โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยแถบกระดาษทดสอบเปลี่ยนสี

Detection of Glucose in Urine by a Paper-Based Color Test-Strip

ชื่อนิสิต นายศตายุ นุ่นสวัสดิ์

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยแถบกระดาษทดสอบเปลี่ยนสี

Detection of Glucose in Urine by a Paper-Based Color Test-Strip

โดย

นายศตายุ นุ่นสวัสดิ์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง การตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยแถบกระดาษทดสอบเปลี่ยนสี

โดย นายศตายุ นุ่นสวัสดิ์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จูอนุวัฒนกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยแถบกระดาษทดสอบเปลี่ยนสี
ชื่อนิสิตในโครงการ นายศตายุ นุ่นสวัสดิ์ เลขประจำตัว 553 31514 23
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

ทำการเตรียมกระดาษทดสอบกลูโคสที่มีเคอร์คูมินและใช้ตรวจวัดกลูโคสในปัสสาวะโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีกลูโคสในปัสสาวะ ขั้นตอนการตรวจวัดใช้หลักการการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและกลูโคสออกซิเดส ซึ่งทำให้เกิดกรดกลูโคนิก และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จากนั้นเติมไอออน Fe^{2+} ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะออกซิไดส์ไอออน Fe^{2+} ไปเป็นไอออน Fe^{3+} เมื่อไอออน Fe^{3+} ทำปฏิกิริยากับเคอร์คูมินบนกระดาษทดสอบจะเกิดการเปลี่ยนสีของกระดาษทดสอบจากสีเหลืองของเคอร์คูมินเป็นสีน้ำตาลของสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} พัฒนาวิธีการตรวจสอบด้วยการทดสอบกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ กระดาษทดสอบให้สีที่แตกต่างกันเมื่อใช้ทดสอบกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ และกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในปัสสาวะจะสามารถมองเห็นการเปลี่ยนสีกระดาษทดสอบได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ ได้ใช้ความเข้มสีน้ำตาลมาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคสในปัสสาวะ ซึ่งมีช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0 ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.946 ในงานวิจัยนี้ ได้วิธีใหม่และง่ายสำหรับการตรวจวัดกลูโคสในปัสสาวะ

คำสำคัญ: กลูโคสออกซิเดส, เคอร์คูมิน, Fe^{3+}, กลูโคสในปัสสาวะ, กระดาษทดสอบ, เทคนิคการตรวจวัดโดยการเทียบสี

Title Detection of Glucose in Urine by a Paper-based Color Test-Strip

Student name Mr. Satayu Nunsawat ID 553 31514 23

Advisor name Assist. Prof. Dr. Fuangfa Unob

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2015

Abstract

A glucose test paper containing curcumin was prepared and used to detect glucose in urine by observing the change of color from yellow to brown when glucose is present. A procedure is based on the reaction between glucose and glucose oxidase that can produc e gluconic acid and hydrogen peroxide. Then ferrous ions were added and oxidized to ferric ions by hydrogen peroxide. When ferric ions interacted with curcumin on the test paper, the paper color changed from yellow color of curcumin to brown color of curcumin-Fe(III) complexes. The method was developed by testing the test papers with hydrogen peroxide and glucose of different concentrations. The test paper could give distinct color when used to test glucose in urine samples and a 0.5 mM level of glucose in urine could clearly detected by naked eyes. Furthermore, using an intensity of brown color, a calibration curve for the determination of glucose concentration in urine could be constructed with a linear range from 0 to 1.5 mM and the co-efficient of 0.946. In this work, a new and an easy method for glucose detection in urine was obtained.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Keyword: glucose oxidase, curcumin, Fe^{3+}, glucose in urine, test paper, colorimetric method

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินงานและการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในโครงการวิจัยนี้ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ มาโดยตลอด งานวิจัยและรายงานฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงได้ หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงการวิจัย ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จูอนุวัฒนกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ที่กรุณาตรวจสอบ แก้ไขและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายต่างๆ ในการดำเนินโครงการครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาวสุดธิดา รวมอร่าม และพี่ๆ ในหน่วยวิจัย Environmental Analysis Research Unit (EARU) ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจผู้วิจัยในการดำเนินโครงการวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ ครอบครัวของผู้ทำวิจัยที่คอยให้กำลังใจและการสนับสนุนตลอดการดำเนินโครงการให้ผ่านอุปสรรคต่างๆ จนสำเร็จลุล่วงตามที่ตั้งใจ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โรคเบาหวาน	3
2.2 การตรวจวัดกลูโคส	4
2.3 เทคนิคการตรวจวัดโดยการเทียบสี	6
2.4 เคอร์คูมิน	6
2.5 โหมดสี	8
2.5.1 โหมดสี RGB	8
2.5.2 โหมดระดับสีเทา	9
2.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด	10
2.6.1 ความเที่ยง	10

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.2 ความแม่น 11

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

บทที่ 3 การทดลอง 14

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 14

3.2 สารเคมี 15

3.3 การเตรียมสารละลาย 15

3.4 ขั้นตอนการทดลอง 17

3.4.1 การเตรียมกระดาษเคอร์คูมิน 17

3.4.2 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 18

3.4.3 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคส 23

3.4.4 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ 24

บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง 27

4.1 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 29

4.2 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคส 36

4.3 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ 40

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 45

ข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก 53

ประวัติผู้วิจัย 57

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้ของการวิเคราะห์สารตัวอย่าง 10
ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามมาตรฐาน AOAC INTERNATIONAL
ตารางที่ 2.2 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ยอมรับได้ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ 11
ความเข้มข้นแตกต่างกันตามมาตรฐาน AOAC INTERNATIONAL
ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 14
ตารางที่ 3.2 สารเคมี 15
ตารางที่ 3.3 การทดสอบการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินกับเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะ 25
ตารางที่ 4.1 สีของกระดาษเคอร์คูมินเมื่อทดสอบกับสารละลายที่เกี่ยวข้อง 29
ตารางที่ 4.2 สีของกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 3, 5 และ 7 มิลลิโมลาร์ 30
ตารางที่ 4.3 สีของกระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 32
ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้นต่างกัน
ตารางที่ 4.4 สีของกระดาษทดสอบเมื่อใช้เวลาในการเปลี่ยนสีต่างกัน 33
ตารางที่ 4.5 การทดสอบการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบ 34
สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์
ตารางที่ 4.6 ผลของปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสต่อสีกระดาษเคอร์คูมิน 37
ตารางที่ 4.7 การทดสอบการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส 38
ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมินกับเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะ 41
ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ช่วงความเข้มข้นกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะด้วยการเทียบสี 42
ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ และเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) 43

ตารางที่ 5.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลาย 45
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 2.0 มิลลิโมลาร์
ตารางที่ 5.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบ 46
สารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ขมิ้นและผงขมิ้น 6

รูปที่ 2.2 โครงสร้างเคอร์คูมิน ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน 7

รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคอร์คูมินในรูปคีโตนและรูปอีนอล 8

รูปที่ 2.4 โหมดสี RGB 8

รูปที่ 2.5 ภาพแสดงระดับสีเทา 9

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนภาพในโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา 20

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยนภาพในโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา 21

รูปที่ 3.3 ผลลัพธ์ของการเปลี่ยนภาพในโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา 21

รูปที่ 3.4 การเลือกพื้นที่ของแผ่นกระดาษทดสอบ 22

รูปที่ 3.5 การหาค่าความเข้มสีเทา 22

รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} 28

รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 35
และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจากภาพถ่ายของกระดาษทดสอบ

รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส 39
และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจากภาพถ่ายของกระดาษทดสอบ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

โรคเบาหวาน คือ สภาวะที่ร่างกายมีปริมาณน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ อันเนื่องมาจากฮอร์โมนอินซูลินมีไม่เพียงพอต่อการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน หรืออาจเกิดจากการทำงานผิดปกติของฮอร์โมนอินซูลิน[1,2,3]

โรคเบาหวานจัดอยู่ในกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases, NCDs) ซึ่งมักจะค่อยๆ แสดงอาการและความรุนแรงขึ้นทีละเล็กละน้อยหากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกวิธี และกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังนี้ยังจัดเป็นกลุ่มโรคที่ถือว่าเป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของประชากรในประเทศไทย[4] ผู้ป่วยโรคเบาหวานมักมีอาการปวดปัสสาวะบ่อย กระหายน้ำ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร และน้ำหนักตัวลดโดยไม่ทราบสาเหตุ เป็นต้น ซึ่งในผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานนั้นมักเกิดโรคแทรกซ้อนตามมาเนื่องจากโรคเบาหวาน เช่น ภาวะเลือดเป็นกรด เกิดแผลที่เท้า กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด สมองขาดเลือด และไตเสื่อม เป็นต้น[5]

ในปี พ.ศ. 2558 สหพันธ์เบาหวานนานาชาติ (International Diabetes Federation, IDF) มีการประมาณจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจากทั่วโลกสูงถึง 415 ล้านคน และจำนวนผู้ป่วยจะเพิ่มมากยิ่งขึ้นถึง 624 ล้านคน ภายในอีก 30 ปีข้างหน้า[6] ซึ่งการประมาณการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นมีโอกาสเกิดขึ้นจริงสูงเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ที่เคยระบุจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจากประชากรทั่วโลกไว้ที่ 347 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2551[7] นอกจากนี้ ยังมีรายงานจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานทั่วโลกภายในปี พ.ศ. 2558 สูงถึง 5 ล้านคน ในส่วนของประเทศไทยนั้นในปี พ.ศ. 2558 มีการรายงานจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งผู้ป่วยเก่าและผู้ป่วยใหม่ที่เพิ่มขึ้นมามากกว่า 4 ล้านคน จากจำนวนประชากรทั่วประเทศกว่า 65 ล้านคน[8] ซึ่งถือว่าเป็นตัวเลขที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับจำนวนประชากรทั้งหมดภายในประเทศ ดังนั้น การตระหนักและหันมาใส่ใจต่อสุขภาพให้ห่างไกลจากโรคเบาหวานจึงเป็นเรื่องสำคัญ

การวินิจฉัยโรคเบาหวานนั้นทำได้โดยการวิเคราะห์ทางตรงผ่านการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาปริมาณกลูโคสในกระแสเลือด[9-12] และทางอ้อมโดยการตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะ การตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในปัสสาวะนั้นเป็นที่นิยม เนื่องจากการทดสอบทำได้อย่างสะดวกและรวดเร็วจาก

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าส่วนใหญ่การตรวจวัดกลูโคสในปัสสาวะใช้แผ่นกระดาษทดสอบที่ได้จากการนำกระดาษไปชุบด้วยสารละลายผสมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และออโธโทลิดีน ซึ่งตรวจวัดกลูโคสในปัสสาวะโดยดูการเปลี่ยนสีของสารออโธโทลิดีนบนแผ่นกระดาษทดสอบ[13]

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยวิธีใหม่ สำหรับเป็นแนวทางเบื้องต้นในการตรวจสอบสุขภาพร่างกายของผู้ที่มีโอกาสเสี่ยงเป็นโรคเบาหวาน โดยการใช้กระดาษตรวจวัดที่เคลือบด้วยเคอร์คูมินเพื่อใช้ทดสอบหาปริมาณกลูโคส ซึ่งอาศัยการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินเมื่อตรวจพบกลูโคสในปัสสาวะ โดยให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของกลูโคสและกลูโคสออกซิเดส ไปออกซิไดส์ไอออน Fe^{2+} เป็นไอออน Fe^{3+} ซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเคอร์คูมินที่มีสีน้ำตาล กระดาษเคอร์คูมินจึงเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีกลูโคสในตัวอย่าง และยังสามารถระบุช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้โดยการสังเกตความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลงไปบนกระดาษเคอร์คูมินด้วยตาเปล่าและการใช้โปรแกรมหาความเข้มสี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

พัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในปัสสาวะโดยใช้กระดาษเคอร์คูมิน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

เริ่มต้นด้วยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมิน เมื่อใช้ทดสอบกับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยทำการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเข้มข้นข้นของเคอร์คูมินบนกระดาษกรอง ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมิน และความเข้มข้นของสารละลายโลหะไอออน Fe^{2+}

เมื่อได้ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมินจากการทดสอบกับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แล้ว นำวิธีการมาปรับใช้ในการทดสอบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส และตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะโดยเทียบสีกระดาษเคอร์คูมินที่ทดสอบในตัวอย่างปัสสาวะ กับสีกระดาษเคอร์คูมินที่ทดสอบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในปัสสาวะโดยใช้กระดาษเคอร์คูมิน

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน คือ ภาวะที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้นกว่าระดับปกติ อันเนื่องมาจากมีฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอต่อการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน หรืออาจเกิดจากการทำงานผิดปกติของฮอร์โมนอินซูลิน ถ้าระดับกลูโคสในพลาสมาสูงเกินค่า renal plasma threshold คือ 180 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ไตจะไม่สามารถดูดกลับกลูโคสได้หมดจึงเหลือออกมาทางปัสสาวะ โดยโรคเบาหวานสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่

