

การพัฒนาาระบบฟลูอิดินเจคชั่นร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี
เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION SYSTEM WITH
SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION FOR DETERMINATION OF
HYDROQUINONE IN COSMETICS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-SC-M-012-008

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาระบบโพลินเจคชันร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี
เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION SYSTEM WITH
SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION FOR DETERMINATION OF
HYDROQUINONE IN COSMETICS



ฐิตาพร สอนสะอาด
THITAPORN SONSA-ARD

b. 00267036
i.

สาขา.....
เลขทะเบียน 144004
รับเดือนปี 10 ต.ค. 2559

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ KMITL-2016-SC-M-012-008 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION SYSTEM WITH
SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION FOR DETERMINATION OF
HYDROQUINONE IN COSMETICS



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับค่า KMITL-2016-SC-M-012-008 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2016

FACULTY OF SCIENCE

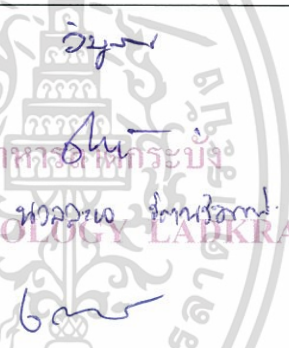
KING MONGKUT' S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ “การพัฒนาระบบโพลอินเจคชันร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง”
(DEVELOPMENT OF FLOW INJECTION SYSTEM WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION FOR DETERMINATION OF HYDROQUINONE IN COSMETICS)

ชื่อนักศึกษา นางสาวฐิตาพร สอนสะอาด
รหัสประจำตัว 56605039
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาขาวิชาเคมี)
ภาควิชา เคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ประธานกรรมการ ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ผศ.ดร.นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ผศ.ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 5 เมษายน พ.ศ.2559 เวลา 14.30-16.30 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 308 อาคารพระจอมเกล้า

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี ธัมะบริพัทธ์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่ 23 เดือน 4 พ.ศ. 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบโพลีอินเจกชันร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง
นักศึกษา	ฐิตาพร สอนสะอาด
รหัสนักศึกษา	56605039
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. เสาวภาคย์ ธีราทรง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาระบบโพลีอินเจกชันร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน การตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาการรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II) โดยไฮโดรควิโนน จากนั้น Fe(II) ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออร์โธเฟิแนนทรอลีนเกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีแดงของ $[Fe(phen)_3]^{2+}$ ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นแสง 508 นาโนเมตร ดังนั้นการเกิดสารเชิงซ้อนนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไฮโดรควิโนน ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม ระบบที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดไฮโดรควิโนนในช่วงความเข้มข้น 5 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร (สมการเส้นตรง: ความสูงของพีค = 0.0045 ± 0.00001 [ไฮโดรควิโนน] - (0.0022 ± 0.0013) , $R^2 = 1$) ระบบที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง (ร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่า 1.15) และมีความแม่นยำสูง (ร้อยละค่าการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 99.9 ถึง 111.8) วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง 6 ตัวอย่าง และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางสถิติ t -test พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลลัพธ์วิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($t_{stat} = 0.01$, $t_{crit} = 1.81$)

คำสำคัญ : ไฮโดรควิโนน, ระบบโพลีอินเจกชัน, สเปกโทรโฟโตเมทรี, เครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง

Thesis title	Development of Flow Injection System with spectrophotometric Detection for Determination of Hydroquinone in Cosmetics
Student	Thitaporn Sonsa-ard
Student ID	56605039
Degree	Master of science
Program	Chemistry
Year	2016
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Saowapak Teerasong

Abstract

In this work, flow injection analysis (FIA) with spectrophotometric detection for determination of hydroquinone (HQ) is presented. The detection is based on the reduction of Fe(III) to Fe(II) by HQ. In the presence of *o*-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. Chemical and physical parameters which influence to the detection were investigated. Under optimum condition, the linear range for determination of HQ was obtained from 5 to 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (regression equation: peak height = $0.0045 \pm 0.00001[\text{HQ}] - (0.0022 \pm 0.0013)$, $R^2 = 1$). This method provided high precision (%RSD < 1.15) and high accuracy (recovery = 99.9 – 111.8%). The developed FIA method was applied to determination of HQ in six skin whitening samples. The obtained results were validated against HPLC method. Results obtained by the developed FIA method and those obtained by HPLC method were not significant difference at 95% confidence level ($t_{\text{stat}} = 0.01$, $t_{\text{crit}} = 1.81$).

Keywords Hydroquinone; Flow injection analysis; Spectrophotometric detection; Cosmetic

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในทุกๆ ขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์นี้อย่างใกล้ชิด ซึ่งผู้เขียนต้องขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์ เวียงคำ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ รวมถึงชี้แนะแนวทางในการจัดรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและเรียบร้อย

ขอขอบพระคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์จากภายนอก คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นवलละออ รัตนวิมานวงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับเครื่องมือวิเคราะห์

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนและให้กำลังใจผู้เขียน ด้วยดีเสมอมา

นางสาวฐิตาพร สอนสะอาด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในงานวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.5 ขั้นตอนของการศึกษา.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 เมลานิน (Melanin).....	5
2.1.1 กระบวนการสร้างเมลานิน (melanogenesis).....	5
2.1.2 หน้าที่ของเมลานิน.....	6
2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเมลานิน.....	7
2.2 สารไวท์เทนนิ่ง (Whitening agent)	7
2.2.1 สารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในขั้นก่อนการสร้างเม็ดสีเมลานิน.....	7
2.2.2 สารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในขั้นระหว่างการสร้างเม็ดสีเมลานิน.....	8
2.2.3 สารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในขั้นหลังจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน.....	10
2.3 ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone)	11

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4 Flow Injection Analysis (FIA)	15
2.4.1 หลักการของระบบ FIA.....	15
2.4.2 เครื่องมือพื้นฐานของระบบ FIA.....	15
2.5 วิธีดั้งเดิมที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน.....	19
2.5.1 เทคนิค Gas Chromatography (GC).....	19
2.5.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	19
2.5.3 เทคนิค Capillary electrophoresis (CE).....	21
2.5.4 เทคนิค Luminescence.....	21
2.5.5 เทคนิค Electrochemical technique.....	22
2.5.6 เทคนิค Spectrophotometry.....	26
2.5.7 เทคนิค Flow Injection analysis (FIA).....	27
2.6 งานวิจัยนี้.....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	31
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	31
3.2 การเตรียมสารละลาย.....	32
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	34
3.3.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการทำ ปฏิกิริยารีดักของเหล็ก ด้วยการวิเคราะห์แบบ batch.....	34
3.3.2 ระบบโพลอินเจกชัน.....	35
3.3.3 ลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการทำ ปฏิกิริยารีดักของเหล็ก ด้วยระบบโพลอินเจกชัน.....	35
3.3.4 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์.....	36
3.3.5 การสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม.....	37
3.3.6 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์.....	38
3.3.7 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ ไฮโดรควิโนนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	40
4.1 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการ ทำปฏิกิริยารีดักชันของเหล็ก ด้วยการวิเคราะห์แบบ batch.....	40
4.2 ผลการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์.....	41
4.2.1 พีเอชของอะซิเตตบัฟเฟอร์.....	42
4.2.2 ความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก (III).....	43
4.2.3 ความเข้มข้นของสารละลายอโรพีแนโนโทรลีน.....	44
4.2.4 ผลการศึกษาอิทธิพลปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบ.....	44
4.2.5 ผลการศึกษาอิทธิพลอัตราการไหล (Flow Rate).....	45
4.2.6 ผลการศึกษาอิทธิพลความยาวมิกซิงคอยด์ตัวที่ 1.....	46
4.2.7 ผลการศึกษาอิทธิพลความยาวมิกซิงคอยด์ตัวที่ 2 และ 3.....	47
4.3 กราฟมาตรฐานที่ได้จากสภาวะการทดลองที่เหมาะสม.....	48
4.4 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์.....	49
4.4.1 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์.....	49
4.4.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์.....	49
4.4.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิง ปริมาณ.....	50
4.5 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	51
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	53
5.1 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	53
เอกสารอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	60
ประวัติผู้เขียน.....	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1	สรุปผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยระบบการไหลที่พัฒนาขึ้น.....	47
ตารางที่ 4.2	ผลการคำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง.....	49
ตารางที่ 4.3	แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เมื่อวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 250 ไมโครโมลต่อลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยระบบ FIA ที่พัฒนาขึ้น.....	50
ตารางที่ 4.4	สรุปคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยระบบการไหล FIA ที่พัฒนาขึ้น.....	51
ตารางที่ 4.5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งโดยวิธี FIA ที่พัฒนาขึ้นและวิธี HPLC.....	52

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1	ปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดไฮโดรควิโนนในงานวิจัยนี้.....	2
รูปที่ 2.1	กระบวนการสร้างเมลานินภายใน Epidermal melanosomes.....	6
รูปที่ 2.2	โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรควิโนน.....	11
รูปที่ 2.3	กลไกการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยไฮโดรควิโนน.....	12
รูปที่ 2.4	แสดงลักษณะผิวหน้าผู้ป่วยที่รักษาฝ้าด้วยยาที่มีไฮโดรควิโนน.....	13
รูปที่ 2.5	แสดงลักษณะของฝ้าถาวรสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเป็นตุ่มนูน (caviar – like) ที่เกิดจากการใช้ไฮโดรควิโนนเป็นระยะเวลานาน.....	14
รูปที่ 2.6	แสดงลักษณะสีผิวของผู้ป่วยโรคต่างขาที่เกิดจากการใช้ไฮโดรควิโนน.....	14
รูปที่ 2.7	แสดงส่วนประกอบของระบบ FIA.....	15
รูปที่ 2.8	แสดงการทำงานของ Peristaltic pump.....	16
รูปที่ 2.9	แสดงการทำงานของ six-port injection valve.....	16
รูปที่ 2.10	แสดงรูปแบบต่างๆ ของ reactors.....	17
รูปที่ 2.11	แสดงการใช้ mini – column ในการ preconcentration ในระบบ FIA.....	17
รูปที่ 2.12	แสดงการใช้ phase separator ในการสกัดในระบบ FIA.....	18
รูปที่ 3.1	ระบบโฟลอินเจกชันที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน.....	35
รูปที่ 3.2	ระบบโฟลอินเจกชันเบื้องต้นที่ใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน.....	36
รูปที่ 4.1	แสดง (ก) สเปกตรัมของสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ และ (ข) กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนนในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 20.0 ไมโครโมลต่อลิตร.....	41
รูปที่ 4.2	แสดง (ก) กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนนช่วงความเข้มข้น 10 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร (ข) สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์ (3 ซ้ำ) เมื่อใช้บัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ เป็นสารละลายตัวพา.....	42
รูปที่ 4.3	แสดงกราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครโมลต่อลิตร กับสารละลายเหล็ก (III) ความเข้มข้นต่างๆ.....	43
รูปที่ 4.4	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนน ช่วงความเข้มข้น 10 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อใช้สารละลายออร์โทฟีแนนโทลีนความเข้มข้นต่างๆ.....	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.5 แสดง (ก) กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนน ช่วงความเข้มข้น 5 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร (ข) สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบที่ปริมาตรต่างๆ.....	45
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงพีคของไฮโดรควิโนน 100 ไมโครโมลต่อลิตร และอัตราการวิเคราะห์ เมื่อผลึกสารด้วยอัตราการไหลต่างๆ.....	46
รูปที่ 4.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนน ช่วงความเข้มข้น 10 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อใช้ MC1 ที่ความยาว 0 และ 50 เซนติเมตร.....	46
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงพีคของไฮโดรควิโนน 100 ไมโครโมลต่อลิตร และอัตราการวิเคราะห์ เมื่อใช้ MC2 และ MC3 ที่ความยาวต่างๆ.....	47
รูปที่ 4.9 แสดงตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครโมลต่อลิตร.....	48
รูปที่ 4.10 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนนช่วงความเข้มข้น 5 – 500 ไมโครโมลต่อลิตร.....	48

สัญลักษณ์และคำย่อ

FIA	flow injection analysis
HQ	hydroquinone
phen	o – phenanthroline



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง (whitening) ได้รับความนิยมอย่างมาก ทำให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์เหล่านี้ออกมาวางจำหน่ายในท้องตลาดเป็นจำนวนมาก ซึ่งแต่ละผลิตภัณฑ์ก็มีส่วนประกอบของสารไวท์เทนนิ่ง (whitening agent) แตกต่างกันไป เช่น วิตามินซี วิตามินอี และ กรดเอเอชเอ เป็นต้น ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) เป็นสารไวท์เทนนิ่งชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง ที่เรียกว่า เมลานิน (melanin) จึงมีผลทำให้ผิวขาวขึ้นได้และได้ผลเร็ว

อย่างไรก็ตามไฮโดรควิโนนมีผลข้างเคียงทำให้เกิดการระคายเคืองผิว ผิวมีความไวต่อแสงมากขึ้น เกิดจุดด่างขาวที่หน้า หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายในผิวหนังทำให้เกิดเป็นฝ้าถาวร และอาจเป็นสารก่อมะเร็งในผิวหนังได้ [1,2] เนื่องจากมีการศึกษาและทดลองในหนูทดลองพบว่า สารไฮโดรควิโนนมีความเป็นพิษ โดยมีค่า LD50 orally in rats มากกว่า 375 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และยังพบว่าไฮโดรควิโนนเป็นสารก่อกลายพันธุ์และมะเร็งในหนูทดลอง [3] ทำให้หลายประเทศไม่อนุญาตให้มีการใช้ไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

สำหรับประเทศไทย ไฮโดรควิโนนถูกกำหนดเป็นสารต้องห้ามในเครื่องสำอางตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง (ฉบับที่ 2) ประกาศ ณ วันที่ 30 ธันวาคม พ.ศ. 2554 โดยอนุญาตให้ใช้ไฮโดรควิโนนได้เฉพาะในผลิตภัณฑ์ชุดทาเล็บเทียม ในอัตราส่วนสูงสุดในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไม่เกิน 0.02% เท่านั้น [4,5]

อย่างไรก็ตามยังคงมีการตรวจพบการปนเปื้อนของไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง [6] เนื่องจากผู้ผลิตบางรายต้องการลดต้นทุนในการผลิต โดยการเติมวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น พรอท และไฮโดรควิโนน แทนการใส่สารไวท์เทนนิ่งประเภทวิตามินซี วิตามินอี และเอเอชเอ เนื่องจากสารดังกล่าวมีราคาแพงและเห็นผลช้ากว่า ดังนั้นจึงมีงานวิจัยต่างๆ ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน เช่น การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีและเคมีไฟฟ้า ซึ่งมีข้อดีคือให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ที่ดี อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก ต้องอาศัยความชำนาญในการใช้เครื่องมือ เครื่องมือวิเคราะห์ราคาแพงและมีขนาดใหญ่ ทำให้ยากต่อการเคลื่อนย้ายสำหรับการวิเคราะห์ภาคสนาม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาระบบโฟลอินเจกชัน (Flow Injection Analysis: FIA) ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยการตรวจวัดเอกสารอาศัยปฏิกิริยาการรีดิวซ์ $Fe(III)$ ให้เป็น $Fe(II)$ โดยไฮโดรควิโนน จากนั้น $Fe(II)$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสารละลายของสารประกอบเหล็กที่ละลายในกรดแอสคอร์บิก ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลอมแดง ซึ่งสามารถวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ได้

ปฏิกิริยากับออร์โธฟีแนนโทรีนเกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีแดงของ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 508 นาโนเมตร ดังนั้นการเกิดสารเชิงซ้อนนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไฮโดรควิโนน วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ง่าย ให้ค่าความแม่นยำและความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง มีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ และมีความน่าเชื่อถือในการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

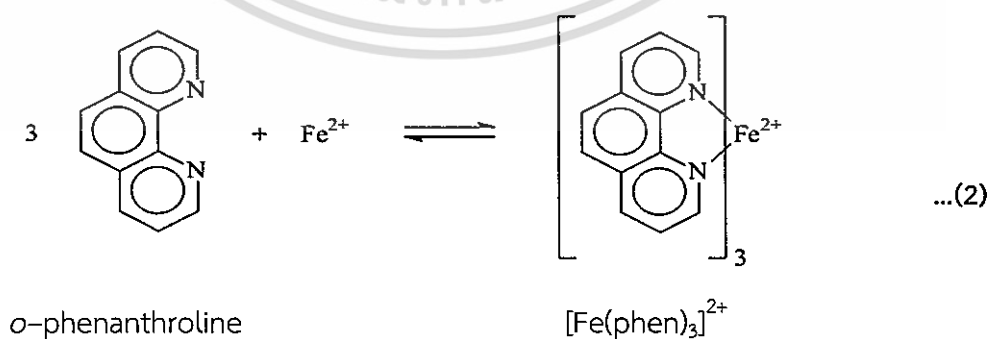
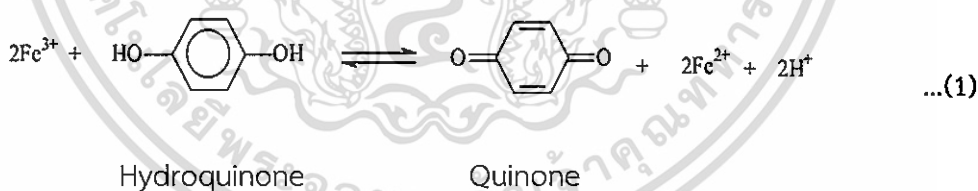
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

1.2.2 เพื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้หาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง

1.3 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในงานวิจัย

จากการศึกษาของงานวิจัยของ R. Belcher และ W. Stephen [7] พบว่า ไฮโดรควิโนนมีความสามารถในการรีดิวซ์ $\text{Fe}(\text{III})$ ให้เป็น $\text{Fe}(\text{II})$ ได้ แล้วเปลี่ยนเป็นควิโนน จากนั้น $\text{Fe}(\text{II})$ ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับออร์โธฟีแนนโทรีน (o-phenanthroline) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงของ $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นแสง 508 นาโนเมตร (รูปที่ 1.1) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำปฏิกิริยาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนน โดยอาศัยระบบโฟลอินเจกชันเพื่อให้การวิเคราะห์ทำได้อย่างรวดเร็วและมีความเป็นอัตโนมัติ ระบบที่พัฒนาขึ้นจะนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง



รูปที่ 1.1 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวัดไฮโดรควิโนนในงานวิจัยนี้ [7]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาปฏิกิริยาเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ซึ่งอาศัยระบบ FIA และตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.4.2 พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

1.4.3 ศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ซึ่งอาศัยระบบ FIA และการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.4.4 นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งในท้องตลาด

1.4.5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

1.5 ขั้นตอนของการศึกษา

1.5.1 ศึกษาข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยเน้นงานวิจัยที่มีการอาศัยระบบการไหลในการวิเคราะห์ และวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch analysis) ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.5.2 ศึกษาปฏิกิริยาเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

1.5.3 พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

1.5.4 ศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ซึ่งอาศัยระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี ทั้งทางเคมี ได้แก่ ลำดับการเกิดปฏิกิริยา ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นต้น และทางกายภาพ ได้แก่ อัตราการไหล และปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบการตรวจวัด เป็นต้น

1.5.5 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดไฮโดรควิโนน ขีดจำกัดต่ำสุดสำหรับการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของไฮโดรควิโนน ความถูกต้อง ความเที่ยง และความรวดเร็วในการวิเคราะห์

1.5.6 ศึกษากระบวนการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอาง

1.5.7 นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้หาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งในท้องตลาด

1.5.8 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC ในการตรวจวัดไฮโดรควิโนนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งในท้องตลาด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ระบบ FIA ที่อาศัยการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรีที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

1.6.2 สามารถนำระบบ FIA ที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

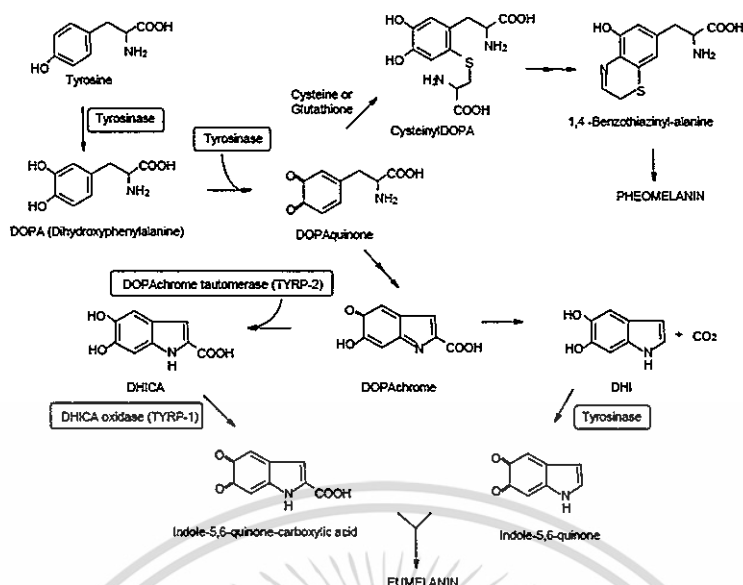
2.1 เมลานิน (melanin) [8 – 9]

เมลานิน คือ เม็ดสีที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ที่ชื่อว่า เมลาโนไซต์ (melanocytes) ซึ่งมีอยู่ในผิวหนังของมนุษย์และสัตว์ เม็ดสีเป็นสิ่งที่ปกป้องสีผิว สีขนและสีผม ซึ่งเฉดสีของเมลานินนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของแต่ละบุคคลด้วย ซึ่งในคนที่ผิวคล้ำหรือดำ จะมีเม็ดสี หรือเมลานินมากกว่าคนที่ผิวขาว เมลานินสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด

1. ยูเมลานิน (eumelanin) เม็ดสีเมลานินชนิดนี้เป็นเม็ดสีสีน้ำตาลถึงดำ คนเอเชียและคนที่มีผิวคล้ำจะมีเม็ดสีนี้มากกว่าคนที่เป็นชนชาติผิวขาว
2. พีโอเมลานิน (pheomelanin) เป็นเม็ดสีสีแดงหรือที่เรียกว่าออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) หรือสีเหลือง ที่เรียกว่าแคโรทีน (carotene) ในคนผิวขาวจะมีเม็ดสีนี้มากกว่าคนผิวคล้ำ
3. แบบผสม คือมีเม็ดสีเมลานินทั้งสองผสมกัน เรียกว่า mixed melanin

2.1.1 กระบวนการสร้างเมลานิน (melanogenesis)

กระบวนการสร้างเมลานิน หรือ melanogenesis เกิดขึ้นภายในเมลาโนโซมของชั้นผิวหนัง (Epidermal melanosomes) โดยเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกระบวนการสร้างเมลานิน เนื่องจากเป็นสารกำหนดอัตรา (rate limiting agent) การสร้างเมลานิน เอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของกรดอะมิโนแอลไทโรซีน (L-tyrosine) เกิดเป็น DOPA หลังจากนั้น DOPA จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็น DOPAquinone ในกรณีที่มีกรดอะมิโน cysteine หรือ glutathione ในกระบวนการ จะทำปฏิกิริยากับ DOPAquinone เกิดเป็นอนุพันธ์ benzothiazine ของเมลานินชนิดพีโอเมลานิน ในขณะที่ถ้า cysteine มีปริมาณน้อย DOPAquinone จะเกิดการปิดวงอะโรมาติกเกิดเป็น DOPACHROME แทน หลังจากนั้น DOPACHROME tautomerase (TYRP – 2) จะเร่งปฏิกิริยา tautomerization ของ DOPACHROME ทำให้เกิดเป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ซึ่งหลังจากนั้นสารนี้จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นหน่วยย่อยของ DHICA-melanin และ DHICA จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นเมลานินชนิดยูเมลานิน โดยการเร่งปฏิกิริยาของ DHICA oxidase (TYRP – 1) ในทางกลับกันหากไม่มี TYRP – 2 หมู่คาร์บอกซิลของ DOPACHROME จะสลายไป เกิดเป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) ซึ่งทั้ง DHICA และ DHI ล้วนเป็นส่วนประกอบหน่วยย่อยของยูเมลานิน กระบวนการดังที่กล่าวมาแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 กระบวนการสร้างเมลานินภายใน Epidermal melanosomes [8]

