

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง โดยอาศัย  
เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

Determination of hydroquinone in cosmetics by using  
UV-visible spectrophotometry

ผศ. ดร. เสาวภาคย์ จีราทรัง

600274597  
2000213

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย): การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง โดยอาศัยเทคนิค  
สเปกโตรโฟโตเมตรี

แหล่งเงิน: เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2558

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ: ผศ. ดร. เสาวภาคย์ ธีราทรง

หน่วยงานต้นสังกัด: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอางโดยอาศัยเทคนิคยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี โดยไฮโดรควิโนนจะทำหน้าที่รีดิวซ์ เหล็ก (III) ให้เป็นเหล็ก (II) จากนั้นเหล็ก (II) ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออร์โทฟิแนนทรอลีน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 508 นาโนเมตร ในการวิจัย ได้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อปฏิกิริยา ได้แก่ ความเข้มข้นของเหล็ก (III) ความเข้มข้นของออร์โทฟิแนนทรอลีน พีเอช และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จะได้ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในช่วง 1-20 ไมโครโมลาร์ โดยได้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานคือ ค่าการดูดกลืนแสง =  $(0.033 \pm 8.68 \times 10^{-5})$  [ไฮโดรควิโนน (ไมโครโมลาร์)] +  $(0.285 \pm 9.7 \times 10^{-4})$  และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1 ขีดต่ำสุดสำหรับการตรวจวัด และขีดต่ำสุดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ 0.7 และ 1.4  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ดี (%RSD = 1.15) และวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอางได้สำเร็จ ซึ่งได้ค่าวิเคราะห์คืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วง 98.13-105.63%

คำสำคัญ: ไฮโดรควิโนน, เหล็ก (III), เหล็ก (II), ออร์โทฟิแนนทรอลีน, เครื่องสำอาง, ยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Research Title:** Determination of hydroquinone in cosmetics by using UV-visible spectrophotometry

**Researcher:** Asst. Prof. Dr. Saowapak Teerasong

**Faculty:** Science

**Department:** Chemistry

### ABSTRACT

This project was aimed to develop a method for determination of hydroquinone in cosmetics by UV-vis spectrophotometry. Hydroquinone is a reducing agent for conversion of Fe(III) to Fe(II). The resultant Fe(II) later reacts with o-phenanthroline, giving a scarlet complex of  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ . This complex has a maximum absorption at 508 nm. Influence parameters such as concentrations of Fe(III) and o-phenanthroline, pH and reaction time were studied. Under optimal conditions, a linear calibration was obtained from 1 to 20  $\mu\text{M}$  hydroquinone. The equation was Absorbance =  $(0.033 \pm 8.68 \times 10^{-5})$  [hydroquinone ( $\mu\text{M}$ )] +  $(0.285 \pm 9.7 \times 10^{-4})$  with  $R^2 = 1$ . The detection limit (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.7 and 1.4  $\mu\text{M}$ , respectively. The method provided good precision of analysis (RSD = 1.15%). The developed method was successfully applied to determination of hydroquinone in cosmetics. The recovery was in range of 98.13-105.63%.

**Keywords:** hydroquinone, Fe(III), Fe(II), o-phenanthroline, cosmetics, UV-visible spectrophotometry

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ในการเอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จาก แหล่งทุนเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผศ. ดร. เสาวภาคย์ อีราทรง  
หัวหน้าโครงการวิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>3</b>
2.1 ไฮโดรควิโนน.....	3
2.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน.....	4
2.3 หลักการในการวิเคราะห์สำหรับโครงการวิจัยนี้.....	6
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b> .....	<b>8</b>
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	8
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	9
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b> .....	<b>14</b>
4.1 ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด.....	14
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม.....	15
4.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน.....	19
4.4 การศึกษาการรบกวนของ $Fe^{3+}$ .....	20
4.5 การวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง.....	21
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย</b> .....	<b>23</b>
<b>บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย</b> .....	<b>24</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
เอกสารอ้างอิง.....	25
ภาคผนวก.....	27
ภาคผนวก ก ผลงานวิจัย.....	28
ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย.....	31
ประวัตินักวิจัย.....	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง.....	22
5.1 แสดงค่าที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน.....	23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรควิโนน และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	3
2.2 แสดงกลไกการผลิตเม็ดสีเมลานิน.....	4
2.3 ปฏิกิริยาการตรวจวัดไฮโดรควิโนนที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้.....	7
4.1 สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ .....	15
4.2 ผลของ pH ต่อปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ .....	16
4.3 ผลของความเข้มข้นต่างๆของ $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ ต่อปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน.....	17
4.4 ผลความเข้มข้นของ o-phenanthroline ต่อปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ .....	18
4.5 ผลของระยะเวลาต่อการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน.....	19
4.6 ผลของความเข้มข้นต่างๆของไฮโดรควิโนนต่อการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน.....	20
4.7 สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อน $\text{Fe}^{3+}$ ความเข้มข้น 0.05 M.....	21



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย

เนื่องจากในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวนั้นได้รับความนิยมอย่างมากในกลุ่มผู้บริโภคในเอเชีย รวมถึงประเทศไทย บริษัทเครื่องสำอางจึงได้ทำการคิดค้นผลิตภัณฑ์เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ครีมที่ทำให้ผิวหน้าขาวใส จึงทำให้ในปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์เหล่านี้วางจำหน่ายอยู่มากมายในท้องตลาด ซึ่งแต่ละผลิตภัณฑ์ก็มีสารที่เป็นส่วนประกอบของสารที่สำคัญที่ทำให้ผิวขาวแตกต่างกันไป ไฮโดรควิโนนก็เป็นสารเคมีซึ่งนิยมนำมาเตรียมเป็นครีมที่ทำให้หน้าขาว เนื่องจากเห็นผลได้เร็ว ไฮโดรควิโนนออกฤทธิ์โดยการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีของผิวหนังที่เรียกว่าเมลานิน (melanin) จึงมีผลทำให้ผิวขาวขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการใช้ไฮโดรควิโนนนี้ ควรใช้ในระยะเวลาที่จำกัด ไม่ควรใช้นานเกินไป นอกจากนี้ การใช้ครีมที่มีส่วนผสมของไฮโดรควิโนนในปริมาณสูง อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ได้ เช่น อาการระคายเคืองต่อผิว เกิดจุดด่างขาวที่หน้า หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายในผิวหนังทำให้เกิดเป็นฝ้าถาวรได้ รวมทั้งเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งผิวหนังด้วย [1]

จากการศึกษาและทดลองในหนูพบว่า สารไฮโดรควิโนนมีความเป็นพิษ โดยมีค่า LC50 orally in rats มากกว่า 375 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และยังพบว่าสามารถมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และก่อมะเร็งในหนูทดลอง [2,3] ในบางประเทศจึงไม่อนุมัติให้มีการใช้ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง แต่บางประเทศอนุมัติให้วางจำหน่ายได้เฉพาะรูปแบบ 2% cream สำหรับในประเทศไทย สารไฮโดรควิโนนเป็นสารที่เคยอนุญาตให้ใช้ในครีมแก้ฝ้า แต่ภายหลังพบว่าไฮโดรควิโนนทำให้เกิดการระคายเคือง และจุดด่างขาวที่หน้าผิวหน้าดำ เป็นฝ้าถาวรรักษาไม่หาย ดังนั้นสารไฮโดรควิโนนจึงถูกกำหนดเป็นสารห้ามในเครื่องสำอางตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง (ฉบับที่ 2) ประกาศ ณ วันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 โดยอนุญาตให้ใช้ไฮโดรควิโนนได้เฉพาะในผลิตภัณฑ์สำหรับบัยอ้อมผสม ในอัตราส่วนสูงสุด ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไม่เกิน 0.3% และในผลิตภัณฑ์ชุดทำเล็บเทียม 0.02% เท่านั้น [4,5]

อย่างไรก็ตาม ยังพบการปนเปื้อนวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น พรอท และไฮโดรควิโนน เนื่องจากผู้ผลิตบางรายต้องการลดต้นทุนในการผลิต แทนการใส่สารประเภทวิตามินซี วิตามินอี และเอเอชเอ เนื่องจากสารดังกล่าวมีราคาแพงและเห็นผลช้ากว่า เมื่อไม่นานมานี้ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ทำการสุ่มตรวจเครื่องสำอางในท้องตลาด และพบการปนเปื้อนวัตถุที่ห้ามใช้ในเครื่องสำอาง โดยได้ประกาศรายชื่อเครื่องสำอางมีสารอันตรายจำนวน 34 รายการ [6]

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยอาศัยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทโฟโตเมทรี (UV – visible spectrophotometry) มาใช้ในการตรวจวัด โดยคาดหวังว่าวิธีที่