โรคเบาหวานชนิดที่ 1 เกิดจากภูมิต้านทานของร่างกายทำลายเซลล์ที่สร้างอินซูลินในส่วนของตับอ่อนทำให้ร่างกายหยุดสร้างอินซูลิน หรือสร้างได้น้อยมาก ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จำเป็นต้องฉีดอินซูลิน เพื่อควบคุมน้ำตาลในเลือดระยะยาว

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคเบาหวานที่พบได้ส่วนใหญ่ ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงในการเกิดโรค แต่มีส่วนเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม มีความสัมพันธ์กับภาวะน้ำหนักตัวมาก และการขาดการออกกำลังกาย นอกจากนี้ ผู้สูงอายุอาจมีการทำงานผิดปกติของอินซูลิน เนื่องจากร่างกายมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้เซลล์ที่สร้างอินซูลินค่อยๆ ถูกทำลายไป แนวทางการรักษาอาจจะใช้ยาในการรับประทาน และบางรายต้องใช้อินซูลินชนิดฉีดเพื่อควบคุมน้ำตาลในเลือด[17]

การวินิจฉัยโรคเบาหวานนั้นทำได้โดยการวิเคราะห์ทางตรงผ่านการเจาะเลือด เพื่อตรวจหาปริมาณกลูโคสในกระแสเลือด และทางอ้อมโดยการตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะ การตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะนั้นเป็นที่นิยม เนื่องจากทำการทดสอบได้สะดวกและรวดเร็ว โดยการตรวจด้วยแผ่นกระดาษทดสอบปัสสาวะ โดยคนปกติทั่วไปจะมีระดับกลูโคสในปัสสาวะไม่เกิน 1.1 มิลลิโมลาร์ ส่วนผู้ที่เสี่ยงในการเป็นโรคเบาหวานจะมีระดับกลูโคสในปัสสาวะอยู่ในช่วง 1.1 ถึง 1.4 มิลลิโมลาร์ และคนที่เป็นโรคเบาหวานนั้นจะมีปริมาณกลูโคสในปัสสาวะมากกว่า 1.4 มิลลิโมลาร์[18,19]

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การตรวจวัดกลูโคส

การตรวจวัดกลูโคสโดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) และเฮกโซไคเนส (hexokinase) โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสมากกว่าเอนไซม์เฮกโซไคเนส เมื่อกลูโคสเกิดปฏิกิริยากับกลูโคสออกซิเดสจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดกลูโคนิก และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่ดีจึงถูกนำไปใช้ทำปฏิกิริยาต่อเพื่อตรวจวัดปริมาณที่เกิดขึ้นและคำนวณกลับเป็นปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง[20]

การตรวจวัดโดยการเทียบสีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ตรวจวัดกลูโคส เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทดสอบง่ายและรวดเร็วต่อการวิเคราะห์ การตรวจวัดกลูโคสโดยทั่วไปมักจะใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และสารเคมีบางชนิดที่สามารถเกิดสีได้ เช่น ออโธไดอะนิซิดีน (*o*-dianisidine) ในกรดซัลฟิวริก และออโธโทลิดีน (*o*-tolidine) โดยได้แสดงตัวอย่างขั้นตอนการตรวจวัดกลูโคสโดยใช้กลูโคสออกซิเดสร่วมกับเปอร์ออกซิเดส และออโธไดอะนิซิดีน (*o*-dianisidine) ในกรดซัลฟิวริก ดังต่อไปนี้[21]

ขั้นตอนที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและกลูโคสออกซิเดส

$$\text{D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{D-Gluconic acid} + H_2O_2 \qquad (1)$$

ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และเปอร์ออกซิเดส

$$H_2O_2 + \underset{\text{(Colorless)}}{\text{Reduced } o\text{-dianisidine}} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \underset{\text{(Brown)}}{\text{Oxidized } o\text{-dianisidine}} \qquad (2)$$

ขั้นตอนที่ 3 เติมกรดซัลฟิวริก

$$\underset{\text{(Brown)}}{\text{Oxidized } o\text{-dianisidine}} \xrightarrow{H_2SO_4} \underset{\text{(Pink)}}{\text{Oxidized } o\text{-dianisidine}} \qquad (3)$$

ในงานวิจัยนี้สนใจตรวจวัดกลูโคสโดยใช้กลูโคสออกซิเดสในการสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นไปออกซิไดซ์ ไอออน Fe^{2+} ให้เปลี่ยนเป็น ไอออน Fe^{3+} แทนการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเรียกปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้ว่า ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton's reaction) และใช้เคอร์คูมินเป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี โดยเคอร์คูมินเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออน Fe^{3+} จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล[46] จึงสามารถนำเคอร์คูมินมาใช้การตรวจวัดกลูโคสได้

ขั้นตอนที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและกลูโคสออกซิเดส

$$\text{D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{D-Gluconic acid} + H_2O_2 \qquad (1)$$

ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton's reaction)

$$2H^+(aq) + H_2O_2(aq) + 2Fe^{2+}(aq) \longrightarrow 2Fe^{3+}(aq) + 2H_2O(l) \qquad (4)$$

ขั้นตอนที่ 3 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+}

$$\underset{\text{(Yellow)}}{\text{Curcumin} + Fe^{3+}} \longrightarrow \underset{\text{(Brown)}}{\text{Curcumin-Fe complex}} \qquad (5)$$

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 เทคนิคการตรวจวัดโดยการเทียบสี[22]

เทคนิคการตรวจวัดโดยการเทียบสี (colorimetric method) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการระบุความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัดโดยอาศัยสารที่ก่อให้เกิดสี ความเข้มสีจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยสามารถเทียบกับสารมาตรฐานของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับการตรวจวัดนั้นสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงได้โดยการใช้เทคนิคสเปกโตรเมตรี หรือสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่าซึ่งเป็นที่นิยมมากกว่า เนื่องจากทำได้สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์

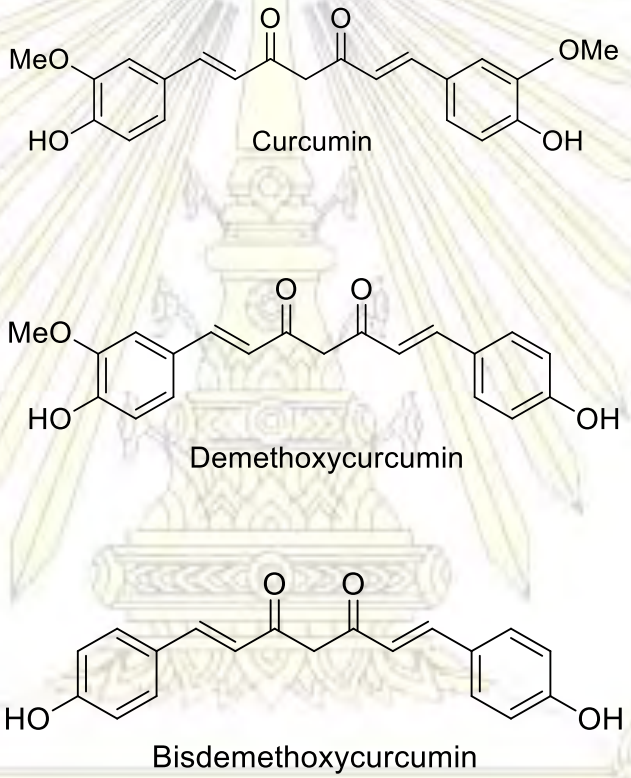
2.4 เคอร์คูมิน

รูปที่ 2.1 ขมิ้นและผงขมิ้น

ขมิ้นจัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกันกับขิง ข่า และกระวาน จัดอยู่ในสกุล *Curcuma longa* เป็นพืชชนิดที่มีเหง้าอยู่ใต้ดิน ขมิ้นถูกนำมาใช้ประโยชน์มาช้านานโดยเริ่มแรกนั้นใช้ผสมในอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติและถนอมอาหารให้เก็บไว้ได้นาน โดยขมิ้นเจริญเติบโตได้ดีในประเทศเขตอบอุ่น ได้แก่ อินเดีย จีน อินโดนีเซีย เป็นต้น[23]

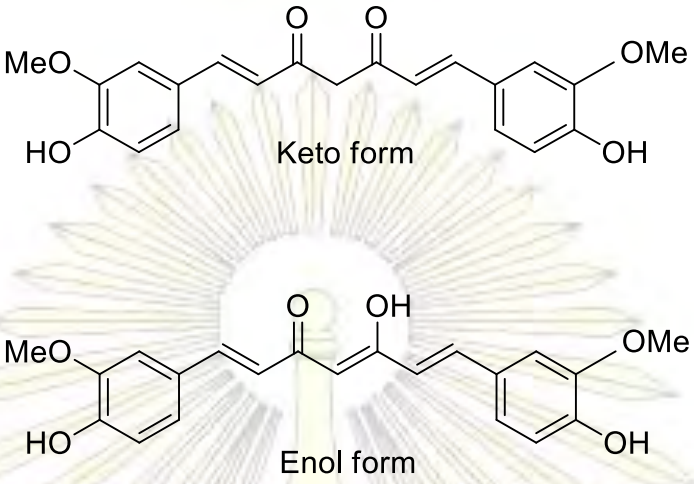
สารที่ให้สีเหลืองในขมิ้นคือ สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoid) ซึ่งประกอบด้วยสารหลัก 3 ชนิด คือ เคอร์คูมิน (curcumin) ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และบิสดีเมท็อกซี่เคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ทั่วไปจะมีส่วนผสมของเคอร์คูมินประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์ ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน 17 เปอร์เซ็นต์ และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมินประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์[24] โครงสร้างของสารทั้งสามชนิดแสดงในรูปที่ 2.2

โครงสร้างของเคอร์คูมินสามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่มีหมู่ฟังก์ชันคีโตน (keto form) หรือ อยู่ในรูปที่มีหมู่ฟังก์ชันอีนอล (enol form) เมื่ออยู่ในสารละลายกรด หรือ เบส ตามลำดับ[25-27](รูป 2.3) ในปัจจุบันเคอร์คูมินถูกนำมาใช้ประโยชน์มากในทางการแพทย์ ได้แก่ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารช่วยป้องกันมะเร็ง สารช่วยป้องกันโรคสมองเสื่อม เป็นต้น[28-30] นอกจากนี้ เคอร์คูมินยังถูกนำมาใช้เป็นสารคีเลตสำหรับจับกับโลหะไอออน ได้แก่ Pb^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} เป็นต้น[31,32]



รูปที่ 2.2 โครงสร้างเคอร์คูมิน ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคอร์คูมินในรูปคีโตนและรูปอีนอล

สมบัติของเคอร์คูมิน[33]

สูตรโมเลกุล: $C_{21}H_{20}O_6$

มวลโมเลกุล: 368.39 กรัมต่อโมล

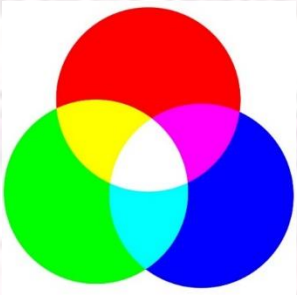
ลักษณะทางกายภาพ: สีเหลืองอมส้ม

จุดหลอมเหลว: 183 องศาเซลเซียส

2.5 โหมดสี [34,35]

โหมดสี (color mode) คือ รูปแบบของสีต่างๆ ในโปรแกรมที่ผู้ใช้สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับรูปภาพที่จะนำไปใช้งาน เช่น โหมดสี RGB และ โหมดระดับสีเทา (grayscale)

2.5.1 โหมดสี RGB



รูปที่ 2.4 โหมดสี RGB

โหมดสี RGB ประกอบด้วยสีสามสี คือ สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน ดังรูปที่ 2.4 โดยแต่ละสีจะไล่ได้ 256 ระดับ โดยใช้หลักการการรวมแสงสี ซึ่งสามารถสร้างสีได้สูงสุด 16.7 ล้านสี ระบบสี RGB เป็นระบบสีของแสง ซึ่งเกิดจากการหักเหของแสงผ่านแท่งแก้วปริซึม จะเกิดแถบสีที่เรียกว่า สีรุ้ง (spectrum) ซึ่งแยกสีตามที่สายตามองเห็นได้ 7 สี คือ แดง แสด เหลือง เขียว น้ำเงิน คราม ม่วง ส่วนใหญ่การใช้สีลักษณะนี้จะใช้ในอุปกรณ์ที่เกี่ยวกับแสง ได้แก่ จอภาพ กล้องดิจิตอล เป็นต้น

2.5.2 โหมดระดับสีเทา

รูปที่ 2.5 ภาพแสดงระดับสีเทา

ภาพระดับสีเทา (Grayscale Image) จัดเป็นโหมดสีที่มีเพียงสองสีคือ สีขาว และสีดำ แต่จะมีระดับความเข้มของสีดำ 255 ระดับรวมกับสีขาวอีกหนึ่งสี ทำให้โหมดสีนี้จะมีเพียง 256 สี ภาพระดับสีเทาจะมีการไล่ระดับความอ่อนแก่ของสีอยู่ระหว่างสีขาวและสีดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.5