เมลานินไซต์เป็นเซลล์สร้างเม็ดสีของชั้นผิวหนังชั้น follicular และ interfollicular epidermis เมลานินไซต์ทำหน้าที่ผลิตไลโซโซมที่เกี่ยวกับออร์แกเนลล์ที่ชื่อว่า เมลานินโซม (melanosome) ภายในเมลานินโซม สารชีวพอลิเมอร์ของเม็ดสีเมลานินถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้สีกับผม และผิว รวมทั้งเนื้อเยื่อต่างๆด้วย การสังเคราะห์เมลานินเกี่ยวข้องกับสองกระบวนการในโปรตีนที่ถูกส่งออกจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และรวมกับไกลโคโปรตีนที่จำเพาะเจาะจงต่อเมลานินโซม ซึ่งเคลือบอยู่กับถุง (vesicles) ที่มาจาก Golgi-apparatus ซึ่ง vesicles นี้จะทำหน้าที่ขนส่งโปรตีนดังกล่าวไปยังเมลานินโซม และทำการสังเคราะห์เปลี่ยนโปรตีนไปเป็นเมลานิน เมลานินไซต์จะอยู่ใต้ชั้นเยื่อผิวหนัง ซึ่งแต่ละอันจะเชื่อมกับเคราติโนไซต์ (keratinocytes) ทั้งหมด 36 เซลล์ เพื่อส่งผ่านเมลานินโซมและปกป้องผิวจากมะเร็งที่เกิดขึ้นจากแสงแดด นอกจากนี้ ปริมาณและชนิดของเมลานินที่ถูกสร้างและส่งผ่านไปยังเคราติโนไซต์จะเกิดการรวมตัวกัน แสดงเป็นสีผิวหนังนั่นเอง

2.1.2 หน้าที่ของเมลานิน

1. ทำหน้าที่เหมือนแผ่นกรองแสง ช่วยป้องกันเซลล์ของร่างกายจากอันตรายของรังสีที่มองไม่เห็น ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet: UV) และรังสีอินฟราเรด (Infrared) โดยเมลานินที่ถูกสร้างขึ้นจะทำหน้าที่กรองรังสีที่จะมาทำอันตรายเซลล์ผิวหนัง
2. ช่วยกระจายแสง เช่น แสงที่มีความยาวคลื่นสั้นอย่างแสงสีม่วงฟ้าที่เมื่อกระทบผิวหนังจะถูกหักเหออกไป
3. ดูดซับรังสี UV และแสงที่เห็นด้วยตาเปล่า แล้วกระจายออกเป็นความร้อน
4. ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเมลานิน

1. แสงแดด หรือรังสี UV เมลานินจะถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับแสง UV นั่นคือ เมื่อผิวหนังสัมผัสกับแสงแดดมากเท่าไรเมลานินก็จะถูกสร้างขึ้นมากเท่านั้น เพื่อที่จะป้องกันไม่ให้แสง UV ทำลายเซลล์ผิวหนัง และ DNA ในส่วนที่ปกคลุมร่างกายอยู่ โดยรังสี UV ชนิด A เป็นรังสีที่มีช่วงความยาวคลื่นยาว พลังงานต่ำ จะกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังเมลาโนไซต์ สร้างเม็ดสีเมลานินได้โดยตรง กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ทำงานได้มากขึ้น และทำให้เซลล์ผิวหนังชั้นบนคือ เคราติโนไซต์ รับสารเมลานินได้มากขึ้นส่งผลให้สีผิวเข้มขึ้น จึงทำให้เกิดผิวคล้ำ เกิดฝ้า หรือกระ และรังสี UV ชนิด B ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่นสั้น พลังงานสูง จะทำให้การทำงานของเซลล์เมลาโนไซต์ และเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ประสานกันได้ดีขึ้นในการรับส่งเม็ดสีเมลานินทำให้ผิวคล้ำได้เช่นกัน
2. พันธุกรรม เชื้อชาติและวัฒนธรรมที่ต่างกันทำให้เจดสีและปริมาณของเมลานินที่สร้างขึ้นต่างกันด้วย อันเนื่องมาจากมรดกทางพันธุกรรม
3. ขนาดของเมลาโนไซต์ ซึ่งแต่ละบุคคลมีขนาดของเมลาโนไซต์ที่แตกต่างกัน จึงทำให้ปริมาณของเมลานินที่ถูกสร้างขึ้นต่อเซลล์มีความแตกต่างกัน
4. โรคบางชนิด มีโรคหลายโรคที่อาจส่งผลต่อการสร้างเมลานิน เช่น โรคผื่นอก (ยีนไม่สามารถสร้างเมลานินได้) และโรคต่างขา (การสูญเสียความสามารถในการสร้างเมลาโนไซต์)

2.2 สารไวท์เทนนิ่ง (Whitening Agent) [10 – 14]

สารไวท์เทนนิ่งคือ สารที่ทำให้ผิวขาว โดยกระบวนการทำงานหลักของสารไวท์เทนนิ่งคือ การลดการผลิตเม็ดสีใต้ชั้นผิว ซึ่งอาจจะปรากฏอยู่ในหลายรูปแบบ เช่น เป็นยารักษา เป็นเครื่องสำอางควบคุม และเครื่องสำอางที่สามารถหาซื้อได้ทั่วไป ปัจจุบันสารไวท์เทนนิ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นมีหลายรูปแบบ ซึ่งสามารถจำแนกตามลำดับขั้นการออกฤทธิ์เพื่อลดปริมาณเมลานินได้ดังนี้

2.2.1 สารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในขั้นก่อนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

คือการป้องกันกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ สารป้องกันแสงแดดหรือครีมกันแดด จากที่ได้อีกมาข้างต้น แสง UV เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเร่งกระบวนการผลิตเม็ดสีเมลานิน ดังนั้น การป้องกันแสงแดดเข้าสู่เซลล์เมลาโนไซต์ ก็สามารถทำให้ผิวขาวขึ้นได้ ซึ่งสารป้องกันแสงแดด แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้

2.2.1.1 Chemical Sunscreen เป็นครีมกันแดดที่มีส่วนผสมของสารเคมีที่ทำหน้าที่ปกป้องแสงแดด โดยการดูดซับพลังงานของแสงแดดไว้ก่อนที่แสงแดดจะผ่านลงไปที่ผิวหนัง ซึ่งสารเคมีเหล่านี้สามารถดูดซับแสงแดดไว้ได้ช่วงหนึ่งเท่านั้น ทำให้จำเป็นต้องทาครีมกันแดดบ่อยๆ หรือใช้ครีมกันแดดที่มี SPF สูงๆ ซึ่งมีส่วนผสมของสารเคมีปริมาณมาก อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ สารในกลุ่มนี้มีอยู่หลายชนิด สามารถจำแนกตามสารออกฤทธิ์ได้ดังนี้

- สารออกฤทธิ์กลุ่มสารเคมีที่ป้องกัน UVA ได้แก่ Oxybenzone, Sulisobenzon, Dioxybenzone, Avobenzone และ Mexoryl sx

- สารออกฤทธิ์กลุ่มสารเคมีที่ป้องกัน UVB ได้แก่ Aminobenzoic acid (PABA), Homosalate, Cinoxate, Octyl methoxycinnamate, Octyl salicylate, Padimate O, Phenyl benzimidazole sulfonic acid, Trolamine salicylate และ Methyl anthralinate

2.2.1.2 Physical Sunscreen เป็นครีมกันแดดที่มีส่วนผสมของสารเคมีที่สามารถสะท้อนรังสี UVA และ UVB ออกไปจากผิวหนังได้ เช่น Titanium Dioxide(TiO₂), Zinc Oxide (ZnO) เป็นต้น สารในกลุ่มนี้สามารถป้องกันได้ทั้ง UVA, UVB, Visible Light และ Infrared Light ซึ่งสารในกลุ่มนี้จะมีผลระคายเคืองต่อผิวหนังน้อยกว่าสารในกลุ่มแรก แต่มีข้อด้อยคือ ครีมกันแดดประเภทนี้ไม่สามารถให้ SPF ที่สูงๆ ได้ และเมื่อทาบนผิวหนังแล้ว หน้าจะดูขาวมาก เนื่องจากสารจะเคลือบบนผิวหนังชั้นบนเพื่อรอแสงกระทบ จึงมีการดูดซึมสู่น้อย

2.2.1.3 แบบผสม Chemical-Physical Sunscreen เป็นการเสริมข้อดี ลดข้อด้อยในแต่ละส่วน นั่นคือ ลดการระคายเคืองต่อผิวหนังจากสารประเภทสารเคมี และลดความขาวเมื่อทาครีม และเสริมประสิทธิภาพในการป้องกันแสงแดดร่วมกัน

2.2.2 สารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในชั้นระหว่างการสร้างเม็ดสีเมลานิน

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะพบว่า เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกระบวนการสร้างเมลานิน ดังนั้นถ้าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ก็จะสามารถลดหรือขัดขวางการสร้างเมลานินให้น้อยลงได้เช่นกัน ดังนั้นสารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในชั้นนี้จึงมีเป้าหมายสำคัญคือการลดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสามารถจำแนกตามกลไกการทำงานได้ดังนี้

2.2.2.1 กลุ่มที่ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสหรือเมลานิน กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน แบ่งย่อยๆ ได้เป็น

- Hydroquinone (HQ) เป็นสารเคมีที่ช่วยยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ สารประกอบ HQ มีฤทธิ์รุนแรงในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระที่จะไปกระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ไปเร่งการผลิตเม็ดสีเมลานิน ปกติแล้วจะใช้ในความเข้มข้น 2% ในเครื่องสำอางทั่วไป หรือถ้าเข้มข้นกว่านั้นก็จะต้องใช้ภายใต้คำสั่งของแพทย์ อย่างไรก็ตาม HQ มีผลข้างเคียงทำให้เกิดการระคายเคืองผิว ผิวมีความไวต่อแสงมากขึ้น เกิดจุดด่างขาวที่หน้า หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายในผิวหนังทำให้เกิดเป็นฝ้าถาวร และอาจเป็นสารก่อมะเร็งในผิวหนังได้ ทำให้หลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย ไม่อนุญาตให้มีการใช้ HQ ในเครื่องสำอาง

- Vitamin C วิตามินซีมีหลายรูปแบบมาก ไม่ว่าจะเป็น Magnesium ascorbyl phosphate, L-ascorbic acid, ascorbyl glucosamine หรือ ascorbic acid เป็นสารที่เสถียรและมีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระสำหรับผิว แต่มีงานวิจัยจำนวนน้อยมากที่แสดงถึงผลดีของมันต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่จะไปกระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะช่วยชะลอการสร้างเม็ดสีเมลานิน

- Kojic acid กรดโคจิกเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเห็ดสาเกของญี่ปุ่น ออกฤทธิ์โดยเป็น Chelating Agent เข้าจับกับ Copper ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระบวนการสร้างเม็ดสี เมื่อโคเอนไซม์ลดน้อยลงเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงทำงานได้ยากขึ้น แต่กรดโคจิกไม่เสถียรเมื่อนำไปเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดยเมื่อกระทบกับแสงแดดมันจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเสื่อมประสิทธิภาพลง ดังนั้นผู้ผลิตเครื่องสำอางจึงได้เปลี่ยนมาใช้โคจิกไดพาลมิเตท (Kojic dipalmitate) ซึ่งเสถียรกว่าแทน อย่างไรก็ตามมีการวิจัยที่ทำการทดลองกับสัตว์ทดลองโดยการให้กรดโคจิกจำนวน

มากเป็นเวลา 26 สัปดาห์ พบว่ามีความผิดปกติกับตับ (เนื้องอก) สำหรับในมนุษย์ การใช้ในปริมาณสูงเกินไปจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้

- **Arbutin** อาบูตินเป็นสารสกัดจากพืชที่เป็นแหล่งธรรมชาติของ HQ อีกที่หนึ่งที่เรียกว่า hydroquinone-beta-D-glucoside โดยจะแบ่งเป็น alpha-arbutin, beta-arbutin และ deoxy-arbutin อาบูตินมีความปลอดภัยมากกว่า HQ และรูปที่เป็นอัลฟาอาบูติน จะเสถียรกว่าเบต้าอาบูติน และเป็นที่ยอมรับกว่าในการนำมาทำตัวยาทำให้ผิวใสกระจ่างขึ้น ในคลินิกผิวหนังมักนำมาใช้รักษาฝ้าแทนยา HQ แม้ให้ผลการรักษาช้ากว่าแต่ก็มีผลข้างเคียงน้อย

- **Licorice** เป็นผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเบ้งสาลี ชะเอม ปัจจุบันนิยมนำมาผสมในเครื่องสำอาง เช่น แป้งรองพื้น ครีมบำรุงผิวหน้า ผิวกาย ลิปสติก ผลิตภัณฑ์ล้างหน้า มีความคงตัวมากกว่าสารตัวอื่นๆ ในกลุ่มนี้

- **สารสกัดทางธรรมชาติ** เช่น Green Tea Extract, Compositae (สารสกัดจาก matricaria) สารสกัดจากปอสา (paper mulberry) สารสกัดจากแอปเปิ้ล (Apple phenon extracts), Ellagic acid, polyglutanmate, tanaka extracts สารสกัดจากเปลือกมะหาด (Mahad) สารสกัดจากบอระเพ็ด สารสกัดจากสาเก สารสกัดจากเปลือกสนมารีไทม์ (Pynocare) และสารสกัดจากสมุนไพรรักษาฝ้าอื่นๆ

- **ยารับประทานรักษาฝ้า** ได้แก่ Tranxemic acid ซึ่งเป็นยากลุ่มต้านการสลายตัวของลิเมิลีต ใช้รักษาและป้องกันภาวะเลือดออกระหว่างผ่าตัดและหลังผ่าตัด ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ของ tranexamic acid ในการรักษาฝ้า โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยาสามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้สร้างเม็ดสีเมลานิน จึงทำให้ฝ้าจางลงได้

2.2.2.2 กลุ่มยับยั้งการพัฒนา (Maturation) ของเอนไซม์ไทโรซิเนส

- **Glutathione** กลูตาไธโอนเป็นสารไตรเปปไทด์ (Tripeptides) ของกรดอะมิโน 3 ตัว คือ ซิสเทอีน (cysteine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) และไกลซีน (glycine) ตัวมันจะทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยน DOPAquinone ไปเป็นฟีโอเมลานินซึ่งมีสีเหลือง-แดง แทนที่จะเหลืองปล่อยให้ผ่านกระบวนการอื่นจนกลายเป็นเป็นยูเมลานิน ซึ่งมีสีน้ำตาล-ดำ ดังนั้นจึงสามารถช่วยให้ผิวไม่คล้ำได้

2.2.2.3 กลุ่มที่ออกฤทธิ์เพิ่มการสลายตัวของเอนไซม์ไทโรซิเนส

- **Alpha linoleic acid** เป็นสาร Antioxidant ที่ช่วยลดการอักเสบ เสริมสร้างความแข็งแรงของ Skin Barrier และยังมีคุณสมบัติในการเร่งการเสื่อมสลายของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงส่งผลให้การผลิตเม็ดสีโดยรวมลดลง

2.2.2.4. กลุ่มยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส

- **Hydroquinone** นอกจากจะป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระที่จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้ว ยังกระตุ้นการสร้าง ROS ขึ้นมาเพื่อทำลายเยื่อหุ้มและโปรตีนของเอนไซม์ไทโรซิเนส และลดการสร้าง DNA และ RNA ของเซลล์เมลานোসิตได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **Lactic acid** มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากนี้ยังมี Peeling Effect กระตุ้นการผลัดเซลล์ผิว ทำให้เมลานินไซโตมีโอกาที่จะส่งผ่านเมลานินโซมาไปยังผิวชั้นบนได้น้อยลง จุดต่างคำจึงค่อยๆจางลง

- **รกแกะ (Placenta Extracts)** ออกฤทธิ์ที่ช่วงต้นของกระบวนการสร้างเมลานิน คือ จะเข้ายับยั้งการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้กระบวนการเปลี่ยนสารต้นแบบไทโรซินไปเป็น DOPA ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ และยังมีส่วนช่วยกระตุ้นกลไกการผลัดเซลล์ผิวและการสร้างเซลล์ผิวใหม่

- **Azelaic acid** เป็นสารที่สกัดจากธัญพืช เช่นข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ เป็นต้น ในเครื่องสำอางมีการใส่กรดนี้ที่มีความเข้มข้นประมาณ 20% โดยทั่วไปจะใช้ในการรักษาสิว แต่งานวิจัยพบว่าสามารถมีผลต่อการรักษาผิวที่มีสีผิดปกติได้ด้วย และการศึกษาอื่นๆ แสดงอีกว่ากรดอาซเลอิกสามารถขัดขวางการสร้างเม็ดสีเมลานินได้เพราะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่โดยปกติแล้วจะพบว่ากรดนี้มีประสิทธิภาพดีในการลดการผลิตเม็ดสีที่มากเกินไปในเซลล์ผิวหนังเมลานินไซโต แต่จะไม่ค่อยมีผลในการลดการผลิตเม็ดสีบนผิวหนังที่ปกติ เช่น กระที่ เกิดไปตามอายุที่มากขึ้น ในอเมริกามีการใช้กรดอาซเลอิกความเข้มข้น 20% ในการรักษาสิวและพบว่าความเข้มข้นขนาด 20% นี้ก็จะให้ผลดีพอๆ กันหรือดีกว่า HQ ที่ความเข้มข้น 2% ซึ่งจากเหตุผลเรื่องความปลอดภัยของ HQ จึงทำให้กรดอาซเลอิกมีความน่าสนใจกว่าในการนำมาใช้

2.2.2.5 กลุ่มที่ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเอนไซม์ D.tautomeras และ D.polymerase

- **Kogic acid** นอกจากที่กรดโคจิกจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้วยังรบกวนการทำงานของเอนไซม์ D.tautomeras และ D.polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ Polymerization ของ DHI และ DHICA ในกระบวนการต่างๆของการสร้างเม็ดสี

- **Albutin** ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการส่งผ่านเม็ดสีที่สมบูรณ์จากกระบวนการสร้างเม็ดสีไม่ให้ถูกส่งผ่านขึ้นไปยังชั้นผิว Epidermis

- **Alpha-tocopheryl ferulate (วิตามิน E)** ทำหน้าที่เหมือนฟองน้ำที่ดูดซับสารอนุมูลอิสระที่จะไปกระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงทำให้การสร้างเมลานินลดลง

2.2.3 สารไวท์เทนนิ่งที่ออกฤทธิ์ในชั้นหลังจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน

- **AHA (Alpha Hydroxy Acid)** กรดเอเอชเอเป็นกรดที่ได้จากธรรมชาติ เรียกว่ากรดผลไม้ ซึ่งมีมากมายหลายชนิด ออกฤทธิ์โดยการลอกเอาเซลล์ผิวที่อยู่ด้านบนสุดซึ่งตายแล้วออก โดยที่เซลล์ผิวด้านบนสุดนี้เป็นบริเวณที่มีการกระจุกตัวของเม็ดสีเมลานินมากที่สุด

- **Niacinamide หรือ Nicotinamide** เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มวิตามินบีซึ่งละลายน้ำได้ และมีความปลอดภัยสูง มีการนำมาใช้ในการทำให้ผิวบริเวณที่จุดซ่อนเร้นขาวขึ้น เนื่องจากทำให้เกิดการระคายเคืองน้อย สามารถลดการเกิดสิวได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวและลดรอยเหี่ยวย่นได้

- **สารฟอกสี (Depigmenting agents)** สำหรับผู้ที่มีอาการทางผิวหนังผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (vitiligo) คือเม็ดสีบางบริเวณของผิวจะมีสีขาว แต่บริเวณใกล้เคียงกลับเป็นสีดำนอกจากนี้ ผู้ที่มีความผิดปกติแบบนี้อาจจะต้องการทำให้ผิวมีสีสม่ำเสมอมากขึ้นโดยการที่ใช้สารประกอบอินทรีย์บางตัว ไม่ว่าจะเป็นวิตามินซี ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้แดดเผา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างเช่น โมโนเบนโซน (Monobenzene) เพื่อลดสีผิวที่เข้มส่วนที่เหลือลง อย่างไรก็ตาม โมโนเบนโซนทำให้เกิดการทำลายเซลล์ผิวหนังเมลานินไซต์ และทำลายเม็ดสีอย่างถาวร อีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยลดเม็ดสีลงได้คือ เมควินอล (Mequinol) แต่ใช้เวลานานกว่า อย่างไรก็ตามสารเคมีพวกนี้ไม่เหมาะที่จะทำให้สีผิวขาวขึ้น ยกเว้นแต่ผู้ที่มีความผิดปกติด้านผิวมาแต่กำเนิด เนื่องจากมีการระคายเคืองสูง

- สารปรอท (Mercury) เป็นสารชนิดแรกที้นำมาใช้ในเครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาว โดยปรอทที่เติมลงไปเครื่องสำอาง จะอยู่ในรูปปรอทคลอไรด์ หรือปรอทแอมโมเนีย ออกฤทธิ์รบกวนเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยรวมตัวกับโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ หรือจับกับไอออนของทองแดงที่มีอยู่ในเอนไซม์ ทำให้สามารถลดการสร้างเมลานินได้ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของปรอทติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้มีการสะสมปรอทในผิวหนัง และดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต ทำให้ตับ และไตพิการ เป็นโรคโลหิตจาง เป็นต้น ปัจจุบันปรอทจึงถูกกำหนดเป็นสารห้ามใช้ในเครื่องสำอาง

2.3 ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) [15 – 20]

Hydroquinone (HQ) มีชื่อทางเคมีว่า benzene-1,4-diol หรือ 1,4-dihydroxybenzene เป็นสารประกอบอินทรีย์อะโรมาติกประเภทฟีนอล หรือเรียกว่า สารประกอบไฮดรอกซีฟีนอลิก (hydroxyphenolic compound) มีสูตรเคมีว่า $C_6H_4(OH)_2$ ลักษณะโครงสร้างทางเคมี จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) สองหมู่เชื่อมต่อกับวงเบนซีน ลักษณะการเชื่อมต่อเป็นแบบ para ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.2 สถานะของ HQ ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศเป็นของแข็งสีขาวเนื้อละเอียด สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็นพาราเบนโซควิโนน (*p*-benzoquinone) หรือที่เรียกว่า *p*-quinone ได้



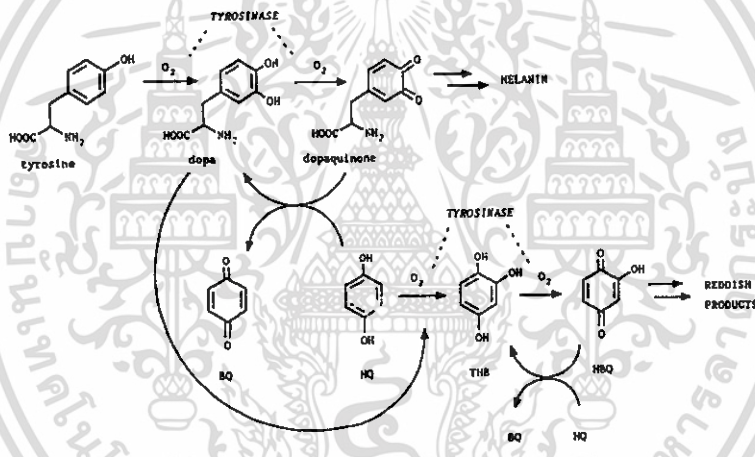
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรควิโนน

(<http://silhouette.ca/blog/hydroquinone-and-rebound-hyperpigmentation/>)

HQ ถูกนำมาใช้เป็นสารช่วยลดปริมาณของเม็ดสีในชั้นผิวหนัง หรือใช้เป็นสารไวท์เทนนิ่ง เนื่องจากมีความสามารถในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากเป็นสารกำหนดอัตราการสร้างเม็ดสีเมลานิน

จากที่กล่าวมาในข้างต้น (หัวข้อ 2.1.1) ในกระบวนการการสร้างเม็ดสีเมลานิน เอนไซม์ไทโรซิเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของกรดอะมิโนแอลไทโรซีน เกิดเป็น DOPA หลังจากนั้น DOPA เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็น DOPAquinone และสุดท้ายจะกลายเป็นเม็ดสีเมลานินที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงสีผิวของเรา แต่เมื่อมี HQ ในกระบวนการ HQ จะทำให้เกิดปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยาที่ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นไทโรซินไปเป็นเมลานินได้ ปฏิกิริยาแรกคือ HQ เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับ DOPAquinone ทำให้ DOPAquinone เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเป็น DOPA ดั้งเดิม ส่วน HQ เปลี่ยนเป็น benzoquinone (BQ) ซึ่งมีความเสถียรมากกว่า ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถเปลี่ยน DOPAquinone เป็นเมลานินได้ ส่งผลทำให้ผิวมีสีที่อ่อนลง และปฏิกิริยาที่สองเป็นปฏิกิริยาสำคัญที่ทำให้เกิดผลข้างเคียงเมื่อใช้ HQ ในระยะยาว นั่นคือเมื่อมี HQ ในกระบวนการ DOPA จะกลายเป็นสารเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของ HQ เกิดเป็น 1,2,4-trihydroxy benzene (THB) โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นโคแฟกเตอร์ร่วมในปฏิกิริยา หลังจากนั้นเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเร่งปฏิกิริยา dehydrogenation ของ THB เกิดเป็น hydroxybenzoquinone (HBQ) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับ HQ เปลี่ยน HQ เป็น BQ และ HBQ เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเป็น THB นอกจากนี้ HBQ ยังสามารถเกิดปฏิกิริยา dimerisation กับสารฟีนอลิก และควิโนนอยด์อื่นๆ เกิดเป็นเม็ดสีสีแดงน้ำตาล (reddish - brown pigment) ซึ่งนั่นกลายเป็นผลข้างเคียงของการใช้ HQ ติดต่อกันเป็นเวลานาน ปฏิกิริยาดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กลไกการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยไฮโดรควิโนน [15]

นอกจากนี้ HQ ยังกระตุ้นการสร้าง ROS ขึ้นมาเพื่อทำลายเยื่อหุ้มและโปรตีนของเอนไซม์ไทโรซิเนส ลดการสร้าง DNA และ RNA ของเซลล์เมลานโนไซต์ ทำให้ HQ เป็นสารไวท์เทนนิ่งที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม HQ ให้ผลข้างเคียงที่อันตรายมากเช่นกัน ซึ่งการใช้ HQ มีผลเสียทั้งแบบฉับพลัน และเรื้อรัง ดังนี้

1. ทำให้เกิดการระคายเคือง แพ้ และเป็นสิว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับกรดวิตามินเอ ที่เป็นสูตรที่นิยมในตำรับยารักษาฝ้า การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ HQ จะต้องมีการเช็กระยะของตัวยาที่แน่นอนระบุนอยู่ และอยู่ภายใต้การควบคุมของแพทย์

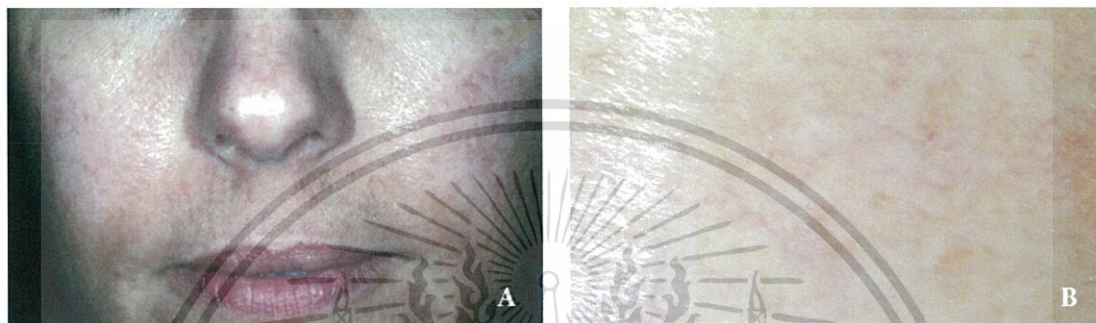
2. เกิดภาวะ Rebound ซึ่งเกิดจากการหยุดใช้ยาที่มี HQ ทันที เนื่องจากผิวหนังเร่งผลิตเซลล์เม็ดสีมาทดแทนจึงทำให้ผิวคล้ำลงกว่าเดิม และเมื่อเอนไซม์ไทโรซิเนสถูกยับยั้งโดย HQ จะทำให้สารตั้งต้นไทโรซินคั่งอยู่ในเมลานโนไซต์ซึ่งอยู่ใต้ชั้นเยื่อผิวหนัง เมื่อหยุดใช้ HQ กะทันหัน จะทำให้ไม่มีตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ประกอบกับไทโรซินที่คั่งอยู่ จะทำให้ไทโรซินถูกเปลี่ยนเป็นเมลานินอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปบนเว็บไซต์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็วและมากมาย ทำให้ผิวกลับมาดำและคล้ำกว่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 2.4A นอกจากนี้ HQ ยังมีข้อเสียคือ ไม่คงสภาพ ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายเมื่อถูกแสงแดดและอากาศ โดยเปลี่ยนจากสีขาเป็นสีน้ำตาล

3. เกิดฝ้าเส้นเลือด (Telangiectatic Melasma) หรืออาจเรียกว่าหลอดเลือดโป่งพอง หรือหยุดนิ่ง เป็นสภาวะที่เส้นเลือดฝอยขยายตัวแบบถาวร ทำให้เกิดเป็นแผลแดงใต้ผิวหนัง ลักษณะของ Telangiectasias ที่สามารถสังเกตได้บนผิวหนังคือ เป็นเส้นเลือดที่ไม่มีชีพจร มีสีแดงโป่ง หรือมีลักษณะเป็นตาข่ายเส้นเลือด แสดงดังรูปที่ 2.4B



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะผิวหนังผู้ป่วยที่รักษาฝ้าด้วยยาที่มีไฮโดรควิโนน (A) มีเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น และ (B) มีฝ้าเส้นเลือดบนผิวแก้ม [17]

4. หากใช้เครื่องสำอางหรือยาที่มี HQ อย่างต่อเนื่องและใช้เป็นระยะเวลาเวลานานจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายในผิวหนัง เกิดเป็นโรคผิวหนัง ได้แก่

- chronosis หรือ defiguring effect คือ ฝ้าถาวรสีน้ำเงินอมดำ ลักษณะเป็นตุ่มนูนอยู่บริเวณโหนกแก้ม และสันจมูก ซึ่งเป็นบริเวณที่ทา HQ บ่อยๆ ซึ่ง HQ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ homogentisic oxidase ซึ่งทำหน้าที่ออกซิไดซ์ homogentisic acid ในการเมตาบอลิซึม (metabolite) ของไทโรซีน ทำให้เกิดการสะสม homogentisic acid ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเกิดพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerizes) เป็นเม็ดสีส้มแดงในผิวชั้น dermis และในบางรายเกิดการสะสมจนกลายเป็นตุ่มนูนสีน้ำตาลเข้ม คล้ายกับไข่ปลาการ์เวียร์ (caviar – like) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

- Leukoderma หรือโรคต่างขาว เป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะของการสูญเสียความสามารถในการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากเมลานินไซโตตาย หรือไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น HQ กระตุ้นการสร้าง ROS ขึ้นมาเพื่อทำลายเยื่อหุ้มและโปรตีนของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้ไทโรซินค้างอยู่ในเมลานินไซโต นอกจากนี้ HQ ยังลดการสร้าง DNA และ RNA ของเซลล์เมลานินไซโต ทำให้เมลานินไซโตถูกทำลายอย่างถาวร ดังนั้นการใช้ HQ อย่างต่อเนื่องและใช้เป็นระยะเวลาเวลานานจึงทำให้เกิดโรคต่างขาวได้ ลักษณะสีผิวของผู้ป่วยโรคต่างขาวที่เกิดจากการใช้ HQ แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของผื่นผิวหนังน้ำตาขี้ผึ้ง มีลักษณะเป็นตุ่มนูน (caviar – like) ที่เกิดจากการใช้ไฮโดรควิโนนเป็นระยะเวลานาน [18]



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะผิวหนังของผู้ป่วยโรคต่างขาที่เกิดจากการใช้ไฮโดรควิโนน
(<http://winchesterlaser cosmetic.com/practice-safe-skin-hydroquinone-part-i/>)

5. เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งผิวหนังเมื่อใช้เครื่องสำอางหรือยาที่มี HQ อย่างต่อเนื่อง และใช้เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากการศึกษาและทดลองในหนูทดลองพบว่า HQ มีความเป็นพิษ โดยมีค่า LD50 orally in rats มากกว่า 375 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และยังพบว่า HQ เป็นสารก่อกลายพันธุ์และมะเร็งในหนูทดลองอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 FLOW INJECTION ANALYSIS (FIA) [21,22]

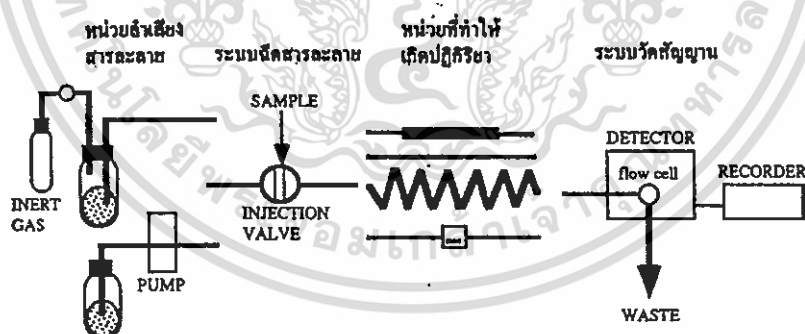
2.4.1 หลักการของระบบ FIA

FIA มีหลักการพื้นฐานจากการฉีดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่กระแสตัวพา (carrier stream) ซึ่งมีการไหลตลอดเวลา สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์จะเกิดเป็นพิกเนชันขึ้นภายในท่อลำเลียง อาจมีกระบวนการต่างๆ เกิดขึ้น ทั้งทางกายภาพ และทางเคมี ก่อนถูกพาไปยังระบบตรวจวัดสัญญาณ (detection system) ที่สามารถบันทึกสัญญาณได้อย่างต่อเนื่อง หลักการที่สำคัญของ FIA สรุปได้ดังนี้

1. สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกฉีดเข้าสู่กระแสของตัวพาซึ่งเป็นสารรีเอเจนต์โดยตรง สารที่ต้องการวิเคราะห์กับรีเอเจนต์ตัวพาจะทำปฏิกิริยากันและเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะถูกนำส่งเข้าสู่เครื่องตรวจวัดต่อไป
2. การกระจาย (dispersion) ของสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกควบคุมโดยระบบทั้งหมด โดยที่ระบบไม่จำเป็นต้องเข้าสู่สมดุลใดๆ ทั้งสิ้น
3. การทำงานของระบบจะถูกควบคุมให้ใช้ระยะเวลาที่เท่ากันตลอด นั่นคือ ตั้งแต่ฉีดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์จนถึงการบันทึกสัญญาณจะใช้เวลาเท่ากันทุกครั้ง ทำให้ผลที่ได้มีความแม่นยำสูง

2.4.2 เครื่องมือพื้นฐานของระบบ FIA

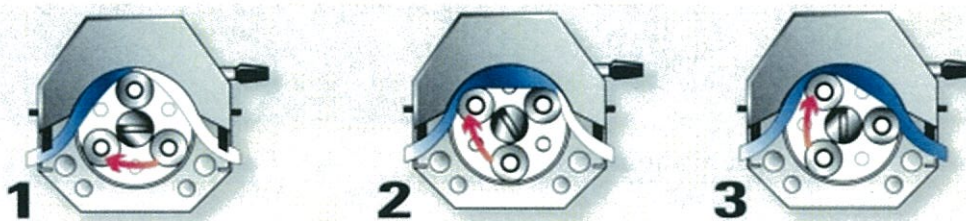
ระบบ FIA สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบของระบบ FIA [21]

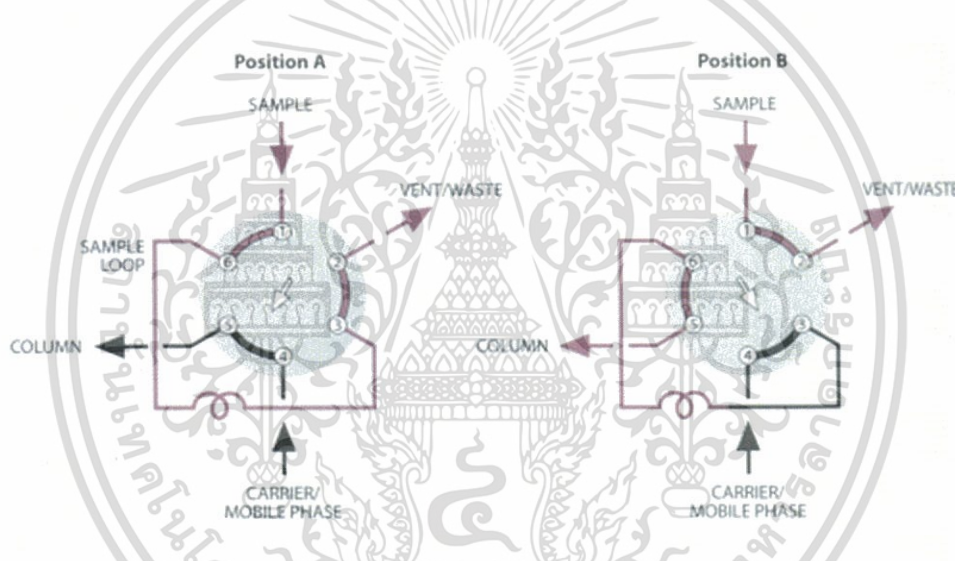
2.4.2.1 หน่วยลำเลียงสารละลาย (Propelling unit) เป็นหน่วยซึ่งสามารถลำเลียงสารละลายตั้งแต่หนึ่งสารละลายขึ้นไป การลำเลียงต้องให้มีอัตราการไหลที่คงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งในการปฏิบัติจะใช้ peristaltic pump หรือใช้ระบบความดันของแก๊ส แต่ที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ peristaltic pump ซึ่งปั๊มชนิดนี้จะประกอบด้วยชุดของตัวหมุน (rotors) ซึ่งสามารถควบคุมให้มีความเร็วคงที่ในการหมุนเพื่อบีบสายยาง (pump tube) เป็นระยะๆ ทำให้สารละลายถูกลำเลียงไปได้ตามทิศทางการหมุนของตัวหมุน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 โดยที่สายยางที่ใช้จำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารละลายหรือตัวทำละลายที่จะถูกลำเลียง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงการทำงานของ Peristaltic pump [21]

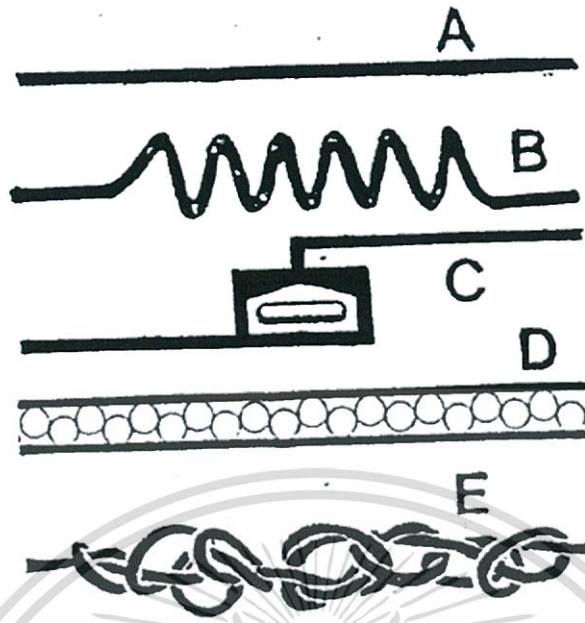
2.4.2.2 ระบบฉีดสารละลาย (Injection system) เป็นระบบที่ใช้ฉีดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่ระบบ FIA โดยที่สามารถควบคุมให้การฉีดแต่ละครั้งมีปริมาตรเท่ากันตลอดการทดลอง ในปัจจุบันจะใช้วิธีการสอดแทรกแทนการฉีดและเครื่องมือที่นิยมใช้ได้แก่ rotary valve ซึ่งเป็นการทำงานของ six-port injection valve แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงการทำงานของ six-port injection valve [21]

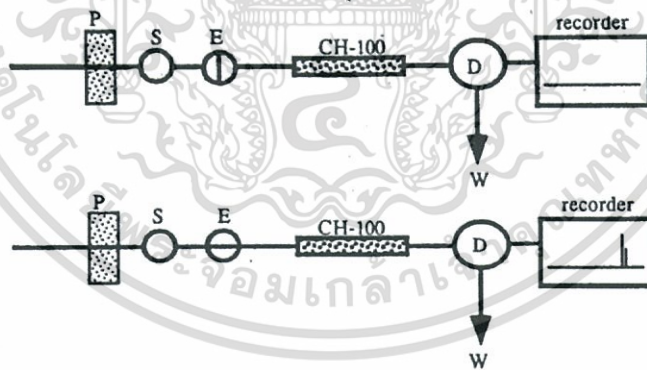
2.4.2.3 หน่วยที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ และอาจรวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่เติมเข้าไปในระบบ (Reaction zone and additional process) ในหน่วยนี้ประกอบด้วยสายลำเลียงสารละลายต่างๆ ซึ่งอาจทำด้วยแก้วหรือพลาสติกที่ทนต่อสารเคมีต่างๆ เช่น PTFE tubing ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-0.8 mm เป็นต้น ส่วนข้อต่อจะมีหลายรูปแบบ เช่น ข้อต่อ 2 ทาง ข้อต่อ 3 ทาง และข้อต่อ 4 ทาง ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้งาน รูปแบบของสายลำเลียงที่ต้องการให้มีการเกิดปฏิกิริยาในสายนั้นมีทำไว้หลายแบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ส่วนกระบวนการอื่นที่เติมเข้าไปในระบบ เช่น mini - column ใช้ในกรณีที่มีการ preconcentration แสดงดังรูปที่ 2.11 หรือ phase separator ใช้ในกรณีที่มีการสกัด แสดงดังรูปที่ 2.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



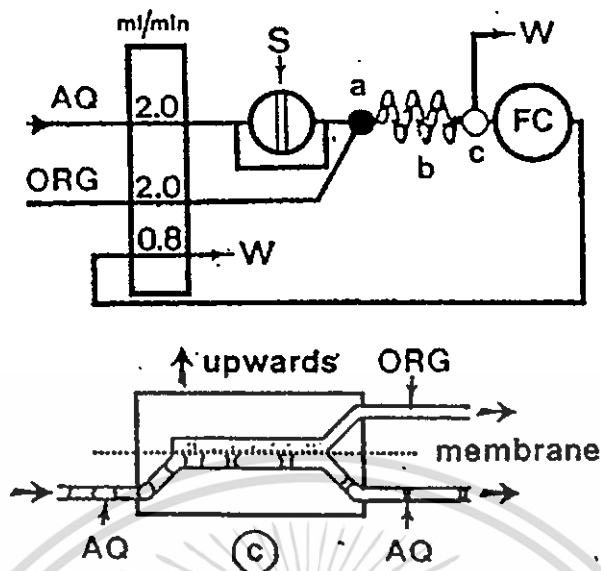
A = Straight open tube B = Coil tube C = Mixing chamber
 D = Single – bead string reactor (SBSR) E = Knitted reactor

รูปที่ 2.10 แสดงรูปแบบต่างๆ ของ reactors [21]



P = Pump S = Sample E = Eluent
 CH-100 = Chelex-100 D = Detector W = Waste

รูปที่ 2.11 แสดงการใช้ mini – column ในการ pre-concentration ในระบบ FIA [21]



S = Sample A = Segmentor b = Extraction coil
 C = Membrane phase separator FC = flow cell
 W = Waste AQ = Aqueous phase ORG = Organic phase

รูปที่ 2.12 แสดงการใช้ phase separator ในการสกัดในระบบ FIA [21]

2.4.2.4 หน่วยวัดสัญญาณ (Sensing system หรือ Detection system) เป็นหน่วยที่วัดสัญญาณจากสารตัวอย่างที่เราสนใจ detection system ที่ใช้ในระบบ FIA มีหลายรูปแบบ การเลือกใช้จะขึ้นกับธรรมชาติของปฏิกิริยาของระบบที่กำลังศึกษา โดยทั่วไปพบว่าเครื่องมือที่ใช้ในเคมีวิเคราะห์เกือบทุกชนิดสามารถนำมาใช้เป็น detection system ใน FIA ได้เช่น spectrophotometer, spectrofluorometer, atomic absorption spectrometer, ICP และเครื่องมือทางด้านไฟฟ้าเคมีบางชนิด เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 วิธีดั้งเดิมที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน

2.5.1 เทคนิค Gas Chromatography (GC)

Anja Judefeind และคณะ [23] ได้พัฒนาวิธี gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดซาลิไซลิก (SA) และ HQ ในตัวอย่างผิวหนังของมนุษย์ และเครื่องสำอางชนิดอิมัลชัน โดยการใช้ Deuterium labeled SA-d6 และ HQ-d6 เป็นสาร internal standard การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการสกัดด้วยเมทานอล ทำให้แห้งภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน และทำให้เป็นสารอนุพันธ์ด้วย *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TMCS) เทคนิคนี้ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดสำหรับการวิเคราะห์ (LOQ) เท่ากับ 50 และ 10 ng mL⁻¹ สำหรับ SA และ HQ ตามลำดับ ค่า %RSD น้อยกว่า 5% และให้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%recovery) 93.1 – 103.3% สำหรับ SA และ 97.3 – 100.8% สำหรับ HQ

E. L. B. Lourenco และคณะ [24] ได้พัฒนาวิธี GC–MS สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ phenol (PHE), HQ และ catechol (CAT) ในตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในคราวเดียวกัน วิธีที่พัฒนาขึ้นอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดของสารประกอบ conjugated phenolic compound หลังจากนั้นทำการสกัด analytes ด้วยเทคนิค solid-phase microextraction (SPME) โดยจุ่ม polar polyacrylate coated fiber ลงในตัวอย่าง 20 นาที พร้อมกับการปั่นกววน หลังจากนั้นไฟเบอร์ที่มี analyte จะถูกนำไปจุ่มในไอของรีเอเจนต์ hexamethyldisilazane เพื่อทำให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์ หลังจากนั้นจึงนำสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นบนไฟเบอร์ไปฉีดเข้าระบบ GC-MS วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดสำหรับการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.3, 0.15 และ 0.02 µg mL⁻¹ สำหรับ PHE, HQ และ CAT ตามลำดับ

เทคนิค GC ให้ sensitivity และ selectivity ในการวิเคราะห์สูง เนื่องจากมีการแยกก่อนที่จะทำการตรวจวัด แต่เทคนิคนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ทำให้ไม่สะดวกในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีจำนวนมาก เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง และยากต่อการวิเคราะห์ในภาคสนามเนื่องจากเครื่องมือมีขนาดใหญ่

2.5.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Cheng-Hui Lin และคณะ [25] พัฒนาวิธี microdialysis sampling ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดอิมัลชัน ในขั้นตอนการทำ dialysis ใช้น้ำปราศจากไอออน (DI water) เป็นสารละลาย perfusate ใช้โพรบ (probe) เป็น polycarbonate fiber ยาว 10 มิลลิเมตร และอัตราการไหลเท่ากับ 5 ไมโครลิตรต่อนาที ส่วน HPLC ใช้เฟสคงที่เป็น Hypersil Fluophase PFP column และใช้ potassium dihydrogen phosphate ละลายใน 40% (v/v) methanol ในสารละลาย 0.020 M phosphate buffer เป็นเฟสเคลื่อนที่เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 2 µM – 2 mM ค่า LOD เท่ากับ 0.2 µM ซึ่งมีความถูกต้อง (%bias) ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (n=3) และระหว่างวัน (n=12) อยู่ในช่วง 9.5 – 13.0 % ความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำพิจารณาได้จากค่า

%RSD ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 7.55% และให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 89 – 112% ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดีที่การเตรียมตัวอย่างทำได้ง่าย สามารถสกัดหรือแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว และไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

P. Lopez Garcia และคณะ [26] พัฒนาวิธี HPLC และวิธี ultraviolet derivative spectrophotometric (UVDS) method สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ สำหรับ HPLC ดำเนินการโดยใช้เทคนิค reversed phase โดยใช้คอลัมน์ RP – 18 เป็นเฟสคงที่ และใช้เมทานอลและน้ำ (20:80 v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-vis Detector ที่ความยาวคลื่นแสง 289 นาโนเมตร ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น $6.0\text{--}30.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ พร้อมกับค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.08 และ $0.26\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ตามลำดับ สำหรับวิธี UVDS อาศัยสเปกตรัมพื้นฐานของ HQ ไปสร้างกราฟอนุพันธ์ที่ 1 คือกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\Delta A/\Delta \lambda$ และความยาวคลื่นแสง โดยให้พีคหัวกลับที่ 302 นาโนเมตร เมื่อนำความสูงของพีคที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ HQ ทำให้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น $10.0\text{--}26.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ในกรดซัลฟิวริก $0.1\ \mu\text{N}$ พร้อมกับค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.14 และ $0.46\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ตามลำดับ ทั้งสองวิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัด HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดเจล และครีม เมื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากสองวิธีด้วย t – test และ F – test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Wenhui Gao และ Cristina Legido-Quigley [27] พัฒนาระบบ HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ HQ, phenol และสารกันบูดอีก 6 ชนิด ในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดครีม สารที่ต้องการวิเคราะห์ทุกตัวถูกสกัดออกจากตัวอย่างครีมด้วย 60% เมทานอล สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้เฟสคงที่เป็นคอลัมน์ C 18 (100 mm × 2.1 mm) และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและ 0.05 M ammonium formate ในน้ำ (pH = 3.0) สำหรับการทำให้ gradient elution ซึ่งสามารถแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากกันได้ภายใน 10 นาที เทคนิคนี้ให้ sensitivity สูง โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวัดเท่ากับ $1.0\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ สำหรับ phenol, $0.1\text{--}150\ \mu\text{g mL}^{-1}$ สำหรับ sorbic acid, $2.0\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ สำหรับ benzoic acid, $0.5\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ สำหรับ HQ, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben ให้ค่า LOD อยู่ในช่วง $0.05\text{--}1.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ โดยให้ค่า %RSD สำหรับการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง น้อยกว่า 5 % และ %recovery อยู่ในช่วง 86.5 – 116.3 %

อย่างไรก็ตาม HPLC มีข้อจำกัดคล้ายกับเทคนิค GC คือ เทคนิคนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ทำให้ไม่สะดวกในการวิเคราะห์สารตัวอย่างเป็นจำนวนมาก เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง และยากต่อการวิเคราะห์ในภาคสนามเนื่องจากเครื่องมือมีขนาดใหญ่

2.5.3 เทคนิค Capillary Electrophoresis (CE)

Claudia Desiderio และคณะ [28] ได้พัฒนาเทคนิค Capillary electrochromatography (CEC) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณของ HQ และอนุพันธ์ ได้แก่ methyl-, dimethyl-, benzyl-, phenyl-, propyl-HQ derivatives โดยการบรรจุ octadecylsilica (ODS) ใน fused-silica capillary เพื่อใช้เป็นเฟสคงที่ในเทคนิค CE และใช้ 20 mM Ammonium acetate pH 6-acetonitrile (30:70%v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้ศักย์ไฟฟ้า 25 kV และความดัน 5 bar ในการแยก และตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-visible diode array detector ที่ความยาวคลื่นแสง 205 นาโนเมตร ซึ่งสามารถกล่าวหาสามารถแยก HQ และอนุพันธ์ ได้ภายในเวลา 6 นาที ให้ช่วงความเป็นเส้นในช่วงความเข้มข้น 5–90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ พร้อมกับค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 1.37 และ 3.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ในการวิเคราะห์หา HQ และอนุพันธ์ ในตัวอย่างเครื่องสำอาง

Yi-Hui Lin และคณะ [29] ได้พัฒนาเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ arbutin (AR), kojic acid (KA) และ HQ ได้ในคราวเดียวกัน โดยใช้การแยกด้วยเทคนิค micellar electrokinetic capillary electrophoresis (MEKC) ซึ่งมี sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็นตัวก่อไมเซลล์ สภาวะที่เหมาะสม ใช้ SDS ที่ความเข้มข้น 100 mM และใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 mM ที่ pH 6.5 เป็น running buffer ใช้ศักย์ไฟฟ้า 20 kV ในการแยก ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 20–200, 20–100 และ 8–80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ และ LOD เท่ากับ 5.4, 7.1 และ 2.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ AR, KA และ HQ ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ในการวิเคราะห์หา AR, KA และ HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอาง

เทคนิค CE สามารถแยก HQ ในตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ค่า LOD ต่ำ เนื่องจากมีการแยกสารก่อนแล้วจึงตรวจวัด ทำให้ไม่มีการรบกวนจากเมทริกซ์ในตัวอย่าง และสามารถพัฒนาให้เป็นเครื่องวิเคราะห์นอกห้องปฏิบัติการได้ แต่ก็เป็นเทคนิคที่มีราคาแพง และจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญและเชี่ยวชาญสูง

2.5.4 เทคนิค Luminescence

J. McCall และคณะ [30] พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ Phenols, Catechols, Benzoquinones และ HQ โดยจะเกิด electrochemiluminescence (ECL) ของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipyridine) เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า +1.4 V แก่สารละลายผสมของ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ และ $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}$ (tri-*n*-propylamine) ซึ่ง Phenols, Catechols, Benzoquinones และ HQ สามารถยับยั้ง หรือ quenching ECL ที่เกิดขึ้นได้ โดยการลดลงของ ECL จะแปรผันตามปริมาณ Phenols, Catechols, Benzoquinones หรือ HQ

M. Pistonesi และคณะ [31] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ Resorcinol และ HQ ในตัวอย่างอากาศได้ในคราวเดียวกัน โดยใช้เทคนิค Synchronous fluorescence spectrofluorimetry ที่ทำงานโดยการสแกนทั้ง excitation และ emission monochromator ไปพร้อมๆ กัน โดยที่กำหนดให้ความแตกต่างของความยาวคลื่น ($\Delta\lambda$) ของ excitation และ emission มีค่าคงที่ ในงานนี้ $\Delta\lambda$ เท่ากับ 15 นาโนเมตร เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่สุด วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประยุกต์ใช้หาปริมาณ Resorcinol และ HQ ในตัวอย่างอากาศ โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ และ Resorcinol ในช่วงความเข้มข้น $0.02\text{--}0.16\text{ mg L}^{-1}$ ($0.416\text{--}3.3\text{ mg m}^{-3}\text{ air}$) และ $0.05\text{--}0.6\text{ mg L}^{-1}$ ($1.04\text{--}12.5\text{ mg m}^{-3}\text{ air}$) พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 0.125 mg m^{-3} และ 0.292 mg m^{-3} ตามลำดับ วิธีนี้มีข้อดีคือ รวดเร็ว ง่าย และใช้แค่น้ำเป็นตัวทำละลายเท่านั้น

Guirong LI และคณะ [32] ได้พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยใช้ Pyronin Y (PY) ซึ่งให้ค่าการเรืองแสงแบบเรโซแนนซ์ (resonance fluorescence) สูง เมื่ออยู่ในสารละลายกรดซัลฟิวริก การตรวจวัด HQ อาศัยความสามารถของ HQ ในการเป็นตัวเร่ง (catalyst) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ PY โดย potassium bromate ซึ่งมีผลทำให้ค่าการเรืองแสงของ PY ลดลง การลดลงของค่าการเรืองแสงของ PY เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ HQ วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น $4.42\text{--}1600\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ และค่า LOD เท่ากับ $1.46\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$

Hui Huang และคณะ [33] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ทั้ง HQ และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ horse radish peroxidase (HRP) และ conjugate fluorescence polymers PPESO₃ ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ที่ละลายน้ำได้ในสถานะของ HRP และ H_2O_2 HQ สามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็น 1,4-benzoquinone (BQ) ซึ่ง BQ สามารถทำให้เกิดการ quenching photoluminescence (PL) ของ PPESO₃ ได้ทำให้การเรืองแสงของ PPESO₃ ลดลง เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ และ H_2O_2 ในช่วงความเข้มข้น $1\text{ }\mu\text{M}\text{--}2\text{ mM}$ และ $6\text{ }\mu\text{M}\text{--}2\text{ mM}$ และค่า LOD เท่ากับ $0.5\text{ }\mu\text{M}$ และ $1\text{ }\mu\text{M}$ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ HQ ด้วยเทคนิค Chemiluminescence นั้นมีข้อดีคือ มี sensitivity สูง ทำให้ได้ค่า LOD ต่ำ การใช้งานเครื่องมือง่าย และราคาไม่แพง แต่เทคนิค Chemiluminescence ที่เคยถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจวัด HQ ส่วนใหญ่มีความยุ่งยากในการดำเนินการทดลอง เช่น เทคนิค Synchronous fluorescence spectrofluorimetry ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญและเชี่ยวชาญ นอกจากนี้ reagent ที่ใช้ทำให้เกิด luminescence มีราคาแพงและไม่เสถียร

2.5.5 เทคนิค Electrochemical technique

Iolanda Cruz Vieira และ Orlando Fatibello-Filho [34] ได้พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยการ modified ขั้ว paraffin/graphite ด้วยเนื้อเยื่อของมันหวาน (sweet potato tissue) ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ peroxidase เมื่อมี H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์นี้สามารถออกซิไดซ์ HQ ไปเป็น *p*-quinone หลังจากนั้น *p*-quinone จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันด้วยไฟฟ้า (electrochemical reduction) กลับไปเป็น HQ ได้ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.22 V การประยุกต์ใช้ขั้วที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิค amperometry ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น $75\text{ }\mu\text{M}\text{--}1.6\text{ mM}$ และให้ค่า LOD เท่ากับ $8.1\text{ }\mu\text{M}$ วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดครีม ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีที่ใช้วัสดุพิษทางธรรมชาติ และราคาถูกในการเตรียมอิเล็กโทรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ines Rosane W.Z. de Oliveira และคณะ [35] ได้พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยการสังเคราะห์สารเชิงซ้อนของ $[Cu_2(HL)(OAc)](ClO_4)_2$ โดยมี N,N',N' -[tris-(2-pyridyl methyl)]- N -(2-hydroxy-3,5-ditert-butylbenzyl)-1,3-propanediamine-2-ol(H_2L) เป็นลิแกนด์ ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อน catechol oxidase catalyst ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสารประกอบฟีนอลิก เปลี่ยนเป็นควิโนน (quinone) สารเชิงซ้อนที่ได้ถูกนำไปสร้างเป็นขั้วอิเล็กโทรดโดยการผสมกับแกรไฟต์ และ modified ลงบนขั้ว carbon paste และนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิค square wave voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอาง โดย HQ จะถูกออกซิไดซ์เป็น quinone หลังจากนั้นจะถูกรีดิวซ์ด้วยไฟฟ้ากลับไปเป็น HQ ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.2 V กระแสที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณ HQ โดยให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น $60 \mu M - 2.5$ mM และให้ค่า LOD และ LOQ เท่า 0.3 และ $1 \mu M$ ตามลำดับ

Liang Wang และคณะ [36] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified glassy carbon electrode (GCE) ด้วย penicillamine (Pen) โดยอาศัยปฏิกิริยา electrooxidation ของ Pen เกิดเป็น Pen ที่มีลักษณะคล้ายอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก (cation radicals) ทำให้เกิดการเชื่อมต่อดัวยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างไนโตรเจนของหมู่เอมีนของ Pen และผิวหน้าของขั้วคาร์บอน ขั้วที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค differential pulse voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ และ catechol ซึ่งสามารถให้พีค oxidation potential ของ HQ และ catechol แยกออกจากกันถึง 103 mV ซึ่งให้ค่า LOD ในการตรวจวัด HQ ในสถานะที่มี catechol ความเข้มข้น 0.1 mM เท่ากับ $1 \mu M$ และค่า LOD ในการตรวจวัด catechol ในสถานะที่มี HQ ความเข้มข้น 0.1 mM เท่ากับ $0.6 \mu M$ วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ในตัวอย่างน้ำประปาได้ในคราวเดียวกัน

Dong-Ming Zhao และคณะ [37] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified poly-amidosulfonic acid และ multi-wall carbon nanotubes composite (PASA/MWNTs) บนขั้ว GCE ด้วยเทคนิค electro-polymerization ซึ่งเริ่มต้นด้วยการหยดสารแขวนลอยตัวของ MWNTs ที่เตรียมใน N,N -dimethylformamide บนขั้ว และระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะแสงอินฟราเรด หลังจากนั้นกระตุ้น MWNTs/GCE ด้วย cyclic sweepings จาก $-1.2V$ ถึง $+1.2V$ จำนวน 20 รอบ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสร้าง PASA/MWNTs/GCE โดยการทำให้ cyclic sweepings จาก -1.5 ถึง $+2.5V$ จำนวน 10 รอบ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 5.0 mM amidosulfonic acid ขั้วที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค differential pulse voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ และ catechol ซึ่งสามารถให้พีค reduction potential ของ HQ และ catechol แยกออกจากกันถึง 103 mV เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในสถานะที่มี catechol ความเข้มข้น 0.1 mM ในช่วงความเข้มข้น $6 \mu M - 0.4$ mM และให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด catechol ในสถานะที่มี HQ ความเข้มข้น 0.1 mM ในช่วงความเข้มข้น $6 \mu M - 0.7$ mM วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ในตัวอย่างน้ำประปาได้ในคราวเดียวกัน

Jun Wang และคณะ [38] ได้พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยการเตรียมวัสดุคาร์บอนผสมระหว่าง graphene nanosheets และ carbon nanospheres โดยอาศัยการเกิด electrolyzing ของ graphite rod ในสารละลายกรดไนตริก ภายใต้สภาวะกระแสไฟฟ้าคงที่ และนำวัสดุคาร์บอนผสมที่ได้ไป modified บนพื้นผิวของขั้ว GCE อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค differential pulse voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ ในตัวอย่างดิน ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 100 และ 100 – 600 μM

Wei Sun และคณะ [39] ได้พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified poly(crystal violet) functionalized graphene oxide (CV-GO) ลงบนพื้นผิวของขั้ว carbon ionic liquid electrode (CILE) ด้วยวิธี potentiostatic method นั่นคือการจุ่มขั้ว CILE ลงในสารละลาย CV-GO ที่สังเคราะห์ขึ้น และให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ -1.2V เป็นเวลา 300 วินาที เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่า ขั้วที่ได้สามารถให้พีค oxidation potential ของ HQ และ catechol แยกออกจากกันถึง 112 mV ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 2.0 ขั้วที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด HQ และ catechol ในตัวอย่างน้ำเทียมได้ในคราวเดียวกัน ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ และ catechol ในช่วงความเข้มข้น 0.12 – 600 และ 0.36 – 600 μM พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 0.033 และ 0.097 μM ตามลำดับ

Guiyun Xu และคณะ [40] พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยใช้ carbon nanotube (CNT) doped poly(3,4- ethylenedioxythiophene) (PEDOT) conducting polymer modified ลงบนพื้นผิวขั้ว carbon paste electrode (CPE) อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค differential pulse voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ โดยอาศัยปฏิกิริยา electrocatalytic oxidation ของ HQ ซึ่งให้ oxidation potential ต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วย bare CPE เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 1.1 – 125 μM พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 0.3 μM และวิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัด HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง

Jing Zou และคณะ [41] พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยการสังเคราะห์ hexagonal phase CuS nanocrystals ซึ่งมีคุณสมบัติการเป็นสารกึ่งตัวนำที่ดีมาก ด้วยวิธี straightforward method และนำไป modified บนพื้นผิวของขั้ว GCE โดยการหดยสารแขวนลอยของ CuS nanocrystals และ chitosan และทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค cyclic voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ ในตัวอย่างน้ำประปาและน้ำแร่จากภูเขา Farmer ที่ซื้อได้จากห้างสรรพสินค้า พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 4.5 μM – 4.5 mM พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 1.5 μM

Hui-Lin Guo และคณะ [42] ได้พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified พื้นผิวขั้ว GCE ด้วย pyridinic nitrogen doped graphene (pyridine-NG) ซึ่งเป็น electrocatalyst ที่ดีมากสำหรับการสร้างขั้ว electrochemical sensor เพื่อตรวจวัด HQ และ catechol เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่าขั้ว pyridine-NG/GCE ที่พัฒนาขึ้น ทั้ง HQ และ catechol สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งปฏิกิริยา

ออกซิเดชันและรีดักชัน โดยให้พิกัด oxidation potential ของ HQ และ catechol แยกออกจากกัน ถึง 103 mV เมื่อนำขั้วที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค differential pulse voltammetry เพื่อตรวจวัด HQ และ catechol ในคราวเดียวกัน ในตัวอย่างน้ำเทียม พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในสถานะที่มี catechol ความเข้มข้น 100 μM ในช่วงความเข้มข้น 5 - 200 μM และให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด catechol ในสถานะที่มี HQ ความเข้มข้น 100 μM ในช่วงความเข้มข้น 5 - 200 μM และค่า LOD เท่ากับ 0.38 และ 1 μM สำหรับการตรวจวัด HQ และ catechol ตามลำดับ

Yanli Zhang และคณะ [43] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified พื้นผิวขั้ว GCE ด้วย graphene และ titanium dioxide nanoparticles nanocomposite (GR-TiO₂) การนำ GR-TiO₂/GCE ไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ในคราวเดียวกัน สามารถศึกษาได้ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่า พิกัด oxidation และ reduction potentials ของ catechol และ HQ เกิดขึ้นที่ประมาณ 0.372/0.018 V และ 0.313/-0.103 V ตามลำดับ และเมื่อนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิค differential pulse voltammetry พบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด catechol และ HQ ในช่วงความเข้มข้น 0.5-100 μM พร้อมกับค่า LOD ในการตรวจวัด catechol และ HQ เท่ากับ 0.087 μM และ 0.082 μM ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาขึ้นประสบความสำเร็จในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน ทั้งในตัวอย่างน้ำประปาและน้ำตัวอย่างจากทะเลสาบ

Weimeng Si และคณะ [44] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified ขั้วอิเล็กโทรด ด้วยการทำให้ electro-polymerization ของ 3,4-ethylenedioxythiophene ลงบน nitrogen-doped graphene ที่เคลือบบนพื้นผิวของขั้ว GCE เมื่อศึกษาปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ HQ และ catechol บนขั้วที่พัฒนาขึ้น ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่าพิกัดปฏิกิริยารีดอกซ์ของ HQ และ catechol สามารถแยกกันได้อย่างดี ขั้วที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิค differential pulse voltammetry เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ และ catechol ได้ในคราวเดียวกัน ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดทั้ง HQ และ catechol ในช่วงความเข้มข้น 1-10 μM และค่า LOD สำหรับการตรวจวัด HQ และ catechol เท่ากับ 0.18 และ 0.26 μM ตามลำดับ

Wei Liu และคณะ [45] พัฒนาวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ HQ, catechol และ Resorcinol ได้ในคราวเดียวกัน โดยการ modified ขั้ว GCE ด้วย nitrogen doped porous carbon nanopolyhedrons (N-PCNPs)-multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) hybrid materials ขึ้นเป็นครั้งแรก เริ่มต้นด้วยการสังเคราะห์ N-PCNPs ด้วยกระบวนการ carbonization ของ ZIF-8 nanopolyhedrons (ZIF-8 NPs) หลังจากนั้นเตรียม N-PCNPs-MWCNTs hybrid materials โดยการผสม N-PCNPs และ MWCNTs เข้าด้วยกันในน้ำบริสุทธิ์ แล้วทำการ sonicated และปั่นกวนเป็นเวลา 2 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ จะได้สารแขวนลอยของผลิตภัณฑ์สีดำ หลังจากนั้นทำการ casting สารแขวนลอย N-PCNPs-MWCNTs hybrid materials ลงบนพื้นผิวของ GCE และ

ทั้งให้แหล่งที่อุณหภูมิห้อง N-PCNPs-MWCNTs/GCE ที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิค

differential pulse voltammetry เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ, catechol และ Resorcinol ได้ในคราวเดียวกัน ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดทั้ง HQ, catechol และ Resorcinol ในช่วงความเข้มข้น 0.2-455 μM , 0.7- 440 μM และ 3.0-365 μM ตามลำดับ และค่า LOD เท่ากับ 0.03 μM , 0.11 μM และ 0.38 μM ตามลำดับ เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นประสบความสำเร็จในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด HQ, catechol และ Resorcinol ได้ในคราวเดียวกันในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ

ข้อดีของ Electrochemical detection คือ มี sensitivity และ selectivity สูง เมื่อมีการ modified electrode สะดวกต่อการนำไปวิเคราะห์นอกห้องปฏิบัติการ แต่เทคนิคนี้มีความเสถียรของสัญญาณต่ำ และมีความยุ่งยากและซับซ้อนในการเตรียมอิเล็กโทรด

2.5.6 เทคนิค Spectrophotometry

R. Belcher และ W.I. Stephen [7] ได้พัฒนาวิธี spectrophotometry สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในระดับไมโครกรัมเป็นครั้งแรก การตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ของเหล็ก(III) การทดลองทำได้โดยการเติมเกลือของเหล็ก(III) ลงในสารละลายที่มี HQ เหล็ก(III) จะถูกรีดิวซ์กลายเป็นเหล็ก(II) ซึ่งมีปริมาณเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ HQ หลังจากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณเหล็ก(II) ที่เกิดขึ้นโดยการเติม o-Phenanthroline ซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเหล็ก(II) ได้ผลิตภัณฑ์สีส้มแดง ในสภาวะที่สารละลายมี pH ประมาณ 3 – 4

A. Afkhami และ H. A. Khatami [46] พัฒนาริธีวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างไนไตรต์ (nitrite) และ Neutral Red ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร HQ สามารถทำปฏิกิริยากับ nitrite ได้ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่างไนไตรต์ และ Neutral Red จึงลดลง มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตรลดลง เมื่อความเข้มข้นของ HQ เพิ่มขึ้น วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 3.0 mg mL^{-1} และค่า LOD เท่ากับ 0.07 mg mL^{-1}

Sirajuddin และคณะ [47] พัฒนาริธีวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ HQ ไปเป็น BQ ด้วย KMnO_4 ซึ่ง BQ ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 245.5 นาโนเมตร วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 0.07 – 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ และค่า LOD เท่ากับ 0.021 $\mu\text{g mL}^{-1}$ วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัด HQ ในตัวอย่างของเสียจาก photographic solution

Huiying Wang [48] พัฒนาริธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยอาศัย localized surface plasmon resonance light scattering (LSPR-LS) ของอนุภาคเงินระดับนาโน (AgNPs) ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่าง HQ และ silver ammonia ในตัวทำละลายผสมของ sodium hydroxide และ ammonia ซึ่ง silver ammonia สามารถถูกรีดิวซ์ได้ด้วย HQ ทำให้เกิดเป็น AgNPs โดยไม่ต้องมีการเติม AgNPs seed AgNPs ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่นแสง 430 นาโนเมตร โดยที่ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ HQ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 0.4 – 2.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ การคำนวณค่า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และค่า LOD เท่ากับ 70.6 nmol L^{-1} วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างน้ำ

Eman S. Elzanfaly และคณะ [49] พัฒนาริธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกรดเรติโนอิก (retinoic acid : RA) และ HQ ได้ในคราวเดียวกัน การสร้างกราฟมาตรฐานทำโดยการบันทึกสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม RA และ HQ ในอัตราส่วนความเข้มข้นต่างๆ กราฟมาตรฐานของการตรวจวัด RA พล็อตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 339 nm และความเข้มข้นของ RA ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด RA ในช่วงความเข้มข้น $1 - 10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ส่วนกราฟมาตรฐานของการตรวจวัด HQ พล็อตระหว่างความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 289.2 และ 257.8 นาโนเมตร และความเข้มข้นของ HQ หรือพล็อตระหว่างความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 225.8 และ 289.2 นาโนเมตร และความเข้มข้นของ HQ ซึ่งให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น $3 - 30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ และค่า LOD เท่ากับ $0.24 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

การวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ด้วยเทคนิค spectrophotometry มีข้อดีคือ ง่าย ใช้เครื่องมือราคาไม่แพง แต่ก็มีข้อเสียคือ การตรวจวัด HQ โดยตรงนั้นมี selectivity และ sensitivity ต่ำ เนื่องจาก HQ ดูดกลืนแสงในช่วง UV และมีอนุพันธ์หลายตัวที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน จำเป็นต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาต่างๆเพื่อเพิ่ม selectivity และ sensitivity

2.4.7 เทคนิค Flow Injection analysis (FIA)

M.E. Rueda และคณะ [50] ได้พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ซึ่งระบบ FIA ประกอบด้วยสารละลายตัวพาที่ได้ไล่แก๊สที่ละลายอยู่ในสารละลายออกด้วยแก๊สฮีเลียมแล้ว ระหว่างอินเจกชันวาล์วและดีเทคเตอร์ มีส่วนของ conditioning cell เพื่อกำจัดตัวรบกวนบางตัวออกไป การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าใช้เซนเซอร์เป็นขั้ว porous graphite electrode ตรวจวัดในโหมด amperometric mode คือวัดกระแสที่ได้จากการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่สารละลาย เทคนิคนี้ให้ค่า LOD ในการตรวจวัด HQ เท่ากับ $6.6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง

B. Gomez-Taylor Corominas และคณะ [51] พัฒนาระบบ tandem-flow ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิค Luminescence สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ HQ ด้วย potassium permanganate ในสารละลายกรดซัลฟิวริก และเมื่อมี quinine sulphate และ benzalkonium chloride ก็จะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ซึ่งความเข้มแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ HQ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น $0.1 - 15 \text{ mg L}^{-1}$ พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 0.03 mg L^{-1} และสามารถวิเคราะห์ได้ 103 ตัวอย่างต่อชั่วโมง เทคนิคนี้นำไปประยุกต์วิเคราะห์หาปริมาณ HQ ได้ในตัวอย่างที่หลากหลาย ได้แก่ ยา น้ำยาล้างรูป และการตรวจสอบสารตกค้างในน้ำ

Behzad Haghghi และ Reza Dadashvand [52] พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิค Luminescence เพื่อตรวจวัด HQ, catechol และ resorcinol ขึ้นมา 2 ระบบ โดยทั้งสองระบบอาศัยปฏิกิริยาการ quenching Chemiluminescence (CL) ด้วยสารที่ต้องการวิเคราะห์เหมือนกัน ต่างกันตรงปฏิกิริยาที่ทำให้เกิด CL โดยระบบแรกอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ luminol ด้วย *N*-chlorosuccinimide (NCS) ในสารละลายเบส KOH ส่วนระบบที่สองใช้ NCS ออกซิไดซ์ KI ไปเป็นไอโอดีน และไอโอดีนจึงไปออกซิไดซ์ luminol อีกครั้งหนึ่ง ทั้งสองปฏิกิริยาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถคายแสงออกมาได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เมื่อมี HQ, catechol หรือ resorcinol ในปฏิกิริยาจะทำให้การคายแสงของ luminol ลดลง วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ค่า LOD ในการตรวจวัด HQ, catechol และ resorcinol เท่ากับ 0.002, 0.01 และ 0.3 μM ตามลำดับ สำหรับระบบ NCS-KI-luminol และ 0.01, 0.17 และ 1.6 μM ตามลำดับ สำหรับระบบ NCS-luminol และทั้งสองระบบสามารถวิเคราะห์ได้ 60 - 70 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ซึ่งระบบ NCS-KI-luminol ให้สัญญาณ background และ sensitivity ดีกว่าระบบ NCS-luminol แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีมี selectivity ที่ต่ำ เพราะเมื่อนำทั้งสองระบบไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ HQ, catechol และ resorcinol ในตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อมจริงพบว่า ให้ค่า RSD สูงถึง 6% ดังนั้นอาจต้องมีการต่อระบบร่วมกับเทคนิค HPLC สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง

Deyong He และคณะ [53] พัฒนาระบบ FIA - CL เพื่อตรวจวัด HQ และ catechol โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชันของ Fe ด้วย H_2O_2 ซึ่งทำให้เกิด hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) หลังจากนั้น $\cdot\text{OH}$ จะออกซิไดซ์ rhodamine 6G (Rh6G) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่คายแสงได้ แต่เป็น weak CL แต่เมื่อมี HQ หรือ catechol จะทำหน้าที่เป็น CL enhancer โดย $\cdot\text{OH}$ จะออกซิไดซ์ HQ หรือ catechol ไปเป็น quinone ที่อยู่ในสภาวะกระตุ้น หลังจากนั้น quinone นี้จะถ่ายพลังงานส่วนเกินให้กับ Rh6G ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถให้ CL ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร ดังนั้นหากมีปริมาณ HQ หรือ catechol ในตัวอย่างมาก ปริมาณแสงที่คายออกมาที่ 555 นาโนเมตร ก็จะมีค่าสูงด้วย เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ และ catechol ในช่วงความเข้มข้น 0.008 - 1 และ 0.01 - 2 mg L^{-1} ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 0.004 และ 0.006 mg L^{-1} ตามลำดับ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 60 วินาทีต่อตัวอย่าง วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างน้ำประปา

Lijun Zhao และคณะ [54] พัฒนาระบบ FIA - CL เพื่อตรวจวัด HQ และ catechol โดยอาศัยความสามารถของ HQ และ catechol ในการยับยั้งปฏิกิริยา chemiluminescence ของ luminol-KMnO₄- β -cyclodextrin (β -CD) เริ่มต้น KMnO₄ สามารถออกซิไดซ์ luminol ได้สภาวะเบสเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถให้ CL ได้ แต่งานวิจัยนี้ได้พบว่า การเติม β -CD ลงในปฏิกิริยาสามารถเพิ่มสัญญาณ CL ได้ เนื่องจาก β -CD สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดย KMnO₄ และทำให้เกิด hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) และ Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) ซึ่ง $\cdot\text{OH}$ และ $^1\text{O}_2$ จะทำปฏิกิริยากับ luminol เกิดเป็น luminol ที่อยู่ในสภาวะกระตุ้นและเกิดการคายแสงออกมาเพื่อกลับสู่สภาวะพื้น แต่เมื่อมีการเติม HQ หรือ catechol ลงในปฏิกิริยา HQ และ catechol สามารถถูกออกซิไดซ์ได้โดย $\cdot\text{OH}$ และ $^1\text{O}_2$ เกิดเป็น quinone มีผลทำให้สัญญาณ CL มีค่าลดลง เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ และ catechol ในช่วงความเข้มข้น 1 - 10 และ 1 - 20 ng mL^{-1} ซึ่งมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า LOD เท่ากับ 0.1 และ 0.4 ng mL⁻¹ ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาขึ้นถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ

Shifeng Li และคณะ [55] พัฒนาระบบ FIA - CL เพื่อตรวจวัด HQ, catechol และ resorcinol โดยอาศัยความสามารถของ HQ, catechol และ resorcinol ในการยับยั้งปฏิกิริยา chemiluminescence ของ luminol-NaIO₄-gold nanoparticles โดยปกติ superoxide radical ions (O₂⁻) เกิดจากปฏิกิริยาของ periodate (IO₄⁻) และออกซิเจนในสารละลายเบส หลังจากนั้น O₂⁻ จึงออกซิไดซ์ luminol แล้วเกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถให้ CL ได้ แต่ CL ที่ได้มีความเข้มแสงต่ำ งานวิจัยนี้พบว่า gold nanoparticles สามารถเพิ่มสัญญาณ CL ได้ เนื่องจาก gold nanoparticles สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น หรือสารมัธยันต์ในปฏิกิริยาระหว่าง luminol และ IO₄⁻ ซึ่งทำให้เกิดสารที่เป็น active oxygen ได้แก่ 'OH and O₂⁻ ซึ่งทั้งสองตัวสามารถออกซิไดซ์ luminol ได้ จึงทำให้ gold nanoparticles สามารถเพิ่มสัญญาณ CL ได้ ซึ่ง CL ที่เกิดขึ้นมีความเข้มแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เทคนิคนี้ให้ค่า LOD ในการตรวจวัด HQ, catechol และ resorcinol ในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 2.1 ng mL⁻¹ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 30 วินาทีต่อตัวอย่าง วิธีที่พัฒนาขึ้นประสบผลสำเร็จในการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ catechol ในตัวอย่างน้ำประปา และตัวอย่างน้ำเสีย

Yang Ran และคณะ [56] พัฒนาระบบ FIA - CL เพื่อตรวจวัด HQ โดยอาศัยความสามารถของ HQ ในการยับยั้งปฏิกิริยา chemiluminescence ของ Luminol-H₂O₂-CdTe Quantum Dots (CdTe QDs) ปฏิกิริยาการเกิด CL เริ่มต้นด้วย H₂O₂ ทำปฏิกิริยากับเบสในสารละลายเกิด HO₂⁻ และเมื่อ HO₂⁻ ทำปฏิกิริยากับ luminol ในสภาวะเบส และมี CdTe QDs เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะทำให้เกิด O₂⁻ ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ luminol แล้วเกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถให้ CL ได้ เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 1 - 25 nM และค่า LOD เท่ากับ 0.76 nM วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อมจริง

Bushra B. Qassim และ Hamssa S. Omaish [57] พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน HQ ไปเป็น p-Benzoquinone ด้วย KMnO₄ ในสารละลายเบส ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเขียว ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 610 นาโนเมตร เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 3 - 125 µg mL⁻¹ พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 0.25 µg mL⁻¹ และสามารถวิเคราะห์ได้ 55 ตัวอย่างต่อชั่วโมง วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างยา ซึ่งไม่มีการรบกวนจากสารเติมแต่งที่ทำให้ยากับรูป แต่สำหรับการประยุกต์ใช้หาปริมาณ HQ ในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทครีมไวท์เทนนิ่ง จำเป็นเพิ่มขึ้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วย เพื่อกำจัดตัวรบกวน

Zhongcheng Wang และคณะ [58] พัฒนาระบบ FIA - CL เพื่อตรวจวัด HQ โดยอาศัยความสามารถของ HQ ในการยับยั้งปฏิกิริยา chemiluminescence ของ Luminol-H₂O₂ ที่เร่งปฏิกิริยาด้วย Jacobsen's catalyst (Mn(III)(Salen)Cl) โดย Mn(III)(Salen)Cl เร่งปฏิกิริยาการเกิด CL ด้วยการทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ เกิดเป็น (salen)Mn^{III}OOH ซึ่งจะทำให้ออกซิไดซ์ luminol ไปเป็น luminol radical ในสารละลายเบสได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้น luminol radical เกิดปฏิกิริยา

ออกซิเดชันต่อไปเป็น 3-aminophthalate (3-APA*) ที่อยู่ในสภาวะกระตุ้น ดังนั้น 3-APA* จึงให้ CL ออกมาที่ความยาวคลื่นแสง 425 นาโนเมตร เพื่อกลับสู่สภาวะพื้น แต่เมื่อฉีด HQ ลงในระบบ HQ จะแข่งกับ Luminol ทำปฏิกิริยากับ (salen)Mn^{III}OOH ทำให้การเกิด luminol radical และ 3-APA* ลดลง ดังนั้นหากมี HQ ในตัวอย่างมาก ความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นแสง 425 นาโนเมตร ก็ยิ่งลดลง เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัด HQ ในช่วงความเข้มข้น 0.6 – 10 ng mL⁻¹ พร้อมด้วยค่า LOD เท่ากับ 0.1 ng mL⁻¹ วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ HQ ในตัวอย่าง ประปา น้ำจากทะเลสาบ และน้ำบาดาล

การใช้เทคนิค FIA ในการวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ส่วนมากจะพัฒนาร่วมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิค Chemiluminescence (CL) ซึ่งทำให้มี sensitivity ที่ดี และเป็นระบบอัตโนมัติ เหมาะแก่การนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างหลายๆ แต่ reagent ไม่จำเพาะเจาะจงต่อ HQ นอกจากนี้ยังมีราคาแพง และมีการเตรียม reagent ที่ค่อนข้างยุ่งยาก

2.6 งานวิจัยนี้

จากข้อดีของระบบ FIA ที่มีการวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติ เหมาะแก่การนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก และข้อดีของการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี คือ ง่าย และใช้เครื่องมือราคาไม่แพง จึงทำให้ผู้วิจัยต้องการพัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ HQ โดยการตรวจวัดอาศัยปฏิกิริยาที่ R. Belcher และ W.I. Stephen [7] นำเสนอ นั่นคือ การรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II) โดย HQ จากนั้น Fe(II) ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับอโรโทฟีแนนโทรอลีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงของ [Fe(phen)₃]²⁺ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 508 นาโนเมตร ดังนั้นการเกิดสารเชิงซ้อนนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ HQ ที่มีในตัวอย่าง วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ง่าย ให้ค่าความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง มีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ และมีความน่าเชื่อถือในการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ HQ ในเครื่องสำอาง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ความบริสุทธิ์ (%)	ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
กรดอะซิติก (Acetic acid)	CH_3COOH	99.8	Carlo Erba Reagent, Italy
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	$\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	99.5	Rankem, India
กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)	H_2SO_4	98.0	Analytical Reagent, India
ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone)	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	99.5	Acros organics, Belgium
แอมโมเนียม ไอร์ออน(III) ซัลเฟต ดอดเดคาไฮเดรต (Ammonium iron(III) sulfate dodecahydrate)	$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99.0\%$	Sigma – Aldrich, Singapore
ออโรฟีแนนทโรรีลีน (o-Phenanthroline)	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$	$\geq 99.0\%$	Fluka Analytical, Belgium

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องตรวจวัด

1. ขวดวัดปริมาตร
2. บีกเกอร์
3. ปิเปต และ ไมโครปิเปต
4. ขวดรูปชมพู่
5. หลอดหยด
6. กระจกตวง
7. นาฬิกาจับเวลา

เอกสารนี้ 8. เครื่องวัด pH – Metrohm, 827 pH Lab Meter, USA อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เครื่องยู่วี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โมเดล Jasco V630, USA
10. อุปกรณ์สำหรับสร้างระบบโพลอินเจคชัน ได้แก่
 - 10.1 Peristaltic pump – IDEX Health & Science, ISM827B, USA
 - 10.2 6-Port/3-Channel Injection and Switching Valve - IDEX Health & Science, V - 450, USA
 - 10.3 Flow through cell สำหรับเครื่องยู่วี – วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ – Hellma Analytics, 178.010 – QS, Germany
 - 10.4 PTFE tube ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.0 มิลลิเมตร – Vici AG International, JR – T6807 – M 25, Switzerland
 - 10.5 Pump tube ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.95 มิลลิเมตร – IDEX Health & Science, AME10 – SC0058 – 9304, USA
11. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)
 - 11.1 Pump : Water 510 HPLC pump – Millipore corporation, USA.
 - 11.2 Column : HiQ Sil C18HS column (125 mm×4 mm i.d., 5µm particle size, 100A pore size) – KYA Technologies corporation, Japan.
 - 11.3 Detector : Water 486 Tunable absorbance detector, Millipore corporation, USA.

3.2 การเตรียมสารละลาย

สารละลายทุกตัวเตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ได้จากเครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ (RO + Mixed bed, Treat Chemical, Thailand) และสารเคมีทุกตัวเป็นเกรดสำหรับงานวิเคราะห์เคมี (Analytical Reagent Grade)

3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน

1. สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร
ละลายไฮโดรควิโนน 0.0554 กรัม และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลต่อลิตร
ปีเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 1 มา 2.50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 50.00 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมจากการปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน เข้มข้น 500 ไมโครโมลต่อลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร โดยปริมาตรที่ปิเปตและความเข้มข้นไฮโดรควิโนนสุดท้ายเป็นดังตารางด้านล่าง

ปริมาตรที่ปิเปต (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 มิลลิลิตร (ไมโครโมลต่อลิตร)
-	0
0.25	5
0.50	10
1.00	20
2.50	50
5.00	100
12.50	250

3.2.2 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร พีเอช 3.6

1. สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

ปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น (99.8%) 2.86 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายโซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

ละลาย $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 1.36 กรัม และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด (ตามหัวข้อ 1 และ 2) ปริมาตร 231.5 และ 18.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับพีเอชให้ได้ 3.6 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก หรือโซเดียมอะซิเตต

3.2.3 การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร

ปิเปตสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (98%) 2.78 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.2.4 การเตรียมสารละลายเหล็ก (III) ความเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร

ชั่ง $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 0.6027 กรัม มาละลาย และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรด H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3

3.2.5 การเตรียมสารละลายอโรฟีแนนโทรลีน ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร

ชั่งอโรฟีแนนโทรลีนจำนวน 2.4778 กรัม มาละลาย และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรด H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 ด้านการคำนวณ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างครีม 1.xxxx กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน และละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
2. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. เทสารละลายที่ได้ใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
4. กรองสารละลายที่ได้ผ่านไนลอนเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร
5. ถ่ายสารละลายที่ได้จากการกรองใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และวิธี HPLC

หมายเหตุ อาจทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างเพิ่มเติมตามความเหมาะสม เพื่อให้ความเข้มข้นของไฮโดรควิโนนอยู่ในช่วงการวิเคราะห์โดยกราฟมาตรฐาน

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยารีดักชันของเหล็ก ด้วยการวิเคราะห์แบบ batch

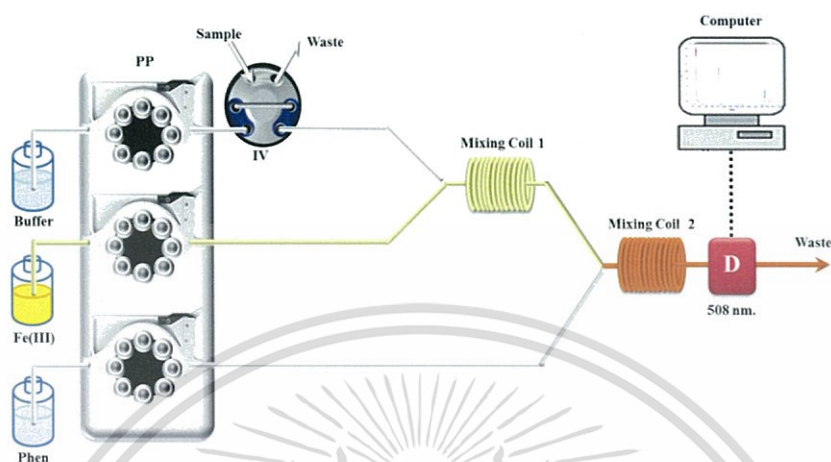
สภาวะการทดลองและขั้นตอนการทดลองอ้างอิงมาจากการวิเคราะห์ด้วยระบบแบบ batch [59]

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนน ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ปริมาตรต่างๆ ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ
2. ปิเปตสารละลายสารละลายเหล็ก (III) ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร และสารละลายออร์โทฟีแนนโทรีน ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 1 แล้วปรับปริมาตรด้วย acetate buffer pH 3.6
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
4. ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้ที่ความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 ระบบโฟลอินเจกชัน

ระบบโฟลอินเจกชันที่ได้พัฒนาขึ้นแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ระบบโฟลอินเจกชันที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน; Buffer: อะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 3.6) ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร, Fe(III): สารละลายเหล็ก (III) ความเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร ในสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร, Phen: สารละลายออร์โทฟีแนนโทรลีน ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ในสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร, PP: Peristaltic Pump (อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที), IV: Injection Valve (300 ไมโครลิตร), Mixing Coil 1: 100 เซนติเมตร, Mixing Coil 2: 100 เซนติเมตร และ D: เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ตรวจวัดที่ 508 นาโนเมตร

3.3.3 ลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยารีดอกซ์ของเหล็ก ด้วยระบบโฟลอินเจกชัน

การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยารีดอกซ์ของเหล็ก ด้วยระบบ FIA ในรูปที่ 3.1 มีลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

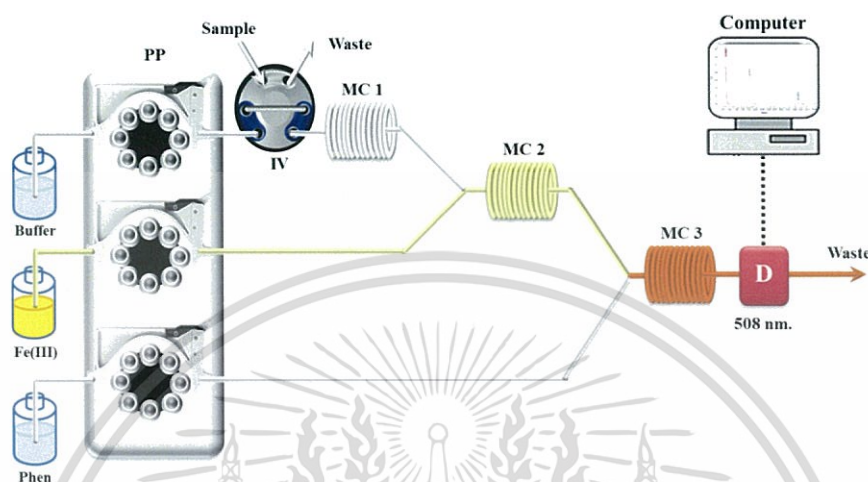
1. เมื่อเปิด Peristaltic Pump รีเอเจนต์ต่างๆจะถูกปั๊มเข้าสู่ท่อ PTFE tube ตามรูปที่ 3.1 โดยใช้อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที และสุดท้ายสารทั้ง 3 ตัว จะไหลมาเจอกันที่ MC2 ได้แก่ บัฟเฟอร์กรดอะซิติก - โซเดียมอะซิเตต, สารละลายเหล็ก (III) และออร์โทฟีแนนโทรลีน กดปุ่ม Set Zero เพื่อปรับสัญญาณจากรีเอเจนต์แต่ละตัวให้เป็น 0 Absorbance

2. ฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมในข้อ 3.2.1 หรือสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่ระบบโฟลอินเจกชันผ่าน IV ซึ่งจะทำให้การฉีดสารตัวอย่างทุกครั้งมีปริมาตรของตัวอย่างที่เข้าสู่ระบบเท่ากัน ซึ่งสารตัวอย่างจะถูกปรับให้มีพีเอชที่เหมาะสมด้วยกระแสตัวพาที่เป็นบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นกระแสของบัฟเฟอร์จะลำเลียงตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับสารละลายเหล็ก (III) และออร์โทฟีแนนโทรลีน ที่ MC1 และ MC2 ตามลำดับ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังรูปที่ 1.1 ตามลำดับ

3. สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นถูกผลึกเข้าสู่ดีเทคเตอร์เพื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 508 นาโนเมตร ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนทุกพารามิเตอร์จะศึกษาโดยใช้ระบบ FIA เบื้องต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.2 และลำดับการวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.3.3



รูปที่ 3.2 ระบบโพลินเจคชันเบื้องต้นที่ใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน; Buffer: อะซิเตตบัฟเฟอร์, Fe(III): สารละลายเหล็ก (III), Phen: สารละลายอโรฟีแนนโทรลีน, PP: Peristaltic Pump, IV: Injection Valve, MC1: mixing coil 1, MC2: mixing coil 2, MC3: mixing coil 3 และ D: เครื่องยูวี – วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตรวจวัดที่ 508 นาโนเมตร

3.3.4.1 พีเอชของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

ทำการศึกษาอิทธิพลของพีเอชของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยพีเอชที่เลือกศึกษาคือ 3.6, 4.2, 4.8 และ 5.4 ตามลำดับ

3.3.4.2 ความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก (III)

ทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก (III) ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความเข้มข้นที่เลือกศึกษาคือ 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลต่อลิตร ตามลำดับ

3.3.4.3 ความเข้มข้นของสารละลายอโรฟีแนนโทรลีน

ทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายอโรฟีแนนโทรลีน ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความเข้มข้นที่เลือกศึกษาคือ 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4.4 ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบ (Injection volume)

ทำการศึกษาอิทธิพลของปริมาตร injection volume ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยปริมาตรที่เลือกศึกษาคือ 100, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ

3.3.4.5 อัตราการไหล (Flow Rate)

ทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราการไหลของสารละลาย ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยอัตราการไหลที่เลือกศึกษาคือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิตรต่อนาที ตามลำดับ

3.3.4.6 ความยาวมิกซิงคอยด์ตัวที่ 1 (Mixing Coil 1: MC1)

ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาว MC1 ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความยาวที่เลือกศึกษาคือ 0 และ 50 เซนติเมตร ตามลำดับ

3.3.4.7 ความยาวมิกซิงคอยด์ตัวที่ 2 และ 3 (MC2, MC3)

ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาว MC2 และ MC3 ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความยาวที่เลือกศึกษาเป็นดังตารางด้านล่างนี้

สถานะการทดลองที่	ความยาว MC2 (เซนติเมตร)	ความยาว MC3 (เซนติเมตร)
1	50	50
2	100	100
3	200	200

3.3.5 การสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้จากสถานะที่เหมาะสม

เมื่อได้สถานะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยระบบโฟลอินเจกชันแล้ว จึงได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน โดยสารละลายรีเอเจนต์ทั้งหมดจะถูกปั๊มเข้าสู่ระบบด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิตรต่อนาที ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 3.6 ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร สารละลายเหล็ก (III) และ สารละลายออร์โทฟีแนนโทรีน ความเข้มข้น 0.005 และ 0.05 โมลต่อลิตร ตามลำดับ ในสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลิตร หลังจากนั้นฉีดสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 5, 10, 50, 100 และ 250 ไมโครโมลต่อลิตร เข้าสู่ระบบด้วย Injection valve ปริมาตร 300 ไมโครลิตร โดยสารละลายทั้งหมดจะเคลื่อนที่เข้าสู่มิกซิงคอยด์ 2 ตัว ความยาวตัวละ 100 เซนติเมตร ใช้เวลาเคลื่อนที่เข้าสู่ดีเทคเตอร์ 1 นาที 30 วินาที และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นถัดไปที่ 2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์

3.3.6.1 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ลงไป จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Spiked sample} - \text{Sample}}{\text{Standard}}$$

เมื่อ Spiked sample คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน
 Sample คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง
 Standard คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

3.3.6.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 250 ไมโครโมลต่อลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นหาค่า %RSD ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
 \bar{X} คือ ค่าเฉลี่ย

3.3.6.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของวิธี คำนวณได้ตามสูตรด้านล่างนี้

$$\text{LOD} = y_B + 3S_B$$

$$\text{LOQ} = y_B + 10S_B$$

เมื่อ	y_B	คือ	จุดตัดแกน y
	S_B	คือ	$\sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$
	y_i	คือ	ค่าสัญญาณจริงที่อ่านได้จากเครื่องมือ
	\hat{y}_i	คือ	ค่าสัญญาณที่ได้จากการแทนค่า x ลงในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน
	n	คือ	จำนวนข้อมูล

3.3.7 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ทำการตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างครีมที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.6 และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธี FIA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC [26] ด้วยวิธีการทางสถิติ t - test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้สภาวะการทดลองสำหรับวิธี HPLC ดังต่อไปนี้

คอลัมน์	:	HiQ Sil C18 HS Column (4.6×150 mm.; 100Å pore size; 5 µm particle) size
เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)	:	น้ำ + เมทานอล (80 : 20, v/v)
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	:	1 มิลลิลิตรต่ออนาที
ปริมาตรที่ฉีดเข้าสู่ระบบ	:	10 ไมโครลิตร
ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด	:	289 นาโนเมตร
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน	:	55, 110, 165, 220, 275 ไมโครโมลต่อลิตร
ไฮโดรควิโนนที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน	:	

บทที่ 4

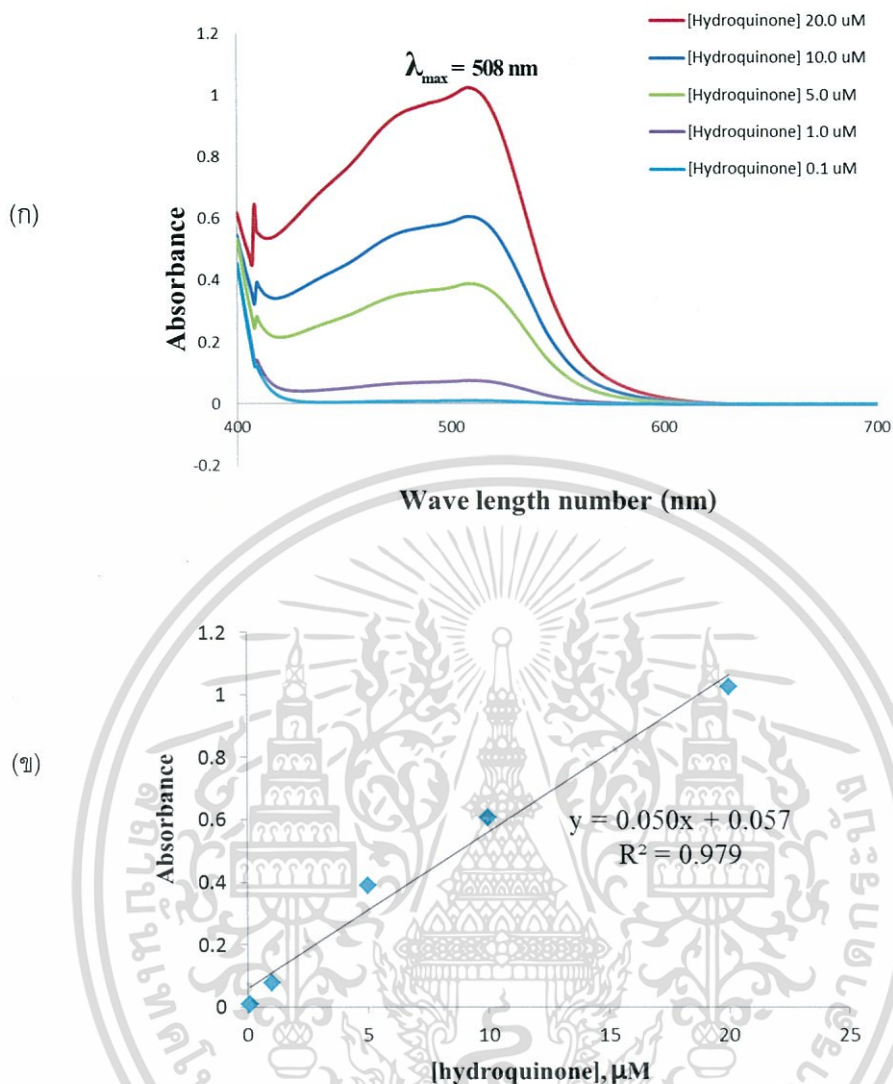
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบโฟลอินเจคชัน (Flow Injection Analysis : FIA) ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ในบทนี้จะกล่าวถึงผลและอภิปรายผลการศึกษาปฏิกิริยาการตรวจวัด การหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสม การประเมินคุณลักษณะต่างๆ ของวิธี และการนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอาง รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของระบบที่พัฒนาขึ้นด้วย

4.1 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยารีดักชันของเหล็ก ด้วยการวิเคราะห์แบบ batch

งานวิจัยนี้พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยอาศัยปฏิกิริยาการรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II) และติดตามปริมาณ Fe(II) ที่เกิดขึ้นโดยการทำปฏิกิริยากับ *o*-phenanthroline เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงของ $[Fe(phen)_3]^{2+}$ ตามงานวิจัยของ R. Belcher และ W. Stephen [7] (รูปที่ 1.1)

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ปฏิกิริยารีดักชันของเหล็ก ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ด้วยการวิเคราะห์แบบ batch [59] ได้ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 20 ไมโครโมลต่อลิตร จากสเปกตรัมที่ได้พบว่า สารเชิงซ้อน $[Fe(phen)_3]^{2+}$ ที่เกิดขึ้น ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 508 นาโนเมตร (รูปที่ 4.1 (ก)) และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 508 นาโนเมตร มาสร้างกราฟกับความเข้มข้นของไฮโดรควิโนน ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (ข) พบว่าให้กราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.979 จึงสามารถสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ปฏิกิริยารีดักชันของเหล็กในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร



รูปที่ 4.1 แสดง (ก) สเปกตรัมของสารเชิงซ้อน $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ และ (ข) กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนนในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 20.0 ไมโครโมลต่อลิตร

4.2 ผลการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

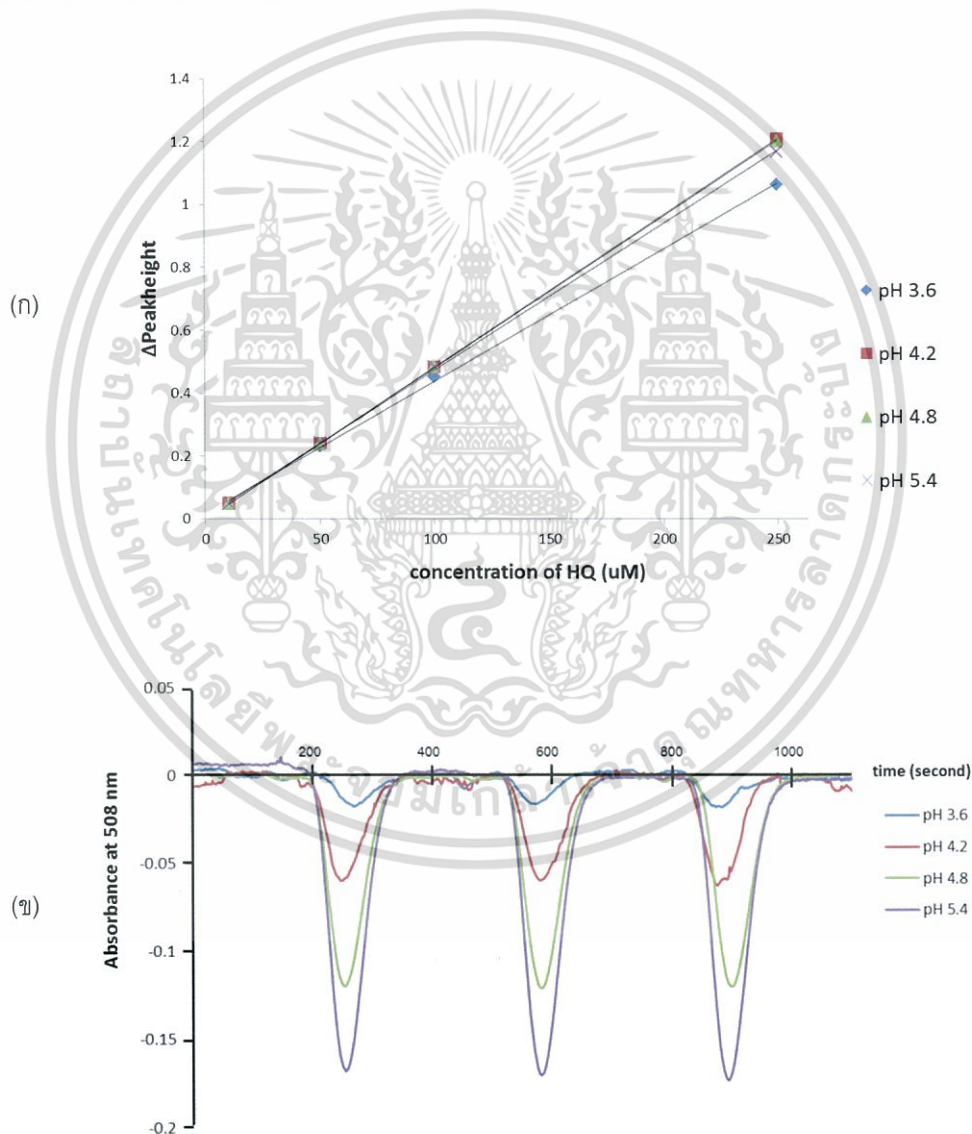
เมื่อพบว่าปฏิกิริยาการรีดิวซ์ $\text{Fe}(\text{III})$ ให้เป็น $\text{Fe}(\text{II})$ ด้วยไฮโดรควิโนน มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน จึงได้ทำการออกแบบระบบ FIA โดยระบบที่ออกแบบเบื้องต้นแสดงดังรูปที่ 3.2

การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน ใช้ระบบ FIA เบื้องต้นที่พัฒนาขึ้น (รูปที่ 3.2) ในการศึกษา และมีลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.3 การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองจะพิจารณาจากความไวในการวิเคราะห์ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) รวมทั้งความเที่ยงในการวิเคราะห์ โดยทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ ทั้งปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี โดยจะศึกษาอิทธิพลคร่าวละปัจจัย (uni-

variable optimization) ดังนี้
 เอกสารฉบับนี้เป็นการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 พีเอชของอะซิเตตบัฟเฟอร์

จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี [60 – 62] ทำให้ทราบว่าทั้งปฏิกิริยารีดักชันของเหล็ก โดยไฮโดรควิโนน และปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง Fe(II) กับ *o*-phenanthroline เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดีในตัวกลางที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน ซึ่งโดยปกติแล้วจะทำการทดลองที่พีเอชในช่วง 3 – 4 และใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ในการควบคุมพีเอช เพราะในตัวกลางที่มีความเป็นกรดสูง H^+ จะแย่งชิงกับ Fe^{2+} เข้าทำปฏิกิริยากับออร์โธฟีแนนโทรอลีนได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาพีเอชของอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยพีเอชที่เลือกศึกษาคือ 3.6, 4.2, 4.8 และ 5.4 ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.2 (ก) พบว่าพีเอชของอะซิเตตบัฟเฟอร์ทั้งหมดให้ความไวในการวิเคราะห์และสัมประสิทธิ์การตัดสีไม่แตกต่างกัน

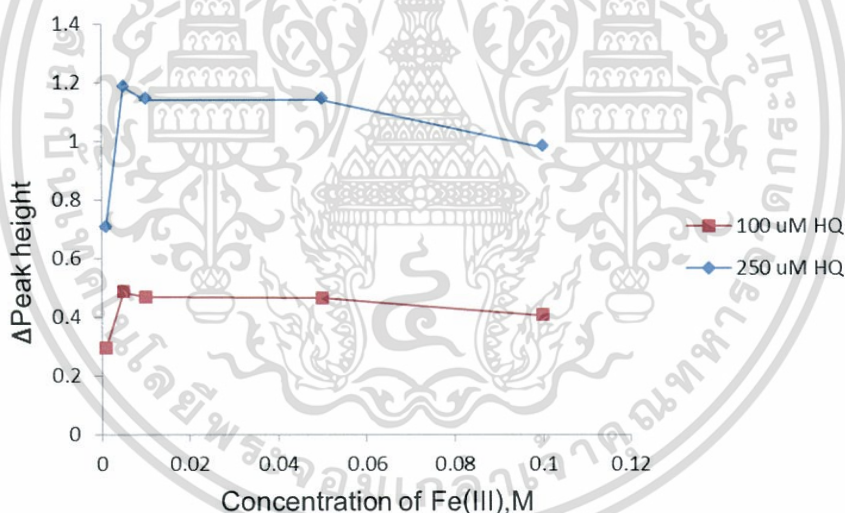


รูปที่ 4.2 แสดง (ก) กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนนช่วงความเข้มข้น 10 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร (ข) สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์ (3 ซ้ำ) เมื่อใช้บัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ เอกสเป็นสารละลายตัวพาไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ในการทดลองพบว่า เมื่อพีเอชของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น สัญญาณของสารละลายแบลงค์ดีดลบบมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (ข) ทั้งนี้เกิดจากผลกระทบของปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Schlieren effect ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อแสงเดินทางผ่านตัวกลางที่มีค่าดัชนีหักเหแสงต่างกัน ซึ่งพบว่าเมื่อพีเอชของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น สัญญาณ Schlieren effect ก็สูงขึ้น เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชสูงขึ้น จะมีความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น ดังนั้นเมื่ออินเจคทอนโซนของสารละลายแบลงค์ซึ่งใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จึงมีความแตกต่างระหว่างค่าดัชนีหักเหแสงของสารละลายบัฟเฟอร์กับสารละลายแบลงค์มาก ทำให้เกิดสัญญาณ Schlieren effect ได้สูง ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์พีเอช 3.6 เพื่อการศึกษาในหัวข้ออื่นๆ ต่อไป เพราะเกิดสัญญาณ Schlieren effect น้อยที่สุด

4.2.2 ความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก (III)

ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก (III) ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความเข้มข้นที่เลือกศึกษาคือ 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.3



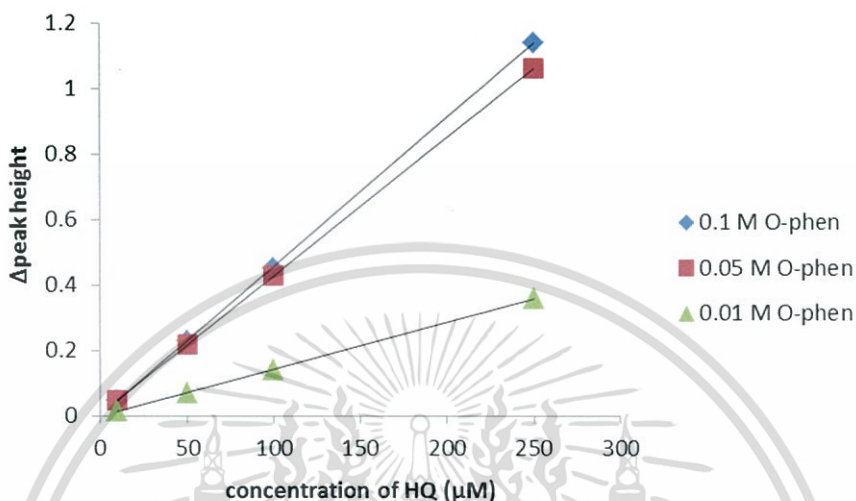
รูปที่ 4.3 แสดงกราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 100 และ 250 ไมโครโมลต่อลิตร กับสารละลายเหล็ก (III) ความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นของเหล็ก (III) 0.001 โมลต่อลิตร ให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำที่สุด เพราะเมื่อความเข้มข้นของรีเอเจนต์ต่ำจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าลง จึงทำให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ ในขณะที่ความเข้มข้นของเหล็ก (III) 0.005, 0.01 และ 0.05 โมลต่อลิตร ให้ความไวในการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน และพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเหล็กสูงขึ้น (0.1 โมลต่อลิตร) จะทำให้เกิด Schlieren effect มากขึ้น ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนต่ำที่สุด ดังนั้นเพื่อให้ได้ความไวของการวิเคราะห์ที่ดี และเกิดผลกระทบจาก Schlieren effect น้อยที่สุด จึงเลือกใช้สารละลายเหล็ก (III) เข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร เพื่อการศึกษาในหัวข้ออื่นๆต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ความเข้มข้นของสารละลายอโรฟีแนนโทรลิน

ทำการศึกษาค่าความเข้มข้นของสารละลายอโรฟีแนนโทรลินที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความเข้มข้นที่เลือกศึกษาคือ 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.4

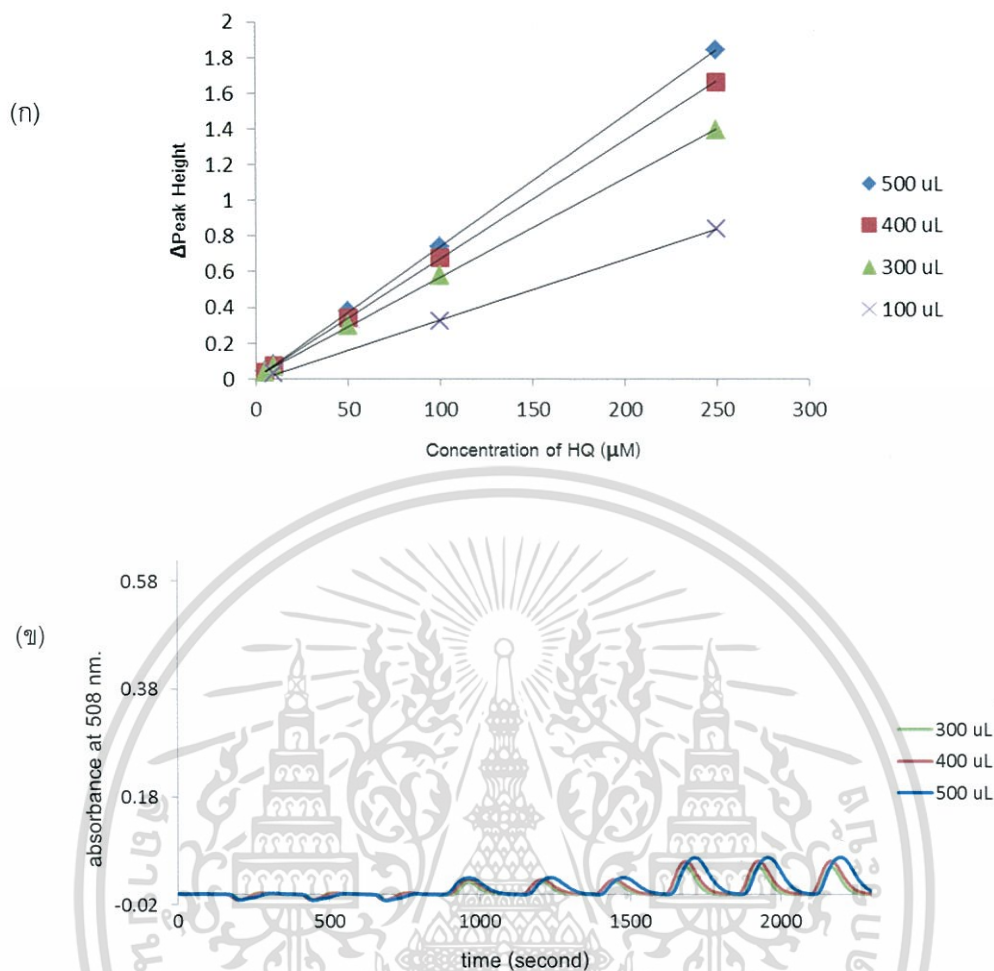


รูปที่ 4.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนน ช่วงความเข้มข้น 10 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อใช้สารละลายอโรฟีแนนโทรลินความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นอโรฟีแนนโทรลิน 0.01 โมลต่อลิตร ให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำที่สุด เพราะเมื่อความเข้มข้นของรีเอเจนต์ต่ำจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าลง จึงให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำที่สุด แต่ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 โมลต่อลิตร ให้ความไวในการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้สารละลายอโรฟีแนนโทรลินเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร เพื่อการศึกษาในหัวข้ออื่นๆ ต่อไป เพราะใช้สารเคมีดังกล่าวปริมาณน้อยกว่า

4.2.4 ผลการศึกษาอิทธิพลปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบ (Injection volume)

ทำการศึกษาอิทธิพลของปริมาณของสารตัวอย่าง ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยปริมาณที่เลือกศึกษาคือ 100, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผลแสดงดังรูปที่ 4.5 (ก) จะเห็นว่า การฉีดสารเข้าสู่ระบบด้วยปริมาณ 500 ไมโครลิตร ให้ความชันของกราฟมาตรฐานหรือความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความสูงพีคของการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนที่ความเข้มข้นต่างๆ (5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร) จะพบว่าทั้งปริมาณ 300, 400 และ 500 ไมโครลิตรให้ความสูงของพีคใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ข) นั้นหมายความว่า ปริมาณสารตัวอย่างทั้ง 3 ปริมาณ ส่งผลต่อค่า LOD ไม่แตกต่างกัน และยังให้ช่วงความเป็นเส้นในการตรวจวัดช่วงเดิม ดังนั้นจึงเลือกฉีดสารเข้าสู่ระบบ 300 ไมโครลิตร เพื่อการศึกษาในหัวข้ออื่นๆ ต่อไป เพราะใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยกว่า และใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างน้อยกว่า

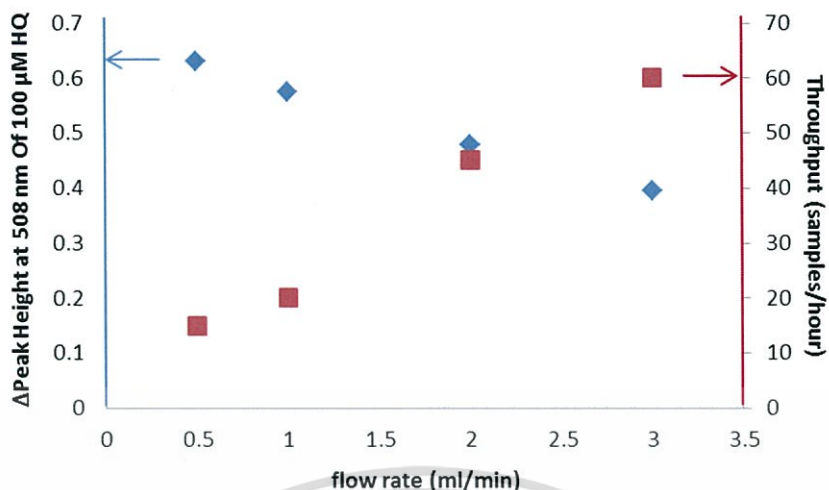


รูปที่ 4.5 แสดง (ก) กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนน ช่วงความเข้มข้น 5 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร (ข) สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบที่ปริมาตรต่างๆ

4.2.5 ผลการศึกษาอิทธิพลอัตราการไหล (Flow Rate)

ทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราการไหลของสารละลาย ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยอัตราการไหลที่เลือกศึกษาคือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ผลแสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อใช้อัตราการไหลช้าๆ จะให้ความไวในการวิเคราะห์สูงกว่า เนื่องจากสารมีเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในท่อนานขึ้น แต่เมื่อพิจารณาปริมาณตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ต่อชั่วโมง (throughput) ร่วมด้วย การใช้อัตราการไหลช้าๆ จะทำให้ได้ throughput ต่ำ ดังนั้นจึงเลือกอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพราะให้ความไวในการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกับการใช้อัตราการไหลที่ 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ให้ throughput มากกว่าการใช้อัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ถึง 3 เท่า

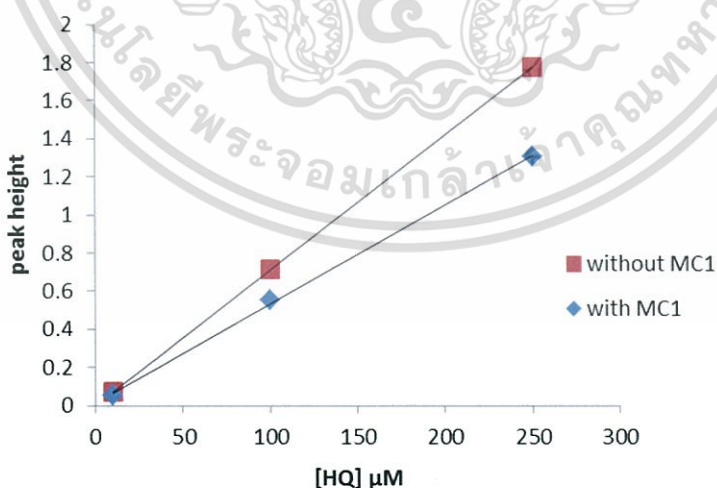
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงพีคของสารมาตรฐานไฮโดรควิโนน 100 ไมโครโมลต่อลิตร และอัตราการวิเคราะห์ เมื่อผลึกสารด้วยอัตราการไหลต่างๆ

4.2.6 ผลการศึกษาอิทธิพลความยาวมิกซิงคอยด์ตัวที่ 1 (MC1)

จากระบบในรูปที่ 3.2 ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาว MC1 ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อไม่มี MC1 ผสมสารตัวอย่างและบัฟเฟอร์ ทำให้ได้ความชันของกราฟหรือความไวในการวิเคราะห์ดีกว่า เนื่องจากการใส่ MC1 เข้าไปในระบบจะทำให้สารตัวอย่างถูกเจือจาง ส่งผลให้สัญญาณที่ได้ลดต่ำลง ดังนั้นจึงเลือกไม่ใช้มิกซิงคอยด์ในการผสมสารตัวอย่างและบัฟเฟอร์ เพื่อการศึกษาในหัวข้ออื่นๆ ต่อไป

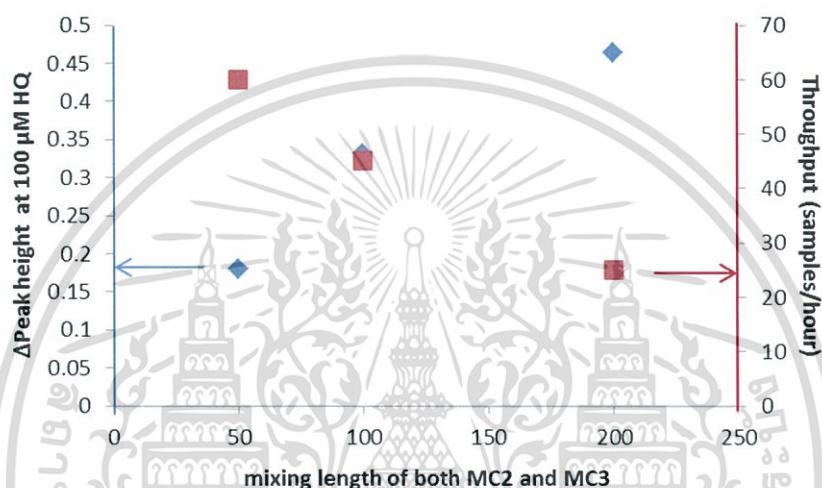


รูปที่ 4.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนน ช่วงความเข้มข้น 10 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อใช้ MC1 ที่ความยาว 0 และ 50 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.7 ผลการศึกษาอิทธิพลความยาวมิกซิงคอยด์ตัวที่ 2 และ 3 (MC2, MC3)

ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาว MC2 และ MC3 ซึ่งส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความยาว MC2/MC3 ที่เลือกศึกษาคือ 50/50, 100/100 และ 200/200 เซนติเมตร ตามลำดับ ผลแสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่าความยาวมิกซิงคอยด์ 200/200 ให้ความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุด เนื่องจากสารมีเวลานานที่สุดในการทำปฏิกิริยากัน แต่ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่างนานเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือกความยาวมิกซิงคอยด์ 100/100 เพราะให้ throughput สูงกว่า 200/200 และให้ความไวในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่น่าพอใจ



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงพีคของสารมาตรฐานไฮโดรควิโนน 100 ไมโครโมลต่อลิตร และอัตราการวิเคราะห์ เมื่อใช้ MC2 และ MC3 ที่ความยาวต่างๆ

จากที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้ได้ระบบ FIA ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนดังแสดงในรูปที่ 3.1 และสามารถสรุปผลการศึกษาดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยระบบโพลอินเจกชันที่พัฒนาขึ้น

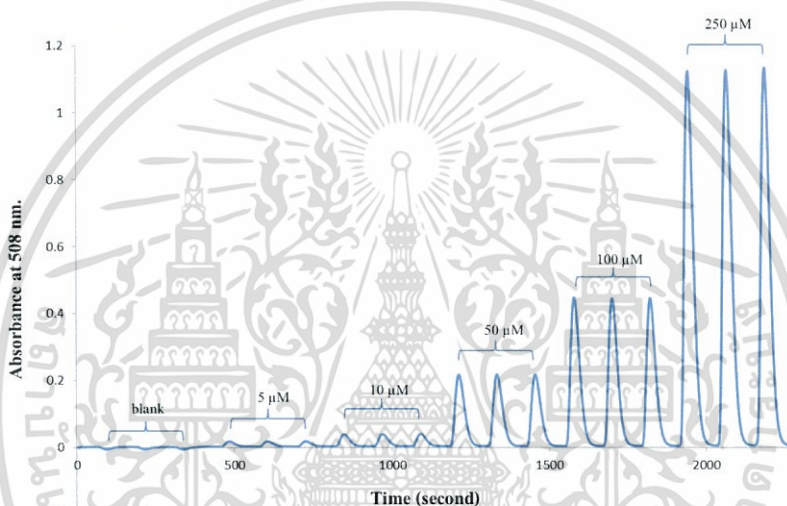
ปัจจัยที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา	ค่าที่เลือก
พีเอชของบัฟเฟอร์	3.6 – 5.4	3.6
ความเข้มข้นของเหล็ก (III)	0.001 – 0.1 โมลต่อลิตร	0.005 โมลต่อลิตร
ความเข้มข้นของ อโรพีแนนโทรลีน	0.01 – 0.1 โมลต่อลิตร	0.05 โมลต่อลิตร
ปริมาตรของ injection volume	100 - 500 ไมโครลิตร	300 ไมโครลิตร
อัตราการไหล	0.5 – 3 มิลลิลิตรต่อนาที	2 มิลลิลิตรต่อนาที
ความยาวมิกซิงคอยด์ MC1	0, 50 เซนติเมตร	0 เซนติเมตร
ความยาวมิกซิงคอยด์ MC2	50 – 200 เซนติเมตร	100 เซนติเมตร
ความยาวมิกซิงคอยด์ MC3	50 – 200 เซนติเมตร	100 เซนติเมตร

4.3 กราฟมาตรฐานที่ได้จากสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

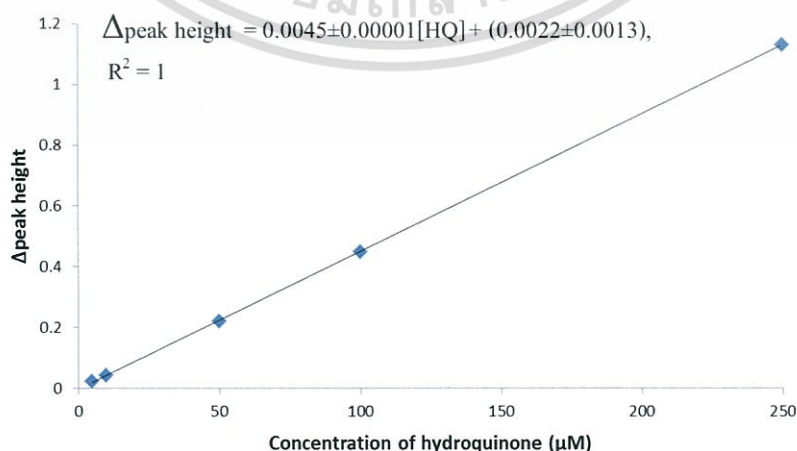
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยระบบโพลินเจคชันที่พัฒนาขึ้นแล้ว จึงได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน โดยตัวอย่างของลักษณะสัญญาณและกราฟมาตรฐาน แสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่าระบบ FIA ที่ได้พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในช่วงความเข้มข้น 5 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร โดยมีสมการเส้นตรงเป็น

ความสูงของพีค = 0.0045 ± 0.00001 [ไฮโดรควิโนน] - (0.0022 ± 0.0013) , $R^2 = 1$
และมีอัตราการวิเคราะห์ 45 ตัวอย่างต่อชั่วโมง



รูปที่ 4.9 แสดงตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 0 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร ด้วยระบบโพลินเจคชันที่พัฒนาขึ้น



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของสารละลายไฮโดรควิโนนช่วงความเข้มข้น 5 – 250 ไมโครโมลต่อลิตร
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์

4.4.1 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ลงไป จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการคำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของไฮโดรควิโนน (ไมโครโมลต่อลิตร)			ร้อยละของ การวิเคราะห์ คืนกลับ
	แรกเริ่ม	ที่เติมลงไป	ที่ตรวจพบ	
A	n.d.	50.0	49.9 ± 0.003	99.9
B	n.d.	50.0	52.3 ± 0.002	104.6
C	n.d.	50.0	53.7 ± 0.001	107.4
D	n.d.	50.0	55.9 ± 0.006	111.8
E	n.d.	50.0	54.2 ± 0.008	108.3
F*	96.1 ± 0.003	50.0	148.4 ± 0.02	104.6

n.d. คือ not detectable

* หลังจากเตรียมตัวอย่างในหัวข้อ 3.2.6 มีการเจือจางตัวอย่าง F ลง 18 เท่า ก่อนนำมาทำการวิเคราะห์

จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งมีร้อยละค่าคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 99.9 – 111.8 นั่นคือ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบภายในตัวอย่าง จึงถือได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูง

4.4.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 250 ไมโครโมลต่อลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง ผลแสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่า 1.15 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 5 ดังนั้นจึงถือได้ว่าวิธีนี้มีความเที่ยงที่สุด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เมื่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 250 ไมโครโมลต่อลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยระบบ FIA ที่พัฒนาขึ้น

ความเข้มข้นไฮโดรควิโนน (ไมโครโมลต่อลิตร)	Δ Peak Height	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
5	0.0226	0.0226	0.0001	0.25
	0.0225			
	0.0226			
10	0.0431	0.0436	0.0005	1.15
	0.0436			
	0.0441			
50	0.2210	0.2211	0.0001	0.07
	0.2211			
	0.2213			
100	0.4505	0.4494	0.001	0.21
	0.4488			
	0.4489			
250	1.1261	1.1290	0.003	0.29
	1.1284			
	1.1326			

4.4.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของวิธี คำนวณได้ตามสูตรด้านล่างนี้

$$\text{LOD} = y_B + 3S_B$$

$$\text{LOQ} = y_B + 10S_B$$

เมื่อ y_B คือ ค่าเฉลี่ยสัญญาณของสารละลายแบลนด์

S_B คือ $\sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$

y_i คือ ค่าสัญญาณจริงที่อ่านได้จากเครื่องมือ

\hat{y}_i คือ ค่าสัญญาณที่ได้จากการแทนค่า x ลงในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

n คือ จำนวนข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อแทนค่าที่วิเคราะห์ได้ลงในสมการข้างต้น และนำค่าที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน จึงทำให้ได้ค่า LOD และ LOQ ของวิธีเท่ากับ 2.71 และ 9.02 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีควมไวในการวิเคราะห์สูง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดไฮโดรควิโนนในตัวอย่างหลายประเภท ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำไปประยุกต์ในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง

จากที่ได้คุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถสรุปผลการศึกษาดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สรุปคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนโดยอาศัยระบบการไหล FIA ที่พัฒนาขึ้น

คุณลักษณะเด่น	ค่าที่ได้
ช่วงความเป็นเส้นตรง (ไมโครโมลต่อลิตร)	5 – 250
สมการเชิงเส้นตรง	$\Delta\text{peak height} = 0.0045 \pm 0.00001[\text{HQ}] - (0.0022 \pm 0.0013)$
สัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ (R^2)	1
% recovery	99.9 – 111.8
% RSD (n = 3)	< 1.15
LOD (ไมโครโมลต่อลิตร)	2.71
LOQ (ไมโครโมลต่อลิตร)	9.02
อัตราการวิเคราะห์ (ตัวอย่างต่อชั่วโมง)	45

4.5 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่าง A ถึง E เป็นตัวอย่างที่มีขายในท้องตลาดทั่วไป ส่วนตัวอย่าง F สั่งซื้อทางอินเทอร์เน็ต หลังจากเตรียมตัวอย่างในหัวข้อ 3.2.6 สามารถนำตัวอย่าง A ถึง E ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC [26] และวิธี FIA ที่พัฒนาขึ้นได้โดยตรง ในขณะที่ตัวอย่าง F ต้องทำการเจือจางลง 18 เท่า ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ เพื่อให้ความเข้มข้นของไฮโดรควิโนนในตัวอย่างอยู่ในช่วงการวิเคราะห์โดยกราฟมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่งโดยวิธี FIA ที่พัฒนาขึ้นและวิธี HPLC

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของไฮโดรควิโนน (ไมโครโมลต่อลิตร)	
	งานวิจัยนี้	วิธี HPLC
A	n.d.	n.d.
B	n.d.	n.d.
C	n.d.	n.d.
D	n.d.	n.d.
E	n.d.	n.d.
F	93.38±0.53	95.08±0.28

จากผลการวิเคราะห์ ไม่พบการปนเปื้อนของไฮโดรควิโนนในตัวอย่าง A ถึง E ในขณะที่ตัวอย่าง F พบการปนเปื้อนของไฮโดรควิโนนค่อนข้างสูง เมื่อคำนวณย้อนกลับพบว่า ตัวอย่าง F มีปริมาณไฮโดรควิโนนอยู่ประมาณ 19.8 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1 กรัม และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธี FIA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC ด้วยวิธีการทางสถิติ t-test พบว่า ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($t_{\text{stat}} = 0.01 < t_{\text{critical}} = 1.81$) จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำ มีประสิทธิภาพการวิเคราะห์เทียบเท่ากับวิธี HPLC และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางได้

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบ FIA ร่วมกับการตรวจวัดทางสเปกโทรโฟโตเมทรี เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างเหล็กและไฮโดรควิโนน วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ง่าย สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว โดยให้อัตราการวิเคราะห์สูงถึง 45 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ทำให้สะดวกในการนำไปวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีจำนวนมาก วิธีนี้ให้ค่า LOD เท่ากับ 2.71 ไมโครโมลต่อลิตร ซึ่งมีความไวในการวิเคราะห์ที่สูงใกล้เคียงกับวิธี HPLC [26] ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 0.73 ไมโครโมลต่อลิตร นอกจากนี้ระบบที่พัฒนาขึ้นยังมีความเป็นอัตโนมัติ ทำให้มีความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้กับวิธี HPLC ด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนนในตัวอย่างเครื่องสำอางได้

อย่างไรก็ตาม กรดแอสคอบิกหรือวิตามินซีซึ่งเป็นสารไวท์เทนนิ่งที่นิยมเติมลงในเครื่องสำอางสามารถรบกวนการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนด้วยระบบที่พัฒนาขึ้นได้ เนื่องจากกรดแอสคอบิกมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก (III) ได้เช่นเดียวกับไฮโดรควิโนน ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีกรดแอสคอบิกเป็นส่วนประกอบ หรือในกรณีที่จะนำไปใช้ศึกษาในตัวอย่างเครื่องสำอางที่มีกรดแอสคอบิกเป็นองค์ประกอบก็จำเป็นจะต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดกรดแอสคอบิกออกก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ และใช้เทคนิคอื่นเพื่อตรวจสอบและยืนยันความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- [1] เอกรัตน์ จันทราทิตย์. 2010. “อันตรายของครีมหน้าขาวที่ผสมไฮโดรควิโนน.” [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0014.pdf>.
- [2] Gao, W. and Quigley, C. 2011. Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. *Journal of Chromatography A*. 1218 : 4307– 4311.
- [3] Topping, D., Bernard, L., Donoghue, J. O. and English J. 2007. Hydroquinone: Acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*. 45 : 70–78.
- [4] กระทรวงสาธารณสุข. 2552. กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง (ฉบับที่ 2). กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข.
- [5] กระทรวงสาธารณสุข. 2555. กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง(ฉบับที่ 2). กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข.
- [6] กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2555. อย. เตือน อย่าซื้ออย่าใช้ เครื่องสำอางอันตราย 34 รายการ เสี่ยง! หน้าพัง. กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข.
- [7] Belcher, R. and Stephen, W.I. 1951. The determination of small amounts of hydroquinone. *Analyst*. 76 : 45 – 49.
- [8] Ebank, J.P., Wickett, R.R. and Boissy, R.E. 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation : The rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*. 10 : 4066 – 4087.
- [9] Williams, J. n.d. “What is Melanin? - Definition, Production & Function.” [online]. Available : <http://education-portal.com/academy/lesson/what-is-melanin-definition-production-function.html#lesson>.
- [10] ทีมงาน womanandkid. n.d. “สารไวท์เทนนิ่งและการทำงาน.” [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.womanandkid.com/index.php/womanhealth/8-healthknowledge/122-whitening-agents-and-how-they-work>.
- [11] Stratford, M.R.L., Ramsden, C.A. and Riley, P.A. 2012. The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20 : 4364–4370.
- [12] Solano, F., Briganti, S., Picardo, M. and Ghanem, G. 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research*. 19 : 550–571.
- [13] Batty. 2010. “ยาและเวชสำอางรักษาฝ้าชนิดใหม่.” [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.oknation.net/blog/print.php?id=615123>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [14] ฝ่ายพิษวิทยา กลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2544. **ความรู้เกี่ยวกับสิ่งเป็นพิษ**. เล่มที่ 15. กรุงเทพฯ : บริษัท พี.เอ. ลีฟวิ่ง จำกัด
- [15] Palumbo, A., Ischia, M.D., Misuraca, G. and Prota, G. 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1073 : 85 – 90.
- [16] Katsambas, A.D. and Stratigos, A.J. 2001. Depigmenting and Bleaching Agents:Coping with Hyperpigmentation. *Clinics in Dermatology*. 19 : 483–488.
- [17] Rendon, M.I., Benitez, A.L. and Gaviria, J.I. 2007. Telangiectatic Melasma: A New Entity? *Cosmetic Dermatology*. 20 : 17 – 22.
- [18] Charlin, R., Barcaui, C.B., Kac, B.K., Soares, D.B., Fonseca, R.R. and Abulafia, L.A. 2008. Hydroquinone-induced exogenous ochronosis: a report of four cases and usefulness of dermoscopy. *International Journal of Dermatology*. 47 : 19–23.
- [19] U.S. Food & Drug Administration, Department of Health and Human Services. 2009. **Supporting Information for Toxicological Evaluation : Hydroquinone**.
- [20] Topping, D.C., Bernard, L.G., O'Donoghue, J.L. and English, J.C. 2007. Hydroquinone: Acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*. 45 : 70–78.
- [21] อุทัยวรรณ แสงเสถียร. 2545. “การประยุกต์เทคนิคโฟลอินเจกชันในการวิเคราะห์หาปริมาณของแดงและนิกเกิล โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ bis(acetylaceton) propylenediimine.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- [22] Ruzicka, Jaromir.(1988). Flow injection analysis. New York : Wiley.
- [23] Judefeind, A., Rensburg, P.J., Langelaar, S. and Plessis, J. 2007. Stable isotope dilution analysis of salicylic acid and hydroquinone in human skin samples by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*. 852 : 300–307.
- [24] Lourenco, E.L.B., Ferreira, A., Pinto, E., Yonamine, M. and Farsky, S.H.P. 2006. On-Fiber Derivatization of SPME Extracts of Phenol, Hydroquinone and Catechol with GC-MS Detection. *Chromatographia*. 63 : 175–179.
- [25] Lin, C., Sheu, J., Wu, H. and Huang Y. 2005. Determination of hydroquinone in cosmetic emulsion using microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 38 : 414–419.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [26] Garcia, P.L., Santoro, M.I.R.M., Kedor-Hackman, E.R.M. and Singh A.K. 2005. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39 : 764–768.
- [27] Gao, W. and Legido-Quigley, C. 2011. Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. *Journal of Chromatography A*. 1218 : 4307– 4311.
- [28] Desiderio, C., Ossicini, L. and Fanali, S. 2000. Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*. 887 : 489–496.
- [29] Lin, Y., Yang, Y. and Wu, S. 2007. Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44 : 279–282.
- [30] McCall, J., Alexander, C. and Richter, M.M. 1999. Electrogenerated Chemiluminescence by Phenols, Hydroquinones, Catechols, and Benzoquinones. *Analytical Chemistry*. 71 : 2523-2527.
- [31] Pistonesi, M., Centurion, M. E., Pereyra, M. and Lista, A.G. 2004. Synchronous fluorescence for simultaneous determination of hydroquinone and resorcinol in air samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378 : 1648–1651.
- [32] Li, G., Tan, G., Liu, Y., Wang, Y. and Liao, L. 2009. A Catalytic Resonance Fluorometry Method for Determination of Hydroquinone and Its Applications. *Analytical Sciences*. 25 : 493 – 497.
- [33] Huang, H., Xu, M., Gao, Y., Wang, G. and Su, X. 2011. Water-soluble fluorescent conjugated polymer-enzyme hybrid system for the determination of both hydroquinone and hydrogen peroxide. *Talanta*. 86 : 164– 169.
- [34] Vieira, I.C. and Fatibello-Filho, O. 2000. Biosensor based on paraffin : graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*. 52 : 681–689.
- [35] Oliveira, I.R.W.Z., Osorio, R.E.M.B., Neves, A. and Vieira, I.C. 2007. Biomimetic sensor based on a novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. *Sensors and Actuators B*. 122 : 89–94.
- [36] Wang, L., Huang, P.F., Bai, J.Y., Wang, H.J., Zhang, L.Y. and Zhao, Y.Q. 2007. Covalent modification of a glassy carbon electrode with penicillamine for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Microchimica Acta*. 158 : 151–157.

- [37] Zhao, D., Zhang, X., Feng, L., Jia, L. and Wang, S. 2009. Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at PASA/MWNTs composite film modified glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 74 : 317–321.
- [38] Wang, J., Yin, H., Meng, X., Zhu, J. and Ai, S. 2011. Preparation of the mixture of graphene nanosheets and carbon nanospheres with high adsorptivity by electrolyzing graphite rod and its application in hydroquinone detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 662 : 317–321.
- [39] Sun W., Wang, Y., Lu, Y., Hu, A., Shi, F. and Sun, Z. 2013. High sensitive simultaneously electrochemical detection of hydroquinone and catechol with a poly(crystal violet) functionalized graphene modified carbon ionic liquid electrode. *Sensors and Actuators B*. 188 : 564– 570.
- [40] Xu, G., Li, B. and Luo, X. 2013. Carbon nanotube doped poly(3,4-ethylene dioxythiophene) for the electrocatalytic oxidation and detection of hydroquinone. *Sensors and Actuators B*. 176 : 69– 74.
- [41] Zou, J., Ma, J., Zhang, Y., Huang, L. and Wan, Q. 2014. A hydroquinone sensor based on a new nanocrystals modified electrode. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89 : 259–264.
- [42] Guo, H., Peng, S., Xu, J., Zhao, Y. and Kang, X. 2014. Highly stable pyridinic nitrogen doped graphene modified electrode in simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Sensors and Actuators B*. 193 : 623– 629.
- [43] Zhang, Y., Xiao, S., Xie, J., Yang, Z., Pang, P. and Gao, Y. 2014. Simultaneous electrochemical determination of catechol and hydroquinone based on graphene–TiO₂ nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B*. 204 : 102–108.
- [44] Si, W., Lei, W., Han, Z., Hao, Q., Zhang, Y. and Xia, M. 2014. Selective sensing of catechol and hydroquinone based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/ nitrogen-doped graphene composites. *Sensors and Actuators B*. 199 : 154–160.
- [45] Liu, W., Wu, L., Zhang, X. and Chen, J. 2014. Simultaneous Electrochemical Determination of Hydroquinone, Catechol and Resorcinol at Nitrogen Doped Porous Carbon Nanopolyhedrons-multiwall Carbon Nanotubes Hybrid Materials Modified Glassy Carbon Electrode. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 35 : 204 – 210.
- [46] Afkhami, A. and Khatami, H.A. 2001. Indirect Kinetic–Spectrophotometric Determination of Resorcinol, Catechol, and Hydroquinone. *Journal of Analytical Chemistry*. 56 : 429 – 432.

- [47] Sirajuddin, M., Bhangar, I., Niaz, A., Shah, A. and Rauf, A. 2007. Ultra-trace level determination of hydroquinone in waste photographic solutions by UV-vis spectrophotometry. *Talanta*. 72 : 546–553.
- [48] Wang, H., Chen, D., Wei, Y., Yu, L., Zhang, P. and Zhao, J. 2011. A localized surface plasmon resonance light scattering-based sensing of hydroquinone via the formed silver nanoparticles in system. *Spectrochimica Acta Part A*. 79 : 2012–2016.
- [49] Elzanfaly, E.S., Saad, A.S. and Abd-Elaleem, A.B. 2012. Simultaneous determination of retinoic acid and hydroquinone in skin ointment using spectrophotometric technique (ratio difference method). *Saudi Pharmaceutical Journal*. 20 : 249–253.
- [50] Rueda, M.E., Sarabia, L.A., Herrero, A. and Ortiz, M.C. 2003. Optimisation of a flow injection system with electrochemical detection using the desirability function application to the determination of hydroquinone in cosmetics. *Analytica Chimica Acta*. 479 : 173–184.
- [51] Corominas, B.G., Icardo, M.C., Zamora, L.L., Mateo, J.V.G. and Calatayud, J.M. 2004. A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone. *Talanta*. 64 : 618–625.
- [52] Haghghi, B. and Dadashvand, R. 2006. Flow injection chemiluminescence analysis of phenolic compounds using the NCS-luminol system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384 : 1246–1253.
- [53] He, D., Zhang, Z. and He, C. 2006. Investigation on the interaction between dihydroxybenzene and Fe^{3+} - H_2O_2 -Rh6G system based on enhancing chemiluminescence. *Luminescence*. 21 : 15–19.
- [54] Zhao, L., Lv, B., Yuan H., Zhou, Z. and Xiao, D. 2007. A Sensitive Chemiluminescence Method for Determination of Hydroquinone and Catechol. *Sensors*. 7 : 578–588.
- [55] Li, S., Li, X., Xu, J. and Wei, X. 2008. Flow-injection chemiluminescence determination of polyphenols using luminol- NaIO_4 -gold nanoparticles system. *Talanta*. 75 : 32–37.
- [56] Ran, Y., Hua-jin, Z., Guo-hui, S., Cheng, G., Jian-jun, L. and Ling-bo, Q. 2013. Determination of Hydroquinone in The Aquatic Environment by Chemiluminescence of Luminol- H_2O_2 Sensitized by CdTe Quantum Dots. *Chinese Journal of Luminescence*. 34 : 116 – 121.
- [57] Qassim, B.B. and Omaish, H.S. 2014. Development of FIA system for the spectrophotometric determination of hydroquinone in pure material and pharmaceutical formulations. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6 : 1548-1559.

