Br-PSAA ไปผสมกับ Cu-Glu_2 ที่ได้มาจากการทดลองในข้อ 2.1.1 เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงของ Cu – 5-Br-PSAA แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 900 nm ต่อไป

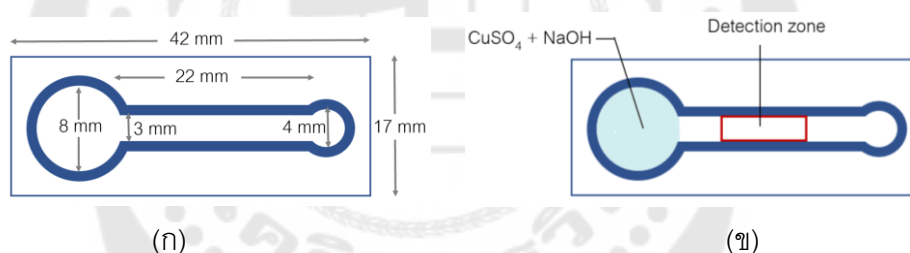
การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ 5-Br-PSAA มาใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิก ทำได้โดยการแบ่งสารละลายสุดท้ายที่ได้จากข้อ 2.1.1 มา 8 μ L ใส่ลงในภาชนะที่บรรจุสารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 0.03 mmol/L ในสารละลายบัฟเฟอร์แอสซิเตด pH 4 เข้มข้น 0.1 mol/L 2.5 mL เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที (Makino, 1989) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนที่ 400 - 900 nm

2.2 การออกแบบและสร้าง μ PADs ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคซิก

2.2.1 การออกแบบอุปกรณ์ μ PADs

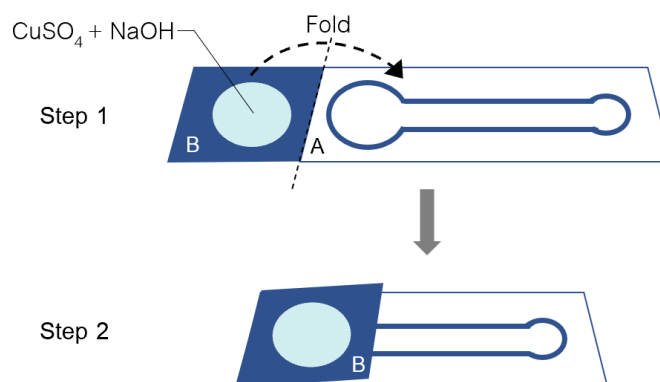
อุปกรณ์ μ PADs สำหรับวัดความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2

อุปกรณ์ μ PADs แบบที่ 1 เป็นแบบที่ทำได้ง่ายและไม่ยุ่งยาก คือ แบบ 2D- μ PADs โดยออกแบบเป็นรูปดัมเบลแบบไม่สมมาตร ประกอบด้วยวงกลมขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 mm สำหรับเป็นบริเวณหยดสารละลายต่าง ๆ วงกลมขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm สำหรับเป็นบริเวณที่รองรับสารละลายที่ไหลมา ตามช่องสี่เหลี่ยมยาว 22.0 mm และกว้าง 3.0 mm ดังแสดงในภาพประกอบ 16 อุปกรณ์มีขนาด 42.0 mm $\times$ 17.0 mm ในการตรวจวัดจะทำการหยดสารละลาย CuSO_4 ลงในบริเวณวงกลมใหญ่ รอจนแห้งประมาณ 7 นาที ตามด้วย NaOH รอจนแห้งประมาณ 7 นาที หลังจากนั้นหยดสารละลายกลูโคสมาตรฐาน หรือสารตัวอย่าง นำไปให้ความร้อน แล้วชะด้วย NaOH 0.1 mol/L เพื่อชะ Cu-Glu_2 ให้ไหลออกมาตามช่องทางที่กำหนด และตรวจวัดความเข้มข้นบริเวณช่องทางการไหล



ภาพประกอบ 16 (ก) รูปแบบ 2D- μ PADs 1 ชั้นสำหรับวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบ Cu-Glu_2 (ข) การหยดสารละลายที่ใช้ในการตรวจวัด

อุปกรณ์ μ PADs แบบที่ 2 เป็นแบบที่มีความซับซ้อนมากขึ้นเล็กน้อย โดยใช้ อุปกรณ์ 3D- μ PADs แบบ 2 ชั้น ดังแสดงในภาพประกอบ 17 ประกอบด้วย μ PADs 2 ส่วน คือ ส่วน A ที่มีลักษณะเป็นรูปดัมเบลแบบไม่สมมาตร มีขนาดเท่ากับ μ PADs ในแบบที่ 1 (ภาพประกอบ 16) และส่วน B ที่ภายในมีวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 mm สำหรับหยดสารละลาย และเกิดปฏิกิริยาดังที่อธิบายไว้ด้านบน ในการตรวจวัดกลูโคสสามารถทำได้ตามขั้นตอนที่แสดงในตาราง 2



ภาพประกอบ 17 3D-μPADs 2 ชั้น เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบ Cu-Glu₂

ตาราง 2 ลำดับขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดย 3D-μPADs 2 ชั้น สำหรับวัด Cu-Glu₂

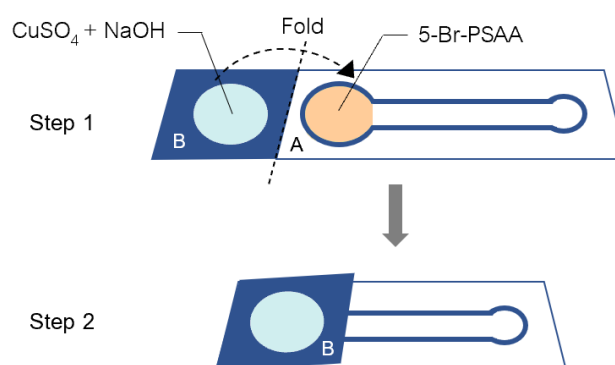
ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
1	หยดสารละลาย NaOH 1.5 mol/L ปริมาตร 6 μL ลงในบริเวณวงกลม B รอแห้งเป็นเวลาประมาณ 7 นาที
2	หยดสารละลาย CuSO ₄ 0.7 mol/L ปริมาตร 6 μL ลงในบริเวณวงกลม B และรอสารละลายแห้งประมาณ 7 นาที
3	หยดสารละลายกลูโคสมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 6 μL ลงบนวงกลม B รอให้สารละลายกระจายตัวและซึมลงกระดาษประมาณ 2 นาที
4	นำ μPADs ใส่ถุงพลาสติกและให้ความร้อนในน้ำ 80 °C เป็นเวลา 3 นาที
5	ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที แล้วพับให้วงกลม B ซ้อนทับกับวงกลม A
6	หยดสารละลาย NaOH 0.1 mol/L 15 μL ลงบนวงกลม B เพื่อทำการชะให้สารละลายไหลลงสู่ชั้นล่างและแพร่ออกตามช่องทางการไหล ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที

ตาราง 2 (ต่อ)

ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
7	คลี่อุปกรณ์ μ PADs 2 ชั้นออก ถ่ายรูปส่วน A ในกล่องสำหรับถ่ายรูปด้วยโทรศัพท์มือถือ และวิเคราะห์ความเข้มสีแดงที่ลดลง (Inverted red intensity) ในระบบ RGB ที่บริเวณวงกลม A ด้วยโปรแกรม ImageJ

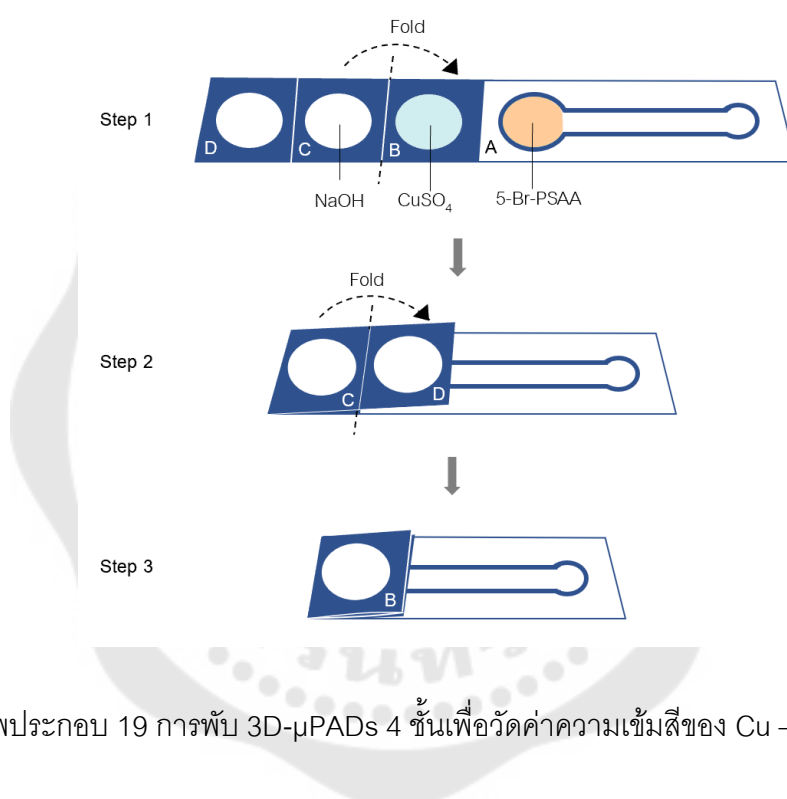
อุปกรณ์ μ PADs สำหรับวัดความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu – 5-Br-PSAA

อุปกรณ์ μ PADs แบบที่ 3 ใช้ 3D- μ PADs แบบ 2 ชั้น เหมือนกับแบบที่ 2 แต่มีการหยดสาร 5-Br-PSAA ลงในวงกลมของส่วน A ดังแสดงในภาพประกอบ 18 สำหรับวัดความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA ในการตรวจวิเคราะห์จะเริ่มด้วยการหยด 5-Br-PSAA ลงในบริเวณวงกลมของส่วน A และหยด NaOH ลงในวงกลม A รอจนแห้งประมาณ 7 นาที ตามด้วยสารละลาย CuSO_4 และรอจนสารละลายแห้งอีกครั้ง หลังจากนั้นหยดสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง ลงในวงกลม B นำไปให้ความร้อน และพับวงกลม B มาทับส่วน A ให้วงกลมทั้ง 2 ซ้อนทับกันพอดี แล้วชะด้วยสารละลาย NaOH 0.1 mol/L เพื่อชะ Cu-Glu₂ จากวงกลม B ลงสู่ส่วน A ทำปฏิกิริยากับ 5-Br-PSAA และไหลออกตามช่องที่กำหนด ทำการวัดค่าความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA ที่บริเวณวงกลมของส่วน A



ภาพประกอบ 18 3D- μ PADs 2 ชั้นเพื่อวัดค่าความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA

อุปกรณ์ μ PADs แบบที่ 4 มีการออกแบบให้มีความซับซ้อนมากขึ้นเล็กน้อย เพื่อป้องกันการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ กับ 5-Br-PSAA ที่ทำการหยดไว้ก่อน ใช้ 3D- μ PADs แบบ 4 ชั้น ดังแสดงในภาพประกอบ 19 ประกอบด้วย ส่วน A B C และ D โดย ส่วน A, B และ C มีรูปร่างเหมือนกันคือเป็นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 mm และบริเวณ D ที่มีลักษณะเป็นรูปดัมเบลแบบไม่สมมาตร มีขนาดเท่ากับ μ PADs ในแบบที่ 1 (ภาพประกอบ 16) ในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคสิกสามารถทำได้ตามขั้นตอนดังแสดงในตาราง 3



ภาพประกอบ 19 การพับ 3D- μ PADs 4 ชั้นเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 3 ลำดับขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสิกโดย 3D- μ PADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-5-Br-PSAA

ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
1	หยดสารละลาย 5-Br-PSAA 0.8 mmol/L ในบัฟเฟอร์แอสซิเตต ปริมาตร 5 μ L สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 mol/L ปริมาตร 6 μ L และสารละลาย NaOH 1.0 mol/L ปริมาตร 6 μ L ลงในวงกลม A, B และ C ตามลำดับ รอแห้งเป็นเวลาประมาณ 7 นาที

ตาราง 3 (ต่อ)

ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
2	หยดสารละลาย HCl 0.2 mol/L ปริมาตร 5 μ L ลงในวงกลม A
3	พับครึ่งระหว่างวงกลม B และ C โดยวงกลม C ซ้อนทับวงกลม B และ วงกลม D ซ้อนทับวงกลม A
4	หยดสารละลาย NaOH 1.0 mol/L ปริมาตร 12 μ L ลงบนวงกลม C เพื่อให้เกิดตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ รอแห้งประมาณ 7 นาที
5	หยดสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 6 μ L ลงบนวงกลม C รอให้สารละลายแพร่ประมาณ 1 นาที แล้วหยดซ้ำอีก 6 μ L และรอเวลาอีกประมาณ 1 นาที
6	นำ μ PADs ใส่ถุงพลาสติกและให้ความร้อนในน้ำอุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 นาที
7	พับครึ่งอุปกรณ์ μ PADs อีกครั้ง โดยพับครึ่งระหว่างวงกลม C และ D ให้วงกลมทั้ง 4 ซ้อนทับกันพอดี (ลำดับวงกลมจากชั้นบนลงชั้นล่างคือ B C D A)
8	ชะด้วยน้ำ 25 μ L ลงที่วงกลม B ให้สารละลายไหลลงสู่ด้านล่างและแพร่ออกตามช่องทางการไหล รอเวลา 10 นาที
9	คลี่อุปกรณ์ที่ซ้อนกันอยู่ 4 ชั้นออก ถ่ายรูปอุปกรณ์ชั้นล่างสุด (ส่วน A) ในกล่องสำหรับถ่ายรูปด้วยโทรศัพท์สมาร์ทโฟน และวิเคราะห์ความเข้มสีฟ้า (Blue intensity) ในระบบ RGB ที่บริเวณวงกลม A ด้วยโปรแกรม ImageJ

2.2.2 การขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs

ในการออกแบบอุปกรณ์ μ PADs ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะทำการออกแบบ μ PADs โดยใช้โปรแกรม Adobe illustrator เพื่อสร้างแบบสำหรับขอบเขตที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic wax barrier) แสดงด้วยสีน้ำเงินในภาพประกอบ 16-19 ก่อนนำไปสร้างแม่พิมพ์ (block screen) เพื่อใช้ในการขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs บนกระดาษกรอง โดยอาศัยเทคนิคการสกรีนสารที่มีคุณสมบัติไม่

ขอบน้ำผ่านบล็อกสกรีน (Wax screen printing) เพื่อขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs วิธีการดังกล่าวผู้วิจัยได้ดัดแปลงมาจาก Buring et al. (2018) โดยมีขั้นตอนดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ขั้นตอนการขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs

ลำดับ	ขั้นตอนในการวิเคราะห์
1	วางบล็อกสกรีนที่มีลวดลายของรูปแบบ μ PADs ที่ออกแบบไว้บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
2	ผสมสีอีพ็อกซี 0.4 g เรซิน 4.0 g และฮาร์ดเดนเนออร์ 4.0 g (อัตราส่วน 0.1 : 1.0 : 1.0) คนให้เข้ากัน และทิ้งไว้ประมาณ 6 นาที
3	เทสีผสมในข้อ 2 ลงบนบล็อกสกรีน แล้วสกรีนผ่านลวดลายของบล็อก
4	นำบล็อกสกรีนออกจากกระดาษกรอง ทิ้งกระดาษไว้ประมาณ 1 วัน เพื่อให้สีซึมลงกระดาษและแห้งสนิท เกิดเป็นขอบเขตที่ไม่ชอบน้ำตามลายที่กำหนด
5	ติดเทปพลาสติกใสด้านหลังของอุปกรณ์ μ PADs เฉพาะชั้นล่างของ μ PADs (ส่วน A) เพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารละลายออกนอกบริเวณตรวจวัด

ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพการขึ้นรูปของอุปกรณ์ μ PADs ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีดังกล่าวสามารถทำได้หลายวิธี เบื้องต้นคือการสังเกตด้วยตาเปล่า อุปกรณ์ μ PADs ที่ดี สีของขอบเขตที่ไม่ชอบน้ำที่ได้จากการสกรีนจะต้องสม่ำเสมอและชัดเจนทั้งด้านหน้าและด้านหลังของ μ PADs ไม่มีรอยร้าว หรือการขาดหายของสี ไม่มีการกระจายของจุดสีเล็ก ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณตรวจวัด และสามารถส่องตรวจอุปกรณ์บางชิ้นได้ด้วยการหยดน้ำสีผสมอาหารลงบริเวณตรวจวัด จะต้องไม่มีการรั่วไหลของสีผสมอาหารออกนอกขอบเขต หลังจากนั้นทำการวัดขนาดของบริเวณชอบน้ำ ทั้งบริเวณวงกลม และช่องทางการไหลของสารละลาย แล้วจึงทำการตัดแยกอุปกรณ์ μ PADs ตามขนาดของบริเวณชอบน้ำ

หลังจากทำการสกรีนทุกครั้งควรทำความสะอาดให้เรียบร้อย ซึ่งในการทำความสะอาดบล็อกสกรีนจะใช้การสเปรย์โทลูอีนลงบนบล็อกแล้วเช็ดด้วยกระดาษเช็ดอเนกประสงค์จนไม่มีสีหลุดออกมาทั้งด้านหน้าและด้านหลังของบล็อกสกรีน

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโคนิกบน μ PADs

ผู้วิจัยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ μ PADs 2 แบบ ประกอบด้วย μ PADs สำหรับวัดความเข้มข้นของ Cu-Glu_2 และ $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ ดังนี้

2.3.1 อุปกรณ์ 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2

2.3.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย CuSO_4 ที่ 0.5, 0.7 และ 1.0 mol/L โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 mol/L

2.3.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ที่ 1.0, 1.5 และ 2.0 mol/L โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 mol/L

2.3.1.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 ที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 °C เป็นเวลา 3 นาที โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน 0.3 และ 1.0 mol/L

2.3.1.4 ศึกษาเวลาในการให้ความร้อนในการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน 0.3 และ 1.0 mol/L

2.3.1.5 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการถ่ายรูปเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้น หลังจากชะสารละลาย Cu-Glu_2 ด้วยสารละลาย NaOH 0.1 mol/L ปริมาตร 15 μL ทำการถ่ายรูปอุปกรณ์ μ PADs ที่เวลา 5, 7, 10, 12 และ 15 นาที โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน 0.3 และ 1.0 mol/L

2.3.1.6 ศึกษาปริมาตรการชะด้วยสารละลาย NaOH 0.1 mol/L ที่ปริมาตร 6, 10 และ 15 μL โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน 0.3 และ 1.0 mol/L

2.3.2 อุปกรณ์ 3D- μ PADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$

2.3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย HCl ที่ 0.0, 0.2, 0.5 และ 0.7 mol/L โดยตรวจวิเคราะห์กับสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L

2.3.2.2 ศึกษาอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 โดยให้ความร้อนในน้ำที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L

2.3.2.3 ศึกษาเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 1.0, 2.0, 30 และ 5.0 นาที ตรวจวิเคราะห์แบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L

2.3.2.4 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้น โดยถ่ายรูปแบบอุปกรณ์ μ PADs ที่เวลา 10, 12, 15 และ 17 นาทีหลังจากทำการชะสารละลาย Cu-Glu₂ ด้วยน้ำปริมาตร 25 μ L โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L

2.3.2.5 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 0.7 และ 1.0 mol/L โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 4 และ 6 mmol/L

2.3.2.6 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 5-Br-PSAA ที่ความเข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 mmol/L ในสารละลายบัฟเฟอร์แอซิเตต pH 4 โดยตรวจวิเคราะห์กับแบลงค์ (น้ำ) และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 4 และ 6 mmol/L

2.3.2.7 ศึกษาความเข้มข้นสารละลาย CuSO₄ ที่ 0.1, 0.5 และ 1.0 mol/L โดยตรวจวิเคราะห์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 4, 6 และ 8 mmol/L

2.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคด้วย μ PADs ที่พัฒนาขึ้น

ในการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนค μ PADs ที่พัฒนาขึ้นสำหรับติดตามความเข้มข้น Cu-Glu₂ และ 5-Br-PSAA ทั้ง 2 แบบ จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 และศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.4.1 ช่วงความความเข้มข้นของกรดกลูโคโนคที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (Working range)

2.4.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวัดกรดกลูโคโนคได้ (Limit of detection, LOD) คำนวณได้จากการแทนค่าของผลรวม 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและสัญญาณเฉลี่ยของแบลงค์ ลงในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

2.4.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่อุปกรณ์สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคได้ (Limit of quantitation, LOQ) คำนวณได้จากการแทนค่าของผลรวม 5 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและสัญญาณเฉลี่ยของแบลงค์ ลงในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

2.4.4 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) คำนวณจากความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ของสารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน จำนวน 10 ซ้ำ แล้วรายงานในรูปของ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.5 การประยุกต์ใช้ μ PADs ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 แบบ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคโนคในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ เซรัมบำรุงผิวที่วางขายในห้างสรรพสินค้าทั่วไป ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ชนิด การเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้โดยเจือจางเซรัมในน้ำ สารละลายตัวอย่างถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณของกรดกลูโคโนค ด้วยอุปกรณ์ μ PADs ทั้ง 2 แบบที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม แล้วศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ดังนี้

ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) โดยวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างที่เติมและไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคโนคด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น แล้วนำผลวิเคราะห์มาคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับตามสมการที่ (3)