การใช้งานโหมดสีเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ ในส่วนของการหาค่าความเข้มสีของภาพถ่ายกระดาษเคอร์คูมิน เมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออน Fe^{3+} โดยการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล โดยสีน้ำตาลจะมีความเข้มสีเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีปริมาณกลูโคสมากขึ้น และเนื่องจากสีเหลืองและสีน้ำตาลอยู่กันคนละเฉดสี เพื่อให้การเปรียบเทียบความเข้มสีมีความถูกต้องมากที่สุด จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนภาพจากโหมดสี RGB ให้เป็นภาพในโหมดสีเทาด้วยโปรแกรมที่ใช้กับการจัดการรูปภาพ เช่น โปรแกรม ImageJ

2.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด[36]

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด (method validation) เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีตรวจวัดเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ช่วยให้ทราบถึงสมบัติเงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ

2.6.1 ความเที่ยง

ความเที่ยง (precision) หมายถึง ความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์เดิมซ้ำกันหลายครั้ง โดยการกระจายตัวของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ มักแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) หรือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ระดับความเที่ยงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยสามารถหาระดับความเที่ยงโดยพิจารณาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD)

ตารางที่ 2.1 ค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ตามมาตรฐาน AOAC INTERNATIONAL[37]

Analyte [%]	Analyte ratio	Unit	RSD [%]
100	1	100%	1.3
10	10^{-1}	10%	2.8
1	10^{-2}	1%	2.7
0.1	10^{-3}	0.1%	3.7
0.01	10^{-4}	100 ppm	5.3
0.001	10^{-5}	10 ppm	7.3
0.0001	10^{-6}	1 ppm	11
0.00001	10^{-7}	100 ppb	15
0.000001	10^{-8}	10 ppb	21
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.2 ความแม่น

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) หมายถึง การวิเคราะห์ที่ได้ค่าผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง หากผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าจริงมาก แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องสูง (high accuracy) แต่ถ้าผลการวิเคราะห์ที่ได้ห่างไกลจากค่าจริง แสดงว่าการทดสอบนั้นมีความถูกต้องต่ำ (low accuracy) โดยวิธีหนึ่งในการตรวจสอบความแม่นของวิธีการวิเคราะห์ คือ การหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้สารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ในปริมาณที่แน่นอนลงไป ซึ่งมีข้อจำกัด คือ ความแม่นที่ตรวจเช็คได้นั้นครอบคลุมเฉพาะขั้นตอนที่วิเคราะห์ spiked sample เท่านั้น การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ แสดงดังต่อไปนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{ค่าจากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน}) - (\text{ค่าจากตัวอย่างที่ไม่เติม}) \times 100}{(\text{ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม})}$$

ตารางที่ 2.2 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ยอมรับได้ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามมาตรฐาน AOAC INTERNATIONAL[37]

Analyte [%]	Analyte ratio	Unit	Mean recovery [%]
100	1	100%	98-102
≥10	10^{-1}	10%	98-102
≥1	10^{-2}	1%	97-103
≥0.1	10^{-3}	0.1%	95-105
0.01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0.001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0.0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0.00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0.000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวัดปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยแผ่นกระดาษทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรคเบาหวานโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสนั้นเริ่มต้นศึกษาเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1956 โดยใช้แผ่นกระดาษทดสอบปัสสาวะที่สามารถเปลี่ยนสีเมื่อตรวจพบกลูโคส แผ่นกระดาษทดสอบนี้เตรียมได้จากสารละลายผสมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และสารที่ทำให้เกิดสี ได้แก่ ออโธโทลิดีน (*o*-tolidine) และทาร์ทราซิน (tartrazine) โดยปรับ pH สารละลายผสมเป็น pH 5 เมื่อนำไปทดสอบปัสสาวะแผ่นกระดาษทดสอบจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงินหากมีกลูโคสในปัสสาวะ ความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงขึ้นกับความเข้มข้นของกลูโคสในปัสสาวะ[13,14] ต่อมาได้มีการปรับปรุงวิธีการตรวจวัดกลูโคส เนื่องจากในปัสสาวะมีสารบางชนิดยับยั้งการทำงานของกลูโคสออกซิเดส ได้แก่ กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) และกรดยูริก (uric acid) โดยใช้ถ่านกัมมันต์ผสมกับปัสสาวะเพื่อกำจัดตัวยับยั้ง[15,16]

นอกจากวิธีการตรวจวัดกลูโคสด้วยแผ่นกระดาษทดสอบแล้ว ยังมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ในการตรวจวัดกลูโคส เช่น การใช้วิธีตรวจวัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยการใช้อนุภาคนาโนของทองคำร่วมกับไคโตซานสำหรับทำเป็นแผ่นฟิล์มบรรจุกลูโคสออกซิเดสแล้วนำไปตรึงบนผิวของขั้วไฟฟ้า[38] การนำอนุภาคนาโนของแพลทินัม และอนุภาคนาโนของเงินมาใช้ร่วมกับไคโตซานและท่อนาโนคาร์บอนสำหรับทำเป็นแผ่นฟิล์มบรรจุกลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส และนำไปตรึงบนผิวของขั้วไฟฟ้า[39,40] นอกจากนี้ ยังมีการตรวจวัดกลูโคสโดยเทคนิคการเปลี่ยนสี เช่น การใช้กลูโคสออกซิเดสที่ถูกตรึงกับอนุภาคนาโนทองคำที่ดัดแปรด้วยหมู่ไทออล โดยเมื่อมีปริมาณกลูโคสมากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีแดงไปเป็นสีน้ำเงิน[41] และการใช้อนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนของ $ZnFe_2O_4$ ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส และ 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนของ $ZnFe_2O_4$ แทนการใช้เปอร์ออกซิเดส เนื่องจากตรวจพบว่าอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนของ $ZnFe_2O_4$ สามารถทำงานได้เหมือนเปอร์ออกซิเดส โดยการเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสีฟ้าเมื่อตรวจพบกลูโคส[42]

ในงานวิจัยนี้ สนใจศึกษาการตรวจวัดกลูโคส โดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และปฏิกิริยาเฟนตันของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ร่วมกับการใช้สารประกอบเคอร์คูมินเพื่อตรวจวัด Fe^{3+} ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

มีการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของไอออน Fe^{3+} และเคอร์คูมิน ทำให้ทราบว่ารูปแบบการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไอออน Fe^{3+} และเคอร์คูมิน คือ $[FeH_2CU(OH_2)]$ โดยที่ $H_2CU(OH_2)$ แทนเคอร์คูมิน และจากข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ทำให้ทราบว่าที่ตำแหน่งเบตาไดคีโตนของเคอร์คูมินเกี่ยวข้องกับการจับไอออนของเหล็ก[43] ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 ได้มีการสังเคราะห์และตรวจสอบสมบัติของสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} โดยใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิ

เบิลสเปกโทรสโกปี และเทคนิค Mössbauer ซึ่งจากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าไอออน Fe^{3+} เกิดสารประกอบเชิงซ้อนในรูปแบบออกตะฮีดรัล และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไอออน Fe^{3+} ไปเป็นไอออน Fe^{2+} เมื่อ Fe^{3+} อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับเคอร์คูมิน[44] ซึ่งต่างจากที่เคยมีการรายงานไว้เมื่อปี ค.ศ. 1992 ว่าเคอร์คูมินสามารถรีดิวซ์ไอออน Fe^{3+} เป็นไอออน Fe^{2+} ได้[45]

ในปี ค.ศ. 2014 มีการศึกษาการตรวจวัดไอออน Fe^{3+} ด้วยตาเปล่าด้วยใช้แผ่นตรวจวัดที่ได้จากซีน (zein) ผสมกับเคอร์คูมิน เมื่อจุ่มลงในสารละลายไอออน Fe^{3+} พบว่าแผ่นตรวจวัดเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเกิดสารเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} และทำการศึกษาผลของ pH กับการรบกวนของไอออนชนิดอื่น ได้แก่ Ag^{+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+} และ As^{5+} พบว่าที่ pH 2 ไม่เกิดการรบกวนของไอออนชนิดอื่น ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายไอออน Fe^{3+} ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของแผ่นตรวจวัดด้วยตาเปล่าเท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร[46]

จากงานวิจัยข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวัดกลูโคสในปัสสาวะโดยใช้กลูโคสออกซิเดส และพัฒนากระดาษทดสอบเปลี่ยนสีเคอร์คูมิน โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเมื่อตรวจพบกลูโคส

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ	ยี่ห้อ/รุ่น
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Denver Instrument
เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง	Mettler Toledo
กระดาษกรอง เบอร์ 1	Whatman
บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร	Pyrex, Duran
ขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50 และ 200 มิลลิลิตร	Pyrex
ถาดหลุมทดสอบ	-
นาฬิกาจับเวลา	-
กล่องควบคุมแสง	-
เครื่องวัด pH	Mettler Toledo
ไมโครปิเปต ขนาด 10, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร	Transferpette
สมาร์ทโฟน	iPhone 5s
คอมพิวเตอร์ พร้อมโปรแกรม ImageJ	Asus

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

ตารางที่ 3.2 สารเคมี

สารเคมี	ผู้จัดจำหน่าย
เคอร์คูมิน (curcumin)	Sigma-Aldrich
เอทานอล (ethanol)	Merck Millipore
แอมโมเนียมเฟอรัสซัลเฟต (ammonium ferrous sulfate hexahydrate)	RANKEM
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide 30%)	Merck Millipore
กลูโคส (glucose)	Sigma-Aldrich
กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase from *Aspergillus niger*)	Sigma-Aldrich
กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid fuming 37%)	Merck Millipore
กรดแอซีติก (acetic acid (glacial) 100%)	Merck Millipore
โซเดียมแอซีเทตแอนไฮดรัส (sodium acetate anhydrous)	CARLO ERBA
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	Sigma-Aldrich
เฟอร์ริกคลอไรด์ (iron(III) chloride)	CARLO ERBA

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 3, 5 และ 7 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยชั่งเคอร์คูมิน 12.8 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล และเตรียมสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิโมลาร์ ด้วยการเจือจางสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ด้วยเอทานอล

3.3.2 สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากการปิเปตสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.02 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากการปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากการปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากการปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยการตวงสารละลายกรดไฮโดร คลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยการตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.4 สารละลายไอออน Fe^{3+} ความเข้มข้น 6.0 มิลลิโมลาร์

ชั่งเฟอร์ริคคลอไรด์ 24.3 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

3.3.5 สารละลายโลหะไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 6.0 มิลลิโมลาร์

ชั่งแอมโมเนียมเฟอรัสซัลเฟตให้ได้น้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 0.11 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

3.3.6 สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคสให้ทราบน้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 2.252 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยการปิเปตจากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจาก

ไอออน จากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากการเจือจางสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.7 สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 5.1

เตรียมสารละลายโซเดียมแอซีเทต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมแอซีเทต ประมาณ 8.2 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากการเจือจางกรดแอซีติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ pH 5.1 จากการผสมสารละลายโซเดียมแอซีเทต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 74.5 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายกรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25.5 มิลลิลิตร

3.3.8 สารละลายกลูโคสออกซิเดส

ชั่งกลูโคสออกซิเดส 15.0 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.4 ขั้นตอนการทดลอง

3.4.1 การเตรียมกระดาษเคอร์คูมิน

1. ตัดกระดาษกรอง โดยใช้ที่เจาะกระดาษรูปวงกลม
2. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร หยดสารละลายเคอร์คูมินแต่ละความเข้มข้น (3, 5 และ 7 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองที่ตัดเตรียมไว้แล้ว
3. รอประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้กระดาษที่หยดด้วยสารละลายเคอร์คูมินแห้งพอดี จากนั้นบรรจุลงถุงซิปพลาสติกเก็บไว้พร้อมใช้งาน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

3.4.2.1 การศึกษาการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน

1. ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายไอออน Fe^{3+} ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมทดสอบ
2. จุ่มกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมิน ที่เวลา 3 นาที

3.4.2.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเคอร์คูมินในการเตรียมกระดาษทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมทดสอบ
2. เติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงผสมกับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น เขย่าให้เกิดปฏิกิริยา
3. จุ่มกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายไอออน Fe^{2+} กับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น แช่ไว้เป็นเวลา 3 นาที
4. นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และถ่ายรูปกระดาษ เคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์ โดยควบคุมระยะห่างระหว่างกระดาษและกล้องโทรศัพท์ให้คงที่เสมอ
5. ทำซ้ำ แต่เปลี่ยนเป็นใช้กระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 และ 7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

3.4.2.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออน Fe^{2+} ต่อความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

1. ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมทดสอบ

2. เติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น และเขย่าให้เกิดปฏิกิริยา
3. จุ่มกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายไอออน Fe^{2+} กับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น เป็นเวลา 3 นาที
4. นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น และถ่ายรูปกระดาษเคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์
5. ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายไอออน Fe^{2+} จาก 1.5 มิลลิโมลาร์ เป็น 0.6, 3.0 และ 4.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

3.4.2.4 การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

1. ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมทดสอบ
2. เติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น และเขย่าให้เกิดปฏิกิริยา
3. จุ่มกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ลงในสารละลายผสมระหว่างสารละลายไอออน Fe^{2+} กับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น เป็นเวลา 3 นาที
4. นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และถ่ายรูปกระดาษเคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์
5. ทำซ้ำ โดยเปลี่ยนเวลาในการจุ่มกระดาษเคอร์คูมินจาก 3 นาที เป็น 2 นาที