- [58] Wang, Z., Tang, Y., Hu, H., Xing, L., Zhang, G. and Gao, R. 2014. Chemiluminescence detection of hydroquinone with flow-injection analysis of luminol-hydrogen peroxide system catalyzed by Jacobsen's catalyst. *Journal of Luminescence*. 45 : 818–823.
- [59] วุฒิพงษ์ พรหมวัฒน์, อัญญา บุษงทอง และอาภาพร จันทะมาศ. 2556. “การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรควิโนนในเครื่องสำอางโดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี.” ปรินญาณีพนธ์วิทยา ศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [60] Fresenius, W., Schneider, W. 1965. *Analytical Chemistry*., 209: 340.
- [61] Chao, J., Shikha G., T. David W. 2015. *Environment Science and Technology*. 49: 14076–14084.
- [62] Z. marczenko and M. Balcerzak. 2000. *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Netherlands: Elsevier.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



PACCON

PURE AND APPLIED CHEMISTRY
INTERNATIONAL CONFERENCE

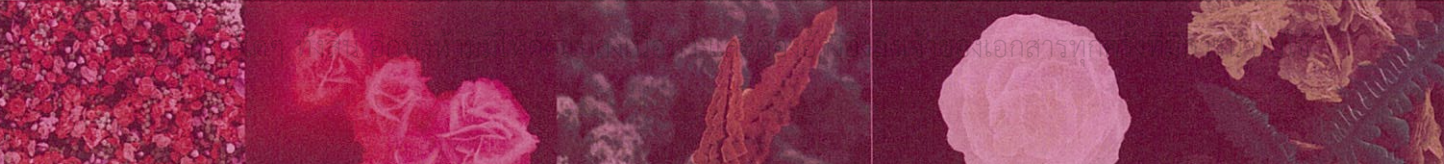
2016



PROCEEDINGS

THAILAND: One Hundred Years of **100**
Advancement in Chemistry' Years

9-11 February 2016  BITEC  Bangkok, Thailand



Indirect measurement of hydroquinone in cosmetics based on Fe(III)-thiocyanate complexation using spectrophotometer and paired emitter detector diodes

Thitaporn Sornsara-Ard, Pappatcha Kaewrungrueang, Raweewan Nanthapan, Sarawut Yamee, Saowapak Teerasong*

Department of Chemistry and Applied Analytical Chemistry Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

*e-mail: saowapak.te@kmitl.ac.th

Abstract:

A simple, rapid and economical method for measurement of hydroquinone was developed. Hydroquinone can reduce Fe(III) to Fe(II). The remaining Fe(III) later reacts with thiocyanate to yield a colored complex. Therefore, the hydroquinone concentration in excess of that necessary to form the liberated complex can be determined spectrometrically. In this work, a commercial spectrophotometer and paired emitter detector diodes (PEDD) fabricated in-house were used as a detector. A linear range of 5-100 and 10-100 μM for quantification of hydroquinone was achieved using spectrophotometer and PEDD, respectively. Superior precision of analysis was attained for both detectors (relative standard deviation < 0.2%). Each measurement required 3 min, offering high sample throughput. Moreover chemicals used in the method are inexpensive. The developed method was applied for screening hydroquinone in whitening agents. The results were consistent with those obtained using the phenanthroline method. Analytical recoveries were found to be in an acceptable range, indicating no interference by other cosmetic ingredients. Furthermore the PEDD is portable, enabling on-site analysis.

1. Introduction

The market for skin lightening agents is continuously increasing, especially in Asian countries, due to consumers' demand for such products. It has been reported that one-third of the women in Indonesia, Malaysia and Taiwan use products for pigment reduction. In Thailand, over 60% of face creams sold in the market have whitening agents among their components.¹

Hydroquinone is an effective depigmenting agent often used under a physician's direction treatment of skin diseases. However, this compound has some side effects with long-term usage. Therefore, several countries including Thailand, now prohibit the use of hydroquinone in cosmetics.² The Thai Food and Drug Administration (FDA) randomly screens cosmetics to find those which may have been intentionally adulterated. Unfortunately, whitening

creams containing hydroquinone are occasionally found in local markets.³

Various techniques have been developed for measurement of hydroquinone in cosmetics. These methods include spectrophotometry^{4,5}, liquid chromatography^{6,7}, electrophoresis⁸ and electrochemistry.^{9,10} Amongst these, spectrophotometric method is preferred. This method is sufficiently sensitive while remaining inexpensive and easy to perform. Moreover, spectrophotometric method is amendable to on-site analysis using miniaturized equipment.

Paired emitter detector diodes (PEDD)^{11,12} is detector based on spectrometric principles. A PEDD configures of two light emitting diodes (LEDs) in which one acts as a light source (light emitter) and another is used as a light detector. The LED emitter works on a forward bias while the LED detector is regulated on a reverse bias. When the light

from the emitter interacts with the detector, a photocurrent is produced resulting in a capacitance discharge in the LED detector. The generated current can be quantified by either determining its discharge time¹¹ or directly measuring the output voltage attained at the LED detector.¹² If the measured signal has a linear relation to the concentration of substance being measured, the method can be exploited for the purpose of quantitative analysis.

Since it has only two LEDs, a PEDD has an advantage in terms of miniaturization, low power consumption and low-cost. Hence, this device is commonly used for various applications requiring on-site analysis.¹³⁻¹⁶

In this work, a method based on a Fe(III)-thiocyanate system was developed for indirect determination of hydroquinone concentration. In the proposed system, excess Fe(III) is reduced by hydroquinone. Unreacted Fe(III) is later complexed with thiocyanate. The color of the resulting Fe(III)-thiocyanate appears as an inverse function of the concentration of hydroquinone. In the current study, a PEDD was constructed in-house. The color of the Fe(III)-thiocyanate complex was monitored spectrometrically using a commercially available spectrophotometer and a PEDD. The validity of this method for screening cosmetic creams for hydroquinone was investigated.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

A stock solution of 0.01 M hydroquinone was prepared by dissolving 0.0551 g of hydroquinone (Acros, USA) in 50.00 mL of DI water. This solution can be stored in a refrigerator for several weeks. For constructing the calibration, working standard solutions of hydroquinone were freshly prepared by appropriate dilution of the stock solution.

A 0.01 M Fe(III) solution was prepared by adding 0.2144 g of $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich,

Spain) to 0.1 M sulfuric acid. The volume of this solution was made up to 50.00 mL. A 0.25 M thiocyanate solution was prepared by dissolving 1.2148 g of KSCN (Sigma-Aldrich, Japan) in 50.00 mL of DI water.

2.2 Instrumental Set-up

Absorbance measurement was performed using a UV-visible spectrophotometer (Jasco V-630, Japan) with 1 cm quartz cuvettes. The detection wavelength was set to 458 nm, the maximum absorption of resulting complexes.

A simple PEDD was assembled. A blue LED was used for the light emitter and a red LED was employed for the detector. These two LEDs were positioned on the opposite sides of the cuvette. A power supply (Best PS-1502DD, China) was used to supply 6.0 V to a LED emitter connected to a 100 ohm resistor to generate stable light. The LED detector was connected to a digital multi-meter (Kyoritsu Electrical Instruments Works KEW1011, Japan) for recording output potential. The in-house PEDD is shown in Figure 1.

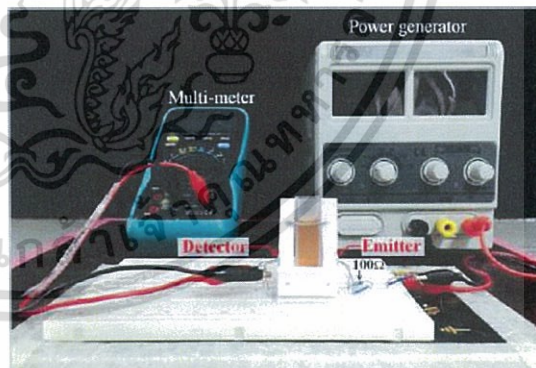


Figure 1. A PEDD developed in-house for hydroquinone detection.

2.3 Sample preparation

Various brands of whitening cream were purchased from a local night market and from the Internet. Some of these samples did not have an FDA certificate reference on their packages, meaning that they were not subject to FDA scrutiny.

The procedure for sample preparation carried out in this work was adopted from earlier work⁴ with some modification. One gram of cosmetic cream was accurately weighed. A 5 mL of DI water was added, which was then added to 5 mL of 0.1 M sulfuric acid with moderate stirring. This solution was warmed in a water bath at 40 °C for 10 min. The extract was centrifuged at 5000 rpm for 20 min, and subsequently filtered through Whatman No.1 filter paper. The filtrate was diluted with DI water to a final volume of 25 mL.

2.4 Analysis of hydroquinone

Different amounts of hydroquinone stock solution were pipetted into a series of 50-mL volumetric flasks. A 1.5 mL volume of Fe(III) solution was transferred into each flask. This solution was shaken for 1 min prior to addition of 2 mL of thiocyanate. Finally, individual flasks were filled with DI water to the mark. A reddish solution was achieved. Absorbance was recorded by 3 min using a UV-visible spectrophotometer and the PEDD detector.

For determination of hydroquinone content of cosmetic samples, 1 mL of the sample was pipetted into a 50-mL flask. The tests were subsequently done as performed for the standard solutions.

2.5 Method validation

The method developed was validated using the Belcher and Stephen method¹⁷ which determines hydroquinone based on the Fe(II)-phenanthroline reaction. In this validation method, an appropriate aliquot of standard/sample was pipette into a 25-mL volumetric flask, to which 2 mL of 0.05 M Fe(III) solution (prepared in 0.1 M sulfuric acid) was added. After 1 min, 2 mL of 0.1 M ortho-phenanthroline (prepared in 0.1 M sulfuric acid) was transferred to the flask followed by addition of 0.2 M acetate buffer at pH 3.6 to a final volume of 25 mL. Absorbance measurement of the resulting Fe(II)-phenanthroline complex was done at 508 nm.

3. Results and Discussion

3.1 Detection principle

The method developed in the current study involves in reduction of Fe(III) with hydroquinone to Fe(II). The remaining Fe(III) is further reacted with thiocyanate, yielding a red colored complex of Fe(III)-thiocyanate which can spectrometrically analyzed. Hence, the concentration of hydroquinone inversely corresponds to the complex formed.

3.2 LED selection for the PEDD

Since the complex formed strongly absorbed blue light, a blue LED was used as a light source. The LED detector was evaluated. Fe(III)-thiocyanate complex was prepared at various concentrations. The concentrations of colored complex were then determined using red, green and blue light detectors. Figure 2 shows that the red LED offered a good response with linear relation to the concentration of the Fe(III)-thiocyanate complex than those of green and blue LEDs. Therefore, the red LED was used as a light sensor in subsequent experiments.

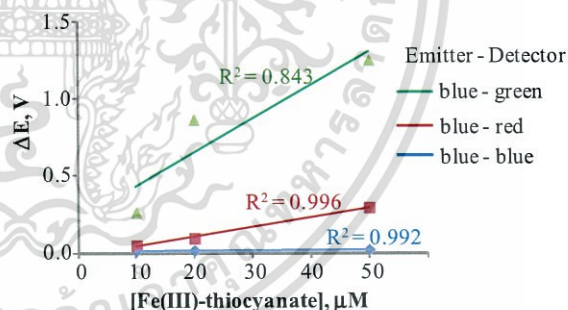


Figure 2. Voltage responses obtained using red, green and blue light sensors.

3.3 Optimization

The factors which may influence the detection sensitivity include reagent concentrations, reaction time and degree of agitation. These were further investigated. In this study, the optimal conditions were determined using a spectrophotometer.

The effect of iron concentration was examined over the range of 0.01 to 0.05 M with thiocyanate fixed at a

concentration of 0.1 M. Results showed that employing higher concentrations of Fe(III) yielded a more linear calibration (data not shown). This occurred since a large excess of iron can react with a large amount of hydroquinone, leaving some hydroquinone unreacted to complex with thiocyanate. However in Figure 3, it can be seen that when using high concentrations of iron (0.025 and 0.05 M), the spectra of blank and 10 μ M hydroquinone solutions greatly overlapped. When using a low concentration of iron (0.01 M), slight differences in the absorbance of these two solutions could be detected. Since the developed method aimed to detect illegal incorporation of hydroquinone in cosmetic, low detection limits are very important. Therefore, a 0.01 M Fe(III) solution was selected since this condition enables superior detection.

The concentration of thiocyanate must be sufficient to complex with existing Fe(III) after the reduction reaction. Therefore, the effect of thiocyanate concentration on the analytical sensitivity was studied over the range of 0.05 to 0.25 M. It was observed that absorbance increased with increasing thiocyanate concentration (Figure 4). Furthermore, at high concentrations of thiocyanate, the differences in absorbance of the blank solution and the 5 μ M of standard hydroquinone solution could be discerned. In this way, the sensitivity of the method was improved. Thiocyanate at concentration of 0.25 M was thus chosen.

Since the Fe(III) solution was prepared in a sulfuric acid medium, the influence of acid concentration on the hydroquinone detection was determined. The Fe(III) reagent was prepared in 0.01, 0.05 and 0.10 M sulfuric acid. Each solution was used for hydroquinone determination. It was found that concentration of acid negligibly affected the sensitivity of analysis. Therefore further experimentation was done with 0.10 M of sulfuric acid solutions.

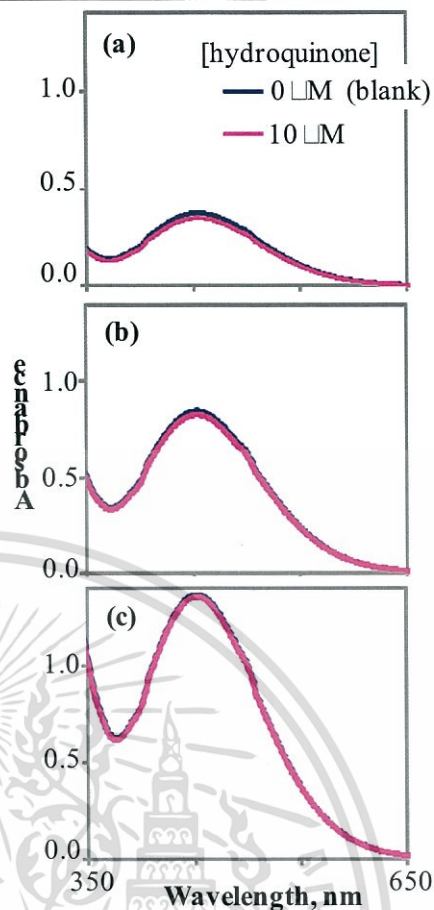


Figure 3. Absorption spectra of resultant Fe(III)-thiocyanate solutions at Fe(III) concentrations of (a-c) 0.01, 0.025 and 0.05 M.

In order to enhance the speed of reaction, vigorous agitation of the solution was done using a vortex mixer and compared to agitation done by hand. No differences were found between by these two agitation methods. Hence, agitation by hand was adopted.

Absorbance of Fe(III)-thiocyanate was recorded at 1, 3, 5 and 10 min after the reaction. Figure 5 reveals that the absorbance was constant after 5 min, indicating completion of the reaction. However, regarding routine analysis, in which presence of many suspected agents needs to be verified, short analysis times are desired. Therefore time required for absorbance measurement in the method of the current study was in 3 min.

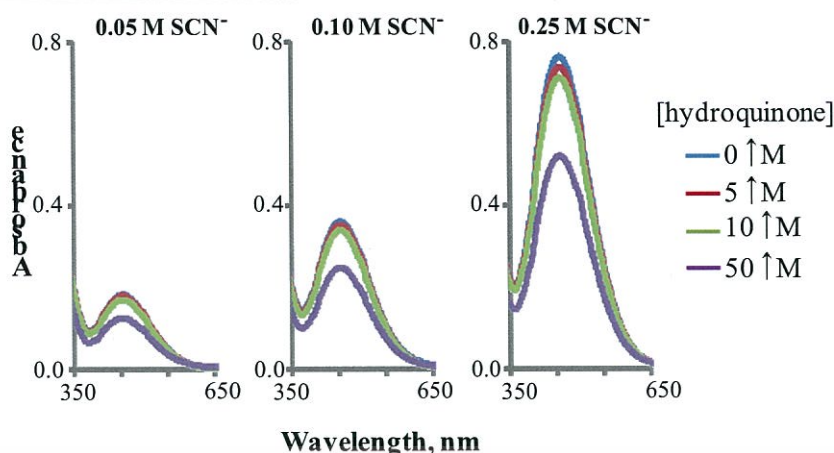


Figure 4. Effect of thiocyanate concentration on hydroquinone detection.

Table 1. Hydroquinone content in cosmetic creams measured by the Fe(III)-thiocyanate method using a spectrophotometer and PEDDs compared with the Fe(II)-phenanthroline method.

Sample	Added	[Hydroquinone], μM		
		Fe(III)-thiocyanate		Fe(II)-phenanthroline
		Spectrophotometer	PEDD	
A	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	57.2 ± 0.5	47.9 ± 3.0	52.1 ± 0.1
B	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	50.3 ± 1.6	60.5 ± 2.3	51.3 ± 0.1
C	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	50.7 ± 1.9	62.5 ± 2.3	52.7 ± 0.1
D	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	50.3 ± 1.2	58.5 ± 2.0	52.0 ± 0.1
E	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	53.7 ± 1.6	55.9 ± 2.1	51.9 ± 0.1
F	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	52.7 ± 2.0	53.2 ± 3.0	51.4 ± 0.04
G	-	n.d.	n.d.	n.d.
	50.0	52.0 ± 0.5	47.9 ± 2.4	52.2 ± 0.1
H	-	30.9 ± 0.8	29.3 ± 2.0	27.5 ± 0.1
	50.0	69.5 ± 1.3	87.0 ± 3.0	79.3 ± 0.03

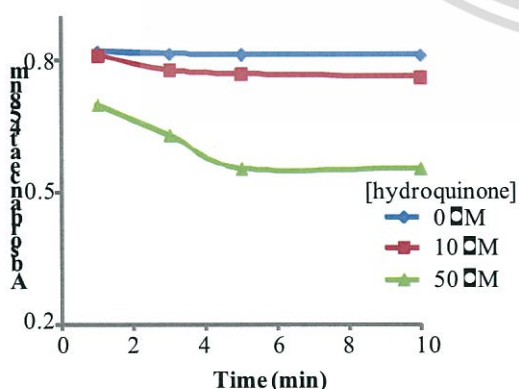


Figure 5. Absorbance of Fe(III)-thiocyanate complex versus reaction time.

3.4 Analytical performance

For the detection of hydroquinone using a bench top spectrophotometer, linear calibration was achieved over a range of 5 to 100 μM. The regression equation was:

$$\Delta\text{Abs} = (0.004 \pm 0.0001)[\text{hydroquinone}, \mu\text{M}] + (0.002 \pm 0.006), r^2 = 0.999$$

where ΔAbs is the absorbance of a blank solution subtracted from that of the hydroquinone solution. The relative

standard deviation (RSD) was 0.2% and the limit of detection (LOD), calculated as three times the standard deviation, was 0.6 μM . The LOD found in this work was lower than previously reported values.^{4,5}

Use of a simple PEDD was developed to meet the demand for a portable instrumental method for on-site screening of hydroquinone adulteration in lightening creams. This detector used the same protocol as for UV-visible detection. A linear relationship between hydroquinone concentration and output voltage was obtained over the range of 10 to 100 μM . The regression was:

$$\Delta E = (0.491 \pm 0.033)[\text{hydroquinone, } \mu\text{M}] + (1.148 \pm 2.116), r^2 = 0.999$$

ΔE is the difference in the potentials of the hydroquinone and blank solutions. The method provided good precision (%RSD = 0.1). The LOD was 8.5 μM of hydroquinone. Although the PEDD offers less sensitivity compared to the use of a commercial spectrophotometer, its sensitivity was great enough for screening hydroquinone content in cosmetics.

The method developed in the current showed good sensitivity in hydroquinone measurement. This method can be used for either laboratory or on-site analysis. Moreover, chemical costs for the current study are less than for the conventional method¹⁷ based on a Fe(II)-phenanthroline complex. The price of 1,10-phenanthroline monohydrate is about 1,186 USD/100g, while potassium thiocyanate is only 76 USD/100g (same grade and supplier). This indicates that the method of the current is study more economical even in routine work.

3.5 Interference study

The effects of common substances found in cosmetic creams were tested for possible interferences in the assay. A 50 μM of the tested substances were individually spiked into 50 μM of hydroquinone. One species was not

considered to interfere if it caused signal change less than $\pm 3\text{S.D}$. It was found that oxalic acid, tartaric acid, citric acid, salicylic acid, resorcinol and phenol did not interfere the analysis of hydroquinone. Particularly, resorcinol and phenol could be tolerated up to 500 and 1000 μM , respectively.

3.6 Analysis of hydroquinone in cosmetic creams

In the current study, UV-visible and PEDD detection were used to determine the hydroquinone contents in whitening creams. Samples A to G were analyzed as-prepared whereas sample H was dilute 145 times before analysis. The results are summarized in Table 1. Fortunately, seven of eight samples were hydroquinone-free. Sample H was contaminated with hydroquinone at a level of ~ 12 mg of hydroquinone per gram of cream. The conventional Fe(II)-phenanthroline method was used for validation of the UV-visible and PEDD detection methods of the current study. All samples were spiked with 50 μM of hydroquinone and then analyzed using the three methods. These three sets of results were statistically compared using one-way ANOVA. No differences at 95% significance level difference were determined between the methods ($F_{\text{observed}} = 0.41$, $F_{\text{critical}} = 3.55$). Additionally, recovery was studied. Acceptable recoveries were found in range of 77.3-114.4% and 95.8-125.0% for spectrophotometric analysis and PEDD methods, respectively. This indicates no interference by other cosmetic ingredients.

4. Conclusion

This work describes an indirect determination of hydroquinone based on the Fe(III)-thiocyanate reaction. The method developed in the current study provided simple and rapid detection of hydroquinone in cosmetics with sufficient sensitivity. The method can be done in either a laboratory using a bench-top

spectrophotometer or on-site with portable PEDDs. Reagents are of relatively low cost, minimizing the expense of analysis. Therefore, the method is viable for determining adulteration of cosmetics with hydroquinone.

Acknowledgement

This work was financial supported by the Faculty of Science, KMITL.

References

1. The impact of globalization in the industry of cosmetics; Maria, S. O.; Vlad, S.D. University of Oradea: Annals of Faculty of Economics, **2013**; pp 681-691.
2. <http://www.fda.moph.go.th/News52/PragadCosmetic16Feb52.pdf> (retrieved 3 June 2015).
3. http://www.fda.moph.go.th/.../671911792_ข่าวเตือนเครื่องสำอางห้ามใช้ (retrieved 3 June 2015).
4. Garcia, P. L.; Santoro, M. I. R. M.; Singh, A.K.; Kedor-Hackmann, E. R. M. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2007**, *43*, 397-404.
5. Elzanfaly, E. S.; Saad, A. S.; Abd – Elaleem, A. B. *Saudi Pharm. J.* **2012**, *20*, 249-253.
6. Gao, W.; Gray, N.; Heaton, J.; Smith, N. W.; Jia, Y.; Legido – Quigley, C. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 324-328.
7. Desmedt, B.; Rogiers, V.; Courselle, P.; De Beer, J. O.; De Paepe, K.; Deconinck, E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *83*, 82-88.
8. Desiderio, C.; Ossicini, L.; Fanali, S. *J. Chromatogr. A* **2000**, *887*, 489-496.
9. Wu, H.; Hu, J.; Li, H.; Li, H. *Sens. Actuators, B* **2013**, *182*, 802-808.
10. De Oliveira, I. R. W. Z.; De C. *Sens. Actuators, B* **2007**, *122*, 89-94.
11. Lau, K.; Baldwin, S.; O'Tool, M.; Shepherd, R.; Yerazunis, W. J.; Izuo, S.; Ueyama, S. Diamond, D. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *557*, 111-116.
12. Tymecki, L. Pokrzywnicka, M.; Koncki, R. *Analyst* **2008**, *133*, 1501-1504.
13. Tymecki, L.; Brodacka, L.; Rozum, B.; Koncki, R. *Analyst* **2009**, *134*, 1333-1337.
14. De Vargas-Sansalvador, I. M. P.; Fay, C.; Phelan, T.; Fernandez-Ramos, M. D.; Capitan-Vallvey, L. F.; Diamond, D.; Benito-Lopez, F. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *699*, 216-222.
15. Saetear, P.; Kharntau, K.; Ratanawimarnwong, N.; Sereenonchai, K.; Nacapricha, D. *Talanta* **2013**, *115*, 361-366.
16. Czugala, M.; Maher, D.; Collins, F.; Burger, R.; Hopfgartner, F.; Yang, Y.; Zhaou, J.; Ducree, J.; Smeaton, A.; Fraser, K. J.; Benito – Lopez, F. *RSC Advances* **2013**, *3*, 15928-15938.
17. Belcher, R.; Stephen, W. I. *Analyst* **1951**, *76*, 45-49.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจิตาพร สอนสะอาด
วัน เดือน ปีเกิด	6 มิถุนายน 2533
ที่อยู่ปัจจุบัน	58 หมู่ที่ 7 ตำบลทุ่งนาเลา อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ 36180 โทร 0972375017
ประวัติการศึกษา	2555 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ เกรดเฉลี่ย 3.46 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษา	ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	พ.ศ. 2556 มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ “S. Teerasong, T. Sonsa-Ard, C. Vimolkajana, N. Choengchan, A. Chompoosor, and D. Nacapricha, Colorimetric Sensor Using Silver Nanoparticles for Determination of Hydrogen Peroxide Based on a Flow Injection System, <i>Journal Nanoelectronics and Optoelectronics</i> , 8 (2013), 446 – 449.”
พ.ศ. 2556-2558	อาจารย์ผู้ช่วยสอนในรายวิชา ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ 1 และ 2
พ.ศ. 2558	นำเสนอผลงานวิจัย (Poster) ในงานประชุมวิชาการ paccon 2015 ในหัวข้อ “Development of Flow Injection System for The Spectrophotometric Determination of Hydroquinone in Cosmetics”
พ.ศ. 2559	นำเสนอผลงานวิจัย (Proceeding) ในงานประชุมวิชาการ paccon 2016 ในหัวข้อ “Indirect Measurement of Hydroquinone in Cosmetics based on Fe(III)-Thiocyanate Complexation Using Spectrophotometer and Paired Emitter Detector Diodes”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้