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติมกลูโคเนต} - \text{ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้น}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นของสารกลูโคเนตที่เติมลงไป}} \quad \dots(3)$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสิกโดยอาศัยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) ผู้วิจัยได้แบ่งผลการทดลองออกเป็นหัวข้อดังนี้

1. การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคสิก
2. การออกแบบและสร้าง μ PADs ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคสิก
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสิกบน μ PADs
4. การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสิกด้วย μ PADs ที่พัฒนาขึ้น
5. การประยุกต์ใช้ μ PADs ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

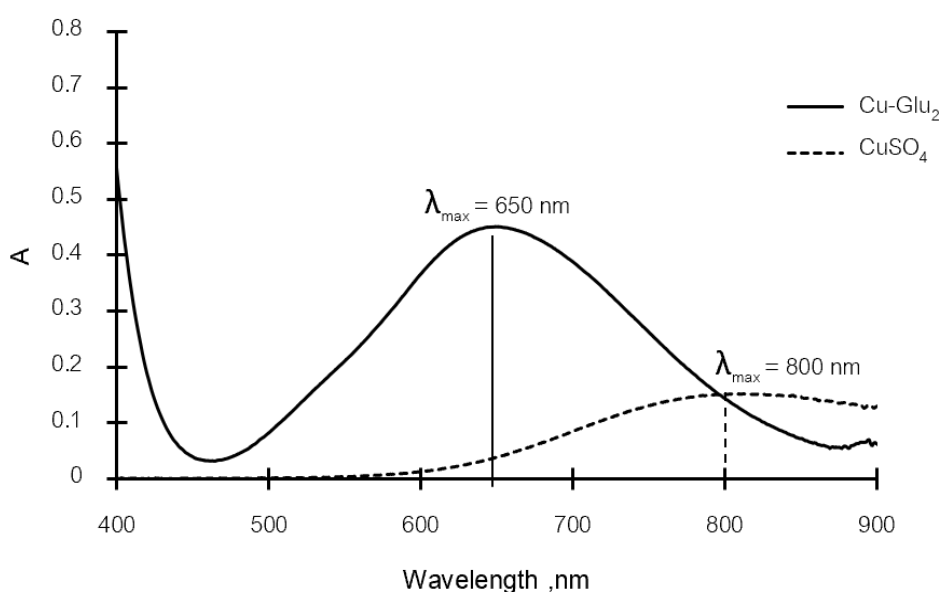
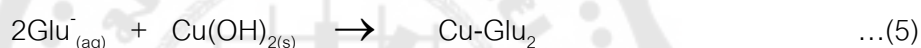
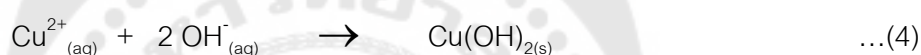
1. การศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคสิก

1.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2

การศึกษาปฏิกิริยาการตรวจวัดกรดกลูโคสิก โดยอาศัยปฏิกิริยาการแทนที่ของกลูโคเนตกับ Cu^{2+} ในสารประกอบ $\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}$ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Cu-Glu_2 ที่ละลายน้ำได้ หลังจากทำการกรองเพื่อแยกตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ที่เหลืออยู่ออกไป ก็จะสามารถวัดความเข้มข้นของ Cu-Glu_2 ที่เกิดขึ้นได้ ปริมาณของ Cu-Glu_2 นี้จะสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของกรดกลูโคสิก

ในการทดลองจะเริ่มจากการผสมสารละลาย NaOH และสารละลาย CuSO_4 เข้าด้วยกัน จะเกิดตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ขึ้น ซึ่งตะกอนดังกล่าวมีลักษณะเป็นตะกอนวุ้น สีฟ้า กระจายอยู่ในสารละลาย จากนั้นเมื่อเติมสารละลายกรดกลูโคสิกในรูปของโซเดียมกลูโคเนต แล้วนำไปให้ความร้อนในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จะสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มขึ้นแสดงถึงปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบ Cu-Glu_2 ที่มากขึ้น ในขณะเดียวกัน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ที่เหลือจะเปลี่ยนเป็นตะกอนสีดำของคอปเปอร์ออกไซด์ (CuO) ซึ่งเป็นตะกอนที่มีขนาดใหญ่สามารถตกลงมาอยู่ที่ก้นภาชนะ จากนั้นทำการกรองตะกอนออกจากสารละลายก่อนนำไปวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง

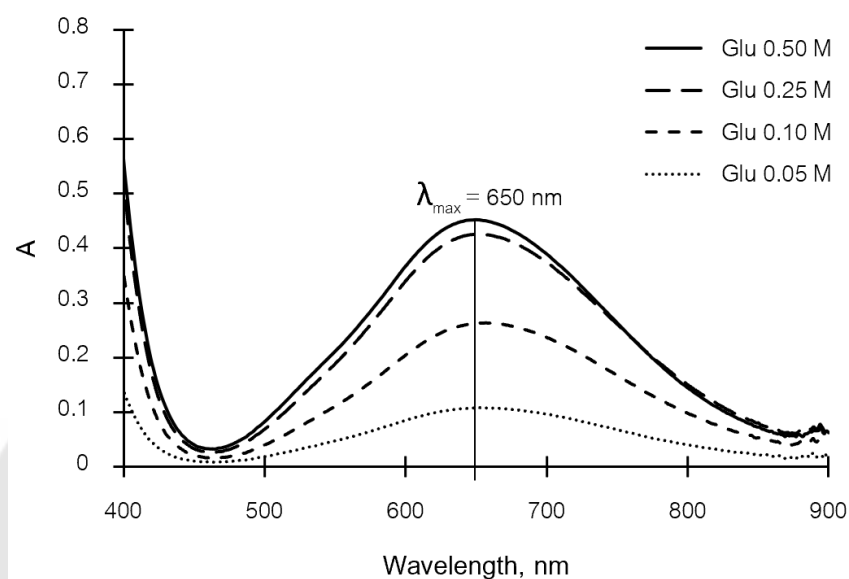
อย่างไรก็ดีเพื่อยืนยันการดำเนินไปของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu₂ ผู้วิจัยได้จึงเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยา เทียบกับ สารละลาย CuSO₄ เริ่มต้น ที่ความเข้มข้น 12.5 mmol/L ดังแสดงในภาพประกอบ 20 พบว่า สารละลายทั้งสองมีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{\max}$) ที่แตกต่างกัน คือ 650 nm และ 800 nm โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 0.45 และ 0.15 สำหรับสารละลาย Cu-Glu₂ และคอปเปอร์ซัลเฟต ตามลำดับ ค่า $\lambda_{\max}$ ของสารที่ได้หลังทำปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไปจากสารตั้งต้น (CuSO₄) ยืนยันได้ว่ามีปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้น และค่า $\lambda_{\max}$ ที่ 650 nm ก็ใกล้เคียงกับค่า $\lambda_{\max}$ ของ สารประกอบ Cu-Glu₂ เกิดขึ้นตามที่ผู้เคยเสนอไว้ (Alt, 1955) แสดงว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการ ทดลองน่าจะเป็นดังแสดงในสมการที่ (4) และ (5) ตามลำดับ



ภาพประกอบ 20 สเปกตรัมของสารละลาย CuSO₄ เริ่มต้นและสารละลาย Cu-Glu₂ ที่เตรียมได้

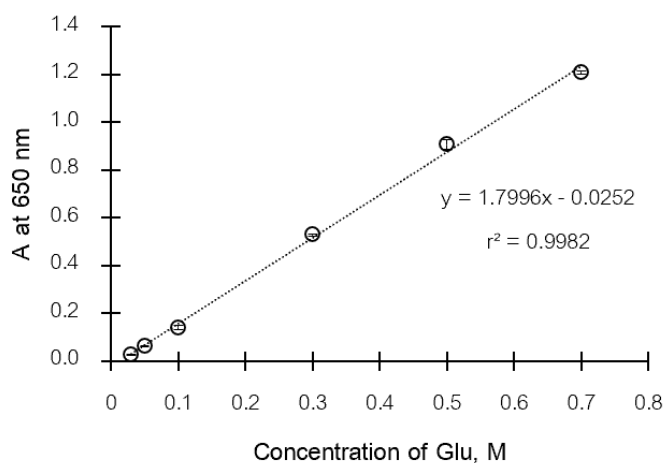
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมของสารละลาย Cu-Glu₂ ที่เตรียมได้กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคเนตที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.25 และ

0.50 mol/L ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพประกอบ 21 พบว่าทุกสเปกตรัมที่ได้มีค่า $\lambda_{\max}$ เท่ากันที่ 650 nm และค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max}$ นี้แปรผันตามความเข้มข้นของกลูโคเนต จึงมีแนวโน้มที่สามารถใช้ค่าการดูดกลืนแสงนี้ ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกรดกลูโคโนคในตัวอย่างได้



ภาพประกอบ 21 สเปกตรัมของสารละลาย Cu-Glu₂ เมื่อใช้สารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.05 - 0.50 mol/L

ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ได้ดังแสดงในภาพประกอบ 22 พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตได้ในช่วงความเข้มข้น 0.03 – 0.70 mol/L ได้สมการเส้นตรง $y = 1.800(\pm 0.012)x - 0.025(\pm 0.008)$ ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (Coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.998 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) เท่ากับ 0.024 mol/L และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 10SD) เท่ากับ 0.03 mol/L ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, $n=10$) ได้เท่ากับ ร้อยละ 2.57 คัดจากสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.5 mol/L



ภาพประกอบ 22 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Cu-Glu_2 ที่ 660 nm

เมื่อทำการประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตในตัวอย่างเซรัมบำรุงผิวที่จำหน่ายทั่วไปในห้างสรรพสินค้า ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 4 ชนิด โดยเจือจางตัวอย่างสองเท่า และสีเท่าก่อนทำการวิเคราะห์ และศึกษาร้อยละการคืนกลับด้วยการเติมกลูโคเนตมาตรฐาน 0.2 mol/L ลงในสารละลายตัวอย่างได้ผลดังตาราง 5

ตาราง 5 ปริมาณกรดกลูโคเนตในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี

ตัวอย่าง	การเจือจาง	ความเข้มข้นกลูโคเนต (mol/L)		ร้อยละการคืนกลับ
		ตัวอย่างเริ่มต้น	เมื่อเติม Std.Glu	
A	2x	0.308 ± 0.054	0.525 ± 0.017	120.3
	4x	0.142 ± 0.007	0.366 ± 0.016	107.6
B	2x	0.053 ± 0.004	0.230 ± 0.005	98.3
	4x	0.039 ± 0.004	0.225 ± 0.011	103.2
C	2x	0.031 ± 0.002	0.221 ± 0.006	105.1
	4x	n.d.	0.206 ± 0.003	100.7
D	2x	n.d.	0.173 ± 0.011	81.7
	4x	n.d.	0.180 ± 0.012	87.8

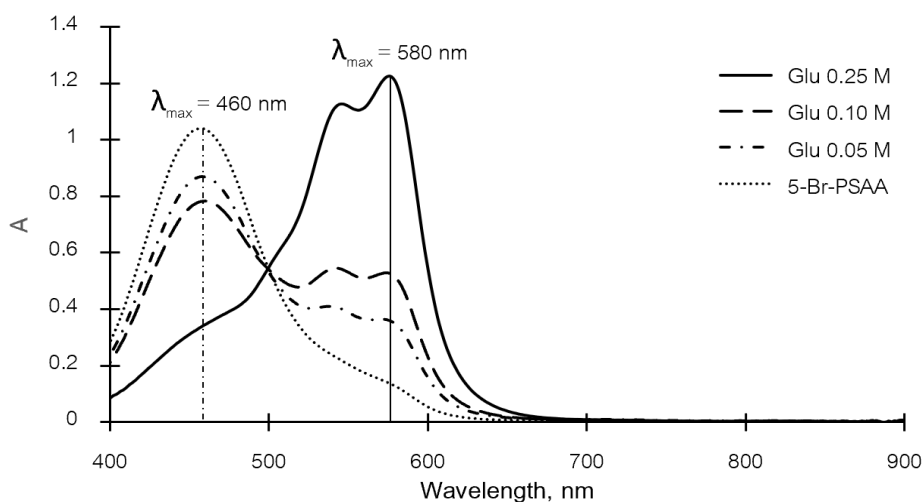
n.d. คือ ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้

จากผลการทดลองพบว่า มีตัวอย่าง A และตัวอย่าง B เท่านั้นที่มีปริมาณกรดกลูโคโนคอยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ โดยมีปริมาณกรดกลูโคโนคอยู่ 0.56 และ 0.15 mol/L ในตัวอย่าง A และ B ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้ของตัวอย่าง A กับผลวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.56 mol/L พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับค่าที่ระบุไว้ที่ฉลากผลิตภัณฑ์ที่ 0.56 mol/L แสดงว่าผลวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้อง และเมื่อทำการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างเครื่องสำอางทั้งสี่ชนิดโดยเติมสารละลายกรดกลูโคโนคมาตรฐานเข้มข้น 0.2 mol/L พบว่าได้ค่า 80 – 120% แสดงว่าองค์ประกอบของตัวอย่างไม่รบกวนวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคในเครื่องสำอาง

1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเชิงซ้อน Cu – 5-Br-PSAA

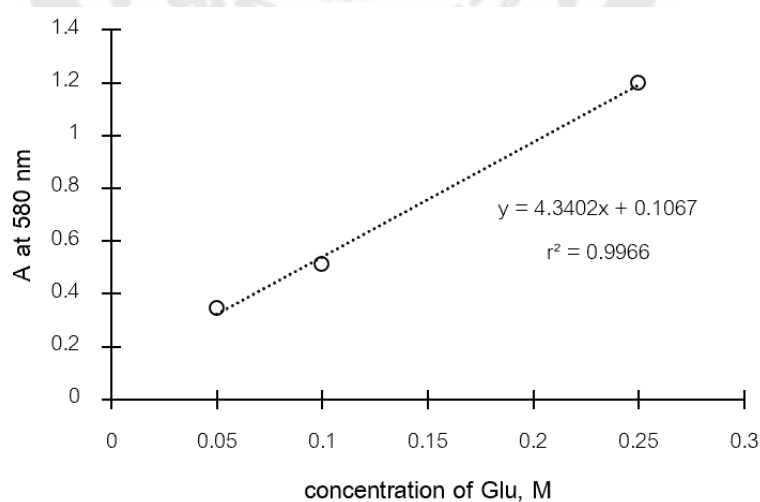
จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า Cu^{2+} สามารถเกิดปฏิกิริยากับ 5-Br-PSAA ได้ในสถานะที่เป็นกรดอ่อน และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง ผู้วิจัยจึงนำ 5-Br-PSAA มาใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคโนคเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์

ทำการทดลองโดยเติมสารละลาย Cu-Glu_2 ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาในข้อ 1 มา 8 μL ลงในสารละลาย 5-Br-PSAA เข้มข้น 0.03 mmol/L ปริมาตร 2.5 mL พบว่า สารละลายเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีม่วง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 900 nm ภาพประกอบ 23 แสดงสเปกตรัมของสารละลายที่ได้เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ 5-Br-PSAA ที่ไม่ได้ผสมกับสารละลาย Cu-Glu_2 พบว่า λ_{max} ของสารประกอบ Cu – 5-Br-PSAA อยู่ที่ความยาวคลื่น 580 nm ซึ่งแตกต่างไปจาก λ_{max} ของรีเอเจนต์ 5-Br-PSAA ที่ 460 nm แสดงว่า 5-Br-PSAA เข้าจับกับ Cu^{2+} ใน Cu-Glu_2 ได้ และเกิดเป็น Cu – 5-Br-PSAA ที่มีสีม่วงได้ และแนวโน้มค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้สารละลายกรดกลูโคโนคมาตรฐานที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถนำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคหรือกรดกลูโคโนคได้



ภาพประกอบ 23 สเปกตรัมของสารละลาย 5-Br-PSAA ในบัฟเฟอร์แอสซิเตด pH 4 และสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่เกิดจากสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 0.05 – 0.25 mol/L

จากผลของการศึกษาเบื้องต้นในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.25 mol/L พบว่าได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในภาพประกอบ 24 สมการเส้นตรง $y = 4.340x + 0.107$ และมีสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (r^2) เท่ากับ 0.997 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ 5-Br-PSAA มาช่วยในการติดตามปริมาณกลูโคเนตจะช่วยให้สามารถวัดปริมาณกลูโคเนตที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงได้

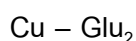


ภาพประกอบ 24 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ความยาวคลื่น 580 nm

2. การออกแบบและสร้าง μ PADs ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดกรดกลูโคซิก

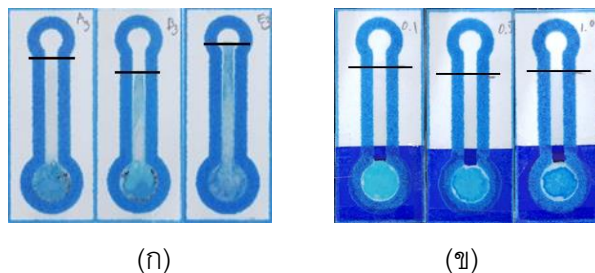
2.1 ออกแบบอุปกรณ์ μ PADs

2.1.1 อุปกรณ์ μ PADs สำหรับวัดความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน



ในการติดตามความเข้มข้นของสารประกอบ Cu-Glu_2 ที่เกิดขึ้น ผู้วิจัยได้ออกแบบ μ PADs ทั้งหมดสองแบบ โดย μ PADs แบบที่ 1 เป็น 2D- μ PADs มีรูปร่างเป็นดัมเบลแบบไม่สมมาตร (ภาพประกอบ 16) โดยให้วงกลมขนาดใหญ่เป็นบริเวณสำหรับเกิดปฏิกิริยา แล้วทำการชะสารประกอบ Cu-Glu_2 ออกมาตามช่องทางการไหล ทำการติดตามความเข้มข้นที่บริเวณช่องทางการไหล พบว่าสารละลายที่แพร่ออกมาตามช่องทางการไหลมีระยะทางการแพร่ไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งถึงแม้ทำการชะด้วยสารละลาย NaOH ที่ปริมาตรเท่ากัน ซึ่งมีผลต่อความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ สารละลายที่แพร่ไปได้ไกลจะมีความเข้มข้นที่น้อยกว่าสารละลายที่แพร่ได้ใกล้ ทั้งนี้เนื่องจากตะกอนที่เกิดขึ้นในบริเวณเกิดปฏิกิริยาขัดขวางการไหลของสารละลายออกสู่ช่องทางการไหล และตะกอนกระจายตัวอย่างไม่สม่ำเสมอ ทำให้การไหลของสารละลายในแต่ละครั้งแตกต่างกันออกไป ดังผลการทดลองที่แสดงในภาพประกอบ 25 ดังนั้น 2D- μ PADs จึงไม่เหมาะสมต่อการตรวจติดตามความเข้มข้นของสารประกอบ Cu-Glu_2

μ PADs แบบที่ 2 เป็น 3D- μ PADs 2 ชั้น (ภาพประกอบ 17) ถูกพัฒนาเพิ่มเติมเพื่อลดปัญหาระยะทางการไหลของสารละลายที่ไม่สม่ำเสมอที่ส่งผลต่อความเข้มข้น โดยเพิ่มวงกลม B เป็นบริเวณสำหรับหยดสารละลายต่าง ๆ เพื่อควบคุมให้ปฏิกิริยาทั้งหมดเกิดขึ้นเฉพาะภายในวงกลม B ก่อน แล้วจึงทำการชะ Cu-Glu_2 ที่เกิดขึ้นให้ไหลในแนวดิ่งลงสู่วงกลม A ด้านล่าง และแพร่ออกสู่ช่องทางการไหล จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถควบคุมระยะทางการไหลของสารละลายได้ดีขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 25 ผู้วิจัยจึงพิจารณาว่า μ PADs ที่เหมาะสมกับการตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย Cu-Glu_2 คือ 3D- μ PADs แบบ 2 ชั้น



ภาพประกอบ 25 ภาพถ่ายแสดงระยะทางการไหลของสารละลายตามช่องทางการไหลของ
อุปกรณ์ (ก) 2D-μPADs และ (ข) 3D-μPADs แบบ 2 ชั้น

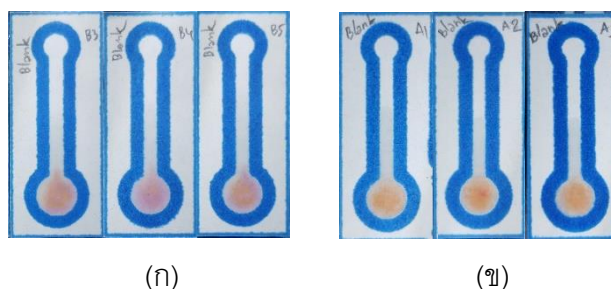
2.1.2 อุปกรณ์ μPADs สำหรับวัดความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน

Cu – 5-Br-PSAA

ในการติดตามความเข้มข้นของสารประกอบ Cu – 5-Br-PSAA สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสนั้น ผู้วิจัยได้ออกแบบ μPADs ทั้งหมดสองแบบคือ μPADs แบบที่ 3 และ 4

μPADs แบบที่ 3 คือ 3D-μPADs 2 ชั้นที่มีการหยดสารละลาย 5-Br-PSAA ที่บริเวณกลม A (ชั้นล่าง) เพื่อใช้ในการติดตามความเข้มข้นของสารประกอบ Cu – 5-Br-PSAA (ภาพประกอบ 18) โดยให้ปฏิกิริยาทั้งหมดเกิดขึ้นภายในวงกลม B (ชั้นบน) เช่นเดียวกับแบบที่ 2 พบว่าเมื่อพับ μPADs ให้วงกลม B ซ้อนทับวงกลม A ตะกอนคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์จะสัมผัสกับ 5-Br-PSAA ได้โดยตรง ทำให้มีการเปลี่ยนสีของ 5-Br-PSAA จากสีเหลืองเป็นสีม่วงได้แม้เมื่อไม่มีสารกลูโคส (แบลงค์) ดังแสดงในภาพประกอบ 26(ก) ดังนั้น 3D-μPADs แบบ 2 ชั้น จึงไม่เหมาะสมต่อการติดตาม Cu – 5-Br-PSAA

μPADs แบบที่ 4 คือ 3D-μPADs แบบ 4 ชั้น (ภาพประกอบ 19) ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการติดตามความเข้มข้นของ Cu – 5-Br-PSAA โดยหยด 5-Br-PSAA ที่บริเวณวงกลม A ซึ่งเป็นชั้นล่างสุดของอุปกรณ์ และหยดสารละลาย CuSO_4 ลงในวงกลม B และสารละลาย NaOH ลงในวงกลม C ทั้งนี้การหยดสารละลายลงในวงกลมแต่ละวงกลมแยกกันก็เพื่อให้สารละลายกระจายทั่วทั้งพื้นที่วงกลม และเมื่อทำการพับครั้งที่ 1 แล้วหยดสารละลาย NaOH ซ้ำอีกครั้งตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ จะเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ส่วนวงกลม D เป็นชั้นกระดาษเปล่าที่กั้นระหว่างตะกอนของคอปเปอร์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไม่ให้สัมผัสกับ 5-Br-PSAA โดยตรงเมื่อพับ μPADs เป็น 4 ชั้น สามารถป้องกันปัญหาการเปลี่ยนสีของ 5-Br-PSAA ดังเช่นภาพที่แสดงในภาพประกอบ 26(ข) ดังนั้น μPADs ที่เหมาะสมต่อการติดตามการวัดความเข้มข้นของ 5-Br-PSAA คือ 3D-μPADs แบบ 4 ชั้น



ภาพประกอบ 26 ภาพถ่ายแสดงสี 5-Br-PSAA ที่ผ่านการทดสอบด้วยแบลนด์ 3 ซ้ำเมื่อใช้

(ก) 3D-μPADs แบบ 2 ชั้น และ (ข) 3D-μPADs แบบ 4 ชั้น

2.2 การขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs

ในการขึ้นรูปอุปกรณ์ μPADs ด้วยเทคนิค Wax screen printing พบว่าสามารถขึ้นรูปได้ง่าย สะดวก และได้อุปกรณ์ μPADs เป็นจำนวนมาก ซึ่งในปริมาณสารผสมระหว่างสีอีพ็อกซี เรซิน และฮาร์ดเทนเนอร์ในอัตราส่วน 0.4 : 4 : 4 g สามารถขึ้นรูป 3D-μPADs แบบ 4 ชั้นได้ครั้งละประมาณ 160 ชิ้น ภายในเวลาประมาณ 15 นาที และในการสกรีนแต่ละครั้ง ได้อุปกรณ์ที่สีซึมลงกระดาษจนถึงด้านหลัง ขนาดของบริเวณตรวจวัดเป็นไปตามที่กำหนด สามารถนำไปใช้งานได้ คิดเป็นร้อยละ 90 ของจำนวน μPADs ทั้งหมดที่สกรีนได้



ภาพประกอบ 27 ตัวอย่างอุปกรณ์ 3D-μPADs แบบ 4 ชั้น ได้จากสกรีน (ก) ด้านหน้า

และ (ข) ด้านหลังของ μPADs

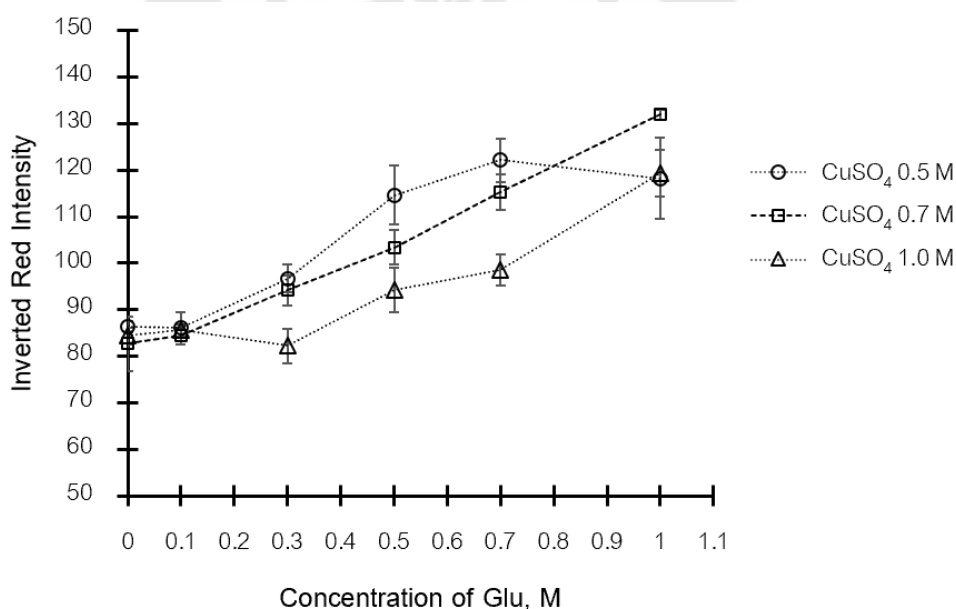
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคสิก

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ 3D-μPADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu₂

3.1.1 ความเข้มข้นสารละลาย CuSO₄

เนื่องด้วยสารละลาย CuSO₄ เป็นรีเอเจนต์ที่สำคัญในการเกิด Cu-Glu₂ และความเข้มข้นของสารละลายส่งผลต่อสัญญาณการวิเคราะห์ และช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของ CuSO₄ ที่ 0.5 , 0.7 และ 1.0 mol/L ผล

การทดลองดังแสดงในภาพประกอบ 28 พบว่า เมื่อใช้คอปเปอร์ซัลเฟต 0.7 mol/L จะให้แนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคเนตที่มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด การใช้ CuSO_4 0.5 mol/L ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์สารละลายกลูโคเนตที่มีความเข้มข้นสูงได้ เนื่องจากปริมาณของ Cu^{2+} ไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา ส่วนการใช้สารละลาย CuSO_4 ที่ 1.0 mol/L จะทำให้เกิดตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ จำนวนมาก และขัดขวางการแพร่ของสารละลายลงสู่กระดาษ ทำให้เมื่อทำการหยดสารละลายกลูโคเนตจะมีสารละลายบางส่วนสามารถไหลออกนอกบริเวณตรวจวิเคราะห์ ส่งผลให้ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ค่อนข้างสูง จึงไม่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์คือที่ 0.7 mol/L



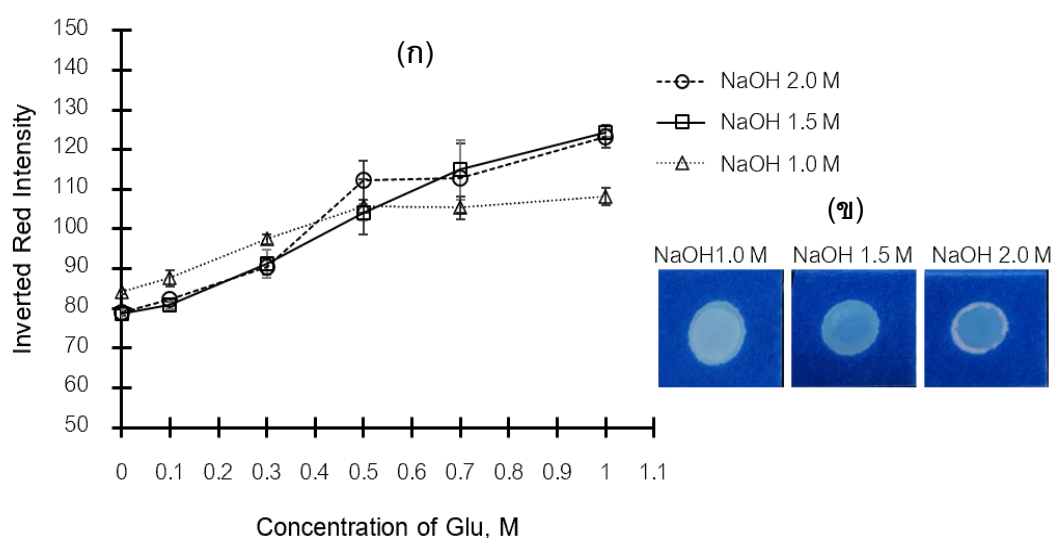
(สภาวะการทดลอง : $[\text{NaOH}] = 1.5 \text{ M}$, eluted = 0.1 M NaOH 15 μL , Heating 80°C , 2 min, Capture time 10 min, n = 3)

ภาพประกอบ 28 ผลของความเข้มข้น CuSO_4 ที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตด้วยการวัดความเข้มสี Cu-Glu_2

3.1.2 ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากการเกิด Cu-Glu_2 จะต้องเกิดในสภาวะเบส ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

ที่ 1.0, 1.5 และ 2.0 mol/L ภาพประกอบ 29(ก) แสดงแนวโน้มค่าสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 1.0 mol/L พบว่า เมื่อใช้สารละลาย NaOH ที่ 1.0 mol/L ไม่สามารถวิเคราะห์สารละลายกลูโคเนตที่ความเข้มข้นสูง 0.5 – 1.0 mol/L ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเนื่องมาจากการเกิด Cu-Glu_2 จะต้องเกิดในสภาวะที่เป็นเบสคือมี OH^- เหลือในระบบ แต่ตามปริมาณสารสัมพันธ์สารละลาย NaOH 1.0 mol/L จะเป็นสารกำหนดปริมาณในการเกิดตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ส่วนการใช้ NaOH ที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 mol/L ในสัญญาณสีที่ไม่แตกต่างกัน แต่ในทางปฏิบัติ การใช้ NaOH 2.0 mol/L มีโอกาสที่ตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ที่เกิดขึ้นหลังจากหยด CuSO_4 กระจายตัวอย่างไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งบริเวณที่ทำการวิเคราะห์บน μPADs ดังแสดงในภาพประกอบ 29(ข) ดังนั้น 1.5 mol/L จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย NaOH ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนต



(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.7 \text{ M}$, eluted = 0.1 M NaOH 15 μL , Heating 80 $^\circ\text{C}$,

2 min, Capture time 10 min, n = 3)

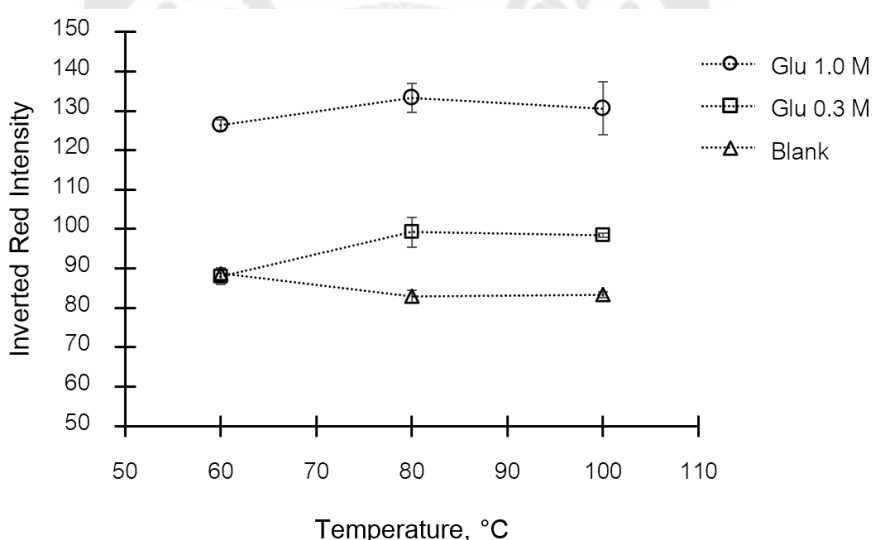
ภาพประกอบ 29 ผลของความเข้มข้น NaOH ที่มีต่อการตรวจวัดปริมาณกลูโคเนตด้วยการวัดความเข้มสี Cu-Glu_2

(ก) แนวโน้มของความเข้มสีแปรผันตามความเข้มข้นของกลูโคเนตเมื่อใช้สารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(ข) ลักษณะของตะกอนที่เกิดขึ้น

3.1.3 อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

การให้ความร้อนช่วยให้ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบ Cu-Glu₂ เกิดขึ้นได้เร็วขึ้น และช่วยให้ตะกอน Cu(OH)₂ ที่มีลักษณะเป็นตะกอนร่วนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนเป็นตะกอน CuO และรวมตัวเป็นตะกอนดำติดอยู่บนกระดาษ ไม่ถูกชะลงสู่กระดาษชั้นล่าง ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการให้ความร้อนด้วยการนำ μ PADs ใส่ถุงพลาสติกและต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 °C ผลดังแสดงในภาพประกอบ 30 พบว่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เฉพาะที่สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.3 mol/L มีค่าไม่แตกต่างจากแบลนด์ น่าจะเป็นผลจากการที่ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu₂ เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ การให้ความร้อนที่ 60 °C จึงไม่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้ ส่วนการให้ความร้อนที่ 80 และ 100 °C ให้ค่าเฉลี่ยของสัญญาณความเข้มสีที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้การให้ความร้อน 80 °C ในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการตรวจวิเคราะห์

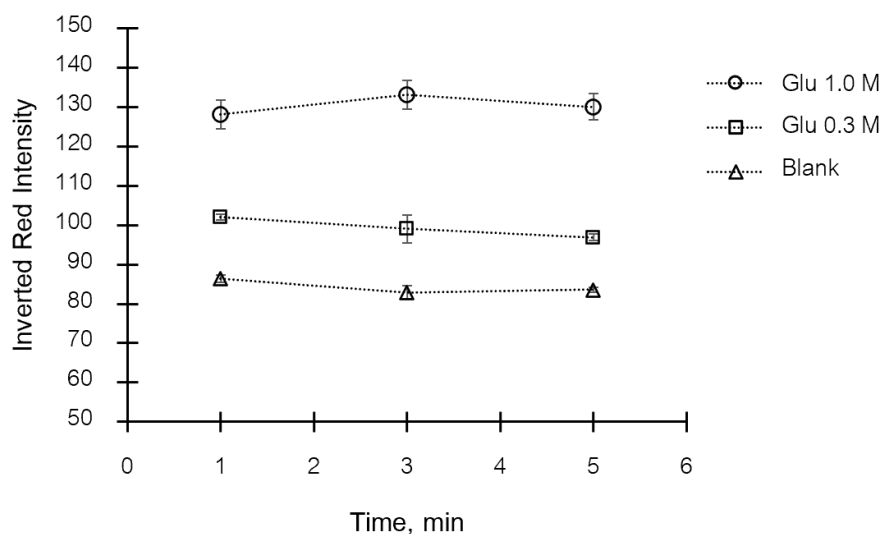


(สภาวะการทดลอง : [NaOH] = 1.5 M, [CuSO₄] = 0.7 M, eluted = 0.1 M NaOH 15 μ L, Heating time = 3 min, capture time = 10 min, n = 3)

ภาพประกอบ 30 ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu-Glu₂

3.1.4 เวลาในการให้ความร้อน

ผู้วิจัยศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที แนวโน้มดังแสดงในภาพประกอบ 31 พบว่าการให้ความร้อนในช่วงเวลาที่ศึกษาให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน ผู้วิจัยได้เลือกเวลาในการให้ความร้อนที่ 3 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาการเกิด Cu-Glu₂ เกิดขึ้นได้สมบูรณ์ และไม่นานจนเกินไป

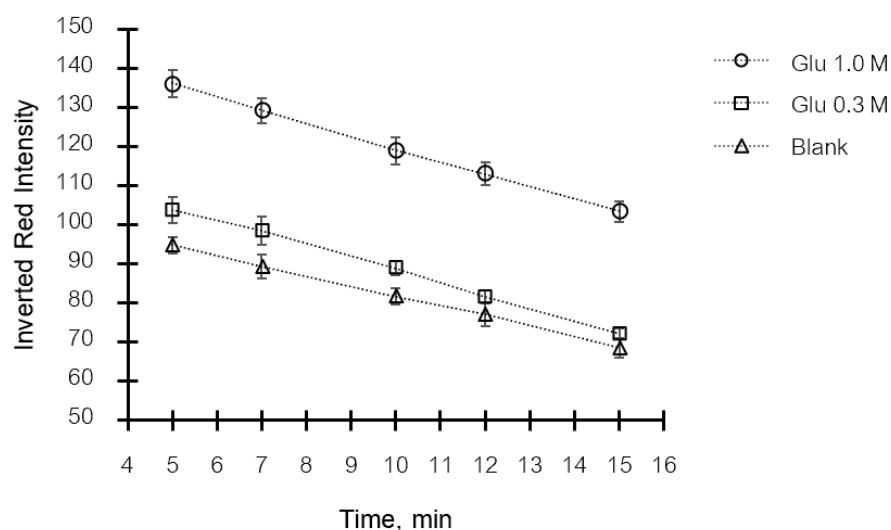


(สภาวะการทดลอง : $[\text{NaOH}] = 1.5 \text{ M}$, $[\text{CuSO}_4] = 0.7 \text{ M}$, eluted = 0.1 M NaOH
 $15 \mu\text{L}$, Heating temp. = 80°C , capture time = 10 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 31 ผลของเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu-Glu_2

3.1.5 เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูป

เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูปมีความสำคัญต่อค่าความเข้มสีของภาพถ่ายที่ได้บน μPADs ในงานวิจัยนี้เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูปหมายถึงช่วงเวลาที่น่าจะเหมาะสำหรับการชะด้วยสารละลาย NaOH จนกระทั่งทำการบันทึกภาพถ่าย μPADs ในกล้องถ่ายรูปด้วยสมาร์ทโฟน ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเวลาในการถ่ายรูปที่เหมาะสมที่เวลา 5, 7, 10, 12 และ 15 นาที ภาพประกอบ 32 แสดงแนวโน้มของค่าความเข้มสีที่ได้จากการถ่ายภาพที่เวลาต่าง ๆ พบว่าค่าสัญญาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ทั้งนี้เป็นเพราะสารละลายบนกระดาษแห้งขึ้นเรื่อย ๆ ความเข้มสีที่สังเกตเห็นจึงลดลงตามลำดับ จึงเลือกใช้ในการถ่ายรูปที่เวลา 10 นาทีในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำกว่าการถ่ายรูปที่ 5 และ 7 นาที และยังสามารถแยกสัญญาณระหว่างแบลงค์กับกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าการถ่ายรูปที่ 12 และ 15 นาที นอกจากนี้ยังเป็นการทำให้มั่นใจว่าสารละลายสามารถแพร่ลงสู่ชั้นล่างได้อย่างสมบูรณ์

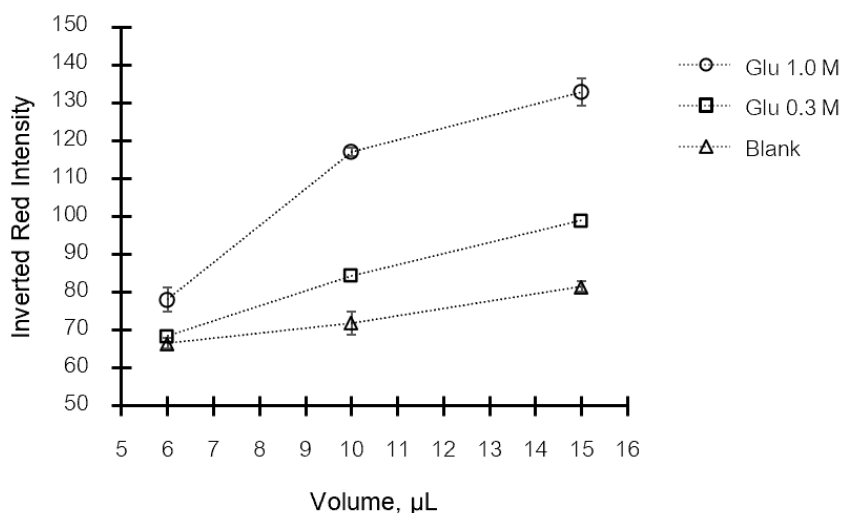


(สภาวะการทดลอง : $[\text{NaOH}] = 1.5 \text{ M}$, $[\text{CuSO}_4] = 0.7 \text{ M}$, eluted = 0.1 M NaOH $15 \mu\text{L}$, Heating 80°C , 3 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 32 ผลของเวลาที่ใช้ในการถ่ายภาพที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu-Glu_2

3.1.6 ปริมาตรในการชะ

ในการตรวจวิเคราะห์ สารประกอบ Cu-Glu_2 ที่เกิดขึ้นจะอยู่บริเวณวงกลม B ซึ่งเป็นชั้นบนของ 3D- μPADs จะถูกชะลงสู่ด้านล่างด้วย สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 mol/L เพื่อป้องกันการละลายของตะกอน $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ที่เหลือจากปฏิกิริยา ทั้งนี้ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการชะจะส่งผลต่อระยะทางการไหลของสารละลาย และความเข้มสีของ Cu-Glu_2 ที่จะปรากฏบน μPADs ชั้นล่าง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาปริมาตรของสารละลาย NaOH ดังกล่าวที่ปริมาตร 6, 10 และ $15 \mu\text{L}$ แนวโน้มดังปรากฏในภาพประกอบ 33 เมื่อทำการชะด้วยปริมาตรเพียง $6 \mu\text{L}$ พบว่าไม่สามารถชะสารละลายลงมาชั้นล่างได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อทำการชะด้วยสารละลายที่ปริมาณมากขึ้นพบว่าสามารถชะสารละลาย Cu-Glu_2 และให้ความเข้มสีที่สูงขึ้น ดังนั้นปริมาตรที่เหมาะสม คือ $15 \mu\text{L}$



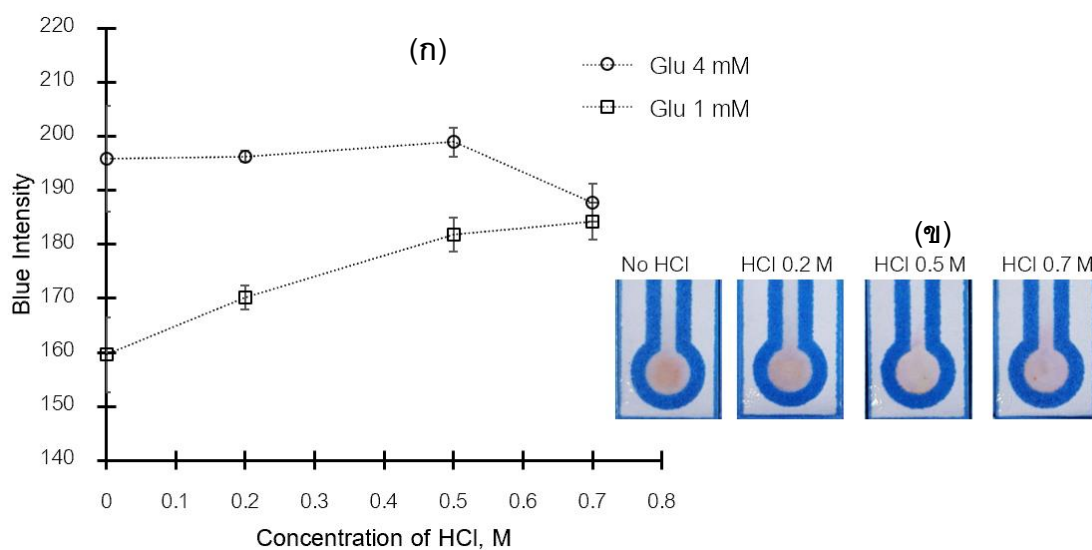
(สภาวะการทดลอง : $[\text{NaOH}] = 1.5 \text{ M}$, $[\text{CuSO}_4] = 0.7 \text{ M}$, eluted = 0.1 M NaOH , Heating 80°C , 3 min, capture time = 10 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 33 ผลของปริมาณตัวชะที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$

3.2.1 ความเข้มข้นของสารละลาย HCl

เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบ Cu-Glu_2 จะเกิดในสภาวะที่เป็นเบสดังนั้นเมื่อทำการชะด้วยน้ำ สารละลาย Cu-Glu_2 ที่แพร่จากด้านบนลงมาสู่ด้านล่างจึงอยู่ในสภาวะที่เป็นเบส แต่สารประกอบเชิงซ้อน $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ เกิดขึ้นได้ดีและถูกตรวจวัดในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน ดังนั้นจึงต้องหยุดสารละลายกรด HCl ที่บริเวณวงกลม A หลังจากหยุดสารละลาย 5-Br-PSAA เพื่อปรับให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดเพื่อให้ 5-Br-PSAA สามารถแทนที่กลูโคเนตใน Cu-Glu_2 ได้ดี ประกอบกับสภาวะความเป็นกรดเบสส่งผลต่อสี 5-Br-PSAA ดังนั้นความเข้มข้นของกรด HCl จึงส่งผลต่อสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ ภาพประกอบ 34(ก) แสดงค่าความเข้มข้นที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคเนตที่ความเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L เมื่อหยุดด้วยน้ำ และ HCl เข้มข้น 0.2, 0.5 และ 0.7 mol/L พบว่า การหยุด HCl จะช่วยให้สีของ 5-Br-PSAA กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งบริเวณวงกลมมากกว่าการหยุดน้ำที่ปริมาตรเท่ากัน ดังแสดงในภาพประกอบ 34(ข) และที่ความเข้มข้น 0.2 mol/L ให้สัญญาณค่าความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L มากที่สุด ดังนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรด HCl ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คือ 0.2 mol/L



(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 0.5 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.4 \text{ mM}$, Heating 80°C , 1 min, capture time = 15 min, $n = 3$)

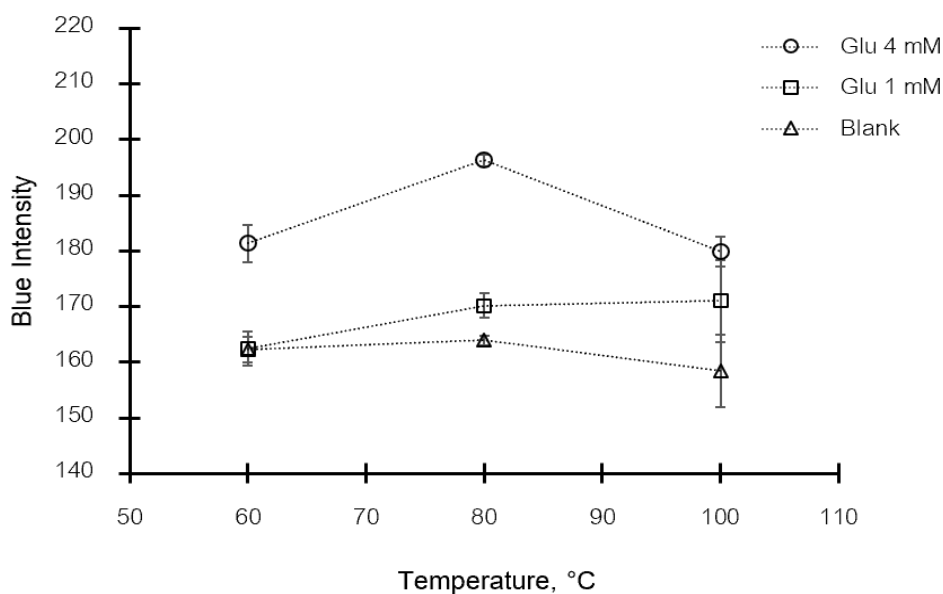
ภาพประกอบ 34 ผลของความเข้มข้น HCl ที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA

(ก) แนวโน้มค่าความเข้มสีเมื่อใช้ HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(ข) ลักษณะของ 5-Br-PSAA หลังการทดลองหยดน้ำและ HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์กลูโคเนต 1 mmol/L

3.2.2 อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่าสัญญาณพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 80°C เนื่องจากให้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ต่ำที่สุด และสามารถระบุความแตกต่างระหว่างความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์แบบลงค์ และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L ได้ชัดเจนที่สุด ดังแสดงในภาพประกอบ 35



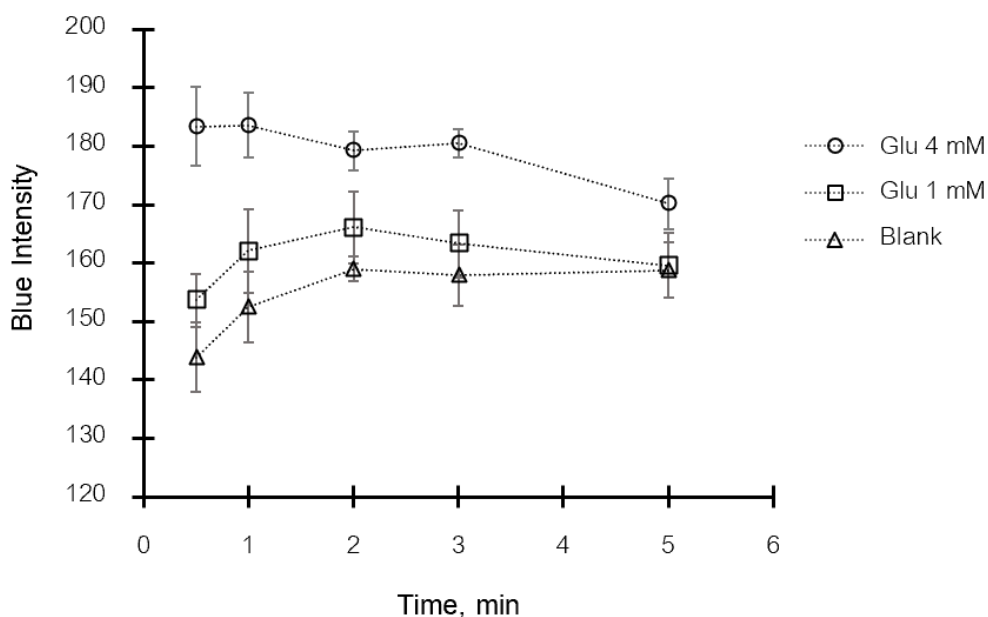
(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 0.5 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.4 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$, Heating time = 1 min, capture time = 15 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 35 ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี

Cu – 5-Br-PSAA

3.2.3 เวลาในการให้ความร้อน

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ดังแสดงในภาพประกอบ 36 เมื่อพิจารณาที่สัญญาณของแบล็คกับที่กลูโคเนตเข้มข้น 1 mmol/L พบว่าสัญญาณมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนจาก 30 วินาที ถึง 2 นาที ก่อนจะเริ่มคงที่ ในขณะที่แนวโน้มของสัญญาณเมื่อใช้กลูโคเนตเข้มข้น 4 mmol/L มีแนวโน้มค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาความแตกต่างของสัญญาณที่ได้ระหว่าง แบล็คและกลูโคเนตเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L พบว่า การให้ความร้อนในช่วงเวลา 30 วินาที ถึง 2 นาที จะให้ค่าความเข้มสีเมื่อวิเคราะห์แบล็ค และสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานที่แตกต่างกันมาก แต่กลับมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่สูง ในขณะที่การให้ความร้อนที่ 3 นาที ให้ค่าความแตกต่างของสัญญาณที่ได้ระหว่างแบล็คและกลูโคเนตเข้มข้น 1 และ 4 mmol/L ที่ลดลงเล็กน้อย แต่มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ต่ำลง ดังนั้น การให้ความร้อนเป็นเวลา 3 นาทีจึงเหมาะสมต่อการใช้ในการตรวจวิเคราะห์มากที่สุด

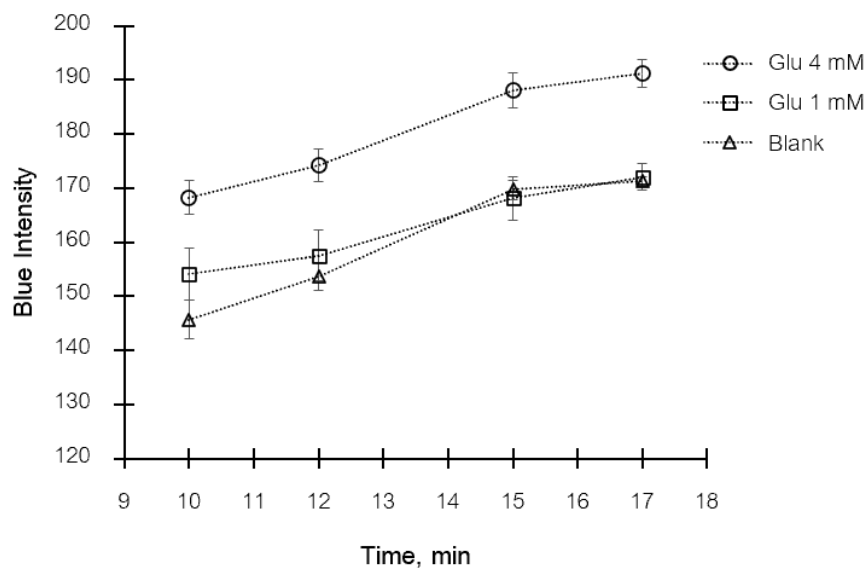


(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 0.5 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.4 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$, Heating temp. = 80°C , capture time = 10 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 36 ผลของเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA

3.2.4 เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูป

เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูปส่งผลต่อการวิเคราะห์ความเข้มสี ซึ่งเวลาดังกล่าวคือ ช่วงเวลาหลังจากทำการชะสารละลายด้วยน้ำจนถึงเวลาที่ทำการบันทึกภาพถ่าย ผลการทดลอง ในภาพประกอบ 37 แสดงแนวโน้มของค่าความเข้มสีที่ได้จากการถ่ายภาพที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 10 – 17 นาที พบว่าค่าความเข้มสีที่วัดได้มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการถ่ายภาพนานขึ้น แต่ที่เวลามากกว่า 15 นาทีขึ้นไป พบว่าสัญญาณของสารมาตรฐานกลูโคเนต 1 mmol/L มีค่าเท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนสีของ 5-Br-PSAA ที่ไม่เสถียรหลังทำการต้มแล้วรอจนแห้งแล้ว ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการถ่ายรูปที่เหมาะสมคือ 10 นาที เนื่องจากแยกความแตกต่างระหว่างความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์แบลงค์ สารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน 1 และ 4 mmol/L ได้ดี



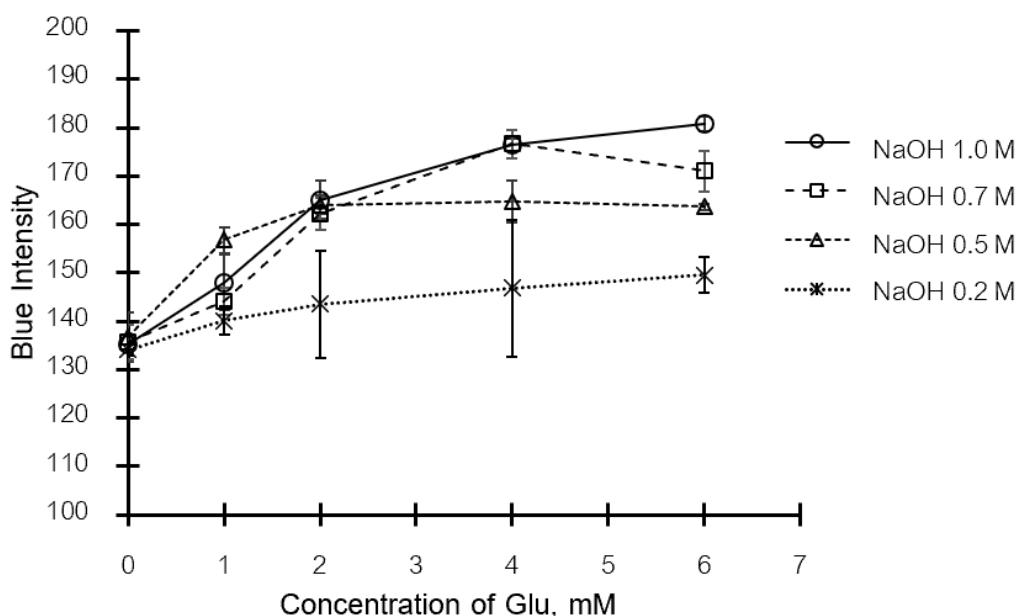
(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 0.5 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.4 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$, eluted H_2O $25 \mu\text{L}$, Heating = 80°C , 3 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 37 ผลของเวลาในการถ่ายภาพที่มีต่อการวัดความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA

3.2.5 ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

ความเข้มข้นของ NaOH ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu₂ ที่เกิดขึ้น อีกทั้งปริมาณ NaOH ที่เหลือจากปฏิกิริยาการเกิด Cu(OH)₂ สามารถถูกชะลงมาในชั้นล่าง ส่งผลต่อสีของสารประกอบ 5-Br-PSAA อีกด้วย ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ NaOH ที่ 0.2, 0.5, 0.7 และ 1.0 mol/L โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคเนตมาตรฐานตั้งแต่ 0 ถึง 6 mmol/L จากผลการทดลอง ดังแสดงในภาพประกอบ 38 พบว่าที่ NaOH 0.2 mol/L ให้ค่าความเข้มสีฟ้าที่ไม่แตกต่างกันเมื่อความเข้มข้นของกลูโคเนตเปลี่ยนไป แสดงถึงปริมาณ NaOH ที่ไม่เพียงพอในการเข้าทำปฏิกิริยา ในขณะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 mol/L ขึ้นไป มีแนวโน้มว่าความเข้มแสงที่วัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงแรก ก่อนที่การเปลี่ยนแปลงจะน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคเนตเพิ่มขึ้น ความกว้างของช่วงที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนนี้จะไม่เท่ากัน โดยจะกว้างมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NaOH เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้น NaOH สูง ๆ ช่วยให้สมดุลของการเกิด Cu-Glu₂ ดังสมการที่ 5 เกิดได้มากขึ้น ทำให้สามารถติดตามกลูโคเนตในช่วงที่กว้างขึ้นได้ ดังนั้นความเข้มข้นของ NaOH ที่เหมาะสมคือ 1.0 mol/L





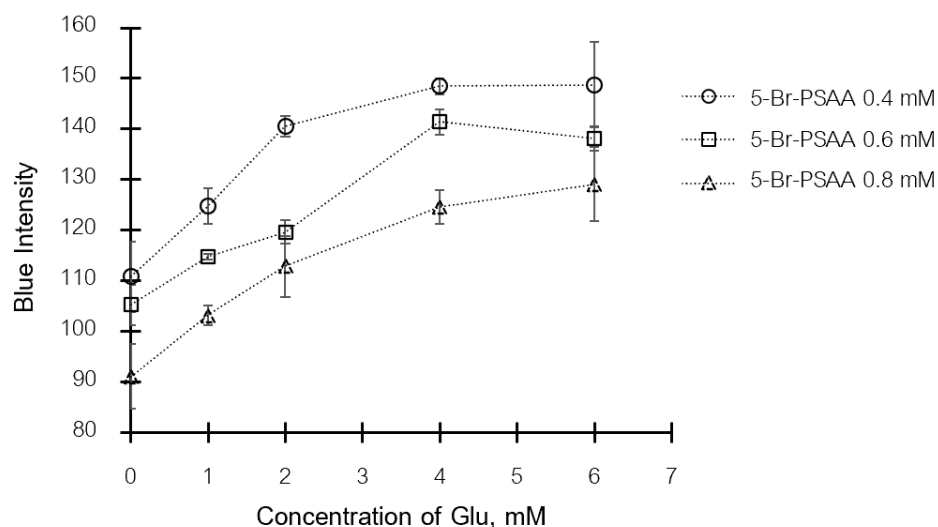
(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.4 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$,

Heating = 80°C , 3 min, eluted H_2O 25 μL , Capture time 10 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 38 ผลของความเข้มข้น NaOH ที่ต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA

3.2.6 ความเข้มข้นของสารละลาย 5-Br-PSAA

ผู้วิจัยทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 5-Br-PSAA ในสารละลายบัฟเฟอร์แอสซิเตด pH 4 ที่มีผลต่อสัญญาณความเข้มสีที่ความเข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 mmol/L แนวโน้มดังแสดงในภาพประกอบ 39 พบว่าเมื่อใช้ 5-Br-PSAA ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นค่าความเข้มสีฟ้าที่วัดได้จะลดลง เนื่องจากสารละลาย 5-Br-PSAA มีสีเหลือง ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ 5-Br-PSAA ส่งผลให้ค่าความเข้มสีฟ้าที่วัดได้มีค่าต่ำลง อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มแสงสีฟ้าที่วัดได้แปรผันตามปริมาณกลูโคสในช่อง 1 ถึง 6 mmol/L ในทุกความเข้มข้นของ 5-Br-PSAA ที่ศึกษา ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 5-Br-PSAA ที่ความเข้มข้น 0.8 mmol/L ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้แน่ใจว่า 5-Br-PSAA มีเพียงพอในการตรวจวัดกลูโคสในช่วงที่ทำการศึกษา



(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 1.0 \text{ M}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$, Heating = 80°C , 3 min, eluted = H_2O 25 μL , Capture time 10 min, $n = 3$)

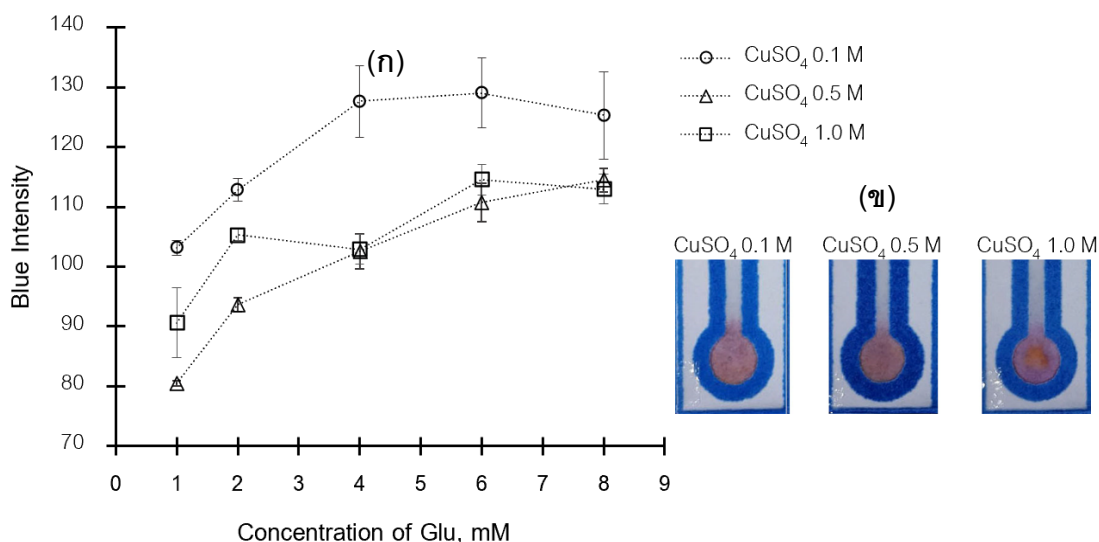
ภาพประกอบ 39 ผลของความเข้มข้น 5-Br-PSAA ที่มีต่อการตรวจวัดความเข้มสี

Cu – 5-Br-PSAA

3.2.7 ความเข้มข้นสารละลาย CuSO_4

สารละลาย CuSO_4 เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยากับกลูโคเนต จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ที่ 0.1, 0.5 และ 1.0 mol/L โดยใช้สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานในช่วง 1 ถึง 8 mmol/L ภาพประกอบ 40 แสดงผลการทดลองพบว่าความเข้มสีที่วัดได้จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้น CuSO_4 เพิ่มขึ้น แสดงถึงปริมาณ Cu-Glu_2 ที่ถูกชะลงมาทำปฏิกิริยากับ 5-Br-PSAA ได้ลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ความเข้มข้นของ CuSO_4 มากขึ้นจะทำให้เกิดตะกอนของ Cu(OH)_2 มีจำนวนมากขึ้นในชั้นบนของกระดาด ซึ่งผลให้ไปขวางการชะสารประกอบ Cu-Glu_2 ทำให้มีปริมาณ Cu-Glu_2 ที่ถูกชะลงมาถึงชั้นล่าง (ที่เป็นส่วนของการตรวจวัด) ลดลง สมมติฐานนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากสังเกตสีของ Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้จากการใช้สารละลาย CuSO_4 1.0 mol/L ดังแสดงในภาพประกอบ 40(ข) ในขณะที่ทำการหยดในชั้นแรกพบว่าเกิดตะกอน Cu(OH)_2 รวดเร็วและไม่สม่ำเสมอทั่ววงกลม แต่ส่วนใหญ่จะเกิดอยู่บริเวณตรงกลางที่หยดสารละลาย และขวางการไหลของสารละลาย เมื่อทำการชะสารละลายด้วย NaOH เจือจางจึงสังเกตได้ว่า สีม่วงของ Cu – 5-Br-PSAA ที่เกิดขึ้นก็ไม่สม่ำเสมอตามไปด้วย จึงเลือกใช้

CuSO_4 ที่ 0.5 mol/L ในการวิเคราะห์ต่อไป เนื่องจากให้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ไม่มากนักเกินไป และมีแนวโน้มที่จะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกลูโคเนตในช่วง 2 – 8 mol/L ซึ่งกว้างกว่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่ได้จากความเข้มข้นคอปเปอร์ซัลเฟตที่ 0.1 mol/L (ช่วงความเป็นเส้นตรง: 1 – 4 mmol/L)



(สภาวะการทดลอง : $[\text{NaOH}] = 1.0 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.8 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$, Heating = 80°C , 3 min, eluted H_2O 25 μL , capture time = 10 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 40 ผลของความเข้มข้น CuSO_4 ที่มีผลต่อการตรวจวัดความเข้มสี Cu – 5-Br-PSAA

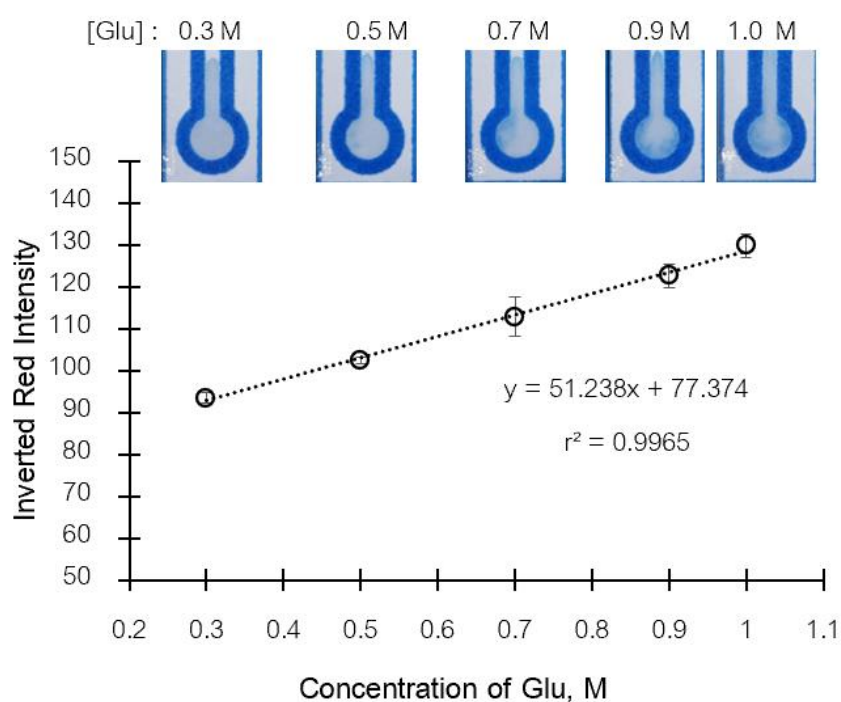
(ก) ความเข้มสีที่ตรวจวัดได้ เมื่อใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(ข) ลักษณะสีของ 5-Br-PSAA ที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคเนตเข้มข้น 4 mmol/L เมื่อใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4. การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคเนตด้วย μPADs ที่พัฒนาขึ้น

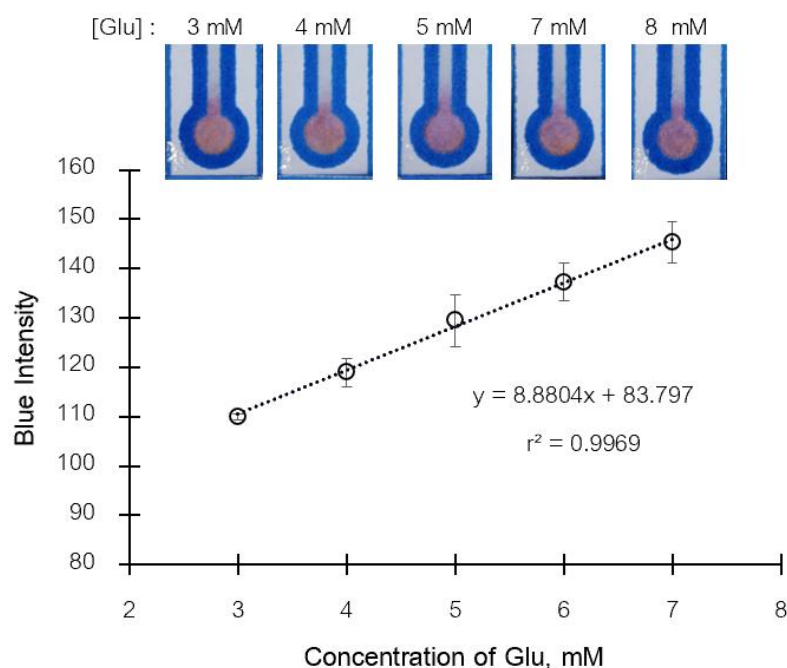
ในการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ 3D- μPADs ที่พัฒนาขึ้นสำหรับติดตามความเข้มสี Cu-Glu₂ และ Cu – 5-Br-PSAA ทั้ง 2 แบบ ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารละลายกลูโคเนตมาตรฐานภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตดังแสดงในภาพประกอบ 41 – 42 โดยการติดตาม Cu-Glu₂ ซึ่งมีสีน้ำเงิน ผู้วิจัยเลือกวิเคราะห์สัญญาณความเข้มสีแดงที่ลดลง (Inverted red intensity) และสำหรับการติดตาม

ความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA ซึ่งมีสีม่วง จะวิเคราะห์สัญญาณความเข้มสีน้ำเงิน (Blue Intensity) เนื่องจากช่องสีทั้งสองให้การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่แปรผันตามความเข้มข้นของสารละลายได้ชัดเจนและมีแนวโน้มเป็นเส้นตรงมากที่สุด



(สภาวะการทดลอง : [NaOH] = 1.5 M, [CuSO₄] = 0.7 M, eluted = 0.1 M NaOH
15 μ L, Heating 80°C, 3 min, capture time = 10 min, n = 3)

ภาพประกอบ 41 กราฟมาตรฐานสำหรับติดตามความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu₂



(สภาวะการทดลอง : $[\text{CuSO}_4] = 0.5 \text{ M}$, $[\text{NaOH}] = 1.0 \text{ M}$, $[\text{5-Br-PSAA}] = 0.8 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.2 \text{ M}$, Heating = 80°C , 3 min, eluted H_2O 25 μL , capture time = 10 min, $n = 3$)

ภาพประกอบ 42 กราฟมาตรฐานสำหรับติดตามความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน
Cu – 5-Br-PSAA

จากผลการทดลองที่ได้ที่สภาวะที่เหมาะสมของทั้งสองวิธี สามารถสรุปประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นดัง ตาราง 6 วิธีวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ 3D- μPADs โดยการตรวจวัดสีของ Cu-Glu₂ โดยตรง สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตได้ในช่วงความเข้มข้น 0.3 – 1.0 mol/L ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) เท่ากับ 0.12 mol/L ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 5SD) เท่ากับ 0.20 mol/L และค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, $n=10$) ได้เท่ากับร้อยละ 4.80

ส่วนการวิเคราะห์โดยอาศัยการติดตามความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน Cu – 5-Br-PSAA ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตได้ในช่วงความเข้มข้น 3 – 7 mmol/L ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) เท่ากับ 2.25 mmol/L และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 5SD) เท่ากับ 2.86 mmol/L ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, $n=10$) ได้เท่ากับ ร้อยละ 3.68

ตาราง 6 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ด้วย 3D-μPADs 2 ชั้น ที่พัฒนาขึ้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu₂ และ 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA

คุณลักษณะ	ค่าที่ได้	
	3D-μPADs 2 ชั้น	3D-μPADs 4 ชั้น
ช่วงความเข้มข้นที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (Working range)	0.3 – 1.0 mol/L	3 – 7 mmol/L
สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน	$y = 51.24(\pm 1.75)x + 77.37(\pm 1.27)$	$y = 8.88(\pm 1.49)x + 83.80(\pm 0.29)$
สัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (r^2)	0.996	0.997
ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD),	0.12 mol/L	2.25 mmol/L
ค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 5SD),	0.20 mol/L	2.86 mmol/L
ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, n=10)	4.80 % (0.5 mol/L)	3.68 % (4 mmol/L)

5. การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μPADs) ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

วิธีการที่พัฒนาขึ้นร่วมกับการใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมบำรุงผิวที่มีจำหน่ายในร้านค้าทั่วไป ภายในเขตกรุงเทพมหานคร การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนก่อนการวิเคราะห์ แล้วศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์โดยรายงานเป็นร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ดังนี้

3D-μPADs 2 ชั้น ที่พัฒนาขึ้นสำหรับติดตามความเข้มข้น Cu-Glu₂ ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว 3 ชนิด ที่เจือจาง 2, 4 และ 10 เท่า เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตาราง 7 เมื่อศึกษาร้อยละการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายกรดกลูโคโนคมาตรฐาน 0.5 mol/L ลงในตัวอย่างพบว่า ที่การเจือจางตัวอย่าง 2 เท่า จะมีร้อยละการคืนกลับต่ำกว่าการเจือจางที่ 4 เท่า และ 10

เท่าตามลำดับ นั้นแสดงว่ามีสารรบกวนในตัวอย่าง เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างให้มากขึ้น ปริมาณสารรบกวนจึงลดลง ร้อยละการคืนกลับขึ้นมีค่าเข้าใกล้ร้อยละ 100 มากขึ้น

ตาราง 7 ปริมาณกรดกลูโคเนตในตัวอย่างที่ถูกวิเคราะห์ได้ด้วย 3D-μPADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu₂

ตัวอย่าง	การเจือจาง	ความเข้มข้นกลูโคเนต (mol/L)		ร้อยละการคืนกลับ
		ในตัวอย่างเริ่มต้น	เมื่อเติม Std.Glu	
A	2x	n.d.	0.69 ± 0.07	66
	4x	n.d.	0.55 ± 0.07	89
	10x	n.d.	0.55 ± 0.07	89
B	2x	n.d.	0.54 ± 0.04	85
	4x	n.d.	0.55 ± 0.10	92
	10x	n.d.	0.73 ± 0.04	95
C	2x	n.d.	0.50 ± 0.21	83
	4x	n.d.	0.56 ± 0.12	93
	10x	n.d.	0.68 ± 0.02	116

n.d. คือ ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้

ทั้งนี้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง A ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีการระบุปริมาณกรดกลูโคเนตเป็นองค์ประกอบในปริมาณ 0.561 mol/L แต่พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคเนตที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการรบกวนขององค์ประกอบในตัวอย่างที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งสอดคล้องกับค่าร้อยละการคืนกลับที่ได้เพียงร้อยละ 66 เท่านั้น

3D-μPADs 4 ชั้น ที่พัฒนาขึ้นสำหรับติดตามความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัด ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตในตัวอย่างเซรัมบำรุงผิว 2 ชนิด ที่ถูกเจือจาง 150 เท่า และ 200 เท่า ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย μPADs สำหรับติดตามความเข้มข้นของ Cu – 5-Br-PSAA เมื่อวิเคราะห์ร้อยละการคืนกลับโดยเติมสารละลายกลูโคเนตมาตรฐาน 0.3 mol/L ลงในตัวอย่าง พบว่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง ร้อย

ละ 82 – 101 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ นั่นแสดงว่าองค์ประกอบของตัวอย่างไม่รบกวนการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้

ตาราง 8 ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วย 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA

ตัวอย่าง	การเจือจาง	ความเข้มข้นกลูโคโนค (mmol/L)		ร้อยละการคืนกลับ
		ในตัวอย่างเริ่มต้น	เมื่อเติม Std.Glu	
A	150x	2.55 ± 0.63	5.28 ± 0.19	87
	200x	4.17 ± 0.63	7.01 ± 0.57	90
B	150x	n.d.	2.58 ± 0.24	82
	200x	n.d.	3.20 ± 0.29	102

n.d. คือ ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้

ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง A ด้วย 3D-μPADs 4 ชั้น ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจพบสัญญาณของกลูโคโนคในตัวอย่าง A ได้เท่ากับ 0.435 ± 0.021 mol/L และ 0.759 ± 0.085 mol/L สำหรับการเจือจางตัวอย่าง 150 เท่า และ 200 เท่าตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากที่ระบุไว้ข้างขวด คือ ปริมาณ 0.561 mol/L ทั้งนี้ความคลาดเคลื่อนอาจมาจากการเจือจางตัวอย่าง หรือความคลาดเคลื่อนจากวิธีการวิเคราะห์ทำให้เมื่อคำนวณกลับไปที่ความเข้มข้นตั้งต้นแล้วทำให้มีค่าความคลาดเคลื่อนเท่ากับ ร้อยละ 22 และร้อยละ 35 สำหรับการเจือจางที่ 150 เท่า และ 200 เท่าตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (μ PADs) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคซิก และผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคซิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทเซรั่มบำรุงผิว

เบื้องต้นผู้วิจัยทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวิเคราะห์กรดกลูโคซิกโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Cu-Glu_2 ในสภาวะเบส โดยทำการทดลองให้หลอดทดลองและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคซิกได้ในช่วงความเข้มข้น 0.03 – 0.70 mol/L ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (Coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.998 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) เท่ากับ 0.024 mol/L และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 10SD) เท่ากับ 0.03 mol/L ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, $n=10$) ได้เท่ากับร้อยละ 2.57 คิดจากความเข้มข้น 0.5 mol/L และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคซิกในตัวอย่างเซรั่มบำรุงผิวที่มีจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าได้ใกล้เคียงความเข้มข้นที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และความเข้มข้นที่ระบุไว้บนฉลากของผลิตภัณฑ์ และยังมีร้อยละการคืนกลับในช่วง ร้อยละ 80 – 120 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัย 5-Br-PSAA มาใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัด ซึ่งพบว่า 5-Br-PSAA สามารถเข้าจับกับ Cu^{2+} แทนที่กลูโคเนตและเกิดเป็น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ ที่มีสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 580 nm ในช่วงความเข้มข้นของ $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ ที่ 0.3 – 20 $\mu\text{mol/L}$ นั้นก็แสดงว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณของกลูโคเนตที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้จากการติดตามความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าว

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices หรือ μ PADs) ในงานวิจัยนี้ ถูกออกแบบให้มีลักษณะเป็น 3D- μ PADs สามารถพับได้ เพื่อสะดวกต่อการกรองตะกอนที่อาจส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์ ซึ่ง 3D- μ PADs มีทั้งแบบ 2 ชั้น และ 4 ชั้น เพื่อใช้ในการติดตามความเข้มสีของ Cu-Glu_2 และ $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ ตามลำดับ โดยเป็นอุปกรณ์ที่มีขนาดเล็ก เมื่อทำการพับอุปกรณ์แล้ว มีขนาดเพียง 17 mm $\times$ 42 mm ใช้สารปริมาณน้อยเพียง 6 μL ต่อการหยดหนึ่งครั้งในการตรวจวิเคราะห์ สามารถใช้ได้

สะดวกและมีราคาถูกกว่าการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ การขึ้นรูปอุปกรณ์ μ PADs ใช้เทคนิค wax screen printing ซึ่งสามารถขึ้นรูปได้ง่าย สะดวก และได้อุปกรณ์ μ PADs ปริมาณมาก และสามารถควบคุมลักษณะ ขนาดของบริเวณชอบน้ำได้อย่างสม่ำเสมอ

3D- μ PADs แบบ 2 ชั้น ที่พัฒนาขึ้นเพื่อติดตามความเข้มข้นของ Cu-Glu_2 สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตได้ในช่วงความเข้มข้น $0.3 - 1.0 \text{ mol/L}$ ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (Coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.996 มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 5SD) เท่ากับ 0.12 และ 0.20 mol/L ตามลำดับ ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, $n=10$) ได้เท่ากับร้อยละ 4.80

3D- μ PADs แบบ 4 ชั้น ที่พัฒนาขึ้นเพื่อติดตามความเข้มข้นของ $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตได้ในช่วงความเข้มข้นต่ำที่ $3 - 7 \text{ mmol/L}$ ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (Coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.997 มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 5SD) เท่ากับ 2.25 และ 2.86 mmol/L ตามลำดับ ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, $n=10$) ได้เท่ากับร้อยละ 3.68

ในงานปริญญานิพนธ์นี้ได้นำ 3D- μ PADs ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตในตัวอย่างเซรัมบำรุงผิวที่มีจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าทั่วไปในกรุงเทพมหานคร พบว่ามีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 81 - 116 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตในตัวอย่างเซรัมบำรุงผิวได้

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคโนคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เซรัมบำรุงผิวได้จริง ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และใช้ต้นทุนต่ำกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือขนาดใหญ่ในห้องปฏิบัติการ เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคเนตเบื้องต้น

ข้อเสนอแนะ

จากการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเซรัมชนิดหนึ่งที่มีกรดกลูโคโนคเป็นองค์ประกอบ พบว่า 3D- μ PADs ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถระบุปริมาณของกรดกลูโคโนคที่มีในผลิตภัณฑ์ได้อย่างถูกต้อง เมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC และเทคนิคสเปกโตรสโกปี ซึ่งเป็นผลมาจากการมีสารรบกวนในตัวอย่างที่มีผลต่อการวิเคราะห์บนกระดาษ ประกอบกับค่าส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ค่อนข้างสูง รวมถึงลักษณะทางกายภาพของเซรั่มที่มีความข้นหนืด ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาบนกระดาดได้อย่างเหมาะสม ผู้วิจัยจึงสังเกตเห็นว่าควรศึกษาสารบวกรบวกรในตัวอย่างที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ และศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดสารบวกรเหล่านั้นออกจากตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ต่อไป



บรรณานุกรม

- AG, J. I. (2019). Sodium gluconate. Retrieved from <https://www.ulprospector.com/en/na/Food/Detail/1104/41562/Sodium-Gluconate>
- Alt, L. L. (1955). Spectrophotometric Determination of Gluconic Acid and Its Salts. *Analytical chemistry*, 27(5), 749-751. doi:10.1021/ac60101a015
- Andrew, B. E. (1991). Determination of gluconate in cleaner formulations by anion exclusion chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 14(9), 635-636. doi:10.1002/jhrc.1240140918
- Buking, S., Saetear, P., Tiyaongpattana, W., Uraisin, K., Wilairat, P., Nacapricha, D., & Ratanawimarnwong, N. (2018). Microfluidic Paper-based Analytical Device for Quantification of Lead Using Reaction Band-length for Identification of Bullet Hole and Its Potential for Estimating Firing Distance. *Analytical Sciences*, 34(1), 83-89. doi:10.2116/analsci.34.83
- Cai, L., Fang, Y., Mo, Y., & Huang, Y. (2017). Visual quantification of Hg on a microfluidic paper-based analytical device using distance-based detection technique. *AIP Adv.*, 7(8), 085214/085211-085214/085218. doi:10.1063/1.4999784
- Chen, C.-Y., Imanari, T., Yamamoto, H., & Kwan, T. (1968). Gas chromatographic separation of L-idonate and D-gluconate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 16(4), 755-757. doi:10.1248/cpb.16.755
- De Oliveira, R. A. G., Camargo, F., Pesquero, N. C., & Faria, R. C. (2017). A simple method to produce 2D and 3D microfluidic paper-based analytical devices for clinical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 957, 40-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.002>
- Del Torno-de Román, L., Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., & Arcos-Martínez, M. J. (2013). Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 858-862. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.053>
- Gouda, A. A., & Amin, A. S. (2010). Copper(II)–neocuproine reagent for

- spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 159-165.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.004>
- Hira. (2017). How Can Gluconolactone Help Your Skin? Retrieved from
<https://www.skinstore.com/blog/skincare/gluconolactone/>
- Karita, S., & Kaneta, T. (2014). Acid–Base Titrations Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical chemistry*, 86(24), 12108-12114.
doi:10.1021/ac5039384
- Koesdjojo, M. T., Pengpumkiat, S., Wu, Y., Boonloed, A., Huynh, D., Remcho, T. P., & Remcho, V. T. (2015). Cost Effective Paper-Based Colorimetric Microfluidic Devices and Mobile Phone Camera Readers for the Classroom. *J. Chem. Educ.*, 92(4), 737-741. doi:10.1021/ed500401d
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., & Pronk, H. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*, 28(5), 359-370.
- Makino, T. (1989). A sensitive, direct colorimetric assay of serum copper using 5-Br-PSAA. *Clin. Chim. Acta*, 185(1), 7-16. doi:10.1016/0009-8981(89)90125-3
- Maquille, L., Cologon, P., Renaudin, L., Gautier, C., Jardy, A., Vial, J., . . . Goutelard, F. (2015). Determination of gluconate in nuclear waste by high-performance liquid chromatography: comparison of pulsed amperometric detection and electrospray mass spectrometry detection. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 306. doi:10.1007/s10967-015-4076-7
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 46(8), 1318-1320. doi:10.1002/anie.200603817
- Namwong, P., Jarujamrus, P., Amatatongchai, M., & Chairam, S. (2018). Fabricating Simple Wax Screen-Printing Paper-Based Analytical Devices To Demonstrate the Concept of Limiting Reagent in Acid–Base Reactions. *Journal of chemical education*, 95(2), 305-309. doi:10.1021/acs.jchemed.7b00410

- Ohno, S., Teshima, N., Sakai, T., Grudpan, K., & Polasek, M. (2006). Sequential injection lab-on-valve simultaneous spectrophotometric determination of trace amounts of copper and iron. *Talanta*, 68(3), 527-534.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.04.073>
- Puangbanlang, C., Sirivibulkovit, K., Nacapricha, D., & Sameenoi, Y. (2019). A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples. *Talanta*, 198, 542-549.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.048>
- Rajakyla, E. (1981). Separation and determination of some organic acids and their sodium salts by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 218, 695-701.
doi:10.1016/S0021-9673(00)82095-6
- Rakotomanga, S., Baillet, A., Pellerin, F., & Baylocq-Ferrier, D. (1991). Simultaneous determination of gluconolactone, galactonolactone and galactitol in urine by reversed-phase liquid chromatography: application to galactosemia. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 570(2), 277-284. doi:10.1016/0378-4347(91)80530-P
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 185-195.
- Rinda, A., Uraisin, K., Sabarudin, A., & Nacapricha, D. (2018). Spectrophotometric determination of cobalt in horse urine using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]aniline as chromogenic reagent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 299, 012006. doi:10.1088/1757-899X/299/1/012006
- Roman, L. D. T.-D., Alonso-Lomillo, M. A., Dominguez-Renedo, O., Jaureguibeitia, A., & Arcos-Martinez, M. J. (2014). GADH screen-printed biosensor for gluconic acid determination in wine samples. *Sens. Actuators, B*, 192, 56-59.
doi:10.1016/j.snb.2013.10.098
- Sakai, T., & Teshima, N. (2008). Advancement of Flow-based Analysis with Alternative Chemical Reactions and New Devices for Environmental and Biological Samples.

- Analytical Sciences*, 24(7), 855-864. doi:10.2116/analsci.24.855
- Seeman, M., & Wiemer, S. (2010). Sodium Gluconate as natural chelating in personal care. *Jungbunzlauer*. Retrieved from <https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/4424/123262/Sodium-Gluconate>
- Sweeley, C. C., Wells, W. W., & Bentley, R. (1966). Gas chromatography of carbohydrates *Methods in Enzymology* (Vol. 8, pp. 95-108): Academic Press.
- Thakur, M., & Deb, M. K. (1999). The use of 1-[pyridyl-(2)-azo]-naphthol-(2) in the presence of TX-100 and N,N'-diphenylbenzamidine for the spectrophotometric determination of copper in real samples. *Talanta*, 49(3), 561-569. doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00054-5)
- Tian, T., An, Y., Wu, Y., Song, Y., Zhu, Z., & Yang, C. (2017). Integrated Distance-Based Origami Paper Analytical Device for One-Step Visualized Analysis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(36), 30480-30487. doi:10.1021/acsami.7b09717
- Wu, Q., He, J., Meng, H., Wang, Y., Zhang, Y., Li, H., & Feng, L. (2019). A paper-based microfluidic analytical device combined with home-made SPE column for the colorimetric determination of copper(II) ion. *Talanta*, 204, 518-524. doi:10.1016/j.talanta.2019.06.006
- Yetisen, A. K., Akram, M. S., & Lowe, C. R. (2013). Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip*, 13(12), 2210-2251. doi:10.1039/c3lc50169h
- Zhang, T., & Anslyn, E. V. (2006). A colorimetric boronic acid based sensing ensemble for carboxy and phospho sugars. *Org. Lett.*, 8(8), 1649-1652. doi:10.1021/ol060279+
- Zhang, Y., Zhou, C., Nie, J., Le, S., Qin, Q., Liu, F., . . . Li, J. (2014). Equipment-Free Quantitative Measurement for Microfluidic Paper-Based Analytical Devices Fabricated Using the Principles of Movable-Type Printing. *Analytical chemistry*, 86(4), 2005-2012. doi:10.1021/ac403026c
- กนกวรรณ พิสนทิยะ, & ยุภาพร สมน้อย. (2557). อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยอาศัยการตรวจวัดทางเอนไซม์. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ฉบับพิเศษ. จุฬาลักษณ์ น้อยพวง. (2555). การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

สำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสจากเลือดครบส่วน ด้วยหลักการเคมีไฟฟ้า. (วิทยานิพนธ์ วท.ม.
คณะสหเวชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์. (2544). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (Vol. 1). กรุงเทพมหานคร: คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. (2551). เครื่องสำอางสำหรับผิวหน้า (พิมพ์ครั้งที่ 2 ed.). กรุงเทพฯ: โอเดียนส
ไตร.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, ส. (2561). มหัศจรรย์เห็ดเชื้อไม้ อุดมด้วย
คุณค่าทางโภชนาการ สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและป้องกันโรคสมองเสื่อม. สารวิจัย(58), 3-
5.

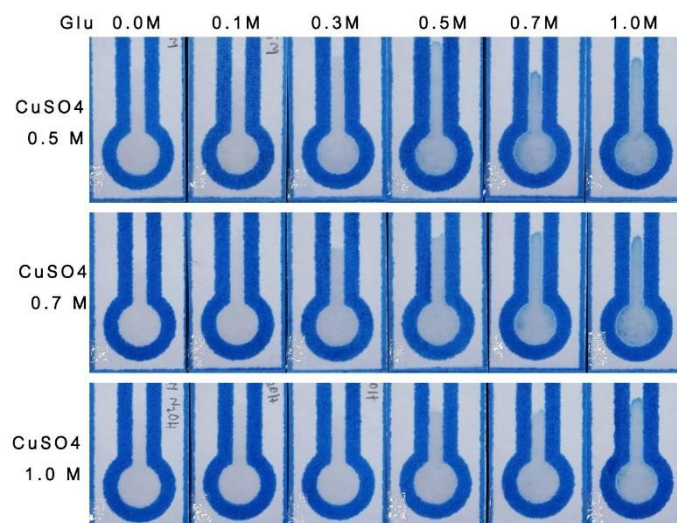




ภาคผนวก

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2

1.1 ความเข้มข้นสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต

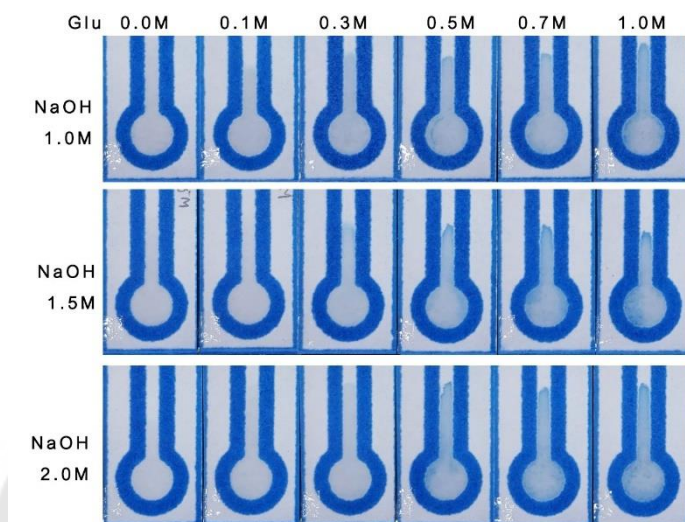


ภาพประกอบ 1 ผลของความเข้มข้น CuSO_4 ความเข้มข้นของ Cu-Glu_2

ตาราง 1 ค่า Inverted Red Intensity ($n = 3$) ของสารละลาย Cu-Glu_2 ที่ CuSO_4 ความเข้มข้นต่าง ๆ

[Glu] M	CuSO_4 0.5 M		CuSO_4 0.7 M		CuSO_4 1.0 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
Blank	86.340	1.274	82.656	5.770	84.381	1.832
0.1	86.028	3.432	84.410	1.789	85.572	1.332
0.3	96.743	3.006	94.209	3.222	82.170	3.593
0.5	114.667	6.375	103.415	3.734	91.913	2.762
0.7	122.092	4.570	113.554	5.621	97.506	1.694
1.0	118.233	8.727	128.228	6.379	119.313	5.114

1.2 ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH



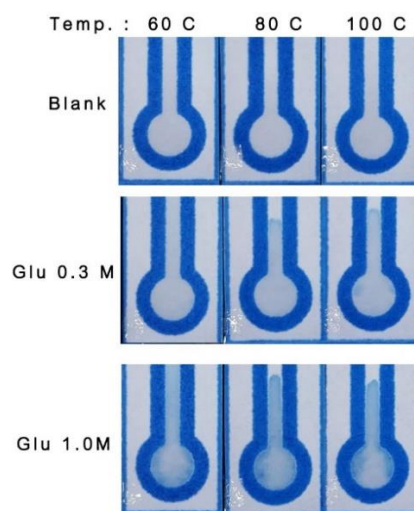
ภาพประกอบ 2 ผลของความเข้มข้น NaOH ความเข้มสีของ Cu-Glu₂

ตาราง 2 ค่า Inverted Red Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu-Glu₂ ที่ NaOH ความเข้มข้นต่าง

ๆ

[Glu] M	NaOH 1.0 M		NaOH 1.5 M		NaOH 2.0 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
Blank	84.191	0.605	78.620	1.306	79.026	0.960
0.1	87.631	2.012	80.880	1.030	82.124	0.451
0.3	97.477	1.189	91.210	3.582	90.572	2.023
0.5	105.676	6.987	104.218	1.954	112.276	4.783
0.7	105.364	2.913	114.891	7.412	112.717	8.744
1.0	107.767	1.657	124.546	0.942	123.247	2.885

1.3 อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

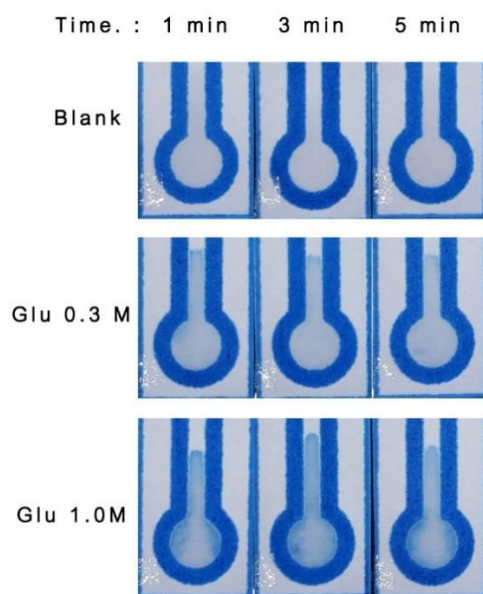


ภาพประกอบ 3 ของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่อความเข้มข้นของ Cu-Glu₂

ตาราง 3 ค่า Inverted Red Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu-Glu₂ ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Temp, °C	Blank		Glu 0.3 M		Glu 1.0 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
60	88.715	1.425	88.030	2.039	126.355	1.367
80	82.848	1.604	99.200	3.767	133.340	3.707
100	83.313	0.684	98.391	0.532	130.626	6.736

1.4 เวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ

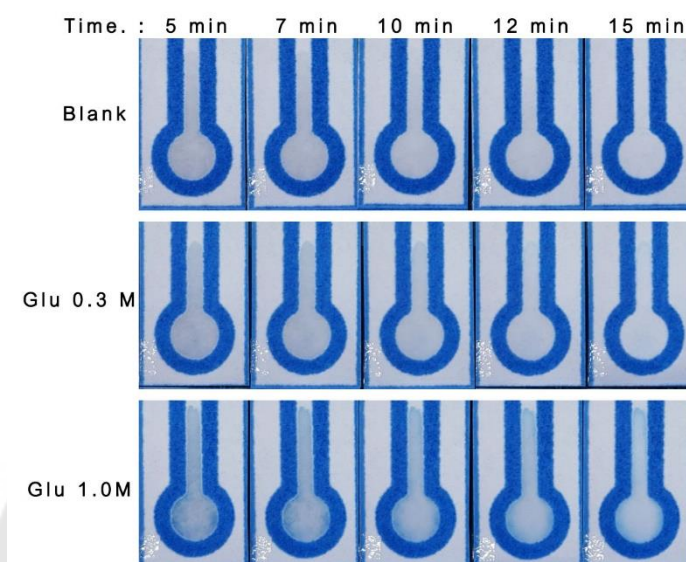


ภาพประกอบ 4 ผลของเวลาในการให้ความร้อนต่อความเข้มสีของ Cu-Glu₂

ตาราง 4 ค่า Inverted Red Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu-Glu₂ ที่ได้จากการให้ความร้อนที่เวลาต่าง ๆ

Time, min	Blank		Glu 0.3 M		Glu 1.0 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
1	86.462	0.949	102.037	0.788	128.166	3.739
3	82.956	1.657	99.055	3.511	133.201	3.587
5	83.582	0.700	96.937	0.759	130.092	3.381

1.5 เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูป

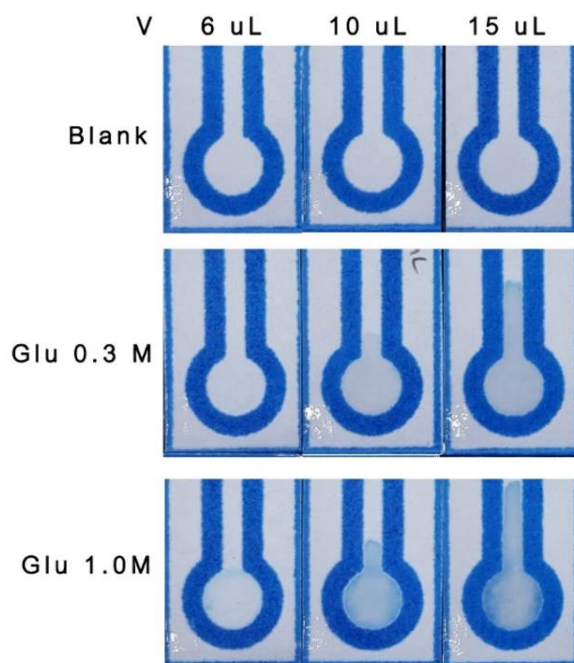


ภาพประกอบ 5 ผลของเวลาในการถ่ายรูปต่อความเข้มสีของ Cu-Glu₂

ตาราง 5 ค่า Inverted Red Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu-Glu₂ ที่ได้จากการถ่ายภาพที่เวลาต่าง ๆ

Time, min	Blank		Glu 0.3 M		Glu 1.0 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
5	94.728	2.088	103.718	3.429	136.083	3.445
7	89.377	3.108	98.502	3.544	129.161	3.285
10	81.630	2.023	88.872	1.740	118.961	3.483
12	77.161	2.981	81.480	1.593	113.041	2.919
15	68.466	2.422	72.123	1.363	103.459	2.632

1.6 ปริมาตรในการชะ



ภาพประกอบ 6 ผลของปริมาตรตัวชะที่มีต่อความเข้มสีของ Cu-Glu_2

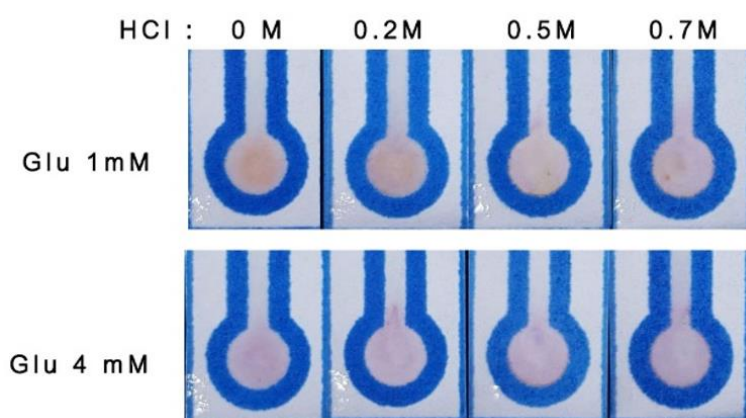
ตาราง 6 ค่า Inverted Red Intensity ($n = 3$) ของสารละลาย Cu-Glu_2 ที่ได้จากการชะด้วย NaOH 0.1 M ปริมาตรต่าง ๆ

Time, min	Blank		Glu 0.3 M		Glu 1.0 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
6	66.591	1.352	68.464	1.472	78.207	3.200
10	71.900	3.125	84.546	4.957	117.122	1.462
15	81.630	2.023	99.125	3.275	132.986	3.741

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น

Cu – 5-Br-PSAA

2.1 ความเข้มข้นของสารละลาย HCl

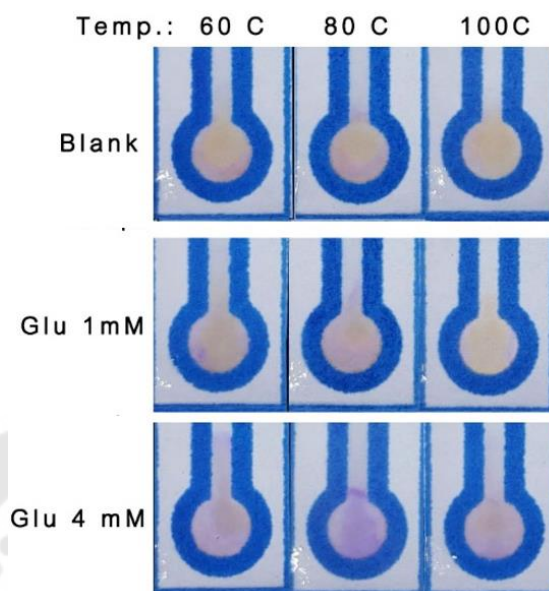


ภาพประกอบ 7 ผลของความเข้มข้น HCl ที่มีต่อความเข้มข้นของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 7 ค่า blue Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้จากการใช้ HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

HCl, M	Glu 1 mM		Glu 4 mM	
	Avg.	SD	Avg.	SD
0	159.57	6.87	195.85	6.89
0.2	170.20	2.19	196.30	1.08
0.5	181.84	3.13	198.91	2.62
0.7	184.24	3.42	187.78	3.53

2.2 อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

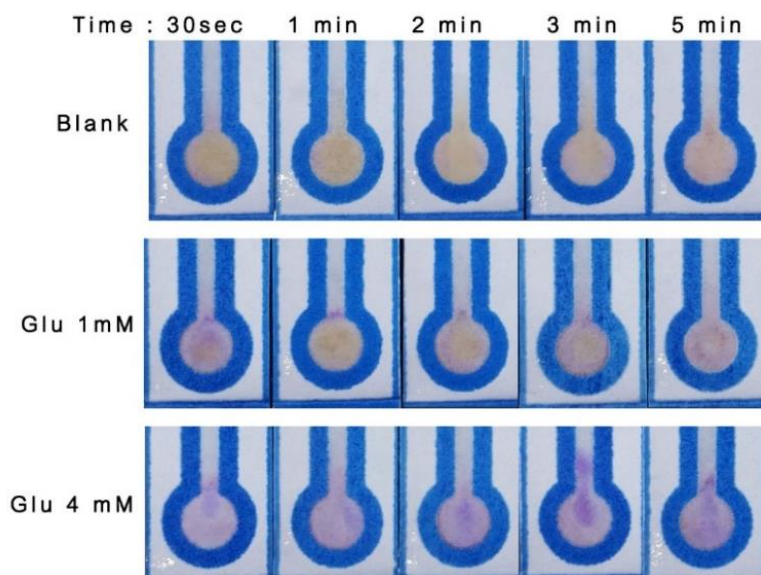


ภาพประกอบ 8 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 8 ค่า blue Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้จากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Temp, °C	Blank		Glu 1 mM		Glu 4 mM	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
60	162.273	2.241	162.409	3.033	181.329	3.309
80	163.890	0.941	170.195	2.191	196.298	1.080
100	158.426	6.588	170.973	7.460	179.855	2.691

2.3 เวลาในการให้ความร้อน

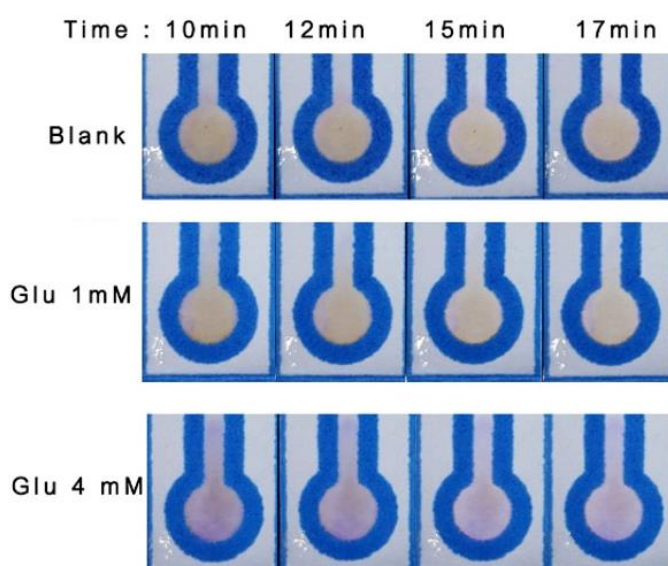


ภาพประกอบ 9 ผลของเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 9 ค่า blue Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้จากการให้ความร้อนที่เวลาต่าง ๆ

time, min	Blank		Glu 1 mM		Glu 4 mM	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
0.5	143.895	5.927	153.511	3.719	183.412	6.751
1	152.535	6.063	162.518	6.395	183.932	4.401
2	159.018	2.150	166.311	6.412	179.714	3.272
3	157.937	5.162	163.747	5.974	179.645	2.882
5	158.811	4.765	159.709	5.492	170.190	4.342

2.4 เวลาที่ใช้ในการถ่ายรูป

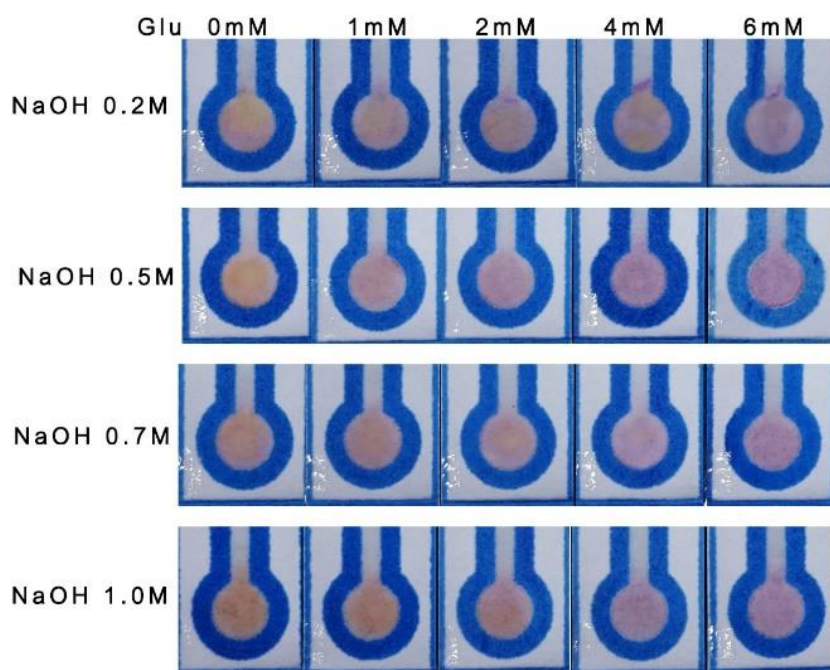


ภาพประกอบ 10 ผลของเวลาในการถ่ายรูปที่มีต่อความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 10 ค่า blue Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้จากการถ่ายภาพที่เวลาต่าง ๆ

time, min	Blank		Glu 1 mM		Glu 4 mM	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
10	145.708	2.572	154.095	4.725	168.289	3.117
12	153.603	1.808	157.525	4.019	174.217	3.235
15	169.655	0.994	168.160	2.413	188.061	2.606
17	171.210	6.068	172.088	4.460	191.184	1.923

2.5 ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

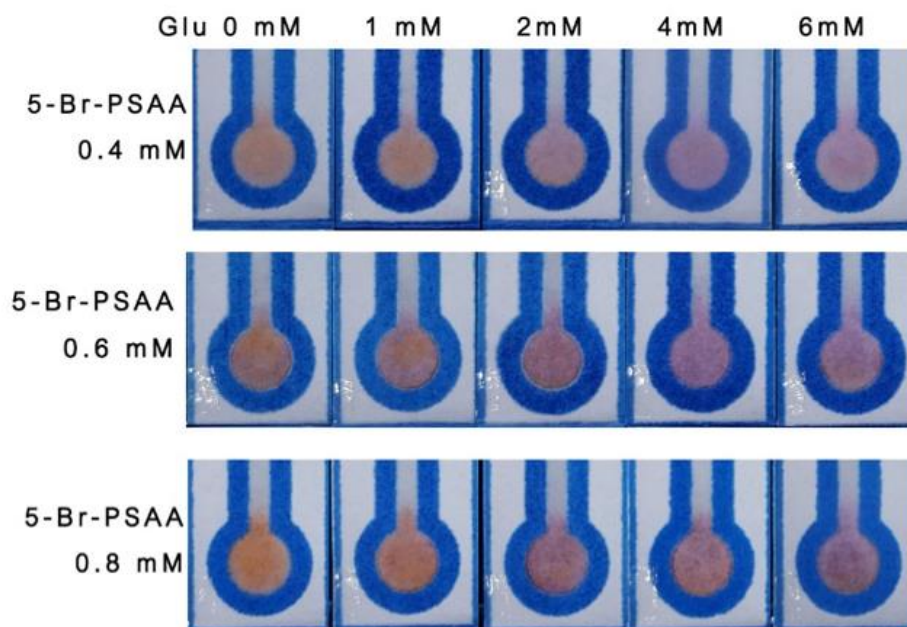


ภาพประกอบ 11 ผลของความเข้มข้นของ NaOH ที่มีต่อความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 11 ค่า blue Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้การใช้ NaOH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Glu, mM	NaOH 0.2 M		NaOH 0.5 M		NaOH 0.7 M		NaOH 1.0M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
0	134.144	1.210	136.786	5.087	136.382	2.732	135.239	1.823
1	140.102	2.885	156.788	2.675	144.176	2.777	147.990	5.790
2	143.516	11.092	164.054	2.003	162.123	3.307	165.073	3.980
4	146.760	8.858	164.676	4.297	176.607	1.608	176.381	0.893
6	149.507	3.638	163.592	0.394	171.091	0.970	180.806	1.580

2.6 ความเข้มข้นของสารละลาย 5-Br-PSAA

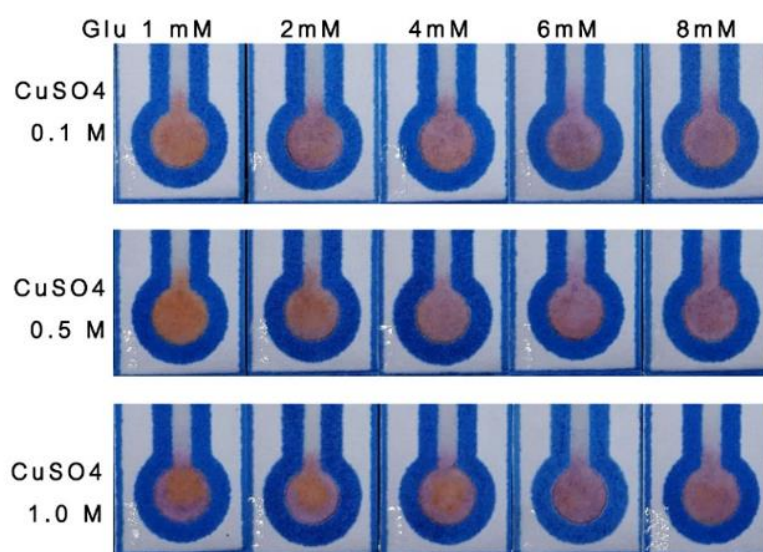


ภาพประกอบ 12 ผลของความเข้มข้นของ 5-Br-PSAA ที่มีต่อความเข้มสีของ Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 12 ค่า blue Intensity (n = 3) ของสารละลาย Cu – 5-Br-PSAA ที่ได้การใช้ 5-Br-PSAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Glu, mM	5-Br-PSAA 0.4 M		5-Br-PSAA 0.6 M		5-Br-PSAA 0.8 M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
0	110.749	7.029	110.749	7.029	91.054	6.440
1	124.714	3.480	124.714	3.480	103.135	1.943
2	140.525	2.106	140.525	2.106	112.852	6.046
4	148.424	1.624	148.424	1.624	124.553	2.388
6	148.740	8.474	148.740	8.474	129.077	7.301

2.7 ความเข้มข้นสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต



ภาพประกอบ 13 ผลของความเข้มข้นของ CuSO_4 ที่มีต่อความเข้มสีของ $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$

ตาราง 13 ค่า blue Intensity ($n = 3$) ของสารละลาย $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$ ที่ได้การ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

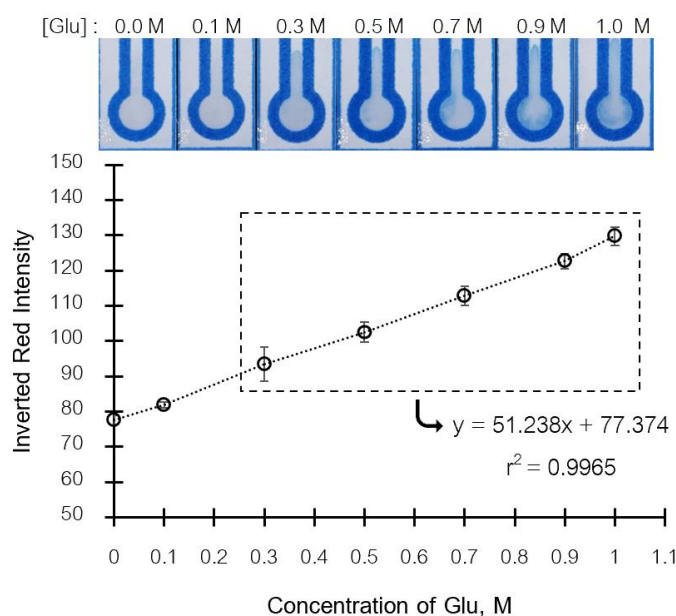
Glu, mM	CuSO_4 0.1M		CuSO_4 0.5M		CuSO_4 1.0M	
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD
1	103.135	1.943	80.481	1.137	90.612	1.020
2	112.852	6.046	93.669	2.048	105.335	2.465
4	127.631	5.842	102.514	3.193	102.878	2.589
6	129.077	7.301	110.704	2.011	114.523	2.537
8	125.319	1.503	114.471	2.996	112.993	3.448

3. การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วย μ PADs ที่พัฒนาขึ้น

3.1 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2

ตาราง 14 ช่วงความเข้มข้นที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (Working range) ด้วย 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2

[Glu], M	Inverted Red Intensity (n = 3)			Avg.	SD
Blank	76.131	78.724	77.726	77.527	1.308
0.1	82.133	82.61	81.032	81.925	0.809
0.3	94.112	88.393	97.834	93.446	4.756
0.5	100.715	100.909	105.74	102.455	2.847
0.7	111.79	115.896	110.679	112.788	2.748
0.9	121.872	121.019	125.023	122.638	2.109
1.0	132.755	128.035	128.474	129.755	2.608



ภาพประกอบ 14 Working range ของวิธีวิเคราะห์ 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับติดตาม Cu-Glu_2

ตาราง 15 ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) และ ค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ, 5SD) ด้วย 3D-μPADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu₂

Inverted Red Intensity @ Blank (n = 10)					Avg.	SD	LOD (3SD)	LOQ(5SD)
73.946	76.131	78.724	77.726	81.166	77.171	1.975	0.118	0.194
75.979	75.525	77.129	78.066	77.314				

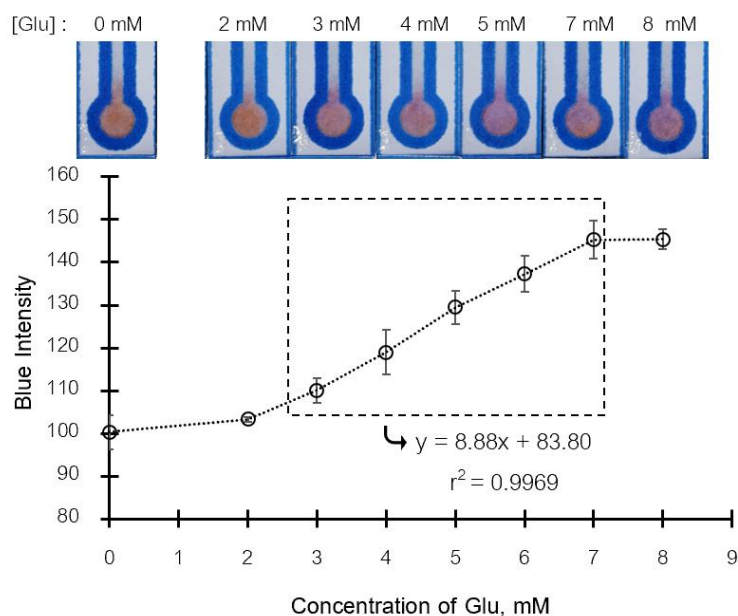
ตาราง 16 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, n=10) ด้วย 3D-μPADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu₂

Inverted Red Intensity @ Glu 0.5 M (n = 10)					Avg	SD	%RSD
100.715	100.909	105.74	107.704	99.506	102.724	4.927	4.796
105.888	100.151	99.319	111.926	95.378			

3.2 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 17 ช่วงความเข้มข้นที่สามารถทำการตรวจวัดได้ (Working range) ด้วย 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA

[Glu], mM	Blue Intensity (n = 3)			Avg.	SD
Blank	101.529	103.216	104.059	102.935	4.000
2	103.863	103.167	102.653	103.228	0.607
3	112.839	107.181	110.066	110.029	2.829
4	119.299	124.021	113.514	118.945	5.262
5	133.714	128.498	126.26	129.491	3.825
6	142.109	134.998	134.664	137.257	4.205
7	147.537	148.12	140.167	145.275	4.433
8	145.928	147.522	142.815	145.422	2.394



ภาพประกอบ 15 Working range ของวิธีวิเคราะห์ 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับติดตาม
Cu – 5-Br-PSAA

ตาราง 18 ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3SD) และ ค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ
ได้ (LOQ, 5SD) ด้วย 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu – 5-Br-PSAA

Blue Intensity @ Blank (n = 10)					Avg.	SD	LOD (3SD)	LOQ(5SD)
103.05	104.989	104.588	100.817	102.657	104.588	2.3	2.250	2.859
104.664	107.706	105.357	107.461	105.987		62		

ตาราง 19 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD, n=10) ด้วย 3D-μPADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น
Cu – 5-Br-PSAA

Blue Intensity @ Glu 0.5 M (n = 10)					Avg	SD	%RSD
115.843	129.355	129.341	123.688	120.44	122.516	4.512	3.683
125.348	119.086	123.154	118.883	120.016			

4. ผลการประยุกต์ใช้ μ PADs ในการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

4.1 ผลการประยุกต์ใช้ 3D- μ PADs 2 ชั้น

ตาราง 20 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิวด้วย 3D- μ PADs 2 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น Cu-Glu_2

sample	dilution	Inverted Red Intensity (n =4)		$[\text{Glu}]_{\text{present}}$	$[\text{Glu}]_{\text{spike}}$	Inverted Red Intensity (n =4)		$[\text{Glu}]_{\text{found}}$	%recovery
		Avg	SD			Avg	SD		
A	2x	100.845	3.848	n.d.	0.5 M	127.176	3.536	0.69 ± 0.07	65.874
	4x	83.769	2.213	n.d.	0.5 M	119.516	3.750	0.55 ± 0.07	89.430
	10x	83.769	2.213	n.d.	0.5 M	119.516	3.750	0.55 ± 0.07	89.430
B	2x	85.045	1.198	n.d.	0.5 M	119.056	2.020	0.54 ± 0.04	85.086
	4x	82.445	2.545	n.d.	0.5 M	119.575	5.152	0.55 ± 0.10	92.890
	10x	85.709	1.399	n.d.	0.5 M	128.914	2.026	0.73 ± 0.04	95.294
C	2x	83.917	1.684	n.d.	0.5 M	117.282	10.862	0.50 ± 0.21	83.469
	4x	82.890	1.065	n.d.	0.5 M	120.337	6.448	0.56 ± 0.12	93.683
	10x	79.629	2.272	n.d.	0.5 M	126.195	1.235	0.68 ± 0.02	116.496

4.2 ผลการประยุกต์ใช้ 3D- μ PADs 4 ชั้น

ตาราง 21 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิวด้วย 3D- μ PADs 4 ชั้น สำหรับวัดความเข้มข้น $\text{Cu} - 5\text{-Br-PSAA}$

Sample	dilution	Red Intensity (n = 4)		$[\text{Glu}]_{\text{present}}$	$[\text{Glu}]_{\text{spike}}$	Red Intensity (n = 4)		$[\text{Glu}]_{\text{found}}$	%recovery
		Avg	SD			Avg	SD		
A	150x	102.680	5.960	2.548	3 mM	125.080	1.572	5.278 ± 0.192	86.807
	200x	114.836	5.658	4.17	3 mM	139.323	4.683	7.014 ± 0.571	90.414
B	150x	90.574	0.788	n.d.	3 mM	103.059	1.937	2.579 ± 0.236	81.994
	200x	92.409	1.903	n.d.	3mM	108.073	2.386	3.205 ± 0.291	101.901


CHEMISTRY FOR CATALYZING SUSTAINABILITY AND PROSPERITY
 FEBRUARY 13 - 14, 2020 || IMPACT FORUM, MUANG THONG THANI, NONTABURI, THAILAND




Spectrophotometric Determination of Gluconic Acid in Skincare Products

Sophika Srihirun and Nuanlaor Ratanawimarnwong
 Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

ABSTRACT

Gluconic acid is a polyhydroxy carboxylic acid that is a multifunctional ingredient for anti-aging, maintaining skin moisture and being buffer agent. This work presents a simple spectrophotometric method for determination of gluconic acid in skincare products. The method employs replacement of $\text{Cu}(\text{OH})_2$ by gluconate ion to form soluble copper-gluconate complex. The residual $\text{Cu}(\text{OH})_2$ is removed by filtration before spectrophotometric detection of copper-gluconate at 650 nm. For quantitative analysis of gluconic acid, parameters affecting the absorbance change including concentration of Cu^{2+} , concentration NaOH and heating time will be optimized. Application to skincare products will also be investigated.

INTRODUCTION

The gluconic acid is non-toxic and non-irritant normally present in various cosmetics which the beneficial effect on skin. However, having too high level of gluconic acid lead to lower pH than the specified standard value of 3.5 regulated by FDA. The recommended amount of gluconic acid is in the range of 5 – 15 %. Therefore, accurate analytical method for gluconic acid determination is crucial in quality control of the cosmetic products.