พัฒนาขึ้นจะเป็นอีกทางเลือกของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง ที่มีความน่าเชื่อถือ และวิเคราะห์ได้รวดเร็ว

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 พัฒนารีวิววิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยอาศัยเทคนิคสเปกโทโฟโตเมทรีในการตรวจวัด

1.2.2 นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

12.1 ศึกษาปฏิกิริยาเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน และตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทโฟโตเมทรี

12.2 ศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

12.3 ศึกษากระบวนการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

12.4 นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้หาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งในท้องตลาด

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณไฮโดรควิโนนที่มีความน่าเชื่อถือ (Reliability) และสามารถนำไปประยุกต์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

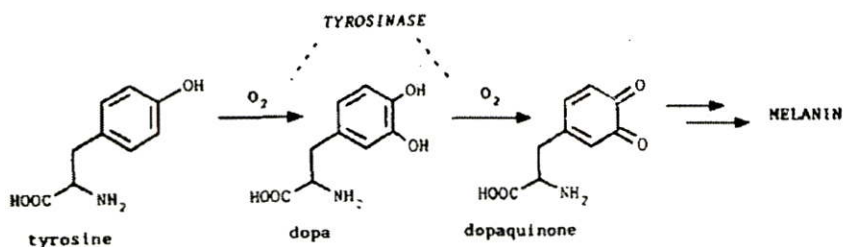
#### 2.1 ไฮโดรควิโนน (hydroquinone)

ไฮโดรควิโนนเป็นสารฟีนอลชนิดหนึ่ง มีเรียกชื่อทางเคมีว่า benzene-1,4-diol หรือ 1,4-dihydroxy benzene มีสูตรเคมีคือ  $C_6H_4(OH)_2$  ลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็น hydroxyl groups สองกลุ่มเชื่อมต่อกับ benzene ring โดยมีลักษณะการเชื่อมต่อเป็นแบบ para (รูปที่ 2.1) ไฮโดรควิโนนมีสถานะเป็นของแข็งสีขาว เนื้อละเอียด สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidation เกิดเป็นสารพาราเบนโซควิโนน (parabenzquinone) หรือที่เรียกว่า p-quinone ไฮโดรควิโนนถูกนำมาใช้เป็นสารช่วยลดปริมาณของเม็ดสีในชั้นผิวหนัง โดยจัดอยู่ในกลุ่มที่มีกลไกในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรควิโนน และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เอนไซม์ไทโรซิเนส เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ให้เป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งก็คือเม็ดสีน้ำตาลหรือดำบนผิวหนัง จากรูปที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่า กลไกการผลิตเมลานินจะต้องใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสในหลายขั้นตอน ดังนั้นจึงถือได้ว่า ไฮโดรควิโนนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นไวท์เทนนิ่ง เนื่องจากการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นสารสำคัญในหลายขั้นตอนของการผลิตเมลานิน



รูปที่ 2.2 แสดงกลไกการผลิตเม็ดสีเมลานิน [7]

ในบางประเทศที่อนุญาตให้ใช้ไฮโดรควิโนน จะใช้ในความเข้มข้น 2% ในเครื่องสำอางทั่วไป หรือถ้าเข้มข้นกว่านั้นก็ต้องใช้ภายใต้คำสั่งของแพทย์ อย่างไรก็ตามในอีกหลายประเทศไม่ยอมให้มีการใช้ ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง เนื่องจากมีผลต่อการทำให้เกิดการระคายเคืองสูง นอกจากนี้ ถ้ามีการหยุดทาครีมอย่างกะทันหัน จะทำให้สารตั้งต้นก็คือ tyrosine ถูกเปลี่ยนเป็นเมลานินอย่างรวดเร็วและมากมาย เกิดภาวะที่เรียกว่า Rebound ก็คือการที่ฝ้าดำขึ้นกว่าเดิม

## 2.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

### 2.2.1 เทคนิคโครมาโทกราฟี

W. Gao และ C. Legido-Quigley [8] ได้พัฒนาเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ฟีนอล และสารกันเสีย 6 ชนิดในเครื่องสำอาง โดยใช้วิธีการชะแบบเกรเดียนท์ (gradient elution) สภาวะที่ทำให้การแยกมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ ใช้เฟสอยู่เป็น C18 column และใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนผสมของเมทานอลกับ 0.05 M แอมโมเนียมในน้ำ วิธีนี้จะให้ความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในช่วง 0.5 – 200 µg/mL และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9997 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) อยู่ที่ช่วงความเข้มข้น 0.2 µg/mL ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) น้อยกว่า 5% ค่าวิเคราะห์คืนกลับ (recovery) อยู่ในช่วงระหว่าง 86.5%–116.3% วิธีใช้เวลาในการแยกน้อยกว่า 10 นาที จึงถือว่าให้ความเร็วในการวิเคราะห์ที่ดี

W. Tongchai และ B. Liawruangrath [9] ได้ใช้เทคนิค micellar liquid chromatographic (MLC) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์แบบต่อเนื่องในการหาปริมาณไฮโดรควิโนนและอาร์บูติน การวิเคราะห์ทั้งหมดจะทำการที่อุณหภูมิห้องที่มีอุณหภูมิคงที่ โดยใช้สารผสมของอะซิโตนไตร 1% โดยปริมาตร และ 0.006 M Brij 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(pH = 6.0) เป็นเฟสเคลื่อนที่ใช้อัตราการไหลที่ 1.0 mL/min ส่วนเฟสอยู่นิ่งเป็น C-18 column สารที่ชะออกมาจากคอลัมน์ จะถูกตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จะได้สมการเส้นตรงสำหรับกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณไฮโดรควิโนนคือ  $y = 0.091x + 0.050$  ( $r^2 = 0.9930$ ) มีค่า LOD ที่ตรวจวัดได้คือ 0.37  $\mu\text{g/mL}$  ค่า recovery อยู่ในช่วง 95.9 – 99.0 % วิธีนี้มีความไว (sensitive) ในการวิเคราะห์ที่ดีเหมาะสมสำหรับงานวิเคราะห์ประจำวันที่เกี่ยวข้องกับเภสัชกรรมและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

### 2.2.2 เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

G. Xu และคณะ [10] ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าที่ทำจาก carbon nanotube เจือด้วย poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT/CNT) เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนน โดยทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับขั้ว CNT ที่ไม่มีการเจือด้วยพอลิเมอร์ พบว่าเมื่อใช้อิเล็กโทรด CNT จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดที่ศักย์ไฟฟ้า 584 mV และมีอัตราการถ่ายโอนประจุเท่ากับ  $0.45 \text{ S}^{-1}$  ในขณะที่การใช้ขั้ว PEDOT/CNT จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่าคือ 141 mV และมีอัตราการถ่ายโอนประจุที่สูงขึ้นคือ  $1.84 \text{ S}^{-1}$  อิเล็กโทรด PEDOT/CNT ที่พัฒนาขึ้นให้ความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในช่วง 1.1-125  $\mu\text{M}$  และมี LOD เท่ากับ 0.3  $\mu\text{M}$  อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้น มีราคาไม่แพงและทำได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ตัวรับกวนส่งผลต่อการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสูง จึงต้องมีการกำจัดตัวรับกวนออกก่อนทำการวิเคราะห์

B. Unnikrishnan และคณะ [11] ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าโดยทำการติด Pt-MnO<sub>2</sub> nanoparticles ลงบน glassy carbon electrode (GCE) และใช้ในการตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนนและแคทีคอล (catechol) จากการตรวจสอบคุณลักษณะด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM) และ Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) พบว่าอนุภาคนาโนของ Pt และ MnO<sub>2</sub> ที่ติดบน GCE มีลักษณะเป็นทรงกลม และจากการศึกษาด้วย Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) พบว่าอนุภาคนาโน Pt ที่อยู่บนฟิล์ม จะทำหน้าที่ช่วยให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก MnO<sub>2</sub> ไปยัง GCE ได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงลด electron transfer resistance ( $R_{et}$ ) ของฟิล์ม การประยุกต์ใช้อิเล็กโทรดในการหาปริมาณไฮโดรควิโนนและแคทีคอล ทำได้โดยอาศัยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่าพีคของการเกิดปฏิกิริยาของสารทั้งสองเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าต่างกันถึง 0.12 V ดังนั้นอิเล็กโทรดนี้จึงสามารถวิเคราะห์หาสารทั้งสองได้ในคราวเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.3 เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี

S. Uddin และคณะ [12] ได้ใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง โดยใช้ ammonium meta-vanadate เป็นสารออกซิไดส์ ซึ่งจะเปลี่ยนไฮโดรควิโนนให้เป็นพาราเบนโซควิโนนในสภาวะที่มีออกซิเจนร่วมด้วย เนื่องจากพาราเบนโซควิโนนมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงยูวีที่สูง จึงสามารถนำมาใช้หาปริมาณไฮโดรควิโนนในระดับต่ำได้ (trace analysis) จากการทดลองพบว่า จะได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนน ที่ความยาวคลื่น 245.5 nm ในช่วง 0.025 – 2.00 µg/mL และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9998 ค่า LOD อยู่ที่ความเข้มข้น 7 ng/mL ค่า RSD น้อยกว่า 1.5% วิธีนี้ถูกนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้กับครีมที่ถูกเจือจางมาแล้วสำหรับการหาไฮโดรควิโนนในระดับที่น้อย

Sirajuddin และคณะ [13] ได้ใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนโดยใช้  $KMnO_4$  เป็นสารออกซิไดส์ ในการเปลี่ยนไฮโดรควิโนนให้เป็นพาราเบนโซควิโนน พารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ความยาวคลื่น เวลา อุณหภูมิ ค่า pH และตัวรบกวนได้ถูกศึกษาเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด จากการทดลองพบความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ 2 ช่วง ได้แก่ ความเข้มข้น 0.07 – 2.0 µg/mL และ 0.05 – 0.005 µg/mL ที่ความยาวคลื่น 245.5 nm และ 262 nm ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9978 และ 0.9843 และค่า LOD อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.021 µg/mL และ 0.0016 µg/mL ตามลำดับ ค่า RSD 1.7% และ 2.4%

### 2.3 หลักการในการวิเคราะห์สำหรับโครงการวิจัยนี้

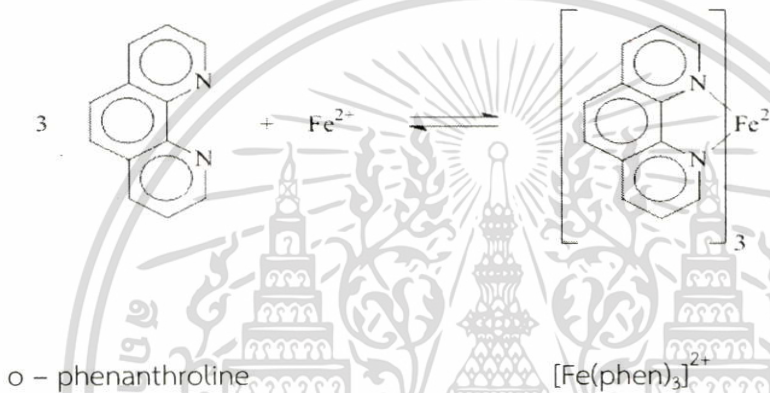
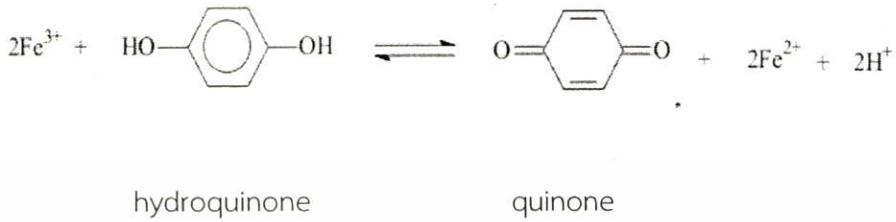
เทคนิคโครมาโทกราฟีและเคมีไฟฟ้า มีข้อดีคือให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ที่ดี แต่เทคนิคนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนานมาก มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก จะต้องอาศัยความชำนาญในการใช้เครื่องมือ เครื่องมือวิเคราะห์มีราคาแพง และเครื่องมือมีขนาดใหญ่ยากต่อการเคลื่อนย้ายสำหรับการวิเคราะห์ภาคสนาม

เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีสามารถวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนได้อย่างรวดเร็ว เครื่องมือใช้ง่ายไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและราคาไม่แพง ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้จะมีความไวในการวิเคราะห์ต่ำกว่าสองเทคนิคข้างต้น แต่ถือว่าเพียงพอต่อการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมตรี และหลักการที่ว่า ไฮโดรควิโนนสามารถรีดิวซ์เหล็ก (III) ให้เป็นเหล็ก (II) จากนั้นเหล็ก (II) ที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับออร์โทฟีแนนทรอลีน (ortho-phenanthroline) เกิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณไฮโดรควิโนน ดังนั้น จึงสามารถนำหลักการดังกล่าวนี้มาใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรควิโนนได้ ปฏิกริยาแสดงดังรูปที่

2.3



รูปที่ 2.3 ปฏิกริยาการตรวจวัดไฮโดรควิโนนที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

##### 3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 เฟอร์ริกซัลเฟตมอนอไฮเดรต (ferric sulfate monohydrate,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- 3.1.1.2 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- 3.1.1.3 ไฮโดรควิโนน (hydroquinone,  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ )
- 3.1.1.4 1-10 ฟีนแอนโทรลีนโมโนไฮเดรต (o-phenanthroline,  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{NO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- 3.1.1.5 อะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer)

##### 3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.2.1 บีกเกอร์ (ขนาด 400 , 150 , 100 , 50 มิลลิลิตร)
- 3.1.2.2 ปีเปต (ขนาด 10 , 5 มิลลิลิตร)
- 3.1.2.3 ไมโครปีเปต (ขนาด 20, 100, 1000 ไมโครลิตร)
- 3.1.2.4 ขวดวัดปริมาตร (ขนาด 250 , 100, 50, 25, 10 มิลลิลิตร)
- 3.1.2.5 กระจกตวง (ขนาด 100, 10 มิลลิลิตร)
- 3.1.2.6 หลอดหยด
- 3.1.2.7 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.2.8 จุกยาง
- 3.1.2.9 ซ้อนตักสาร
- 3.1.2.10 ครอบน้ำกลั่น
- 3.1.2.11 เครื่องซังน้ำหนักรวมละเอียด 4 ตำแหน่ง
- 3.1.2.12 เครื่อง UV-visible spectrophotometer (UV-1800-Shimadzu)
- 3.1.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge
- 3.1.2.14 เครื่องให้ความร้อน
- 3.1.2.15 กระดาษกรอง Whatman no.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การเตรียมสารเคมี

#### 3.2.1.1 สารมาตรฐานไฮโดรควิโนน เข้มข้น 0.01 M

ชั่งไฮโดรควิโนน 0.055 g แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร นำสารละลายที่เตรียมได้นี้มาเจือจางให้เป็นความเข้มข้น 1 mM ก่อนนำไปใช้งาน

#### 3.2.1.2 กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) เข้มข้น 0.1 M

นำกรด  $H_2SO_4$  (Cone. 96 % w/v) มาประมาณ 1.4 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

\*สารละลายนี้ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับเตรียมสารละลาย 0.1 M o-phenanthroline และสารละลายมาตรฐาน 0.05 M  $[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$

#### 3.2.1.3 สารละลาย o-phenanthroline เข้มข้น 0.1 M

ชั่ง o-phenanthroline monohydrate มา 1.98 g แล้วนำไปละลายด้วย 0.1 M  $H_2SO_4$  ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M  $H_2SO_4$  ในขวดวัดปริมาตร

#### 3.2.1.4 สารละลาย $[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$ เข้มข้น 0.05 M

ชั่ง  $[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$  มา 1.93 g นำไปละลายด้วย 0.1 M  $H_2SO_4$  ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M  $H_2SO_4$  ในขวดวัดปริมาตร

#### 3.2.1.5 อะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M พีเอช 3.6 (acetate buffer pH = 3.6)

1. ชั่งโซเดียมอะซิเตต ( $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ ) มา 2.72 g แล้วนำไปละลายด้วยน้ำกลั่น
2. นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 1 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
3. เทกรดอะซิติกมา 2.9 มิลลิลิตร แล้วนำมาใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
4. ปิเปตสารละลายข้อ 2 มา 9.25 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายข้อ 3 มา 115.75 มิลลิลิตร แล้วนำมาใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งครีมตัวอย่างมา 1 g แล้วมาละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นคนด้วยแท่งแก้วคนสาร แล้วใส่ 0.1 M  $H_2SO_4$  5 มิลลิลิตร คนจนสารละลาย
2. นำสารละลายมาอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. นำสารละลายที่อุ่นเสร็จแล้วมาใส่ในหลอด centrifuge แล้วนำทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็วในการหมุน 5000 รอบ/นาที นาน 20 นาที
4. นำสารละลายที่ปั่นเหวี่ยงเสร็จมากรองแบบลดความดันด้วยกระดาษกรอง Whatmanno.42
5. นำสารละลายที่กรองได้มาใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 0.05 M  $H_2SO_4$