3.4.2.5 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

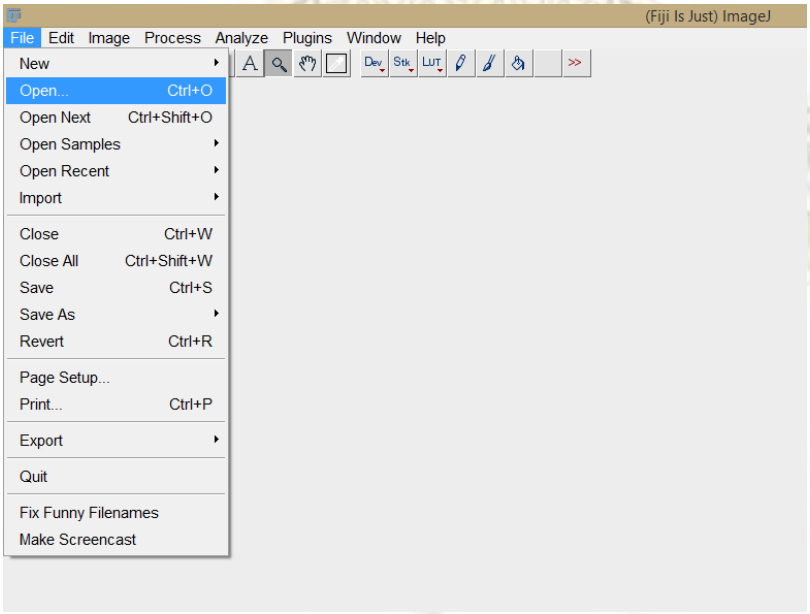
1. ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมทดสอบ
2. เติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น และเขย่าให้เกิดปฏิกิริยา

3. จุ่มกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลายผสมระหว่างสารละลายไอออน Fe^{2+} กับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น เป็นเวลา 2 นาที
4. นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และถ่ายรูปกระดาษ เคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์
5. ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.4.2.6 สร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

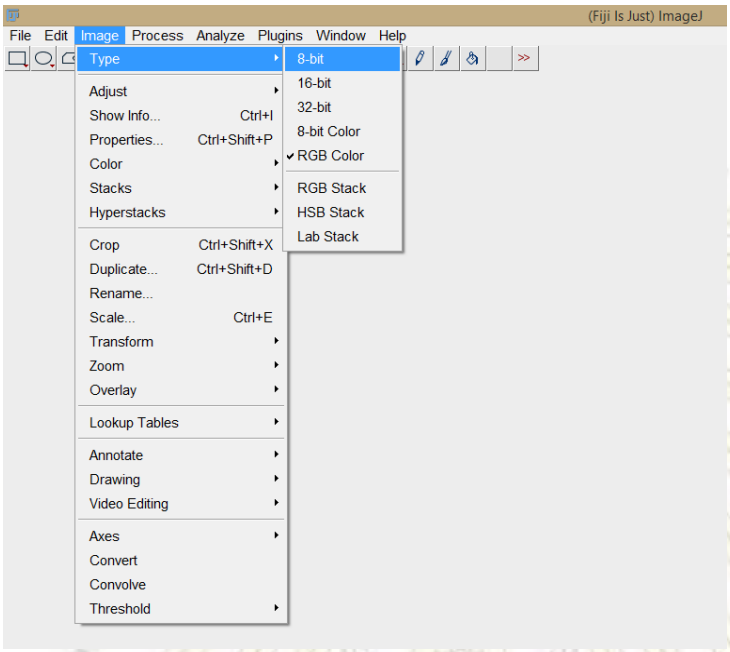
นำภาพถ่ายของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ไปหาความเข้มสี โดยเปลี่ยนโหมดสีของภาพเป็นโหมดภาพสีเทาด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วหาค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย (mean gray value) ของกระดาษทดสอบแต่ละชุด สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย ซึ่งเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ การหาค่าความเข้มสีเทาด้วยโปรแกรม ImageJ ทำตามขั้นตอนได้ดังนี้

1. เปิดโปรแกรม ImageJ ⟶ กด Open เลือกภาพที่ต้องการ



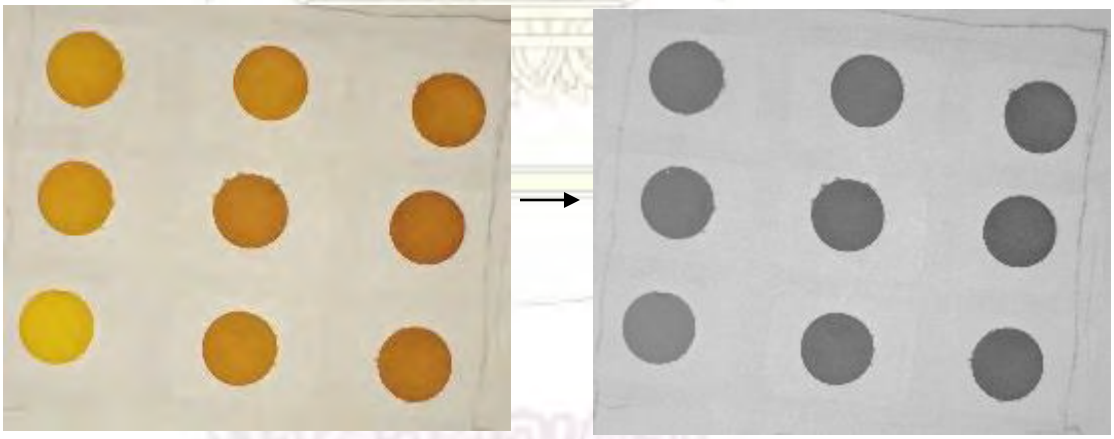
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนภาพในโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา

2. จากนั้น กด Image ⟶ เลือก Type ⟶ เลือก 8-bit



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยนภาพในโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา

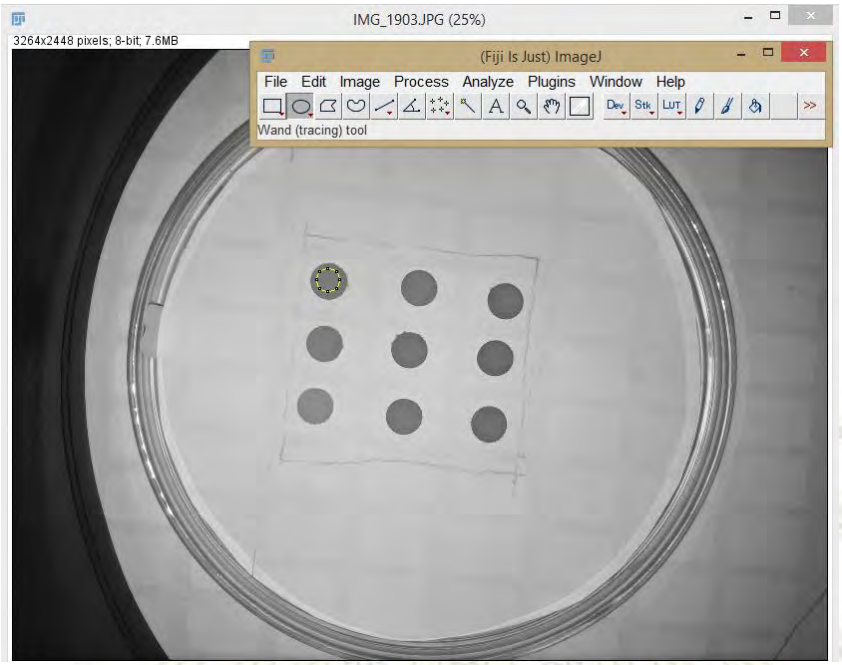
3. ภาพจะเปลี่ยนจากโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา



รูปที่ 3.3 ผลลัพธ์ของการเปลี่ยนภาพในโหมดสี RGB เป็นโหมดระดับสีเทา

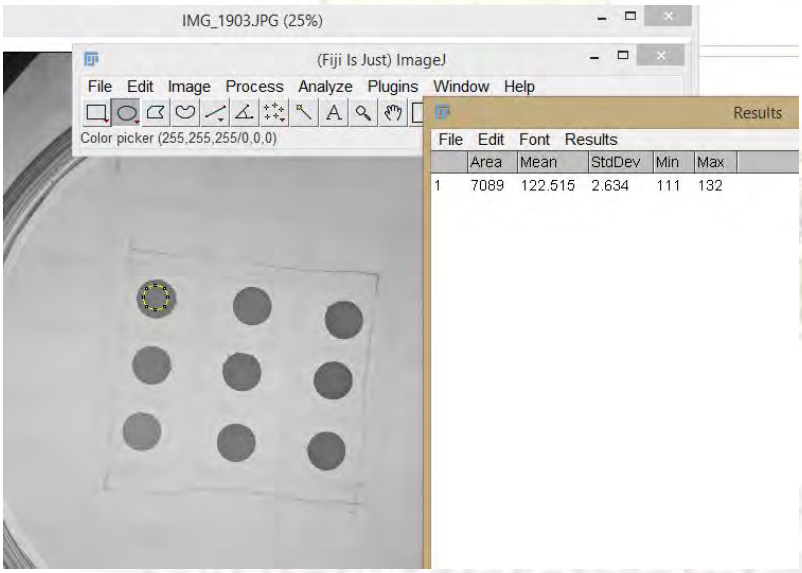
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. กดที่รูปวงกลมของโปรแกรม แล้วเลือกพื้นที่ของแผ่นกระดาษทดสอบ



รูปที่ 3.4 การเลือกพื้นที่ของแผ่นกระดาษทดสอบ

5. กด ctrl + M เพื่อหาค่าความเข้มสีเทา



รูปที่ 3.5 การหาค่าความเข้มสีเทา

3.4.3 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคส

3.4.3.1 การศึกษาผลของปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสต่อการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวดทดสอบ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นผสมและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสออกซิเดสและกลูโคสเป็นเวลา 15 นาที
2. ปิเปตสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 50, 250, 500 และ 1000 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมทดสอบ แล้วเติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุมทดสอบ และเขย่าให้เกิดปฏิกิริยา
3. จุ่มกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ลงในสารละลายผสมเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตและถ่ายรูปกระดาษเคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์

3.4.3.2 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละขวดทดสอบ เติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซิเทต-กรดแอซีติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในแต่ละขวดทดสอบ ผสมให้เข้ากัน
2. ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสออกซิเดส และกลูโคส เป็นเวลา 15 นาที
3. ปิเปตสารละลายผสมจากแต่ละขวดทดสอบ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมทดสอบ แล้วเติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นจุ่มกระดาษเคอร์คูมินลงในสารละลายผสม เป็นเวลา 2 นาที
4. นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตและถ่ายรูปกระดาษเคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์
5. ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.4.3.3 สร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์กลูโคสจากความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

นำภาพถ่ายกระดาษเคอร์คูมินที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ไปหาความเข้มสี โดยเปลี่ยนโหมดสีของภาพเป็นโหมดภาพสีเทาด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วหาค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย (mean gray value) ของกระดาษทดสอบแต่ละชุด สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสและค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย ซึ่งเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

3.4.4 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ

การทดสอบหากลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะจะใช้วิธีการทดสอบแบบเดียวกันกับการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรตัวอย่างปัสสาวะ : สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก : กลูโคสออกซิเดส เท่ากับ 50 : 10 : 1 โดยในการทดลองนี้ใช้ ตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

3.4.4.1 การศึกษาผลของเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะต่อการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน

1. เตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส (spiked sample) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
2. ทำการทดสอบตามลำดับที่ 1 ถึง 5 ดังตารางที่ 3.3 โดย

การทดสอบที่ 1 เติมตัวอย่างปัสสาวะที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสแทนตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

การทดสอบที่ 3 เติมน้ำปราศจากไอออน 10 ไมโครลิตร แทนกลูโคสออกซิเดส

การทดสอบที่ 4 เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายไอออน Fe^{2+}

การทดสอบที่ 5 เติมน้ำปราศจากไอออน 10 ไมโครลิตร แทนกลูโคสออกซิเดส เติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลาย Fe^{2+}

ตารางที่ 3.3 การทดสอบการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินกับเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะ

การทดสอบที่	ปัสสาวะที่เติมกลูโคส 500 ไมโครลิตร	บัฟเฟอร์* 100 ไมโครลิตร	กลูโคสออกซิเดส 10 ไมโครลิตร	หลัง 15 นาที ปิเปตสารละลายผสม 500 ไมโครลิตร	สารละลาย Fe^{2+} 1 มิลลิลิตร
1	-	เติม	เติม		เติม
2	เติม	เติม	เติม		เติม
3	เติม	เติม	-		เติม
4	เติม	เติม	เติม		-
5	เติม	เติม	-		-

หมายเหตุ: * สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก

3. จุ่มกระดาษเคอร์คูมินลงในสารละลายผสมแต่ละการทดสอบเป็นเวลา 2 นาที นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตและถ่ายรูปกระดาษเคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์

3.4.4.2 การศึกษาความแม่นของการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ

1. เตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมด้วยสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ
2. ปิเปตปริมาตร 500 ไมโครลิตร ของปัสสาวะตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ปัสสาวะตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ลงในขวดทดสอบ ตามลำดับ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก 100 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละขวดทดสอบ เขย่าให้สารผสมเข้ากันและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที
3. ปิเปตสารละลายผสมแต่ละขวดทดสอบปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมทดสอบ เติมสารละลายไอออน Fe^{2+} ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เกิดปฏิกิริยาและจุ่มกระดาษเคอร์คูมินลงในสารละลายผสมเป็นเวลา 2 นาที
4. นำกระดาษเคอร์คูมินขึ้นมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู สังเกตและถ่ายรูปกระดาษเคอร์คูมินในกล่องควบคุมแสงโดยใช้แสงแฟลชจากกล้องโทรศัพท์
5. ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

6. นำภาพถ่ายที่ได้ไปหาความเข้มสีในโหมดภาพสีเทาด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วนำค่าที่วัดได้ไปหาค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
7. คำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ และการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ

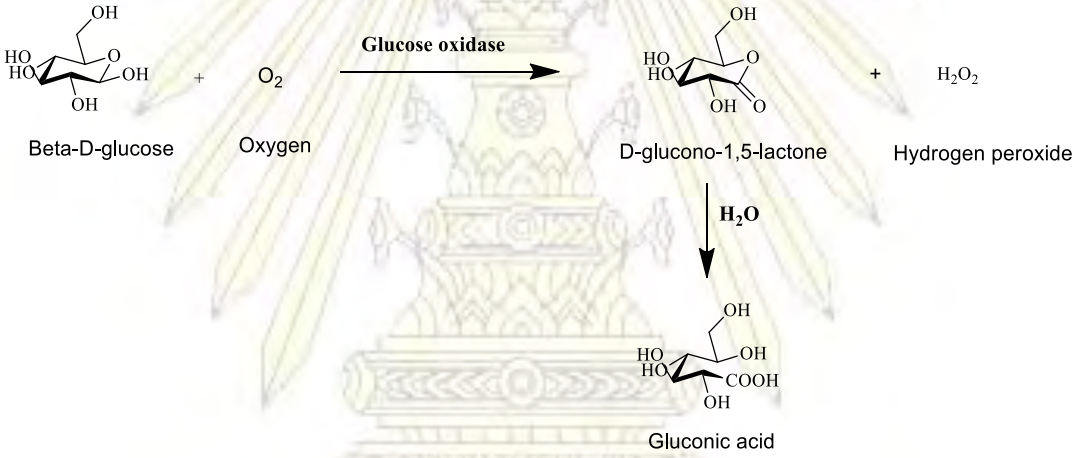
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้พัฒนาการตรวจหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะโดยใช้การเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินซึ่งอาศัยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาตามลำดับ ดังนี้

ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 การใช้กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดกลูโคนิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์[20] ดังสมการที่ (1)



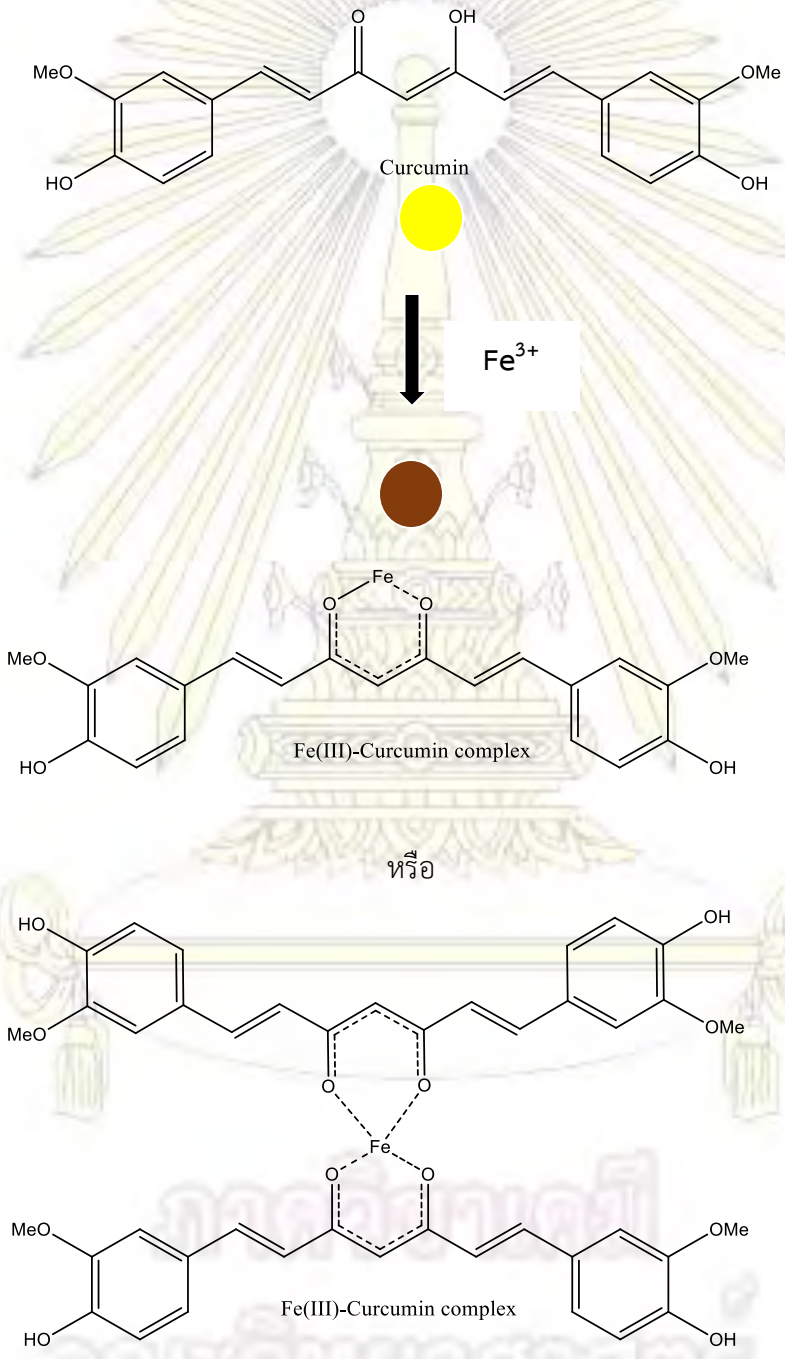
(1)

ปฏิกิริยาขั้นที่ 2 การเติมสารละลาย Fe^{2+} ลงในขั้นที่ 1 เพื่อให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาขั้นที่ 1 ออกซิไดส์ไอออน Fe^{2+} ที่เติมลงไปให้เปลี่ยนเป็นไอออน Fe^{3+} ซึ่งปฏิกิริยานี้เรียกว่า ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton's reaction) โดยในขั้นนี้ควบคุมให้สารละลายมี pH 1-2 เพื่อไม่ให้ไอออน Fe^{3+} เกิดการตกตะกอนเป็นไฮดรอกไซด์

$$2H^{+}(aq) + H_2O_2(aq) + 2Fe^{2+}(aq) \longrightarrow 2Fe^{3+}(aq) + 2H_2O(l) \qquad (2)$$

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยาขั้นที่ 3 ไอออน Fe^{3+} เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเคอร์คูมิน ได้สารประกอบสีน้ำตาล ทำให้กระดาษเคอร์คูมินเปลี่ยนสีจากสีเหลืองของเคอร์คูมินเป็นสีน้ำตาลของสารประกอบเชิงซ้อน[46] โดยโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} ที่เป็นไปได้ แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+}

ความเข้มของสีน้ำตาลบนกระดาษเคอร์คูมินสัมพันธ์กับปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ออกซิไดส์ไอออน Fe^{2+} ให้เปลี่ยนเป็นไอออน Fe^{3+} ที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเคอร์คูมิน โดยเมื่อมีปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มาก เกิดสารประกอบเชิงซ้อนมากและทำให้สีน้ำตาลบนกระดาษเคอร์คูมินเข้มมากขึ้นด้วย จากความสัมพันธ์ข้างต้นนี้ทำให้สามารถประยุกต์ใช้กระดาษเคอร์คูมินในการหาความเข้มข้นของกลูโคสได้ เนื่องจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในปฏิกิริยาขั้นที่ 2 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและกลูโคสออกซิเดส

4.1 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

การทดลองส่วนนี้เป็นการทดลองที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาขั้นที่ 2 และ 3 โดยศึกษาการใช้กระดาษเคอร์คูมิน ทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์โดยตรงเพื่อดูการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินและหาภาวะที่เหมาะสมในการทำให้กระดาษเคอร์คูมินเปลี่ยนสี

4.1.1 การศึกษาการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน

การศึกษาการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินเมื่อจุ่มในสารละลายที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาขั้นที่ 2 และ 3 ได้แก่สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สารละลาย Fe^{2+} และสารละลาย Fe^{3+} เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินว่าเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} เพียงอย่างเดียว โดยจุ่มกระดาษเคอร์คูมินในสารละลายชนิดต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สีของกระดาษเคอร์คูมินเมื่อทดสอบกับสารละลายที่เกี่ยวข้อง

การทดสอบ	สีของกระดาษเคอร์คูมิน
กระดาษเคอร์คูมิน + สารละลาย H_2O_2	
กระดาษเคอร์คูมิน + สารละลาย Fe^{2+}	
กระดาษเคอร์คูมิน + สารละลาย Fe^{3+}	

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.1 ทำให้ทราบว่ากระดาษเคอร์คูมินเมื่ออยู่ในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และสารละลาย Fe^{2+} จะไม่เกิดการเปลี่ยนสีไปจากสีดั้งเดิม แต่เมื่ออยู่ในสารละลาย

Fe^{3+} จะเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำตาล แสดงให้เห็นว่า เฉพาะสารละลาย Fe^{3+} เท่านั้นที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน เนื่องมาจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} และเคอร์คูมิน

4.1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเคอร์คูมินในการเตรียมกระดาษทดสอบ

ในการศึกษานี้ เป็นการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่เหมาะสมในการเตรียมกระดาษกรองสำหรับใช้เป็นแผ่นกระดาษทดสอบสำหรับตรวจหาปริมาณกลูโคส โดยเลือกศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเคอร์คูมินที่ 3, 5 และ 7 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารละลายเคอร์คูมินแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเพื่อใช้เป็นแผ่นกระดาษทดสอบ และนำไปทดสอบกับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 2.0 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ควรจะได้จากกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วงที่ครอบคลุมการตรวจวัดกลูโคสในปัสสาวะของคนปกติ คนที่มีโอกาสเสี่ยงเป็นโรคเบาหวาน และคนที่เป็นโรคเบาหวาน[18,19] ทำการศึกษาโดยจุ่มกระดาษเคอร์คูมินในสารละลายผสมระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยจุ่มเป็นเวลา 3 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สีของกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 3, 5 และ 7 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่ใช้เตรียมกระดาษทดสอบ (มิลลิโมลาร์)	**ความเข้มข้นของ H_2O_2 (มิลลิโมลาร์)**				
	Blank	**0.5**	**1.0**	**1.5**	**2.0**
3					
5					
7					

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าสีของกระดาษเคอร์คูมินมีแนวโน้มเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเข้มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น โดยกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินไม่แตกต่างกันมาก เมื่อทดสอบกับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ยังคงมีปริมาณเคอร์คูมินบนกระดาษทดสอบในปริมาณที่น้อย ทำให้มีเคอร์คูมินสำหรับเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออน Fe^{3+} ได้จำกัดถึงแม้จะมีไอออน Fe^{3+} เกิดขึ้นปริมาณมากก็ตาม ส่วนกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 และ7 มิลลิโมลาร์ จะสังเกตเห็นความแตกต่างของสีกระดาษเคอร์คูมิน เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นได้ชัดเจนกว่าการใช้กระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ อาจเป็นผลมาจากเมื่อความเข้มข้นของเคอร์คูมินเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณของเคอร์คูมินบนกระดาษทดสอบเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย จึงเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออน Fe^{3+} ได้มากขึ้น ทำให้เห็นความแตกต่างของสีกระดาษเคอร์คูมินชัดเจนขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น

จากการศึกษา พบว่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินบนกระดาษทดสอบที่ให้ผลชัดเจนคือ 5 และ 7 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำกระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.1.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายไอออน Fe^{2+} ต่อความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

เนื่องจากในปฏิกิริยาขั้นที่ 2 นั้น ใช้ไอออน Fe^{2+} เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดย Fe^{2+} จะออกซิไดส์เป็นไอออน Fe^{3+} ตามปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาขั้นที่ 1 ซึ่งจำเป็นต้องมีปริมาณไอออน Fe^{2+} เพียงพอสำหรับการเกิดปฏิกิริยาหรือมากเกินพอ จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} ที่ 0.6, 1.5, 3.0 และ 4.5 มิลลิโมลาร์ โดยจุ่มกระดาษเคอร์คูมินลงในสารละลายผสมของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เป็นเวลา 3 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 สีของกระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} (มิลลิโมลาร์)	**ความเข้มข้นของ H_2O_2 (มิลลิโมลาร์)**				
	Blank	**0.5**	**1.0**	**1.5**	**2.0**
0.6					
1.5					
3.0					
4.5					