In this work, formation of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex was applied for analysis of skincare products.

$$\text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{OH}^{-}(\text{aq}) \longrightarrow \text{Cu}(\text{OH})_2(\text{s}) \quad \dots(1)$$

$$2\text{Glu}^{-}(\text{aq}) + \text{Cu}(\text{OH})_2(\text{s}) \longrightarrow \text{Cu}(\text{Glu})_2(\text{aq}) + 2\text{OH}^{-}(\text{aq}) \quad \dots(2)$$

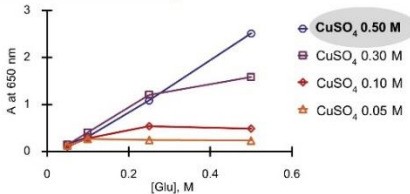
METHOD

- 1 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ was taken place**
Slowly added CuSO_4 into NaOH
- 2 $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex was formed**
Gluconate or sample solutions was added to the mixture
- 3 Boiled**
The mixture was boiled at 100 °C
- 4 Residual $\text{Cu}(\text{OH})_2$ was separated out**
The mixture was filtered through filter paper No.1, the filtrate was made up with DI water to 25.0 cm^3
- 5 Absorption signal was measured**
The solution was filtered through nylon syringe filter and then diluted 4-folds to measured at 650 nm

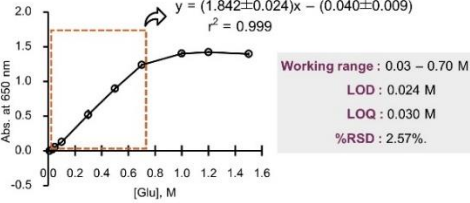
RESULT

1 Optimization

1.1 Concentration of CuSO_4



2 Analytical Feature



Working range : 0.03 – 0.70 M
 LOD : 0.024 M
 LOQ : 0.030 M
 %RSD : 2.57%

3 Sample Analysis

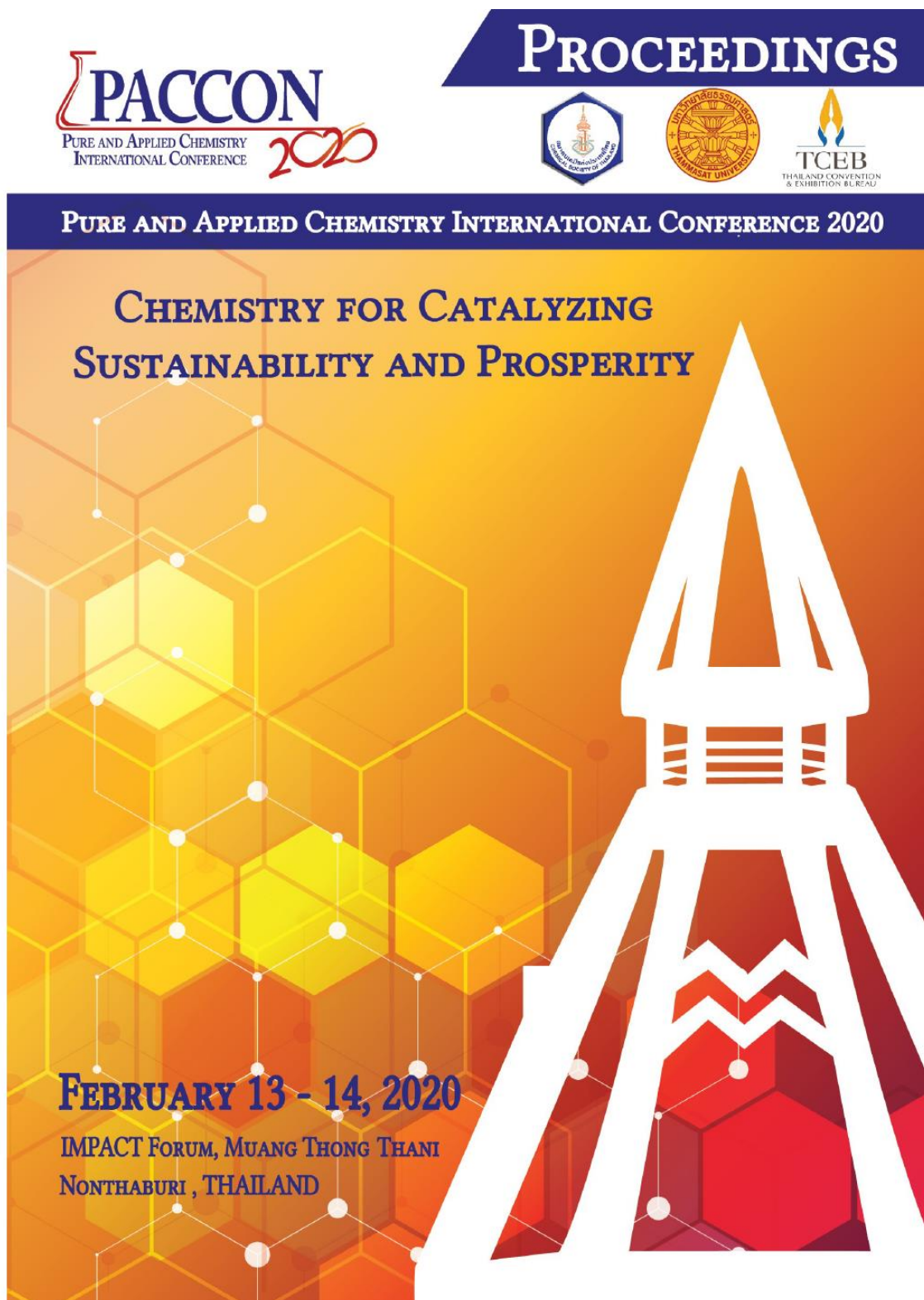
Samples	Physical property	Dilution	[Glu] (mol/dm ³)		%recovery
			Present	Found	
A	Colorless, clear solution	2x	0.308 ± 0.054	0.525 ± 0.017	120.3
		4x	0.142 ± 0.007	0.366 ± 0.016	107.6
B	light green, turbid	2x	0.053 ± 0.004	0.230 ± 0.005	98.3
		4x	0.039 ± 0.004	0.225 ± 0.011	103.2
C	Colorless, clear solution	2x	0.031 ± 0.002	0.221 ± 0.006	105.1
		4x	n.d.	0.206 ± 0.003	100.7
D	White turbid	2x	n.d.	0.173 ± 0.011	81.7
		4x	n.d.	0.180 ± 0.012	87.8

CONCLUSION

The developed method was successfully developed for determination of gluconic acid in skincare serum samples and can be an alternative method instead of HPLC instrument.

In addition, the method is simple, low cost and reliable to control amount of gluconic acid in skincare products without interfere from sample matrix.

Reference :
 Alt, L. L., Spectrophotometric Determination of Gluconic Acid and Its Salts. *Analytical Chemistry* 1955, 27 (5), 749-751



ภาพประกอบ 17 หน้าปกสารสารงานประชุมวิชาการ Pure And Applied Chemistry
International Conference 2020 (PACCON 2020)





Spectrophotometric determination of gluconic acid in skincare products

Sophika Srihirun, Nuanlaor Ratanawimarnwong*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

*E-mail: Nuanlaorr@g.swu.ac.th

Gluconic acid is a polyhydroxy carboxylic acid that is present in various kinds of products such as food, pharmacy and skincare products. In skincare products, gluconic acid is a multifunctional ingredient for anti-aging, maintaining skin moisture and being buffer agent. This work presents a simple spectrophotometric method for determination of gluconic acid in skincare products. The method employs replacement of copper hydroxide by gluconate ion to form soluble copper-gluconate complex. The residual copper hydroxide is removed by filtration before spectrophotometric detection of copper-gluconate at 650 nm. For quantitative analysis of gluconic acid, parameters affecting the absorbance change were optimized. The optimum condition for concentration of copper and sodium hydroxide are 0.5 and 2.5 mol/dm³, respectively, at the heating time of 5 minutes. Calibration curve was in range 0.03 – 0.70 mol/dm³ of gluconate and limit of detection was found to be 0.024 mol/dm³. The developed method was applied to four skincare products which was available in the local shop in Bangkok. Recoveries in the range of 82 – 120% was obtained.

1. Introduction

Gluconic acid (C₆H₁₂O₇) is a polyhydroxy carboxylic acid (PHA) normally present in various cosmetic products. Recently, increasing number of cosmetics containing PHA as an ingredient has been found due to the beneficial effect of PHA on skin such as exfoliation, antioxidant, anti-aging and moisturization effect.¹⁻² Even though the gluconic acid is non-toxic and non-irritant, having too high level of gluconic acid lead to lower pH than the specified standard value of 3.5 regulated by food and drug administration. The recommended amount of gluconic acid is in the range of 5 – 15 %.³⁻⁴ Therefore, accurate analytical method for determination of gluconic acid is crucial in quality control of the cosmetic products.

Various chromatographic methods have been proposed for determination of gluconic acid including ion-exchange chromatography and reverse phase chromatography.⁵⁻⁸ The chromatographic techniques provided accurate results with good precision but the methods had some limitations with using expensive instruments and requiring trained person for analysis. In addition to chromatographic

method, spectrophotometric methods have also been proposed for determination of gluconic acid. Other spectrophotometric method was based on formation of soluble copper-gluconate complex (Cu(Glu)₂) in alkaline medium.⁹ Absorbance was measured at 660 nm provided working range of 1-10 mmol/dm³. However, this method has not been applied for real sample.

In this work, formation of Cu(Glu)₂ complex was applied for analysis of skincare products. Parameters affecting absorption signal including concentration of Cu²⁺, concentration of sodium hydroxide (NaOH) and heating time were investigated. The samples of skin serum were analyzed and validated with high performance liquid method.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

All chemicals were analytical grade reagents. Gluconate sodium salt (C₆H₁₁O₇Na) and Sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich (Bangalore, India). Copper sulphate pentahydrate (CuSO₄·5H₂O) was purchased from Ajax Finechem (New

AC114



South Wales, Australia) Skincare serum samples were commercially available from local shops in Bangkok, Thailand. All solutions were prepared using ultrapure water obtained from Direct-Q 3UV water purification system (Merck, Darmstadt, Germany).

Double beam UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) was used for recording absorption spectrum. Measurement of absorbance at 650 nm were carried out using single beam UV-visible spectrophotometer (Mapada, Shanghai, China) for quantitative analysis of gluconic acid.

2.2 methods

The analytical procedure was adopted from the previous method for determination gluconic acid.⁹ First, precipitation of $\text{Cu}(\text{OH})_2$ was taken place by slowly adding 7.5 cm³ of CuSO_4 0.5 mol/dm³ into a beaker containing 5 cm³ of NaOH 2.5 mol/dm³. Then an aliquot of 2.5 cm³ of Gluconate or sample solutions was added into the mixture to form soluble $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex. The mixture was boiled for 5 minutes, and then cooled to room temperature. The mixture solution was filtered through Whatman filter paper No.1 (Whatman, Buckinghamshire, UK) to separate precipitate $\text{Cu}(\text{OH})_2$ out of the soluble $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex. After washing the precipitate with 0.1 mol/dm³ NaOH , the filtrate was made up with DI water to 25.0 cm³ in volumetric flask. This Cu-Glu_2 solution was further filtered through nylon syringe filter (0.45 μm - pore size) and then diluted 4-folds with DI water. Absorbance of the diluted $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ solution was measured at 650 nm for making calibration curve and analysis of the samples.

Skincare serum samples were diluted with water at the appropriate amount before analysis by the same procedure as describe above.

3. Results & Discussion

3.1 Preliminary study

In this work, the determination of gluconic acid was carried out by using formation of the $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex under alkaline condition as proposed in the previous work.⁹ However, operation procedure was modified as described in 3.2. According to our procedure, the operation consists of 2 steps of reactions including precipitation reaction of $\text{Cu}(\text{OH})_2$ followed by substitution reaction of gluconate ion to $\text{Cu}(\text{OH})_2$ precipitate, as shown in equation (1) and (2), respectively.

Spectrum of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ solution obtained from the procedure describe in 3.2 was recorded and compared with the spectrum of Cu^{2+} solution at the same concentration of 12.5 mmol/dm³. Results in Figure 1 show that the observed color of both $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ and Cu^{2+} solution look quite alike as blue color but the wavelength at maximum absorbance (λ_{max}) of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ and Cu^{2+} are difference at 650 nm and 800 nm, respectively. This result indicates that the gluconate ion could replace the hydroxide ion in $\text{Cu}(\text{OH})_2$ to form $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ (equation 2). As long as the amount of OH^- in equation 1 is kept excess, there is no more Cu^{2+} present in the solution. Then after removal of residual $\text{Cu}(\text{OH})_2$ precipitate, the solution of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ can be measured without an effect of absorption of Cu^{2+} .

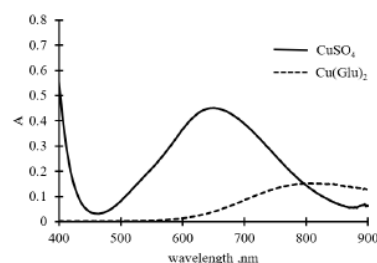


Figure 1. Spectrum of CuSO_4 and $\text{Cu}(\text{Glu})_2$.

AC115



3.2 Optimizations

In optimizations, parameters affected the analysis including concentration of CuSO_4 , concentration of NaOH and heating time were investigated. First, concentration of CuSO_4 from 0.05 to 0.5 mol/dm^3 was studied with different gluconate concentration. Result Figure 2A show that CuSO_4 at 0.50 mol/dm^3 provides linear correlation between absorbance and concentration of gluconate for the entire studied range between 0.05 mol/dm^3 and 0.50 mol/dm^3 . But at lower concentration of CuSO_4 , the absorbance increased when increasing concentration of gluconic acid to 0.25 mol/dm^3 then reach a plateau. This might be due to limited amount of CuSO_4 compared to gluconic acid. Therefore, concentration of CuSO_4 at 0.50 mol/dm^3 was selected as optimal concentration for gluconate quantification.

The effect of concentration of NaOH was studied in the range of 0.5 to 2.5 mol/dm^3 . Results in Figure 2B show that decreasing NaOH from 1.5 mol/dm^3 do not affect the change of absorbance signal. On the other hand, absorbance signal increases dramatically when the concentration of NaOH is increased from 1.5 to 2.5 mol/dm^3 . This result is agreed with the previous report that the $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex was developed in the basic medium. Greater concentration of NaOH than 1.5 mol/dm^3 elevated formation of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex. Though, greater concentration of NaOH than 2.5 mol/dm^3 was not studied since it was found to be difficult to dissolve. Therefore, the NaOH concentration of 2.5 mol/dm^3 was used in all subsequent experiments as it resulted in great absorbance signal with convenient preparation of the solution.

The rate of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex formation can be accelerated by increasing

temperature. In this work, heating time was studied. The heating time was defined as the time duration at which the reaction solution was immersed in boiling water. The total reaction time was fixed at 10 min while the heating time of 0, 1, 3, 5 and 8 min were investigated. The absorbance signal increased with increasing heating time (Figure 3A) for gluconate of 0.50 mol/dm^3 . But this phenomenon was less pronounced for gluconate of 0.3 mol/dm^3 . In addition, the color of the precipitate on a filter paper changed from blue to dark brown color when the heating time was prolonged (Figure 3B). This indicated that dehydration of $\text{Cu}(\text{OH})_2$ was taken place to develop the brown CuO product. Nevertheless, this dehydration reaction did not affect the analysis of gluconic acid since it occurred after the formation of the $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex. Therefore, 5 minutes was selected as optimal time for boiling solution.

3.3 Analytical Features

Standard gluconate solutions were analyzed using the optimum conditions. Analytical features including linear range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and precision were studied. The correlation between the absorbances of $\text{Cu}(\text{Glu})_2$ complex and the gluconate concentration in the range of 0.01 – 1.50 mol/dm^3 were studied as shows in Figure 4A. Working range of the developed method was found to be 0.03 – 0.70 mol/dm^3 . Table 1 demonstrates linear equations of the calibration curves obtained from three inter-days. Good coefficient of determination (r^2) of greater than 0.998 were obtained indicating good efficacy of calibration method. LOD (3σ blank/slope, $n = 5$) and LOQ (10σ blank/slope, $n = 5$) of

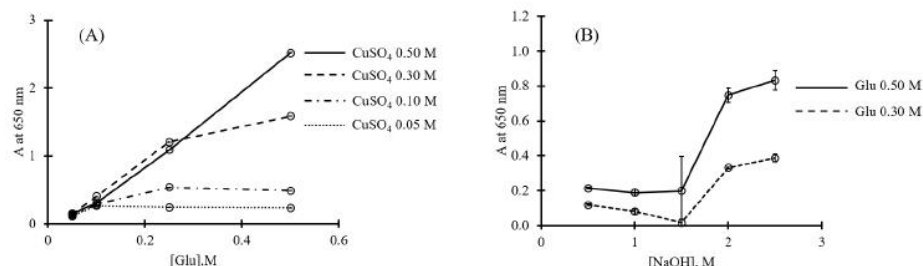


Figure 2. Optimizations results (A) Effect of CuSO₄ concentration to linearity of absorbance signal. (B) Effect of NaOH concentration to the absorbance signal.

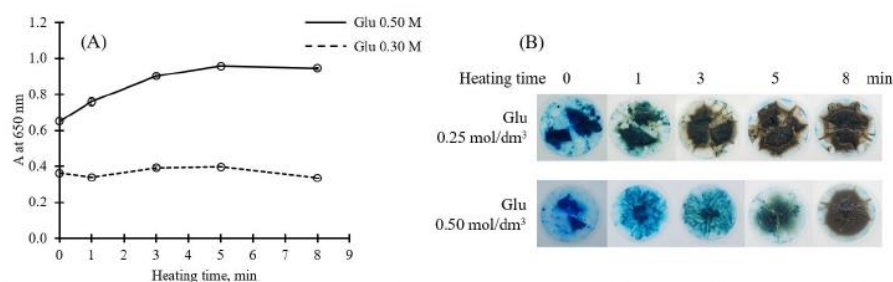


Figure 3. Effect of heating time on (A) absorbance of the Cu(Glu)₂ complex and (B) photos of solid precipitate on the filter paper. The experiment was carried out by using heating time of 0, 1, 3, 5 and 8 min for gluconate standard 0.25 and 0.50 mol/dm³, respectively.

the method were 0.024 mol/dm³ and 0.030 mol/dm³, respectively. The repeatability was evaluated in terms of relative standard deviation (%RSD). Ten replicate analysis of standard gluconate 0.5 mol/dm³ were carried out providing RSD value of 2.57%.

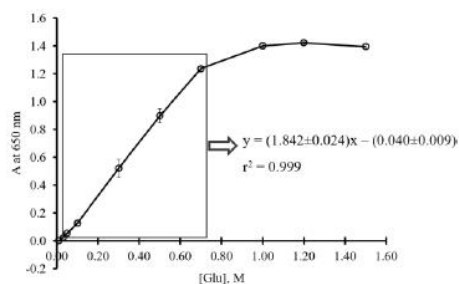


Figure 4 Correlation between absorbance signals and standard gluconate concentration 0.01 – 1.5 mol/dm³ (n = 3).

Table 1. Linear equations of the calibration curve obtained from three inter-days.

Days	Linear equation (n = 3)	r ²
1	$y = (1.842 \pm 0.024)x - (0.040 \pm 0.009)$	0.9993
2	$y = (1.755 \pm 0.017)x - (0.031 \pm 0.006)$	0.9996
3	$y = (1.800 \pm 0.012)x - (0.025 \pm 0.008)$	0.9982

3.4 Samples analysis

The proposed method was applied to determine the gluconic acid content of four skincare serum samples. Only one out of the four samples (labelled as sample A in Table 2) was specified amount of gluconic acid as 10 %w/v. The content of gluconic acid of this sample was analyzed using the

AC117



developed method and the corresponding value of 10.1 % w/v was achieved. In addition, more experiments were carried

out on four samples both clear and hazy fluids to evaluate the recovery of this

Table 2 Concentration of gluconate in synthetic and real samples obtained from samples analysis using the present method.

Samples	Physical property	Dilution	Concentration of Gluconic acid (mol/dm ³)			%recovery
			Present	spiked	Found	
A	Colorless, clear solution	2x	0.054 ± 0.308	0.200	0.017 ± 0.525	120
		4x	0.007 ± 0.142	0.200	0.016 ± 0.366	107
B	light green, turbid	2x	0.004 ± 0.053	0.200	0.005 ± 0.230	.983
		4x	0.004 ± 0.039	0.200	0.011 ± 0.225	103
C	Colorless, clear solution	2x	0.002 ± 0.031	0.200	0.006 ± 0.221	105
		4x	n.d.	0.200	0.003 ± 0.206	100
D	White turbid	2x	n.d.	0.200	0.011 ± 0.173	81.7
		4x	n.d.	0.200	0.012 ± 0.180	.878

method. Addition of 0.2 mol/dm³ of gluconic acid was made for two-times and four-times dilution of the samples. The results given in Table 2 demonstrates that the method provides satisfactorily recovery of the signal within the range of 80 – 120%.

In addition, final confirmation of the present method was carried out. Sample A was analyzed and validated with a reversed phase HPLC method. As a result, concentration of gluconate concentrations obtained from the proposed method was found to be 0.142 mol/dm³, which was agreed well with the results obtained from HPLC of 0.142 mol/dm³. By using t-test for means of two samples, it was indicated that there was no significantly difference between the results obtained from the two methods at 95% confidence level.

4. Conclusion

The developed method based on formation of Cu(Glu)₂ complex was successfully developed for determination of gluconic acid in skincare serum samples. The developed method can be an alternative method for gluconic acid determination instead of HPLC instrument. This study demonstrates the accuracy of the method for quantitative analysis of gluconic acid in the range of 0.03 – 0.70 mol/dm³. The detection limit of the proposed method was

0.024 mol/dm³. The method was applied to the determination of gluconic acid in spiked skincare serum samples with acceptable recoveries (82 – 120%). In addition, the method is simple, low cost and reliable to control amount of gluconic acid in skincare products without interfere from sample matrix.

Acknowledgements

The authors acknowledge the scholarship from the Promotion of Science and Mathematics Talented Teachers (PSMT) entail to Ms. Sophika Srihirun.

References

1. Lee, D. W.; Cha, M. G.; Park, Y. H.; Lee, H. H.; Park, J. U. Cosmetic composition comprising gluconolactone and lactobionic acid e. KR2013090169A, 2013.
2. Wu, J.; Zhang, Y. A cosmetic composition containing plant extract active components. CN106420474A, 2017.
3. Sverdlove, M. J.; Brieva, P. M.; Su, M. H.; Lynch, S. Cosmetic composition comprising glycolic acid and methods of use. US20190201304A1, 2019.
4. Hakozaiki, T.; Oblong, J. E.; Fang Deyer, B. Cosmetic composition and method



- for improving the appearance of skin. WO2018237218A1, 2018.
5. Rajakyla, E. *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 695-701.
 6. Maquille, L.; Cologon, P.; Renaudin, L.; Gautier, C.; Jardy, A.; Vial, J.; Thiébaud, D.; Fichet, P.; Goutelard, F. *J. Radioanalyt. Nuclear Chem.* **2015**, 306.
 7. Andrew, B. E. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, 14 (9), 635-6.
 8. Rakotomanga, S.; Baillet, A.; Pellerin, F.; Baylocq-Ferrier, D. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1991**, 570 (2), 277-284.
 9. Alt, L. L. *Analyt. Chem.* **1955**, 27 (5), 749-751.



ภาพประกอบ 18 ประกาศนียบัตรการนำเสนอผลงานวิจัยงานประชุมวิชาการ Pure And Applied Chemistry International Conference 2020 (PACCON 2020)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	โสภิกา ศรีหิรัญ
วัน เดือน ปี เกิด	10 กุมภาพันธ์ 2538
สถานที่เกิด	จังหวัดฉะเชิงเทรา
วุฒิการศึกษา	ระดับประถมศึกษา : โรงเรียนวัดดอนทอง ระดับมัธยมศึกษา : โรงเรียนเบญจมราชรังสฤษฎิ์ ฉะเชิงเทรา ระดับปริญญาตรี : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	17 หมู่ 11 ตำบลบางตีนเป็ด อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา
ผลงานตีพิมพ์	Spectrophotometric determination of gluconic acid in skincare products