### 3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

#### 3.2.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของ $H_2SO_4$

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนเข้มข้น 1 mM มา 0  $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 1250  $\mu$ l, 2500  $\mu$ l และ 5000  $\mu$ l ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$  ใน 0.1 M  $H_2SO_4$  และ 0.1 M o-phenanthroline ใน 0.1 M  $H_2SO_4$  มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรในข้อ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย 0.1 M  $H_2SO_4$  จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล
5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-4 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของ  $H_2SO_4$  เป็น 0.01 M และ 0.05 M

#### 3.2.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของ $[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนเข้มข้น 1 mM มา 0  $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 1250  $\mu$ l, 2500  $\mu$ l และ 5000  $\mu$ l ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$  ใน 0.1 M  $H_2SO_4$  และ 0.1 M o-phenanthroline ใน 0.1 M  $H_2SO_4$  มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรในข้อ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย 0.1 M  $H_2SO_4$  จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-4 โดยเปลี่ยนความเข้มข้น  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  เป็น 0.02 M, 0.1 M, 0.2 M และ 0.5 M

### 3.2.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของ o-phenanthroline

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนเข้มข้น 0.1 M มา 0  $\mu\text{l}$  , 25 $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$ , 1250  $\mu\text{l}$ , 2500  $\mu\text{l}$  และ 5000  $\mu\text{l}$  ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  ใน 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  และ 0.1 M o-phenanthroline ใน 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรในข้อ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล
5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1-4 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของ o-phenanthroline เป็น 0.25 M, 0.2 M, 0.05 และ 0.01 M

### 3.2.3.4 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนเข้มข้น 0.1 M มา 0  $\mu\text{l}$  , 25 $\mu\text{l}$  , 250  $\mu\text{l}$  , 1250  $\mu\text{l}$  , 2500  $\mu\text{l}$  และ 5000  $\mu\text{l}$  ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  2 มิลลิลิตร แล้วใช้นาฬิกาจับเวลา
3. ปิเปตสารละลาย 0.1 M o-phenanthroline 2 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย acetate buffer pH 3.6 จนถึงขีดบอกปริมาตร
4. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลาและบันทึกผล

## 3.2.4 ขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน และการทดลองสารตัวอย่าง

### 3.2.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนเข้มข้น 1 mM มา 0  $\mu\text{l}$ , 250 $\mu\text{l}$ , 1250  $\mu\text{l}$ , 2500  $\mu\text{l}$ , 3750  $\mu\text{l}$  และ 5000  $\mu\text{l}$  ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  และ สารละลาย 0.1 M o-phenanthroline มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย acetate buffer pH 3.6 จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล

##### 3.2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในสารตัวอย่าง

1. ปิเปตตัวอย่างมา 2500  $\mu\text{l}$  ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  และสารละลาย 0.1 M o-phenanthroline มาอย่างละ 2 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย acetate buffer pH 3.6 จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล
5. คำนวณหาความเข้มข้นของไฮโดรควิโนนโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

##### 3.2.5 การรบกวนของเหล็ก (III) ที่มีผลต่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัด

1. ชั่ง  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  มา 0.0196 g แล้วนำไปละลายด้วย 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ในขวดวัดปริมาตร
2. ชั่ง  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  มา 0.02xx g นำไปละลายด้วย 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ในขวดวัดปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. นำสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ไปสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200–800 นาโนเมตร และบันทึกผล

##### 3.2.6 ขีดจำกัดต่ำสุดสำหรับการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ)

เนื่องจากสารละลายแบลนด์ให้สัญญาณในการวิเคราะห์ จึงได้ใช้สูตรในการคำนวณหาค่า LOD และ LOQ คือ  $\text{blank} + 3\text{SD}$  และ  $\text{blank} + 10\text{SD}$  ตามลำดับ

1. ปิเปตสารละลาย 0.05 M  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  และ สารละลาย 0.1 M o-phenanthroline มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วย acetate buffer จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงจำนวน 8 ครั้ง และคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสูตรข้างต้น

### 3.2.7 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

จากการทดลองนี้ได้เลือกใช้สูตรในการคำนวณหาค่า %RSD คือ  $\%RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$

1. ทำตามวิธีของข้อ 3.2.6
2. คำนวณหาค่า %RSD จากสูตรข้างต้น

### 3.2.8 ค่าวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery)

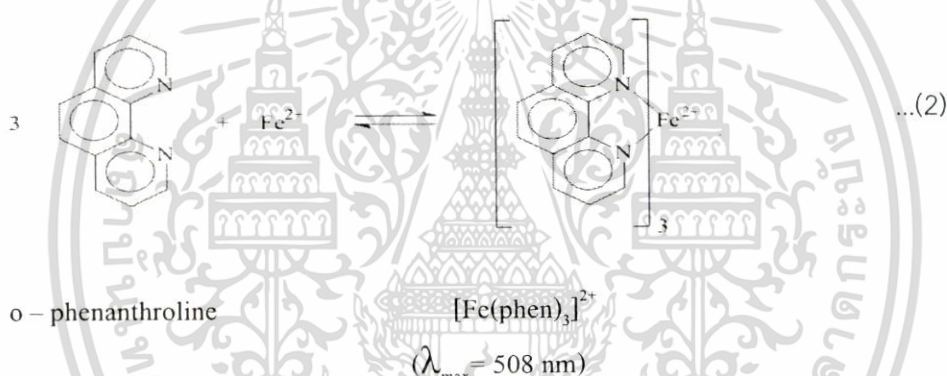
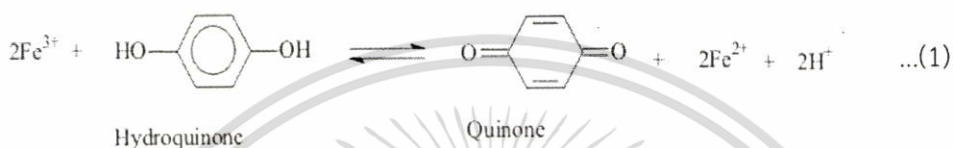
จากการทดลองนี้ได้เลือกใช้สูตรในการคำนวณหาค่า %Recovery คือ

$$\%Recovery = \frac{[\text{Spiked Sample}] - [\text{Sample}]}{[\text{Standard}]} \times 100$$

1. ขวดที่ 1 ปิเปตไฮโดรควิโนน 1 mM และตัวอย่างมาอย่างละ 2500  $\mu\text{l}$  ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร สารละลายขวดนี้เรียกว่า สารตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน (Spiked Sample)
2. ปิเปตสารละลาย  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05 M และ สารละลาย o-phenanthroline 0.1 M มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย acetate buffer pH 3.6 จนถึงขีดบอกปริมาตร
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงและบันทึกผล
5. ขวดที่ 2 ปิเปตสารตัวอย่างมาอย่างละ 2500  $\mu\text{l}$  ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร สารละลายขวดนี้เรียกว่า สารตัวอย่าง (Sample)
6. นำสารละลายขวดที่ 2 มาทำตามขั้นตอนที่ 2-4
7. ขวดที่ 3 ปิเปตไฮโดรควิโนน 1 mM มาอย่างละ 2500  $\mu\text{l}$  ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร สารละลายขวดนี้เรียกว่า สารละลายมาตรฐาน (Standard)
8. นำสารละลายขวดที่ 2 มาทำตามขั้นตอนที่ 2-4
7. คำนวณหาค่า %Recovery จากสูตรข้างต้น

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

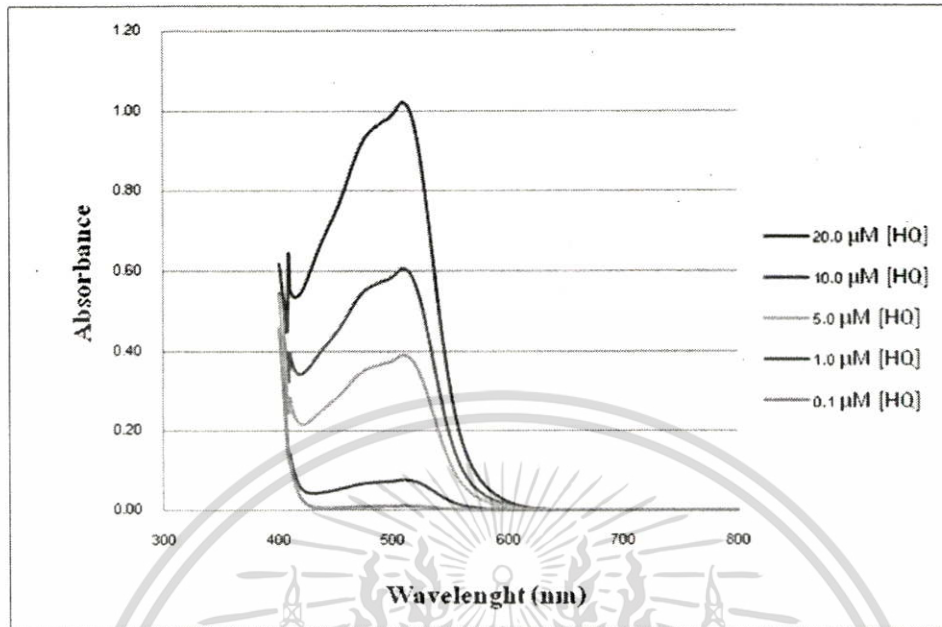
โครงการพิเศษนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอางด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยอาศัยปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



นั่นคือ  $\text{Fe}^{3+}$  จะถูกรีดิวซ์ด้วยไฮโดรควิโนนกลายเป็น  $\text{Fe}^{2+}$  จากนั้น  $\text{Fe}^{2+}$  ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ (1) ไปทำปฏิกิริยากับ o-phenanthroline เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดงดังปฏิกิริยาที่ (2) ดังนั้น  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  ที่ได้ นั้นจะแปรตามปริมาณของไฮโดรควิโนน

### 4.1 ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด

การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมทำได้โดยการเติมสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนที่ความเข้มข้นต่างๆลงในรีเอเจนต์ผสม  $\text{Fe}^{2+}$ -o-phenanthroline จากนั้นทำการสแกนสเปกตรัมตั้งแต่ 400-800 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1



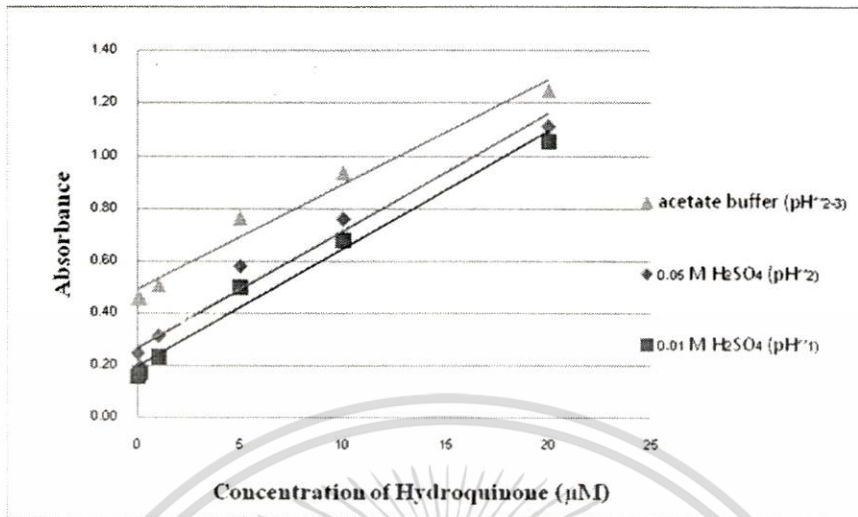
รูปที่ 4.1 สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ , สภาวะที่ทำการทดลองคือ  $0.05 \text{ M Fe}_2(\text{SO}_4)$  in  $0.05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ,  $0.1 \text{ M o-phenanthroline}$  in  $0.05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นของไฮโดรควิโนนได้แก่  $0.1, 1.0, 5.0, 10.0$  และ  $20.0 \mu\text{M}$

จากผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  ที่เกิดขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่  $508 \text{ นาโนเมตร}$  และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มแปรตามความเข้มข้นของไฮโดรควิโนน ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความยาวคลื่นที่  $508 \text{ นาโนเมตร}$  สำหรับการตรวจวัด

#### 4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

##### 4.2.1 ความเข้มข้นของกรดและ pH ที่เหมาะสม

ในการศึกษาหาความเข้มข้นของกรดและ pH ที่เหมาะสมจากการเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนของ  $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$  เนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง  $\text{Fe}^{2+}$  กับ o-phenanthroline เกิดได้ดีที่ pH ประมาณ 3-4 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่  $0.01 \text{ M}$  (pH~2) และ  $0.05 \text{ M}$  (pH~1) เทียบกับการใช้ acetate buffer (pH~3) เป็นตัวทำละลาย

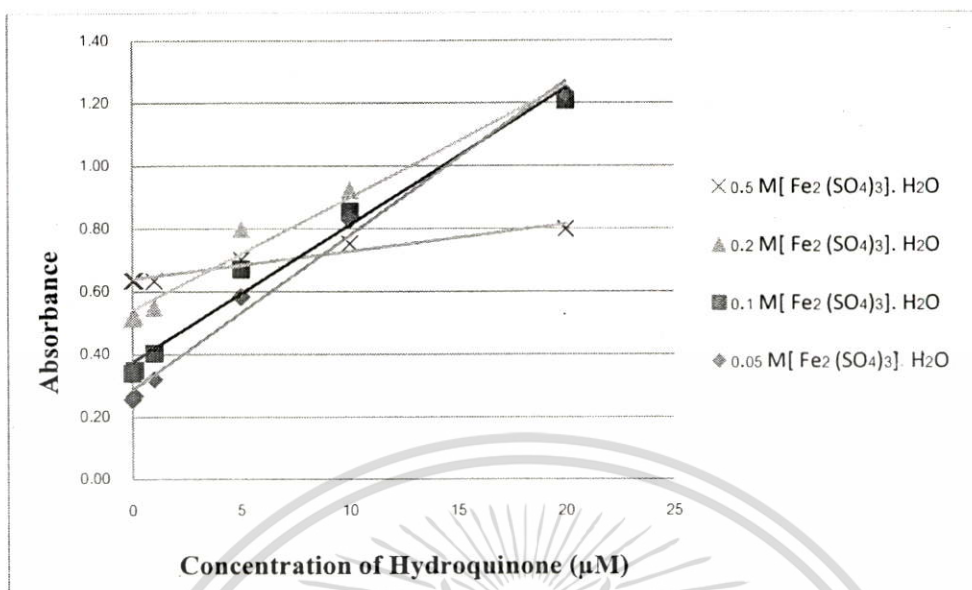


รูปที่ 4.2 ผลของ pH ต่อปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$

จากการทดลองใช้ความเข้มข้นกรดซัลฟูริกแตกต่างกันได้แก่ 0.01 M, 0.05 M และ 0.1 M เป็นตัวทำละลาย พบว่า o-phenanthroline ไม่ละลายในกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.01 M ในขณะที่กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.05 M และ 0.1 M สามารถทำละลาย o-phenanthroline ได้ดี จึงได้ใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.05 M, 0.1 M เป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลาย o-phenanthroline ที่ได้ไปทำการทดลองและได้ค่าการดูดกลืนแสงดังรูปที่ 4.2 อย่างไรก็ตามค่า pH ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 1-2 ซึ่งยังไม่ใช่สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาที่ดีที่สุดในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}$  จึงได้นำอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6 ความเข้มข้น 0.2 M มาเป็นตัวปรับปริมาตรเพื่อช่วยในการควบคุมค่า pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ทำให้ได้ค่า pH ประมาณ 2-3 และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ดีกว่าการใช้กรดซัลฟูริกทั้ง 2 ความเข้มข้นดังแสดงในรูปที่ 4.2 ดังนั้นสภาวะที่เลือกใช้ในการทดลองคือ กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 M เป็นตัวทำละลาย o-phenanthroline และอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6 เป็นตัวปรับปริมาตร

#### 4.2.2 ความเข้มข้นของ $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$

การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  เนื่องจาก  $\text{Fe}^{3+}$  ที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยากับไฮโดรควิโนนในสารละลายจะต้องมีปริมาณที่มากเกินไป เพื่อได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดงที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แปรผันตรงตามปริมาณของไฮโดรควิโนนดังปฏิกิริยาที่ 1

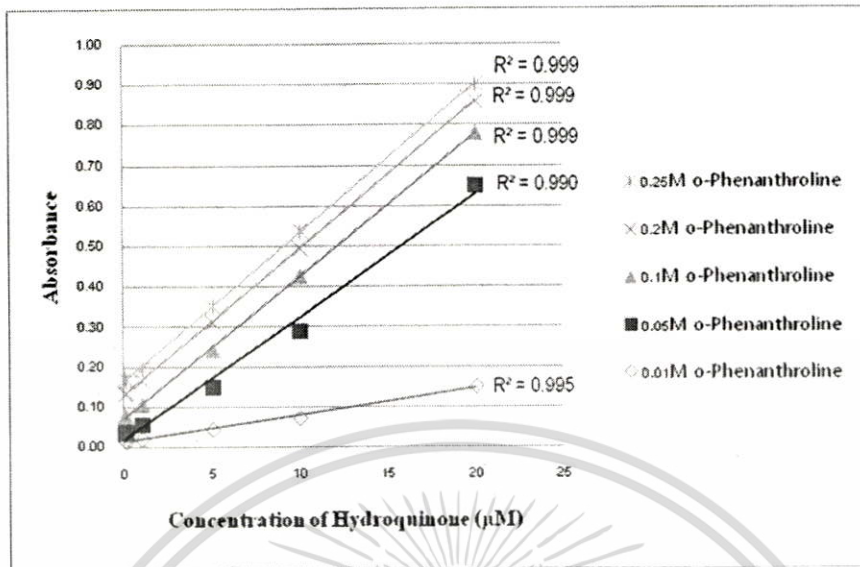


รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นต่างๆของ  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  ต่อปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้นของ 0.05 M มีค่าความไว (Sensitivity) ในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้น 0.1 M, 0.2 M และ 0.5 M มีความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{3+}$  ที่สูงขึ้นจึงทำให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่แย่งและทำให้ค่าดูดกลืนแสงของแบลนด์สูงขึ้นไป ดังนั้นความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการทดลอง คือ  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้นของ 0.05 M

#### 4.2.3 ความเข้มข้นของ o-phenanthroline

ในการศึกษาหาความเข้มข้นของ o-phenanthroline เพื่อทำให้  $\text{Fe}^{2+}$  ที่เกิดขึ้นจับกับ o-phenanthroline โดยจะต้องมีปริมาณที่มากเกินไปทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เปรียบเทียบ o-phenanthroline ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังรูป 4.4



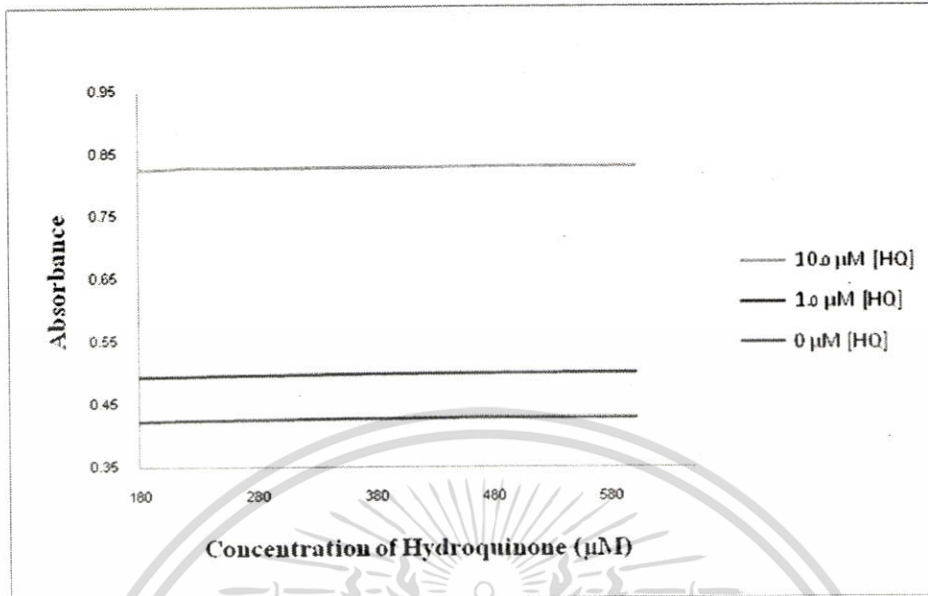
รูปที่ 4.4 ผลความเข้มข้นของ o-phenanthroline ต่อปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$

จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ o-phenanthroline เพิ่มขึ้นทำให้ความไวในการวิเคราะห์ดีขึ้น ( $R^2 = 0.999$ ) โดยที่ความเข้มข้น 0.25 M, 0.1 M และ 0.2 M มีค่าความชันที่ใกล้เคียงกันมาก แต่เนื่องจาก o-phenanthroline มีราคาแพง จึงได้เลือกใช้ความเข้มข้น 0.1 M อย่างไรก็ตามยังคงให้ค่าการวิเคราะห์ที่ดีและความเป็นเส้นตรงที่ดี ดังนั้นความเข้มข้นของ o-phenanthroline ที่เลือกใช้คือ 0.1 M

#### 4.2.4 ระยะเวลาในการทำการเกิดปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรควิโนน,  $\text{Fe}^{3+}$  และ o-phenanthroline นั้น จะต้องทราบเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารเพื่อให้ปฏิกิริยานั้นเกิดสมดุล ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาดังรูป 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลของระยะเวลาต่อการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

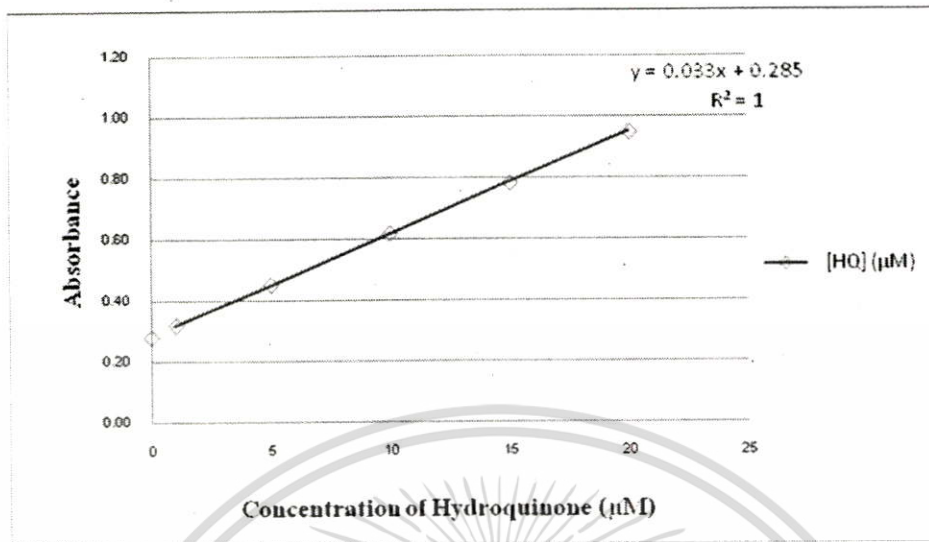
จากผลการทดลองแสดงในรูป 4.5 ได้ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในช่วงตั้งแต่ 3-10 นาที จากรูปพบว่าหลังจากนาทีที่ 3 เป็นต้นไป ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่ ซึ่งแสดงถึงปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลเรียบร้อยแล้ว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการตรวจวัด ณ ที่เวลา 3 นาทีและเนื่องจากถ้าระยะเวลาน้อยกว่า 3 นาที จะส่งผลต่อความไม่สะดวกในขั้นตอนการเตรียมสารอีกด้วย

#### 4.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ได้กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงที่ดี ( $R^2 = 1$ ) ในช่วงความเข้มข้น 1-20 µM ดังรูป 4.6 และมีสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear Regression) เท่ากับ

$$\text{Absorbance} = (0.033 \pm 8.68 \times 10^{-5})[\text{hydroquinone}(\mu\text{M})] + (0.285 \pm 9.7 \times 10^{-4})$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

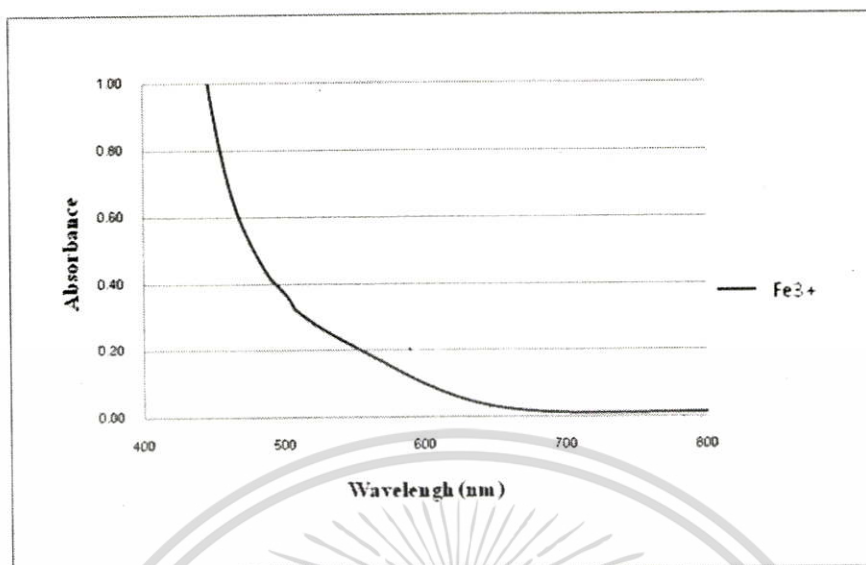


รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นต่างๆของไฮโดรควิโนนต่อการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

เมื่อคำนวณหาค่าขีดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) ของการวิเคราะห์พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.7 µM, ค่าขีดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ) ของการวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 1.4 µM, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าเท่ากับ 1.15 %

#### 4.4 การศึกษาการรบกวนของ $Fe^{3+}$

จากปฏิกิริยาดังสมการ (1) และ (2) ในการทดลองจำเป็นจะต้องมีปริมาณ  $Fe^{3+}$  ที่มากพอเพื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรควิโนนจนหมด จึงทำให้มีปริมาณของ  $Fe^{3+}$  ที่ทำปฏิกิริยากับไฮโดรควิโนนไม่หมด ทำให้เกิดการรบกวนในการวิเคราะห์ ดังนั้นการศึกษการรบกวนของ  $Fe^{3+}$  ที่มีผลต่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัด แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อน  $\text{Fe}^{3+}$  ความเข้มข้น 0.05 M

ผลจากการวิจัยนี้ดังรูปที่ 4.7 ทำให้ทราบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง โดยการสแกนสเปกตรัมทั้ง  $\text{Fe}^{3+}$  (0.05 M  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) ณ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร ดังนั้นการศึกษารับกวนของ  $\text{Fe}^{3+}$  จึงสรุปได้ว่า  $\text{Fe}^{3+}$  มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการศึกษาความเข้มข้นของ  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$  โดยที่ความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{3+}$  ที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ ก็จะมีผลให้เกิดการรบกวนดังแสดงในรูปที่ 4.3

#### 4.5 การวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดลองโดยการสุ่มตัวอย่าง 5 ชนิด โดยที่ตัวอย่าง A และ B เป็นเครื่องสำอางที่หาซื้อจากห้างสรรพสินค้า และตัวอย่างที่เหลือสามารถหาซื้อได้จากตลาดนัดทั่วไป ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ HQ ( $\mu\text{M}$ )		ร้อยละคืนกลับ (% recovery)
	ปริมาณที่เติม (added)	ปริมาณที่พบ (found)	
A	-	1.23	-
	10.0	11.12	98.94
B	-	n.d.	-
	10.0	10.56	105.63
C	-	n.d.	-
	10.0	9.81	98.13
D	-	0.93	-
	10.0	11.19	102.62
E	-	n.d.	-
	10.0	10.39	103.94

n.d. = not detectable

ผลการศึกษาตัวอย่างที่ A, B, C, D และ E พบว่าตัวอย่างที่ B, C และ E ตรวจไม่พบไฮโดรควิโนน แต่ในตัวอย่างที่ A และ D ค่าความเข้มข้นที่วัดได้เท่ากับ  $1.23 \mu\text{M}$  และ  $0.93 \mu\text{M}$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่า LOD แต่ต่ำกว่าค่า LOQ ใดๆแล้วแต่ จำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นเพื่อยืนยันการวิเคราะห์ความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

โครงการนี้เป็นการศึกษาหาปฏิกิริยาและหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี จากปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรควิโนนและ  $Fe^{3+}$  จากนั้นนำซึ่ง  $Fe^{2+}$  เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาข้างต้นมาทำปฏิกิริยากับ o-phenanthroline เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดงที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) ที่ 508 นาโนเมตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะติดตามสารประกอบเชิงซ้อนของ  $[Fe(phen)_3]^{2+}$  ซึ่งจะแปรผันตามปริมาณของไฮโดรควิโนน จากนั้นนำไปทำการตรวจวัดโดยใช้เทคนิค UV-vis spectrophotometry เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในวิเคราะห์ที่สุดจึงต้องมีการควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆให้เหมาะสม ซึ่งผลการศึกษาได้สรุปสภาวะการทดลองที่เหมาะสมไว้ในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงค่าที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

พารามิเตอร์	ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์
ค่า pH ของการเกิดปฏิกิริยา	พีเอช 3.6 (acetate buffer)
o-phenanthroline	0.1 M
$[Fe_2(SO_4)_3] \cdot H_2O$	0.05 M
ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา	3 นาที

จากการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฮโดรควิโนนที่ 508 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของไฮโดรควิโนน โดยพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของไฮโดรควิโนนกับความเข้มข้นของไฮโดรควิโนน ได้สมการเส้นตรง คือ

$$\text{Absorbance} = (0.033 \pm 8.68 \times 10^{-5})[\text{hydroquinone } (\mu\text{M})] + (0.285 \pm 9.7 \times 10^{-4})$$

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้คุณลักษณะเด่นของวิธีการตรวจวัดไฮโดรควิโนนดังนี้ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ  $0.72 \mu\text{M}$  ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เท่ากับ  $5.54 \mu\text{M}$  สำหรับความเที่ยงของวิธีประเมินจากค่า RSD ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.44% และเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ A, B, C, D และ E พบว่าตัวอย่างที่ B, C และ E ตรวจไม่พบไฮโดรควิโนน แต่ในตัวอย่างที่ A และ D ค่าความเข้มข้นที่วัดได้เท่ากับ  $1.23 \mu\text{M}$  และ  $0.93 \mu\text{M}$  ตามลำดับซึ่งมีค่าที่สูงกว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) แต่ต่ำกว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) อย่างไรก็ตามแล้วแต่จำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นเพื่อตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 6

### สรุปผลผลิตงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ ได้ถูกนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015) ที่จัดขึ้นระหว่างวันที่ 21-23 มกราคม พ.ศ. 2558 ณ โรงแรมอมารี วอเตอร์เกต กรุงเทพมหานคร โดยได้นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในหัวข้อเรื่อง 'Development of flow injection system for the spectrophotometric determination of hydroquinone in cosmetics' บทความย่อผลงานและโปสเตอร์แสดงในภาคผนวกท้ายเล่ม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- [1] เอกรัตน์ จันทราทิตย์, อันตรายของครีมหน้าขาวที่ผสมไฮโดรควิโนน: บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน, ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- [2] Topping D.C., Bernard L.G., O'Donoghue J.L., English J.C. Hydroquinone: acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, **45** (2007), 70-78.
- [3] Barber E.D., Hill T., Schum D.B. The percutaneous absorption of hydroquinone (HQ) through rat and human skin in vitro. *Toxicology Letters*, **80** (1995), 167-172.
- [4] กระทรวงสาธารณสุข, กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง (ฉบับที่ 2), 2552.
- [5] กระทรวงสาธารณสุข, กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง, 2551.
- [6] กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค, อย. เตือน อย่าซื้อ อย่าใช้ เครื่องสำอางอันตราย 34 รายการ เสี่ยง! หน้าพัง, ขาวเพื่อสื่อมวลชน กลุ่มประชาสัมพันธ์, สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.
- [7] Palumbo A., d'Ischia M., Misuraca G., Prota G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochimica Biophysica Acta*, **1073** (1991), 85-90.
- [8] Gao W., Legido-Quigley C. Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. *Journal of Chromatography A*, **1218** (2011), 4307-4311.
- [9] Thogchai W., Liawruangrath B. Micellar liquid chromatographic determination of arbutin and hydroquinone in medicinal plant extracts and commercial cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, **35** (2013), 257-263.
- [10] Xu G., Li B., Luo X. Carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for the electrocatalytic oxidation and detection of hydroquinone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **176** (2013), 69-74.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [11] Unnikrishnan B., Ru P-L., Chen S-M. Electrochemically synthesized Pt-MnO<sub>2</sub> composite particles for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **169** (2012), 235-242.
- [12] Uddin S., Rauf A., Kazi T.G., Afridi H.I., Lutfullah G. Highly sensitive spectrophotometric method for determination of hydroquinone in skin lightening creams: application in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, **33** (2011) 132-137.
- [13] Sirajuddin, Bhangar M.I., Niaz A., Shah A., Rauf A. Ultra-trace level determination of hydroquinone in waste photographic solutions by UV-vis spectrophotometry. *Talanta*, **72** (2007), 546-553.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก



The poster features a central graphic of a molecular structure composed of interconnected hexagons, some containing chemical symbols and diagrams. The background includes a faint watermark of a traditional Thai temple and a bridge silhouette at the bottom.

**PACCON 2015**  
 Pure and Applied Chemistry  
 International Conference 2015

*"Innovative Chemistry for Sustainability  
 of the AEC and Beyond"*

21<sup>st</sup> - 23<sup>rd</sup> January 2015  
 Amari Watergate Hotel  
 Bangkok, Thailand

Organized by The Chemical Society of Thailand  
 under the Patronage of Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mahidol

Coorganized by Department of Chemistry, Faculty of Science  
 King Mongkut's University of Technology Thonburi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ANC  
PO  
040

### A Simple Colorimetric Paper-based Sensor for the Determination of Mercury

Nattapong Thuwakhom\*, Prachak Inkaew  
School of Science, Mae Fah Luang University, Muang, Chiang Rai, 57100, Thailand  
\*E-mail: nattapong.thu10@lamduan.mfu.ac.th

- A simple colorimetric paper-based sensor for mercury determination using  $\text{Na}_2\text{S}$  as the reagent was described.
- The intensities of the color formed were determined by Photoshop software and used to determine mercury in the samples.
- The sensor gives good response for mercury concentrations between 40 and 400 ppm ( $R^2 = 0.9872$ ,  $S/N = 4$ ,  $n = 5$ ).
- This sensor was used to determine the amount of mercury in cosmetic samples.

**Keywords** Paper-based sensor; Colorimetric method; Mercury determination

ANC  
PO  
041

### Development of Flow Injection System for the Spectrophotometric Determination of Hydroquinone in Cosmetics

Thitaporn Sonsa-ard and Saowapak Teerasong\*  
Applied Analytical Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand  
\*E-mail: saowapak\_teerasong@hotmail.com

- A flow injection for spectrophotometric determination of hydroquinone (HQ) was developed.
- HQ can reduce  $\text{Fe(III)}$  to  $\text{Fe(II)}$  by HQ. The resulting  $\text{Fe(II)}$  reacts with 1,10-phenanthroline to form colored complex.
- The developed method is highly sensitive, simple and fast on-line analysis of HQ.

**Keywords** Hydroquinone; Flow injection system; Spectrophotometric detection; Skin lightening cosmetics

PO  
ANC

ANC  
PO  
042

### Paper-Based Device for Pesticide Analysis

Souksanh Nouanthavong<sup>1</sup> and Yupaporn Sameenoi<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>Department of Chemistry, Burapha University, Thailand  
\*E-mail: yupaporn@buu.ac.th

- We reported a paper-based device for rapid detection of organophosphorus pesticides using an enzyme inhibition assay and ceria nanoparticles ( $\text{CeO}_2$ , NPs) as colorimetric probes.
- The developed method could easily detect an organophosphorus pesticide, methyl-paraoxon, as low as 26.9 ng/mL.

**Keywords** Ceria nanoparticle; Paper-based device; Enzyme inhibition assay

# Development of Flow Injection System for The Spectrophotometric Determination of Hydroquinone in Cosmetics

Thitaporn Somsa-ard and Saowapak Teerasong\*

Applied Analytical Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science,  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand  
\*E-mail: saowapak\_teerasong@hotmail.com

PACCON  
PURE AND APPLIED CHEMISTRY  
INTERNATIONAL CONFERENCE 2015

## Abstract

Hydroquinone (HQ) is a depigmenting agent, which can inhibit the melanin formation. HQ can easily cause skin irritation and may increase a risk in skin cancer with prolonged usage. Many countries including Thailand, have banned the use of HQ in cosmetics. However, illegal adulteration of HQ in cosmetic has recently been found. In this work, flow injection (FI) with spectrophotometric detection for determination of HQ is presented. The detection is based on the reduction reaction of Fe(III) to Fe(II) by HQ. In the presence of 1,10-phenanthroline (phen), Fe(II) can react with phen, giving a colored complex of  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ . The formation of resulting complex is proportional to HQ concentration, which can be spectrophotometrically monitored at 508 nm. Under optimum condition, the linear calibration was obtained from 5.0 to 250.0  $\mu\text{M}$  of HQ. The detection limit and quantitation limit were 1.5 and 3.25  $\mu\text{M}$ , respectively. The developed system provided good precision ( $\text{RSD} < 1.7\%$ ) with sample throughput 12 samples  $\text{h}^{-1}$ . The developed FI method will be applied to determination of HQ in skin lightening cosmetic samples.



Skin Irritation

## Risks of HQ



Rebound



Telangiectatic Melasma



Chronic

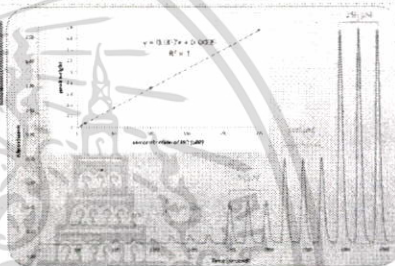
HQ has been shown to be mutagenic in rats and may increase a risk in skin cancer to human.

Many countries including Thailand, have banned the use of HQ in cosmetics due to risks of HQ. However, illegal adulteration of HQ in cosmetic has recently been found. Therefore, the determination of HQ in cosmetics is very important for human health protection and consumer safeguarding.



Leukoderma

## Signal profile and Calibration



## Optimization of FI system

Chemical parameters	Studied range	Selected value
pH of acetate buffer	3.6 – 5.4	3.6
Concentration of $\text{H}_2\text{SO}_4$	0.01 – 0.1 ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0.05 ( $\text{mol L}^{-1}$ )
Concentration of Fe(III)	0.001 – 0.1 ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0.005 ( $\text{mol L}^{-1}$ )
Concentration of Phen	0.01 – 0.1 ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0.05 ( $\text{mol L}^{-1}$ )

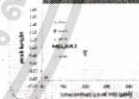
### Sample loop



### Flow rate



### Mixing length



## Objectives of this research

- To develop Flow Injection System with Spectrophotometric Detection for Determination of Hydroquinone
- To apply the proposed method to determination of HQ in cosmetic samples

## Principle of HQ detection

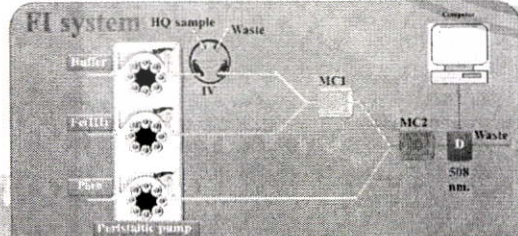
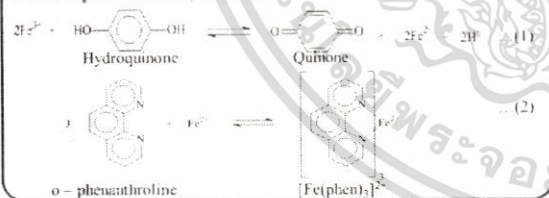


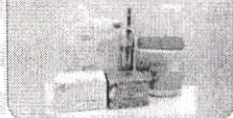
Fig. 1 Schematic diagram of FI system. IV : 6 ports injection valve. MC1 and MC 2 : Mixing coil 1 and 2 (100 cm). Sample loop: 300  $\mu\text{L}$ . Flow rate: 1  $\text{mL min}^{-1}$ . D : UV detector

## Features

Linearity range ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	5 – 250
Calibration equation	$y = 0.007x - 0.0000$
Linear regression coefficients ( $r^2$ )	1
RSD (%)	< 1.70
LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1.5
LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	3.25
sample throughput (samples $\text{h}^{-1}$ )	12

## Applications

The developed FI method will be applied to determination of HQ in these skin lightening cosmetic samples.



## Conclusion

- The developed method is 'highly sensitive', 'simple' and 'fast' on-line analysis of HQ.
- High analytical performances (such as precision and accuracy) will be also achieved for determination of HQ in cosmetic samples

## Acknowledgements

Applied Analytical Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang is grateful acknowledged for equipments and financial support.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

### ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล: ผศ. ดร. เสาวภาคย์ ธีราทรง

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph. D.	Science and Technology Education	มหาวิทยาลัยมหิดล	2553
วท. บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2545

### สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ:

Flow-based techniques, Nanoparticle sensor, Food and drug analysis

### ทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2556	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	ทุนพัฒนานักวิจัยใหม่ กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

- [1] Teerasong S, Sani M, Numsawat P, Martchoo R, Chompoosor A, Nacapricha D. A silver nanoparticle thin film modified glass substrate as a colourimetric sensor for hydrogen peroxide. *Journal of Experimental Nanoscience* 2015; 10: 1327-1335.
- [2] Teerasong S, Wattanasin P, Wilairat P, Nacapricha D. A simple method based on one phase measurement for determination of the octanol-water partition coefficient of drugs. *Chiang Mai Journal of Science* 2015; 42: 691-698.
- [3] Wattanasin P, Saetear P, Wilairat P, Nacapricha D, Teerasong S. Zone fluidics for measurement of octanol-water partition coefficient of drugs. *Analytica Chimica Acta* 2015; 860: 1-7.
- [4] Teerasong S, Sonsa-ard T, Vimolkajana C, Choengchan N, Chompoosor A, and Nacapricha D. Colorimetric Sensor Using Silver Nanoparticles for Determination of Hydrogen Peroxide Based on a Flow Injection System. *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics* 2013; 8: 446-449.
- [5] Mantim T, Saetear P, Teerasong S, Chan-Eam S, Sereenonchai K, Amornthammarong N, Ratanawimarnwong N, Wilairat P, Meesiri W, Uraisin K, and Nacapricha D. Reagent-free analytical flow methods for the soft drink industry: Efforts for environmentally friendly chemical analysis. *Pure and Applied Chemistry* 2012; 84: 2015-2025.
- [6] Chan-Eam S, Teerasong S, Damwan K, Nacapricha D, and Chaisuksant R. Sequential injection analysis with electrochemical detection as a tool for economic and rapid evaluation of total antioxidant capacity. *Talanta* 2011; 84: 1350-1354.