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.3 ทำให้ทราบว่าในช่วงความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} ที่ศึกษา ให้กระดาษเคอร์คูมินที่มีความเข้มสีไม่แตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} ในช่วงดังกล่าวเหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา รวมทั้ง Fe^{2+} ที่มากเกินพอไม่มีผลรบกวนต่อความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินอาจเนื่องจากในภาวะที่ศึกษา Fe^{2+} ไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับเคอร์คูมิน ดังนั้นบางส่วนของ Fe^{2+} ที่ไม่ได้ถูกออกซิไดส์เป็นไอออน Fe^{3+} จึงไม่รบกวนสีของกระดาษทดสอบ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} ที่ 1.5 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.1.4 การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

ทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับสังเกตสีของกระดาษทดสอบ โดยจุ่มกระดาษเคอร์คูมินในสารละลายผสมระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 และ 3 นาที เพื่อความรวดเร็วในการวิเคราะห์ และสังเกตสีของกระดาษทดสอบที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สีของกระดาษทดสอบเมื่อใช้เวลาในการเปลี่ยนสีต่างกัน

ความเข้มข้นของ H_2O_2 (มิลลิโมลาร์)	เวลาการทดสอบ	
	2 นาที	3 นาที
Blank		
0.5		
1.0		
1.5		
2		

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า กระดาษเคอร์คูมินมีความเข้มสีมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเทียบเวลาที่ใช้ในการทดลองที่ 2 และ3 นาที จะเห็นว่าความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นั้นคล้ายคลึงกัน ดังนั้น จึงเลือกเวลาที่ใช้ในการทดสอบเป็นเวลา 2 นาที สำหรับดูการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจวัดกลูโคส

4.1.5 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการใช้กระดาษทดสอบ โดยสังเกตความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน เพื่อดูความเที่ยงในการทดสอบไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แต่ละความความเข้มข้น โดยจุ่มกระดาษเคอร์คูมินในสารละลายผสมของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์กับสารละลาย Fe^{2+} เป็นเวลา 2 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 การทดสอบการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

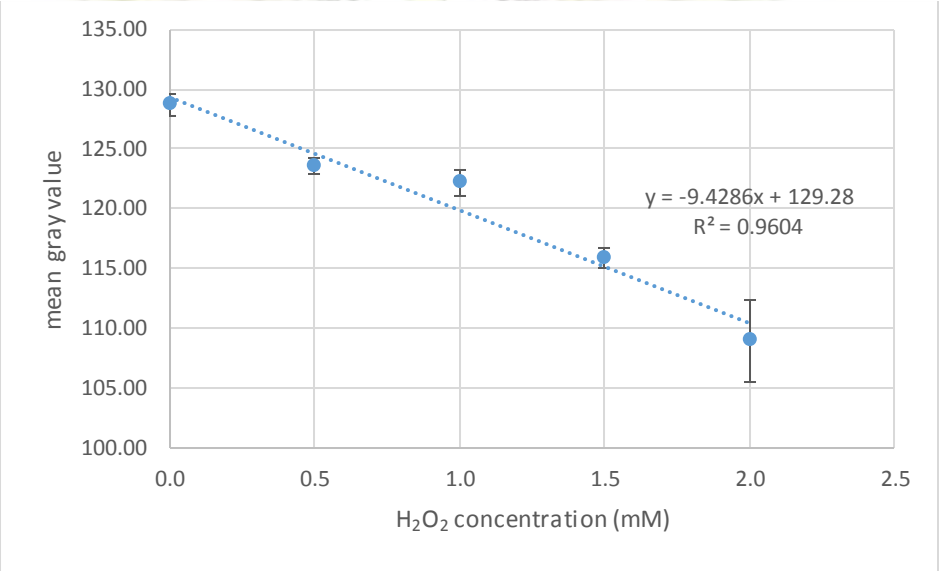
ความเข้มข้นของ H_2O_2 (มิลลิโมลาร์)	ผลการทดสอบ			ความเข้มสีของกระดาษ[a]	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean gray value	%RSD
Blank				128.70 ± 0.93	0.72
0.5				123.58 ± 0.61	0.49
1.0				122.15 ± 1.10	0.90
1.5				115.86 ± 0.88	0.76
2.0				108.99 ± 3.45	3.17

[a] วิเคราะห์รูปภาพด้วยโปรแกรม ImageJ

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.5 ชี้ให้เห็นว่า เมื่อใช้กระดาษทดสอบต่างกัน 3 แผ่น ในการตรวจวัดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินในการทดลองแต่ละครั้งนั้นค่อนข้างคล้ายกัน และความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินจะเข้มมากขึ้นตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ กระดาษทดสอบสามารถให้สีที่แตกต่างได้ชัดเจนเมื่อเทียบกับสีเริ่มต้นของกระดาษเคอร์คูมินที่ไม่ได้จุ่มในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตาม ความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่จุ่มในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ค่อนข้างคล้ายคลึงกันเมื่อดูด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ เมื่อนำภาพถ่ายของกระดาษทดสอบไปหาความเข้มสีในโหมดความเข้มสีเทา (gray values) พบว่า กระดาษทดสอบที่ใช้ทดสอบไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในแต่ละความเข้มข้นมีความเข้มสีที่ใกล้เคียงกัน เมื่อคำนวณหา %RSD พบว่ามีค่า %RSD ที่ต่ำ (< 4 %) แสดงว่าความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละครั้งของการทดสอบนั้นมีความเที่ยงสูง และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินจากค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจะพบว่า ที่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกัน ซึ่งจากค่าความเข้มสีเทาของภาพถ่ายกระดาษทดสอบสามารถใช้บอกความแตกต่างความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินได้ดีกว่าที่ตามองเห็น

4.1.6 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จากความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน

นำค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย (mean gray value) ของภาพถ่ายของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่หาได้จากโปรแกรม ImageJ จากตารางที่ 4.5 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจากภาพถ่ายของกระดาษทดสอบ

จากรูปที่ 4.2 จะได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย โดยมีสมการเส้นตรงเป็น $y = -9.4286x + 129.28$ และค่า R^2 เท่ากับ 0.9604 ซึ่งจากค่า R^2 ของเส้นตรงที่สร้างจากผลการทดลองที่ได้ แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง หรือความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ค่อนข้างดี ซึ่งสามารถนำกราฟมาตรฐานนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้ และจากกราฟจะเห็นว่าค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นอื่น น่าจะเป็นผลมาจากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 2.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีความเข้มข้นสูง และอาจต้องการเวลาในการออกซิไดส์ไอออน Fe^{2+} เป็นไอออน Fe^{3+} รวมถึงอาจต้องการเวลาในการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเคอร์คูมินและไอออน Fe^{3+} มากขึ้น จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่สมบูรณ์ แต่เวลาที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาอยู่ที่ 2 นาที ซึ่งเวลานี้อาจจะไม่เพียงพอสำหรับปฏิกิริยาทั้งหมดที่เกิดขึ้นที่ความเข้มข้นสูง ทำให้ความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินค่อนข้างแตกต่างกัน การเพิ่มเวลาในการ

ทดสอบการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน น่าจะทำให้ความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละครั้งของการทดสอบมีความใกล้เคียงกันมากขึ้น

4.2 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคส

ในการทดลองส่วนนี้เป็นการทดลองตั้งแต่ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 จนถึงปฏิกิริยาขั้นที่ 3 เพื่อหาค่าตัวแปรที่เหมาะสมในการทดลอง เพื่อใช้เป็นวิธีทดสอบหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ โดยทำการศึกษาการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสและสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมิน และหาค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจากภาพถ่ายของกระดาษทดสอบ

4.2.1 การศึกษาผลของปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสต่อสีของกระดาษเคอร์คูมิน

ทำการศึกษาหาปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีกระดาษเคอร์คูมิน เนื่องจาก ไม่สามารถใช้สารละลายผสมของกลูโคสตามปริมาตรของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จากการทดลองที่ผ่านมาได้ โดยจากผลการทดสอบนั้น พบว่าสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำไม่แตกต่างจากสีเริ่มต้นของกระดาษเคอร์คูมินที่ไม่ได้เติมสารละลายกลูโคส เนื่องจากในการผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จากกลูโคส ต้องมีการเติมกลูโคสออกซิเดสเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับกลูโคส และควบคุม pH ให้กลูโคสออกซิเดสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก pH 5.1 ลงไปในสารละลายมาตรฐานกลูโคส ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนั้นเจือจางลง จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน ในการทดสอบจะใช้อัตราส่วนปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกลูโคส : สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก : กลูโคสออกซิเดส เท่ากับ 50 : 10 : 1 ซึ่งอัตราส่วนปริมาตรของกลูโคสออกซิเดสได้จากการคำนวณหาปริมาณที่เพียงพอของกลูโคสออกซิเดสในการทำปฏิกิริยากับกลูโคส[47] และอัตราส่วนปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติกได้จากการทดลองโดยสามารถควบคุม pH สารละลายผสมของกลูโคสได้ pH 5 ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบโดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส 40 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ปิเปตสารละลายผสมข้างต้นมาปริมาตร 50, 250, 500 และ 1000 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งในการทดลองนี้ได้เพิ่มความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลาย Fe^{2+} เพื่อให้เพียงพอต่อปริมาณกลูโคสที่ใช้ทดสอบ จากนั้นจุ่มกระดาษเคอร์คูมินลงในสารละลายผสมข้างต้น เป็นเวลา 2 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลของปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสต่อสีกระดาษเคอร์คูมิน

การทดสอบครั้งที่	ปริมาตรกลูโคส (ไมโครลิตร)				
	Blank	50	250	500	1000
1					
2					

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.6 จะเห็นว่า เมื่อใช้สารละลายผสมของกลูโคสปริมาตร 50 และ250 ไมโครลิตร การเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินยังไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสีเริ่มต้นของกระดาษเคอร์คูมินที่ไม่ได้เติมสารละลายกลูโคส เมื่อใช้สารละลายผสมของกลูโคสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินได้สีที่แตกต่างจากสีเริ่มต้นของกระดาษเคอร์คูมินที่ไม่ได้เติมสารละลายกลูโคส และเมื่อใช้สารละลายผสมของกลูโคสปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กระดาษเคอร์คูมินที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มเกินไป ซึ่งหากนำไปใช้วิเคราะห์สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นมากกว่านี้ จะทำให้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของสีได้ และไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุช่วงความเข้มข้นของกลูโคสได้ ดังนั้น จึงเลือกปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสที่ 500 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบสารละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้นด้วยกระดาษเคอร์คูมินในการทดลองขั้นต่อไป

4.2.2 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำของการใช้กระดาษทดสอบ โดยสังเกตความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมิน เพื่อดูความเที่ยงในการทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคสแต่ละความเข้มข้น โดยการใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่เติมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว ปิเปตสารละลายผสมมาปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจุ่มกระดาษเคอร์คูมินในสารละลายผสมข้างต้น เป็นเวลา 2 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การทดสอบการทำซ้ำของการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	ผลการทดสอบ			ความเข้มสีของกระดาษ[a]	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean gray value	%RSD
Blank				141.84 ± 1.99	1.40
0.5				129.03 ± 1.37	1.06
1.0				119.14 ± 0.55	0.46
1.5				115.65 ± 0.60	0.51

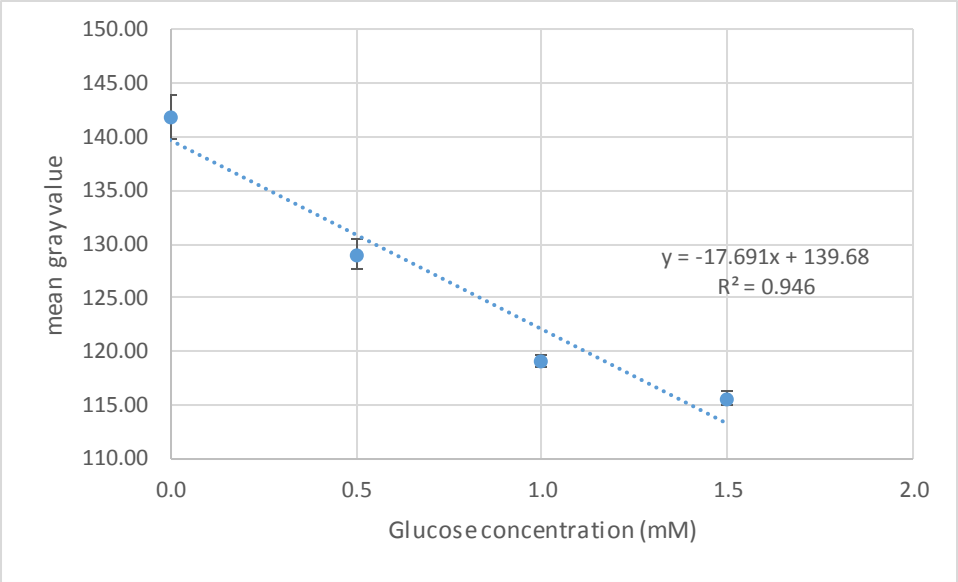
[a] วิเคราะห์รูปภาพด้วยโปรแกรม ImageJ

จากการทดสอบการทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังตารางที่ 4.7 พบว่าสีของกระดาษเคอร์คูมินในแต่ละครั้งของการทดลองนั้นค่อนข้างคล้ายกัน และความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินจะเข้มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่เพิ่มขึ้น โดยกระดาษเคอร์คูมินสามารถให้สีที่แตกต่างจากสีเริ่มต้นของกระดาษอย่างชัดเจน เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ให้สีกระดาษทดสอบที่เข้มมากขึ้น ในขณะที่ความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบกับสารละลายกลูโคสเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ไม่แตกต่างจากกระดาษทดสอบสารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ จึงไม่ได้รวมอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินจากค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย พบว่าค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสสูงขึ้น เมื่อคำนวณหา %RSD จะพบว่า มีค่า %RSD ที่ต่ำ แสดงว่าความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้จากการทดสอบแต่ละครั้งนั้นมีความเที่ยงสูง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคส

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.7 นำค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยที่ได้จากภาพถ่ายกระดาษทดสอบวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสและค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสและค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจากภาพถ่ายของกระดาษทดสอบ

จากรูปที่ 4.3 จะได้สมการเส้นตรง $y = -17.691x + 139.68$ และค่า $R^2 = 0.946$ ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ที่ความเข้มข้นกลูโคส 0 จนถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ครอบคลุมการวินิจฉัยโรคเบาหวาน[18,19] จากค่า R^2 ที่คำนวณได้ แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ที่ไม่สูงมาก ทำให้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่ได้ เมื่อนำมาใช้ในการหาปริมาณกลูโคสจึงไม่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดีมาก และยังต้องพัฒนาต่อไป

จากผลการทดลองที่ให้ความสัมพันธ์ที่ยังไม่เป็นเส้นตรงที่ดีนั้น อาจเป็นผลมาจากเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิเดสและกลูโคสที่เวลา 15 นาที อาจยังไม่เพียงพอต่อการทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นจากกลูโคสในแต่ละความเข้มข้นยังไม่เหมาะสม และในแต่ละครั้งของการทดลองอาจเกิดขึ้นได้ไม่เท่ากัน เมื่อนำค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยมาสร้างกราฟมาตรฐานจึงให้ค่าความเป็นเส้นตรงไม่สูงมาก ซึ่งอาจแก้ไขความเป็นเส้นตรงของกราฟให้ดีขึ้น โดยการเพิ่มเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิเดสและกลูโคสให้มากขึ้นเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้การสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในแต่ละความเข้มข้นและในแต่ละครั้งของการทดสอบมีปริมาณคงที่

นอกจากนี้ยังพบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟ (linear range) ค่อนข้างแคบ นั่นคือความเข้มข้นกลูโคสในช่วง 0 - 1.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอาจจะเกิดจากการเลือกใช้ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมากเกินไป จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 การทดสอบหาปริมาตรสารละลายผสมของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมิน ได้เลือกใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษา ทำให้สามารถตรวจวัดกลูโคสในช่วงความเข้มข้นต่ำได้อย่างชัดเจน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส ทำให้ความเข้มสีของกระดาษทดสอบมีความเข้มมากและเห็นความแตกต่างของสีได้ไม่มากนัก เนื่องจากกระดาษเคอร์คูมินมีความเข้มสีน้ำตาลมากตั้งแต่ที่ความเข้มข้นกลูโคสต่ำ ซึ่งอาจแก้ไขให้มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกว้างขึ้นได้โดยการลดปริมาตรของกลูโคสที่ใช้ทดสอบให้น้อยลง

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ ยังคงใช้ภาวะการทดลองข้างต้นในการทดสอบปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อศึกษาผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix) ของปัสสาวะที่จะมีผลต่อวิธีการวิเคราะห์ และความเป็นไปได้ในการนำวิธีดังกล่าวไปวิเคราะห์กลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะจริง

4.3 การใช้กระดาษเคอร์คูมินในการทดสอบกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ

ในขั้นตอนนี้เป็นการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะ โดยศึกษาการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินกับเมทริกซ์ปัสสาวะ และการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะโดยการเปรียบเทียบความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ตรวจสอบตัวอย่างปัสสาวะกับความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ และการคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในปัสสาวะจากการมองด้วยตาเปล่า และจากการวัดค่าความเข้มสีเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจากภาพถ่ายของกระดาษเคอร์คูมิน

4.3.1 การศึกษาผลของเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะต่อการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมิน

การศึกษาการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินกับเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะเพื่อดูการรบกวนจากเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะ เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะ โดยการทดสอบที่ 1 เป็นการใช้กระดาษเคอร์คูมินในการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ ส่วนการทดสอบที่ 2 ถึง 5 เป็นการใช้กระดาษเคอร์คูมินในการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (spiked sample) เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินได้ง่ายขึ้น เนื่องจากปัสสาวะของคนปกติทั่วไปมักมีความเข้มข้นของกลูโคสในปริมาณที่ต่ำ ทำให้กระดาษเคอร์คูมินในตัวอย่างปัสสาวะที่ไม่ได้เติมสารละลายกลูโคสเปลี่ยนสีน้อยมาก ทำให้ยากต่อการสังเกตผลของเมทริกซ์ การทดลองนี้ทดสอบโดย

จุ่มกระดาษเคอร์คูมินในสารละลายผสม ตัวอย่างปัสสาวะและรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 2 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมินกับเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะ

การทดลองที่	การทดสอบ[b]	สีกระดาษเคอร์คูมิน
1	ตัวอย่างปัสสาวะ + กลูโคสออกซิเดส + Fe^{2+}	
2	ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมกลูโคส + กลูโคสออกซิเดส + Fe^{2+}	
3	ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมกลูโคส + Fe^{2+}	
4	ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมกลูโคส + กลูโคสออกซิเดส	
5	ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมกลูโคส	

[b] ควบคุม pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่ากระดาษเคอร์คูมินไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าในตัวอย่างปัสสาวะอาจจะไม่มีกลูโคสหรือมีกลูโคสในปริมาณที่ต่ำทำให้ไม่เห็นการเปลี่ยนสีกระดาษเคอร์คูมินที่สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า

จากผลการทดลองที่ 2 พบว่ากระดาษเคอร์คูมินเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล ซึ่งให้ผลมาจากการเติมกลูโคสลงในตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการมีกลูโคสในตัวอย่างจริง

จากผลการทดลองที่ 3 พบว่ากระดาษเคอร์คูมินไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าในตัวอย่างปัสสาวะไม่มีสารออกซิไดส์อื่นที่สามารถออกซิไดส์ไอออน Fe^{2+} เป็นไอออน Fe^{3+}

จากผลการทดลองที่ 4 พบว่ากระดาษเคอร์คูมินไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างปัสสาวะ ไม่เกิดปฏิกิริยากับเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะแล้วทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนสีกระดาษเคอร์คูมิน และเมื่อเทียบกับการทดลองที่ 2 เป็นการยืนยันว่า การเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมินเกิดจากสีของสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คูมินและ Fe^{3+} เท่านั้น

จากผลการทดลองที่ 5 พบว่ากระดาษเคอร์คูมินไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้ทดสอบไม่ทำให้สีกระดาษเคอร์คูมินเปลี่ยนแปลงไปได้

ดังนั้น จากการทดลองนี้ พบว่าเมทริกซ์ของตัวอย่างปัสสาวะไม่ส่งผลรบกวนต่อการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมิน

4.3.2 การศึกษาความแม่นของการหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ

ในการศึกษาความแม่นของการหาปริมาณกลูโคสในปัสสาวะนั้น ทำการทดสอบหากลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีเดียวกันกับการใช้กระดาษเคอร์คูมินทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรตัวอย่างปัสสาวะ : สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก : กลูโคสออกซิเดส เท่ากับ 50 : 10 : 1 ในการทดลองนี้ทำการทดลองโดยการใช้ตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมแอซีเทต-กรดแอซีติก 100 ไมโครลิตร และกลูโคสออกซิเดส 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว และปิเปตสารละลายผสมมาปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมด้วยสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจุ่มกระดาษเคอร์คูมิน เป็นเวลา 2 นาที และสังเกตสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ได้ ผลแสดงในตารางที่ 4.10 โดยสามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสในปัสสาวะได้ 2 วิธี คือ

1. การหาปริมาณโดยการเปรียบเทียบสีด้วยตาเปล่า

เทียบสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างปัสสาวะกับสีกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ช่วงความเข้มข้นกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะด้วยการเทียบสี

ความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิโมลาร์)	**สีกระดาษเคอร์คูมินมาตรฐาน**	**ปริมาณกลูโคสที่เติมในปัสสาวะ (มิลลิโมลาร์)**		
		0	**0.5**	**1.0**
Blank				
0.5				
1.0				
1.5				
วิเคราะห์ความเข้มข้นกลูโคสในปัสสาวะ (มิลลิโมลาร์)		อยู่ในช่วง < 0.5	อยู่ในช่วง 0.5-1.0	อยู่ในช่วง 1.0-1.5

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.9 เมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่จุ่มในตัวอย่างปัสสาวะกับสีของกระดาษที่ได้จากการทดสอบสารมาตรฐาน พบว่า ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ อยู่ในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 มิลลิโมลาร์ เมื่อวิเคราะห์ปัสสาวะตัวอย่างที่เติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า จากการเทียบสีกระดาษ มีกลูโคสอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5-1.0 และ 1.0-1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกลูโคสที่มีการเติมลงไปร่วมกับกลูโคสที่มีอยู่ในสารตัวอย่างเอง ซึ่งวิธีการหาความเข้มข้นกลูโคสด้วยการเปรียบเทียบสีนั้นเป็นการบอกความเข้มข้นของกลูโคสได้แบบเป็นช่วง และจำเป็นต้องดูเปรียบเทียบสีกระดาษเคอร์คูมินอย่างละเอียด ถึงจะสามารถบอกช่วงความเข้มข้นกลูโคสได้ตรงตามความเป็นจริง

2. การหาปริมาณกลูโคสโดยใช้กราฟมาตรฐาน

ทำการหาค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยของภาพถ่ายของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบตัวอย่างปัสสาวะด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วนำมาแทนมาค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ได้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ตรวจพบ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะและเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery)

ตัวอย่าง	ปริมาณกลูโคสที่เติม (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่พบ (มิลลิโมลาร์)	%recovery
ตัวอย่างปัสสาวะ	0	0.03 ± 0.02	-
	0.5	0.51 ± 0.12	96
	1.0	1.06 ± 0.11	103

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.10 พบว่าความเข้มข้นกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะตรวจพบที่ 0.03 มิลลิโมลาร์ ส่วนความเข้มข้นกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตรวจพบความเข้มข้นของกลูโคสที่ 0.51 และ 1.06 มิลลิโมลาร์ และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ที่ 96 และ 103 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานขององค์กร AOAC INTERNATIONAL[37]

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการหาความเข้มข้นกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะทั้งสองวิธีพบว่าให้ค่าความเข้มข้นกลูโคสที่ใกล้เคียงกัน โดยวิธีการเปรียบเทียบสีกระดาษเคอร์คูมินจะบอกความเข้มข้นกลูโคสได้เป็นช่วงความเข้มข้น ส่วนวิธีการคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานจะบอกความเข้มข้นของกลูโคสได้เป็นค่า

ความเข้มข้นกลูโคสที่แน่นอน อย่างไรก็ตาม การหาปริมาณกลูโคสความเข้มข้นต่ำมาก ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ สังเกตได้จากผลการทดลองที่มีความเที่ยงต่ำ วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการหาปริมาณกลูโคสที่มีปริมาณสูงระดับหนึ่ง นอกจากนี้ หากต้องการวิเคราะห์กลูโคสในปริมาณต่ำมาก สามารถปรับวิธีการวิเคราะห์ได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น การเพิ่มปริมาตรสารละลายกลูโคสในช่วงความเข้มข้นต่ำๆ ที่ต้องการตรวจวัดสำหรับทดสอบกับกระดาษเคอร์คูมิน จะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษเคอร์คูมินได้ถึงแม้จะมีกลูโคสในปริมาณที่ต่ำก็ตาม

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบกระดาษเคอร์คูมินกับสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นช่วงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ควรจะได้จากกลูโคสและอยู่ในช่วงที่ครอบคลุมการวินิจฉัยโรคเบาหวาน โดยได้ภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนสีกระดาษเคอร์คูมินคือ ใช้กระดาษทดสอบที่เตรียมจากเคอร์คูมินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และเวลา 2 นาที สำหรับดูการเปลี่ยนสีของกระดาษเคอร์คูมินจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 2.0 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้น H_2O_2 (มิลลิโมลาร์)	**Blank**	**0.5**	**1.0**	**1.5**	**2.0**
สีกระดาษเคอร์คูมิน					

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัด ได้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย $y = -9.4286x + 129.28$ และค่า R^2 เท่ากับ 0.9604 ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ที่ความเข้มข้น 0 จนถึง 2.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ผล รายงานในเทอมของ %RSD ต่ำกว่า 3.17%

นำภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนสีกระดาษเคอร์คูมินมาใช้ในการทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมการวินิจฉัยโรคเบาหวาน โดยกระดาษเคอร์คูมินจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล และอาศัยความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินในการระบุช่วงความเข้มข้นของกลูโคส ดังแสดงในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	**Blank**	**0.5**	**1.0**	**1.5**
สีกระดาษเคอร์คูมิน				

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวัดได้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสและค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย $y = -17.691x + 139.68$ และค่า $R^2 = 0.946$ ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ที่ความเข้มข้น 0 จนถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ผล รายงานในเทอมของ %RSD ต่ำกว่า 1.40% และความแม่น (accuracy) ของการวิเคราะห์ พิจารณาจาก %recovery ของการวิเคราะห์กลูโคสในช่วง 96-103% เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

- การเตรียมกระดาษทดสอบเคอร์คูมินควรมีความระมัดระวังในการหยดสารละลายเคอร์คูมินลงบนกระดาษกรองเพื่อให้สารละลายเคอร์คูมินกระจายตัวบนกระดาษกรองได้เท่าๆ กันและป้องกันการให้สีไม่สม่ำเสมอบนแผ่นกระดาษทดสอบเคอร์คูมิน

- การถ่ายรูปโดยใช้แฟลชจากกล้องสมาร์ทโฟนให้ภาพที่ได้แตกต่างจากที่มองเห็นด้วยตาเปล่า และในแต่ละครั้งของการถ่ายรูปอาจมีความคลาดเคลื่อนของค่าความเข้มแสงเมื่อนำไปหาความเข้มสีในโปรแกรม ImageJ แนะนำให้ถ่ายรูปโดยควบคุมระยะห่างระหว่างกระดาษและกล้องโทรศัพท์ให้คงที่เสมอ และจัดวางตำแหน่งกระดาษทดสอบที่ตำแหน่งเดียวกันเสมอเพื่อลดความคลาดเคลื่อนเมื่อนำไปหาความเข้มสีของภาพ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. โรคเบาหวาน คืออะไร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.yaandyou.net/content-view.php?conid=403 [29 มีนาคม 2559]
2. โรคเบาหวาน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/endocrine/DM/intro.htm#.VqwusbKLTIU [29 มีนาคม 2559]
3. เบาหวาน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B9%80%E0%B8%9A%E0%B8%B2%E0%B8%AB%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%99 [29 มีนาคม 2559]
4. กลุ่มโรค NCDs. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaihealth.or.th/microsite/categories/5/ncds/2/173/176-%E0%B8%81%E0%B8%A5%E0%B8%B8%E0%B9%88%E0%B8%A1%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84+NCDs.html [29 มีนาคม 2559]
5. เบาหวาน diabetes. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://thaidiabetes.blogspot.com/ [29 มีนาคม 2559]
6. IDF DIABETES ATLAS - 7TH EDITION. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.diabetesatlas.org/ [29 มีนาคม 2559]
7. WHO. World Health Day 2016: Beat diabetes. [ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2016/event/en/ [29 มีนาคม 2559]
8. รู้เท่าทันภัยเงียบ'เบาหวาน'ปรับพฤติกรรม 'กินอยู่เป็น'ห่างไกลโรค. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dailynews.co.th/article/362236 [29 มีนาคม 2559]
9. Marks, V. Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica Acta.* **1996**, *251* (1), 3-17.
10. Yuen, V. G.; McNeill, J. H. Comparison of the glucose oxidase method for glucose determination by manual assay and automated analyzer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* **2000**, *44* (3), 543-546.
11. Yoo, E. H.; Lee, S. Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel).* **2010**, *10* (5), 4558-4576.

12. Pfutzner, A.; Mitri, M.; Musholt, P. B.; Sachsenheimer, D.; Borchert, M.; Yap, A.; Forst, T. Clinical assessment of the accuracy of blood glucose measurement devices. *Current Medical Research and Opinion.* **2012**, *28* (4), 525-531.
13. Comer, J. P. Semiquantitative Specific Test Paper for Glucose in Urine. *Analytical Chemistry.* **1956**, *28* (11), 1748-1750.
14. Huggett, A. S. G.; Nixon, D. A. Use of glucose oxidase, peroxidase, and *o*-dianisdine in determination of blood and urinary glucose. *The Lancet.* **1957**, *270* (6991), 368-370.
15. Marks, V. An improved glucose-oxidase method for determining blood C.S.F. and urine glucose levels. *Clinica Chimica Acta.* **1959**, *4* (3), 395-400.
16. Sutherland, H. W.; Stowers, J. M.; Christie, R. J. Factors affecting sensitivity of glucose oxidase strips used to test for glycosuria. *The Lancet.* **1970**, *295* (7656), 1071-1074.
17. เบาหวาน diabetes. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://thaidiabetes.blogspot.com [29 มีนาคม 2559]
18. Scherstén, B.; Fritz, H. Subnormal levels of glucose in urine. A sign of urinary tract infection. *Jama.* **1967**, *201* (12), 949-952.
19. Cowart, S.L.; STACHURA, M.E. Chapter 139 Glucosuria. Walker H.K.; Hall W.D.; Hurst J.W., editors. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990.
20. Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L. Glucose oxidase--an overview. *Biotechnology Advances.* **2009**, *27* (4), 489-501.
21. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.mpbio.com/product.php?pid=02195196&country=209 [29 มีนาคม 2559]
22. Colorimetric analysis. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Colorimetric_analysis [29 มีนาคม 2559]
23. Jayaprakasha, G. K.; Jagan Mohan Rao, L.; Sakariah, K. K. Chemistry and biological activities of C. longa. *Trends in Food Science & Technology.* **2005**, *16* (12), 533-548.
24. Huang, M.T.; Ma, W.; Lu, Y.P.; Chang, R.L.; Fisher, C.; Manchand P.S.; Newmark, H.L.; Conney, A.H. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetateinduced tumor promotion. *Carcinogenesis*. **1995**, *16* (10), 2493-2497.

25. Bernabé-Pineda, M.; Ramírez-Silva, M.T.; Romero-Romo, M.; González-Vergara, E.; Rojas-Hernández, A. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* **2004**, *60* (5), 1091-1097.
26. Wang, Y.J.; Pan, M.H.; Cheng, A.L.; Lin, L.I.; Ho, Y.S.; Hsieh, C.Y.; Lin, J.K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **1997**, *15* (12), 1867-1876.
27. Kolev, T. M.; Velcheva, E. A.; Stamboliyska, B. A.; Spiteller, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry.* **2005**, *102* (6), 1069-1079.
28. Ak, T.; Gülçin, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions.* **2008**, *174* (1), 27-37.
29. Javeri, I.; Chand, N. Chapter 31 - Curcumin A2 - Gupta, Ramesh C. In *Nutraceuticals*, Academic Press: Boston, 2016; 435-445.
30. Ghosh, S.; Banerjee, S.; Sil, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and Chemical Toxicology.* **2015**, *83*, 111-124.
31. Bernabé-Pineda, M.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M. A.; González-Vergara, E.; Rojas-Hernández, A. Spectrophotometric and electrochemical determination of the formation constants of the complexes Curcumin–Fe(III)–water and Curcumin–Fe(II)–water. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* **2004**, *60* (5), 1105-1113.
32. Daniel, S.; Limson, J. L.; Dairam, A.; Watkins, G. M.; Daya, S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *Journal of Inorganic Biochemistry.* **2004**, *98* (2), 266-275.
33. เคอร์คูมิน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://th.wikipedia.org/wiki/เคอร์คูมิน [29 มีนาคม 2559]
34. ทำความรู้จักกับโหมดสี. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaidesignidea.com/ตอนที่-1-ทำความรู้จักกับ.html [29 มีนาคม 2559]

35. โหมดสี (Color Mode). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.infinityprinting.co.th/main/content.php?page=sub&category=22&id=55 [29 มีนาคม 2559]

36. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://reo06.mnre.go.th/home/images/upload/file/report/Jurairut070509.pdf [29 มีนาคม 2559]

37. AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: www.pfigueiredo.org/Bromono2b.pdf [29 มีนาคม 2559]

38. Du, Y.; Luo, X. L.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor. *Bioelectrochemistry.* **2007**, *70* (2), 342-347.

39. Kang, X.; Mai, Z.; Zou, X.; Cai, P.; Mo, J., Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol-gel chitosan/silica hybrid. *Talanta.* **2008,** *74* (4), 879-886.

40. Lin, J.; He, C.; Zhao, Y.; Zhang, S. One-step synthesis of silver nanoparticles/carbon nanotubes/chitosan film and its application in glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical.* **2009**, *137* (2), 768-773.

41. Radhakumary, C.; Sreenivasan, K. Naked eye detection of glucose in urine using glucose oxidase immobilized gold nanoparticles. *Analytical Chemistry.* **2011**, *83* (7), 2829-2833.

42. Su, L.; Feng, J.; Zhou, X.; Ren, C.; Li, H.; Chen, X. Colorimetric detection of urine glucose based ZnFe2O4 magnetic nanoparticles. *Analytical Chemistry.* **2012**, *84* (13), 5753-5758.

43. Borsari, M.; Ferrari, E.; Grandi, R.; Saladini, M., Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe (III) complexing ability. *Inorganica Chimica Acta.* **2002**, *328* (1), 61-68.

44. Khalil, M. I.; Al-Zahem, A. M.; Al-Qunaibit, M. H. Synthesis, Characterization, Mossbauer Parameters, and Antitumor Activity of Fe (III) Curcumin Complex. *Bioinorganic Chemistry and Applications.* **2013**, *2013*. 5.

45. Tonnesen, H. H.; Greenhill, J. V. Studies on curcumin and curcuminoids. XXII: Curcumin as a reducing agent and as a radical scavenger. *International Journal of Pharmaceutics*. **1992**, *87* (1), 79-87.

46. Saithongdee, A.; Praphairaksit, N.; Imyim, A. Electrospun curcumin-loaded zein membrane for iron (III) ions sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical.* **2014**, *202*, 935-940.

47. Enzymatic Assay of Glucose Oxidase. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-glucose-oxidase.html [29 มีนาคม 2559]

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ตารางแสดงค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของภาพถ่ายกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

Concentration (mM)	Gray value 1	Gray value 2	Gray value 3	Mean gray value	SD	%RSD
0.0	127.92	129.73	128.44	128.70	0.93	0.72
0.5	124.15	123.67	122.93	123.58	0.61	0.49
1.0	120.89	122.93	122.63	122.15	1.10	0.90
1.5	116.62	114.90	116.04	115.86	0.88	0.76
2.0	108.72	105.68	112.56	108.99	3.45	3.17

ตารางแสดงค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของภาพถ่ายกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส

Concentration (mM)	Gray value 1	Gray value 2	Gray value 3	Mean gray value	SD	%RSD
0.0	140.79	140.59	144.13	141.84	1.99	1.40
0.5	129.93	127.45	129.70	129.03	1.37	1.06
1.0	118.76	118.90	119.14	119.14	0.55	0.46
1.5	116.28	115.57	115.10	115.65	0.60	0.51

ตารางแสดงความเข้มสีของกระดาษเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	**Blank**	**0.5**	**1.0**	**1.5**
สีกระดาษเคอร์คูมิน (แสงแฟลช)				
สีกระดาษเคอร์คูมิน (แสงปกติ)				

การคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ตารางแสดง ค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เติมลงในตัวอย่างปัสสาวะ

ความเข้มข้นกลูโคสที่เติม (มิลลิโมลาร์)	**0**	**0.5**	**1.0**
ค่าความเข้มสีเทา	139.14	128.90	123.25
	138.76	132.87	119.28
	139.45	129.96	120.27
ค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย	139.12	130.58	120.93
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	0.35	2.05	2.07
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	0.25	1.57	1.71
ความเข้มข้นกลูโคสที่ตรวจวัดได้ (มิลลิโมลาร์)	0.03	0.51	1.06
เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery)	-	96	103

1. **คำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์**

จากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย ได้สมการ $y = -17.691x + 139.68$

เมื่อ y = ความเข้มสีเทาเฉลี่ย

x = ความเข้มข้นของกลูโคส

แทนค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ย จะได้

$$x = \frac{130.58 - 139.68}{-17.691} = 0.51$$

ดังนั้น กลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.51 มิลลิโมลาร์

2. คำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

จากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าความเข้มสีเฉลี่ย ได้สมการ y = -17.691x + 139.68

แทนค่าความเข้มสีเทาเฉลี่ยจะได้

$$x = \frac{120.93 - 139.68}{-17.691} = 1.06$$

ดังนั้น กลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 1.06 มิลลิโมลาร์

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะ

$$\text{\%recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นจากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน} - \text{ความเข้มข้นจากตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม}} \times 100$$

1. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

$$\text{\%recovery} = \frac{0.51 - 0.03}{0.5} \times 100 = 96$$

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

$$\%\text{recovery} = \frac{1.06 - 0.03}{1.0} \text{ x } 100 = \ 103$$

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 103 เปอร์เซ็นต์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นายศตายุ นุ่นสวัสดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 14 ตุลาคม 2535 ที่จังหวัดสกลนคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล จังหวัดสกลนคร ในปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในระดับการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 338 หมู่ 10 ตำบล พรรณา อำเภอ พรรณานิคม จังหวัด สกลนคร 47130 โทรศัพท์ 088-292-4053

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย