

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุคโทสแบบกระดาษ
สำหรับอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล

THE DEVELOPMENT OF A PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE
FOR DETECTION OF SUCROSE, GLUCOSE AND FRUCTOSE FOR
SUGAR PRODUCTION INDUSTRY

จินากานต์ อักษร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสแบบกระดาษ
สำหรับอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล

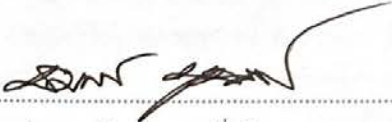
จินากานต์ อักษร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสแบบกระดาษสำหรับอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล
	The Development of a Paper-based Analytical Device for Detection of Sucrose, Glucose and Fructose for Sugar Production Industry
ชื่อ - สกุล	นางสาวจินากานต์ อักษร
สาขาวิชา	เคมีประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตัญญา, ประ.ด.
ปีการศึกษา	2562

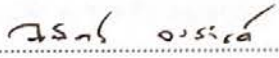
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์สมพร มูลมังมี, Ph.D.)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เนตรนภิส แก้วช่วย, Ph.D.)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตัญญา, ประ.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทิ์ จงสวัสดิ์, ประ.ด.)

วันที่ 14 เดือน มกราคม พ.ศ. 2563

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุคโทสแบบกระดาษ
สำหรับอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล

ชื่อ – สกุล นางสาวจินากานต์ อักษร

สาขาวิชา เคมีประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ประ.ด.

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

โรงงานน้ำตาลมีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำตาล ในกระบวนการการผลิตน้ำตาล ซูโครสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นฟรุคโทสและกลูโคส ส่งผลทำให้คุณภาพของน้ำตาลลดลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสีต่างๆ สีนํ้าตาลสำหรับตรวจวัดซูโครส สีฟ้าสำหรับตรวจวัดฟรุคโทส และสีชมพูสำหรับตรวจวัดกลูโคส วัดค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมอิมเมจ เจ

ขั้นแรกสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้วิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ผลการทดลองพบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส มีความเที่ยง ความถูกต้อง และความจำเพาะเจาะจงสูง มีช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับซูโครส 1 - 25 มิลลิโมลาร์ ฟรุคโทส 2 - 20 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 0.5 - 10 มิลลิโมลาร์ ซีดจำกัดในการตรวจพบซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส เท่ากับ 0.9 0.8 และ 0.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ มีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับซูโครส 2.9 มิลลิโมลาร์ ฟรุคโทส 2.6 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 1.2 มิลลิโมลาร์ สุดท้ายนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ในตัวอย่างน้ำตาลทราย และน้ำอ้อย โดยเปรียบเทียบกับวิธีทางโครมาโทกราฟี พบว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส มีข้อดีเช่น เป็นวิธีที่ง่ายต่อการใช้งาน รวดเร็ว และราคาถูก

คำสำคัญ: ซูโครส ฟรุคโทส กลูโคส น้ำตาล อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

Thesis Title The Development of a Paper-based Analytical Device for Detection of Sucrose, Glucose and Fructose for Sugar Production Industry
Name – Surname Miss Jinakan Aksorn
Program Applied Chemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Siriwan Teepoo, Ph.D.
Academic Year 2019

ABSTRACT

Sugar factories have encountered problems with the quality of sugar. During the sugar production process, sucrose can be converted to fructose and glucose, resulting in reduced quality in manufactured sugar. Therefore, the objective of this research was to develop a paper-based analytical device for detection of sucrose, fructose and glucose using specific enzymes for sucrose, fructose and glucose. Different colored detection products were obtained: brown for sucrose, blue for fructose and pink for glucose. The color intensity was measured with the Image J program.

In the first step, a paper-based analytical device was fabricated using polymer screen-printing method. The optimum conditions and the performances of a paper-based analytical device for detection of sucrose, fructose and glucose were investigated. The results were found that a paper-based analytical device for detection of sucrose, fructose and glucose provided high precision, accuracy and specificity. The linear ranges for detections were 1 - 25 mM for sucrose, 2 - 20 mM for fructose and 0.5 - 10 mM for glucose. The limit of detections of sucrose, fructose and glucose were 0.9 mM, 0.8 mM and 0.4 mM, respectively. The limit of quantitative detections were 2.9 mM for sucrose, 2.6 mM for fructose and 1.2 mM for glucose. Finally, the paper-based analytical device was applied for detection of sucrose, fructose and glucose in sugar and sugarcane samples by comparing with the chromatography method. Both methods showed no significant difference at the 95% confidence level.

The developed method for detections of sucrose, fructose and glucose has advantages that are simple to use, fast and cost-efficient.

Keywords: sucrose, fructose, glucose, sugar, paper-based analytical device

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องด้วยได้รับความกรุณาเป็นอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ ตั๊ญ ที่ให้คำแนะนำ เอาใจใส่ดูแลติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการทำวิทยานิพนธ์อย่างใกล้ชิด และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ นับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา ความทุ่มเท และความตั้งใจจริงของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพร มูลมั่งมี ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนตรนภิส แก้วช่วย ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบครั้งนี้ และยังกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา แนวคิด และตรวจสอบแก้ไขในส่วนที่บกพร่องต่างๆ ของงานวิจัย ตลอดจนวิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท ปี 2559 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบริษัทน้ำตาลราชบุรี จำกัด ที่ร่วมให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย อาคารสถาบันวิจัยเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้การสนับสนุนจนผู้วิจัยสามารถนำเอาความรู้ต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย และทำให้วิทยานิพนธ์นี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ตลอดจนบุคคลต่างๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจอีกมากมาย ที่ผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามได้หมดในที่นี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความปรารถนาดีของทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ หากวิทยานิพนธ์นี้มีข้อบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยกราบขออภัย ณ โอกาสนี้ด้วย

จิณากานต์ อักษร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญตาราง.....	(7)
สารบัญภาพ.....	(8)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 น้ำตาล.....	8
2.2 อุตสาหกรรมน้ำตาล.....	10
2.3 การเกิดน้ำตาลอินเวอร์ท.....	15
2.4 วิธีทั่วไปในการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	16
2.5 ไบโอดีเซนเซอร์.....	18
2.6 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 สารเคมี.....	28
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	29
3.3 วิธีการทดลอง.....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	50
4.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	50
4.2 การแปรผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	53
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และ กลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	54
4.4 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดปริมาณ ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	73
4.5 การตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างจริง.....	93

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1	สภาวะที่ศึกษาในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	40
ตารางที่ 4.1	สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	72
ตารางที่ 4.2	ผลการศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	73
ตารางที่ 4.3	ผลการศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณ ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	74
ตารางที่ 4.4	แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดซูโครส.....	75
ตารางที่ 4.5	ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดฟรุคโทส.....	77
ตารางที่ 4.6	ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส.....	79
ตารางที่ 4.7	แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายแบบลงคี่ในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	81
ตารางที่ 4.8	แสดงผลการศึกษาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณซูโครส.....	83
ตารางที่ 4.9	ผลการศึกษาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณฟรุคโทส.....	84
ตารางที่ 4.10	แสดงผลการศึกษาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส.....	85
ตารางที่ 4.11	แสดงค่าความเข้มข้นของสารทดสอบต่างๆ.....	87
ตารางที่ 4.12	การศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส.....	89
ตารางที่ 4.13	แสดงการศึกษาอายุการเก็บรักษางานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดฟรุคโทส.....	90
ตารางที่ 4.14	แสดงการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดกลูโคส.....	91
ตารางที่ 4.15	ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	92
ตารางที่ 4.16	การเปรียบเทียบความแตกต่างของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธีมาตรฐาน.....	93
ตารางที่ 4.17	การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ทั่วไปกับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น.....	94

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	6
ภาพที่ 1.2	ขั้นตอนการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	7
ภาพที่ 2.1	จำแนกประเภทของคาร์โบไฮเดรต.....	8
ภาพที่ 2.2	โครงสร้างทางเคมีของฟรุคโทส.....	9
ภาพที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของกลูโคส.....	9
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างทางเคมีของซูโครส.....	10
ภาพที่ 2.5	กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย.....	11
ภาพที่ 2.6	กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ.....	12
ภาพที่ 2.7	กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว.....	14
ภาพที่ 2.8	การทำงานของไบโอเซนเซอร์.....	19
ภาพที่ 2.9	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไข.....	22
ภาพที่ 2.10	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด.....	23
ภาพที่ 2.11	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการจุ่มด้วยไข.....	23
ภาพที่ 2.12	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการตัด.....	24
ภาพที่ 2.13	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคโฟโตลิโทกราฟี.....	24
ภาพที่ 2.14	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคพิมพ์แบบสกรีนด้วยขี้ผึ้ง.....	25
ภาพที่ 2.15	ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคพิมพ์แบบสกรีนด้วย PDMS.....	25
ภาพที่ 3.1	การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	29
ภาพที่ 3.2	วิธีการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์.....	30
ภาพที่ 3.3	หน้าต่างโปรแกรมประมวลผลภาพ.....	31
ภาพที่ 3.4	การเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการแปรผลจากโปรแกรมประมวลผลภาพ.....	32
ภาพที่ 3.5	เลือกไอคอนรูปแบบเพื่อทำการแปรผล.....	32
ภาพที่ 3.6	การตั้งค่ากำหนดขนาดรูปทรงในการแปรผล.....	33
ภาพที่ 3.7	การอ่านค่าความเข้มสี.....	33
ภาพที่ 4.1	ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก.....	51
ภาพที่ 4.2	ผลการหารูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (ก) รูปแบบที่ 1 (ข) รูปแบบที่ 2 และ (ค) รูปแบบที่ 3	52
ภาพที่ 4.3	ผลการเลือกอ่านค่าความเข้มสีสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.4 ผลการศึกษาปริมาณของสารละลายในบริเวณตรวจวัด (ก) 1 ไมโครลิตร (ข) 2 ไมโครลิตร (ค) 3 ไมโครลิตร (ง) 4 ไมโครลิตร (จ) 5 ไมโครลิตร (ฉ) 6 ไมโครลิตร และ (ช) 7 ไมโครลิตร.....	54
ภาพที่ 4.5 ผลการศึกษาปริมาณในบริเวณตัวอย่าง (ก) 10 ไมโครลิตร (ข) 20 ไมโครลิตร (ค) 30 ไมโครลิตร และ (ง) 40 ไมโครลิตร	55
ภาพที่ 4.6 ผลการศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทส.....	56
ภาพที่ 4.7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส.....	57
ภาพที่ 4.8 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส.....	58
ภาพที่ 4.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิติติน.....	59
ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาพีเอชของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	60
ภาพที่ 4.11 ผลเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส.....	61
ภาพที่ 4.12 ผลการศึกษาความเข้มข้นของฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส.....	62
ภาพที่ 4.13 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนต์.....	63
ภาพที่ 4.14 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์.....	64
ภาพที่ 4.15 ผลเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทส.....	65
ภาพที่ 4.16 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส.....	66
ภาพที่ 4.17 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส.....	67
ภาพที่ 4.18 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน.....	68
ภาพที่ 4.19 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอล.....	69
ภาพที่ 4.20 ผลการศึกษาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	70
ภาพที่ 4.21 ผลเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส.....	71
ภาพที่ 4.22 ช่วงความเป็นเส้นตรงสารละลายซูโครส.....	76
ภาพที่ 4.23 ช่วงความเป็นเส้นตรงสารละลายฟรุคโทส.....	78
ภาพที่ 4.24 ช่วงความเป็นเส้นตรงสารละลายกลูโคส.....	80
ภาพที่ 4.25 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	83
ภาพที่ 4.26 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟรุคโทสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	84
ภาพที่ 4.27 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	85
ภาพที่ 4.28 ผลการศึกษาตัวรบกวน (ก) มอลโทส (ข) แล็กโทส (ค) กาแล็กโทส (ง) ไซโลส และ (จ) แบลงค์ และ (ฉ) ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ตามลำดับ.....	86
ภาพที่ 4.29 ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส.....	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.30 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์.....	89
ภาพที่ 4.31 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดฟลูออไรด์.....	90
ภาพที่ 4.32 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับตรวจวัดคลอรีน.....	91

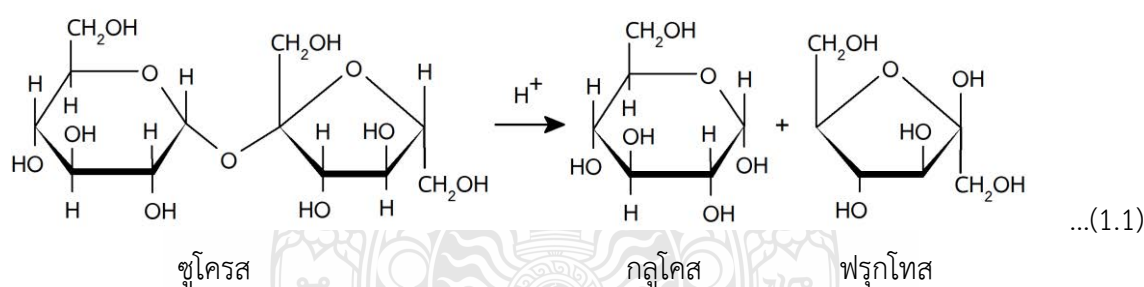


บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันอุตสาหกรรมน้ำตาลสามารถสร้างรายได้ให้ประเทศไทยได้อย่างมาก โดยน้ำตาลเป็นสินค้าส่งออกของประเทศที่ส่งออกมากเป็นอันดับสองของโลก [1] ซึ่งจากการศึกษาในปัจจุบันและที่ผ่านมาพบว่าโรงงานผลิตน้ำตาลได้พบกับปัญหาที่เกี่ยวกับคุณภาพของน้ำตาลที่ได้จากการผลิต ซึ่งกระบวนการผลิตน้ำตาลนั้นต้องผ่านหลายกระบวนการ เช่น ต้ม เคี้ยว การตกผลึก ปั่นแยกผลึก ฟอกสี และการอบ แล้วในขั้นตอนสุดท้ายจะได้น้ำตาลทรายขาว [2] ชนิดและคุณภาพของน้ำตาลทรายจำแนกตามปริมาณซูโครส เช่น น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ต้องมีปริมาณซูโครสไม่น้อยกว่า 99.8 เปอร์เซ็นต์ และต้องมีน้ำตาลอินเวอร์ทไม่เกินร้อยละ 0.04 [3] แต่ที่ผ่านมาพบว่าโรงงานผลิตน้ำตาลมีปริมาณซูโครสไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน เพราะระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลนั้น ซูโครสสามารถเกิดกระบวนการการเปลี่ยนแปลง (Inversion) หรือสลายตัวได้ง่าย เนื่องจากฟิเอช อุณหภูมิที่ใช้ในการเคี้ยวน้ำตาล ระดับความเข้มข้นสารละลายน้ำตาลและเวลาไม่เหมาะสม ทำให้ซูโครสสลายตัวเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคสและฟรุกโทส หรือที่เรียกว่า น้ำตาลอินเวอร์ท [4] ดังสมการที่ 1.1



การเกิด inversion ของซูโครสในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้ ทำให้ปริมาณซูโครสลดลง และเกิดน้ำตาลอินเวอร์ทเพิ่มขึ้น (กลูโคสและฟรุกโทส) โดยมีมาตรฐานการกำหนดคุณภาพของน้ำตาลในระดับต่างๆ เช่น น้ำตาลทรายขาวชั้นคุณภาพ 1 และ 2 ต้องมีน้ำตาลอินเวอร์ทไม่เกินร้อยละ 0.1 น้ำตาลทรายขาวชั้นคุณภาพ 3 ต้องมีน้ำตาลอินเวอร์ทไม่เกินร้อยละ 0.2 และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ต้องมีน้ำตาลอินเวอร์ทไม่เกินร้อยละ 0.04 [3] ดังนั้นถ้าในระหว่างการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเกิดการ inversion จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้ซึ่งจะได้น้ำตาลที่มีคุณภาพลดลง ทำให้ราคาจำหน่ายน้อยลง จึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อรายได้ของบริษัทเป็นอย่างยิ่ง พบว่าในปี 2558 โรงงานน้ำตาลเกิดความสูญเสียน้ำตาลในระหว่างกระบวนการผลิตไป 20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการติดตามปริมาณซูโครส ฟรุกโทส และกลูโคส ในระหว่างการผลิตน้ำตาลจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมาก เพื่อลดปัญหาการเกิด inversion ของซูโครสช่วยป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาต่อคุณภาพของน้ำตาลที่ได้จากการผลิต

วิธีทั่วไปที่ใช้ตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส เช่น เทคนิคโพลาไรเมตรี (Polarimetry) [5, 6] เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [7, 8] แต่พบว่าวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ เครื่องมือมีราคาสูง ผู้วิเคราะห์ต้องมีทักษะในการใช้เครื่องมือ มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การวิเคราะห์หลายขั้นตอนทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และไม่สามารถตรวจวัดได้ในภาคสนาม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะแก้ปัญหาดังกล่าว โดยจะสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อตรวจหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ได้พร้อมกัน โดยใช้เอนไซม์ ซึ่งจะมีเฉพาะเจาะจงต่อซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสเท่านั้น ทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่มีความจำเพาะเจาะจง ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว ราคาถูก สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน เหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้จริงในภาคสนาม

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสแบบกระดาษ
- 1.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.2.3 เพื่อหาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.2.4 เพื่อตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างจริงโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
 - 1.3.1.1 ออกแบบ pattern ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
 - 1.3.1.2 ประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์
 - 1.3.1.3 ศึกษาหาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่เหมาะสม
 - 1.3.1.4 ทารูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.3.2 วิธีการแปรผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ (Image J)
- 1.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
 - 1.3.3.1 ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตรวจวัด
 - 1.3.3.2 ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่าง
 - 1.3.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส
 - 1) ศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทส
 - 2) ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส
 - 3) ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส
 - 4) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีน

- 5) ศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา
- 6) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา
- 1.3.3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส
 - 1) ศึกษาความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนส
 - 2) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกโซยานด์
 - 3) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์
 - 4) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา
- 1.3.3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส
 - 1) ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส
 - 2) ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส
 - 3) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน
 - 4) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอล
 - 5) ศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา
 - 6) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา
- 1.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส ฟรุกโทส และกลูโคสแบบกระดาษ
 - 1.3.4.1 ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)
 - 1.3.4.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)
 - 1.3.4.3 ศึกษาความไววิเคราะห์ (Sensitivity)
 - 1.3.4.4 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection ; LOD)
 - 1.3.4.5 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation ; LOQ)
 - 1.3.4.6 ศึกษาหาความถูกต้องของวิธี (Accuracy)
 - 1.3.4.7 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Selectivity)
 - 1.3.4.8 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.3.5 ตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุกโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น เช่น เทคนิคโครมาโทกราฟี

1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย

ในงานวิจัยมีแนวคิดที่จะพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคแบบกระดาษ (Paper based devices) โดยมีแนวความคิดในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ เพื่อเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ดังนี้

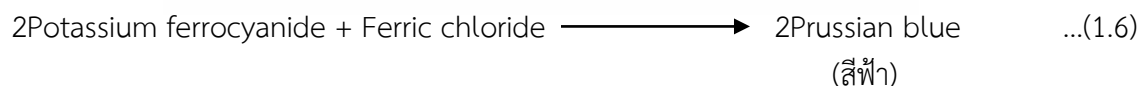
การตรวจวัดซูโครส

สำหรับการตรวจวัดซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับอินเวอร์เทส (Invertase; Inv) กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase; GOx) และเปอร์ออกซิเดส (Peroxidase; HRP) ถ้าในตัวอย่างมีซูโครส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสารโอไดอะนิซิน (o-dianisidine) ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ให้กลายเป็นรูปออกซิไดส์ ได้สารละลายสีน้ำตาล ดังสมการที่ 1.2-1.4 [9] ซึ่งความเข้มสีของสีน้ำตาลจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของซูโครส



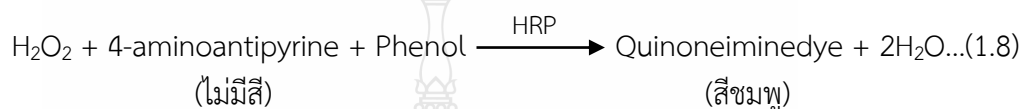
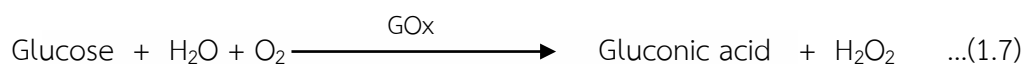
การตรวจวัดฟรุคโทส

ตรวจวัดฟรุคโทสได้จากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส (Fructose dehydrogenase; FDH) โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide) จากนั้นทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride) ได้เป็นสารละลายสีฟ้า ดังสมการที่ 1.5-1.6 [10] ซึ่งความเข้มของสีที่ได้แปรผันตรงกับความเข้มข้นฟรุคโทส

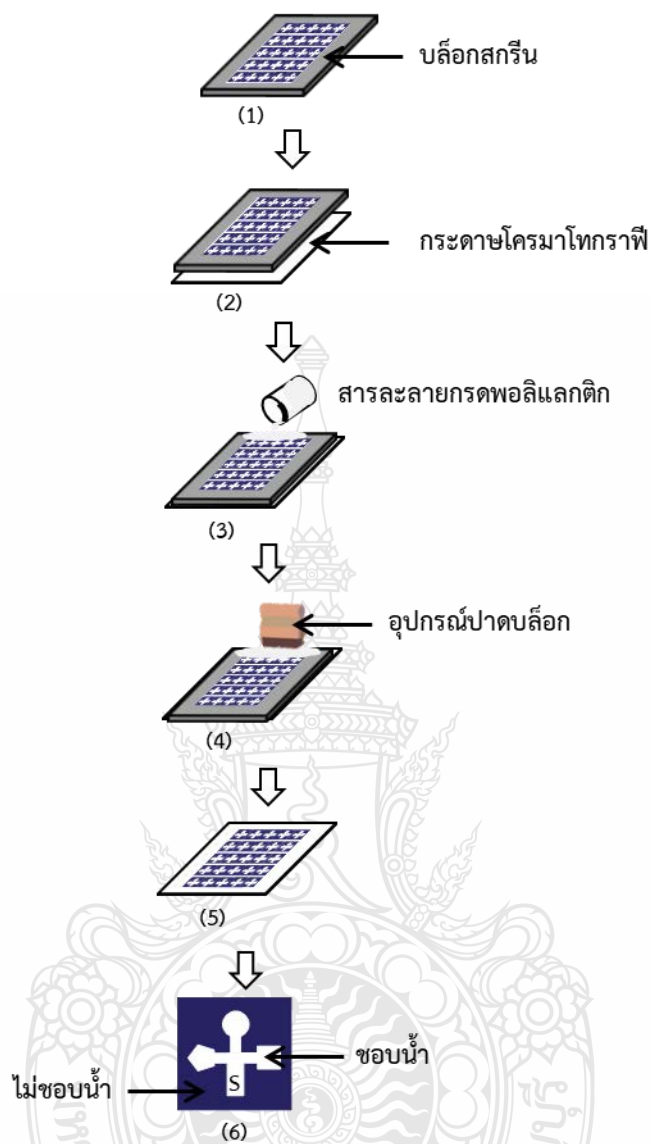


การตรวจวัดกลูโคส

อาศัยการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเกิดปฏิกิริยาต่อกับ 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-aminoantipyrine) และฟีนอล (Phenol) จะได้สารละลายสีชมพู สมการที่ 1.7-1.8 [11] เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น ความเข้มของสีชมพูก็จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน



จากนั้นใช้หลักการตรวจวัดชุดโครส ฟรุทโทส และกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ดังกล่าวนำมาสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดที่ง่าย โดยการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำลงบนกระดาษโครมาโทกราฟี (Whatman filter paper) โดยใช้พอลิเมอร์ในงานวิจัยนี้สนใจจะสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์แบบกรีนด้วยพอลิเมอร์ (Polymer screen-printing) ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่ยิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายสามารถทำได้โดยใช้บล็อกสกรีน ภาพที่ 1.1 แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (ขั้นที่ 1) ออกแบบ pattern ช่อง S สำหรับหยดตัวอย่าง รูปทรงห้าเหลี่ยมสำหรับหยดสารเคมีสำหรับตรวจวัดชุดโครส รูปทรงกลมสำหรับตรวจวัดฟรุทโทส และรูปทรงสี่เหลี่ยมสำหรับตรวจวัดกลูโคส จากนั้น (ขั้นที่ 2) วางบล็อกสกรีนลงบนกระดาษโครมาโทกราฟี (ขั้นที่ 3) ละลายกรดพอลิแลกติกในไดคลอโรมีเทน แล้วเทลงบนบล็อกสกรีน (ขั้นที่ 4) ใช้อุปกรณ์ปาดบล็อกทำการปาดสารละลายกรดพอลิแลกติก (ขั้นที่ 5) ปลอ่ยให้สารละลายกรดพอลิแลกติกแห้ง (ขั้นที่ 6) ได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยส่วนที่เป็น pattern (บริเวณสีขาว) มีสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) และบริเวณส่วนที่อยู่นอก pattern (สีน้ำเงิน) จะมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ปฏิกิริยาเคมีที่ 1.2 ถึง 1.8 จะเกิดขึ้นที่บริเวณที่ชอบน้ำ

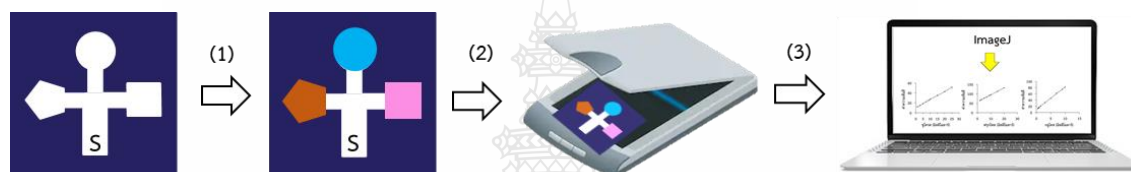


ภาพที่ 1.1 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สำหรับขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส แสดงดังภาพที่ 1.2 ขั้นที่ 1 หยดสารลงในรูปทรงห้าเหลี่ยม (ประกอบด้วย อินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส และ สารละลายไอโอดีน) ส่วนรูปทรงกลม (ประกอบด้วย ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลาย โพแทสเซียมเพอร์ริกซยาไนต์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์) และรูปทรงสี่เหลี่ยม (ประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และสารละลายฟีนอล) จากนั้นหยด สารละลายตัวอย่างลงในช่อง S สารละลายตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปที่รูปทรงห้าเหลี่ยม วงกลม และสี่เหลี่ยม โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในรูปทรงห้าเหลี่ยม ดังสมการที่ 1.2 ถึง 1.4 ในรูปทรงกลมจะเกิดปฏิกิริยา

ดังสมการที่ 1.5 และ 1.6 และรูปทรงสี่เหลี่ยม ปฏิกริยาเกิดดังสมการที่ 1.7 และ 1.8 ดังนั้นถ้าในสารละลายตัวอย่างมีซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ในรูปทรงห้าเหลี่ยมจะเกิดสีน้ำตาล รูปทรงกลมจะเกิดสีฟ้า และรูปทรงสี่เหลี่ยมจะเกิดสีชมพู หลังเกิดปฏิกริยาอย่างสมบูรณ์ในขั้นที่ 2 นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และสุดท้ายในขั้นที่ 3 ทำการตรวจวัดความเข้มสีที่ได้โดยใช้โปรแกรมประมวลผลภาพ (ImageJ) เพื่อวัดความเข้มของสี เพื่อนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานที่ความเข้มชั้นต่างๆของซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส แล้วคำนวณหาความเข้มชั้นของซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ในตัวอย่างได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

2. ขั้นตอนการตรวจวัด



ภาพที่ 1.2 ขั้นตอนการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส
- 1.5.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.5.3 ได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สามารถตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 1.5.4 ได้ตรวจหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

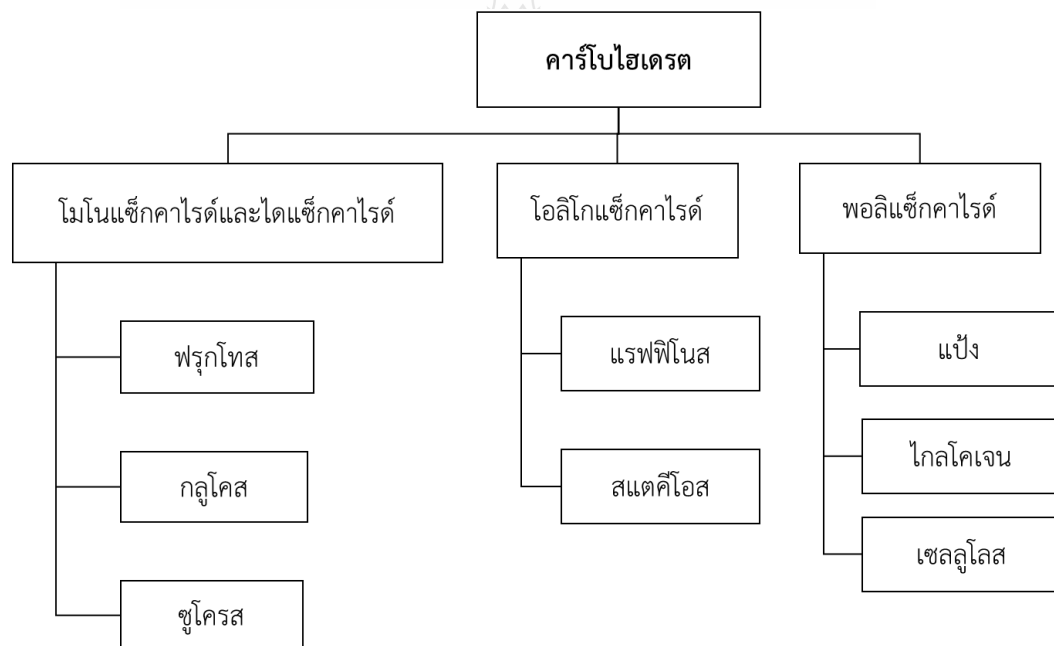
บทที่ 2

วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำตาล

น้ำตาล ทางวิทยาศาสตร์ หมายถึง โมโนแซ็กคาไรด์ หรือไดแซ็กคาไรด์ เป็นกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน (Carbon; C) ไฮโดรเจน (Hydrogen; H) และออกซิเจน (Oxygen; O) มีสูตรโมเลกุลทั่วไป คือ $(CH_2O)_n$ ซึ่งสามารถพบได้ตามธรรมชาติ และอาหารหลายชนิด เช่น นม โยเกิร์ต ผัก ผลไม้ และธัญพืช เป็นต้น น้ำตาลเป็นสารอาหารที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย โดยจำแนกกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ โมโนแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ (Monosaccharide and Disaccharides) โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharides) และพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) [12]

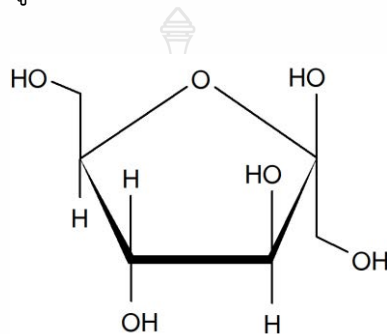
ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 จำแนกประเภทของคาร์โบไฮเดรต

2.1.1 ฟรุคโทส

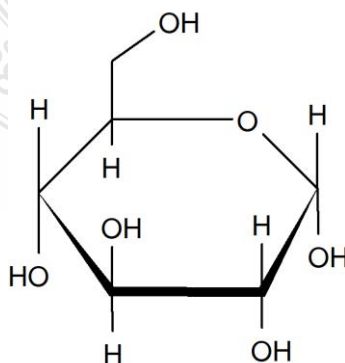
ฟรุคโทส หรือ เลวูโลส (Levulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตกลุ่มโมโนแซ็กคาไรด์ ได้จากการย่อยสลายของซูโครส ซึ่งซูโครสเป็นไดแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบด้วย ฟรุคโทส และกลูโคส โดยที่ฟรุคโทสเป็นคีโตน (Ketone) ถูกพบมากในผลไม้หลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล ฝรั่ง และส้ม เป็นต้น มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 2.2 ฟรุคโทสมีความสามารถในการละลายน้ำสูง สูตรโมเลกุล $C_6H_{12}O_6$ มีจุดหลอมเหลว 103 องศาเซลเซียส สารประกอบฟรุคโทสมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 180.16 กรัมต่อโมล และมีความหนาแน่น 1.69 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของฟรุคโทส

2.1.2 กลูโคส

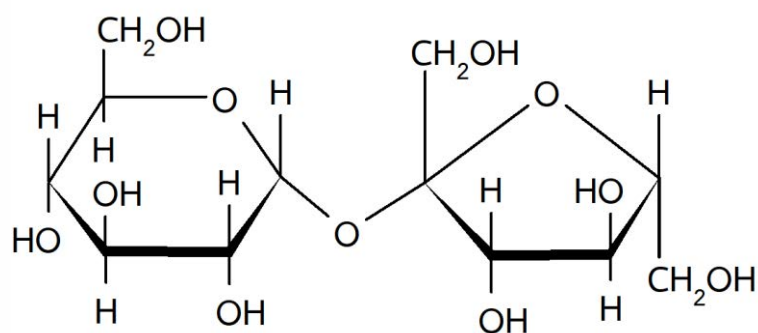
กลูโคส มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เดกซ์โทรส (Dextrose) กลูโคสเป็นแอลดีไฮด์ (Aldehyde) เป็นคาร์โบไฮเดรตกลุ่มโมโนแซ็กคาไรด์ สมบัติทั่วไปของกลูโคส ได้แก่ สูตรโมเลกุล $C_6H_{12}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุล 180.16 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลว 146 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 1.54 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 2.3 กลูโคสสามารถละลายน้ำได้ง่ายในรูปแบบผง มีรสหวาน ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และกลูโคสเป็นส่วนหนึ่งของไดแซ็กคาไรด์ เช่น ซูโครส (กลูโคส และ ฟรุคโทส) แล็กโทส (กลูโคส และ กาแล็กโทส) เป็นต้น



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของกลูโคส

2.1.3 ซูโครส

ซูโครส หรือเรียกทั่วไปว่า น้ำตาลทราย ซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรตกลุ่มไดแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วย 2 โมเลกุลของโมโนแซ็กคาไรด์นั่นคือ ฟรุกโทส และกลูโคส ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) โครงสร้างทางเคมีของซูโครสแสดงดังภาพที่ 2.4 ซูโครสจะพบมากในอ้อย และหัวบีท ซูโครสสามารถเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวทางเคมีได้ที่อุณหภูมิสูง และสภาวะกรดได้เป็นฟรุกโทส และกลูโคส เรียกว่า น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) มีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30 กรัมต่อโมล ความหนาแน่น 1.59 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จุดเดือด 186 องศาเซลเซียส ลักษณะของซูโครสเป็นผลึกของแข็ง ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวาน สามารถละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ และในตัวทำละลายที่มีขั้วอื่นๆ



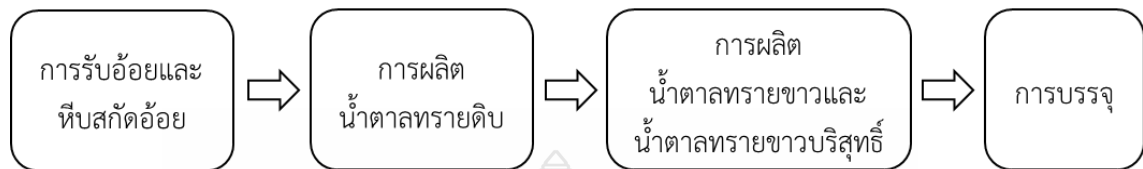
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของซูโครส

2.2 อุตสาหกรรมน้ำตาล

อุตสาหกรรมน้ำตาลถือเป็นอุตสาหกรรมแปรรูปที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งในแต่ละปี อุตสาหกรรมน้ำตาลสามารถสร้างรายได้ให้กับเศรษฐกิจของไทยเป็นจำนวนมาก คิดเป็นมูลค่ามากกว่า 250,000 ล้านบาท โดยปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากกว่า 11 ล้านไร่ ซึ่งในปี 2560 ผลิตอ้อยได้ประมาณ 92.95 ล้านตัน และยังสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรที่ปลูกอ้อยกว่า 430,000 ครัวเรือน ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลทรายรายใหญ่เป็นอันดับ 2 ของโลก [1] โดยผลผลิตน้ำตาลทรายทั้งหมด ผลิตจากอ้อย 70 เปอร์เซ็นต์ และจากต้นบีทอีก 30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอ้อยจึงเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลทราย [13, 14] โดยคุณภาพของน้ำตาลทรายจะขึ้นอยู่กับปริมาณซูโครส [15] ทางการค้าขายอ้อย กำหนดให้ซื้อขายอ้อยตามคุณภาพความหวาน วัดเป็น ซี.ซี.เอส. (Commercial Cane Sugar : C.C.S.) โดย ซี.ซี.เอส. คือ ค่าความหวานหรือปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในอ้อย มีความหมายว่า ราคาอ้อยจะแปรผันไปตามคุณภาพหรือความหวาน ดังนั้น หากอ้อยมีความหวานมาก จะมีค่า ซี.ซี.เอส. สูง

2.2.1 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายโดยส่วนใหญ่ของอุตสาหกรรม จะจำแนกออกเป็น 4 ขั้นตอนหลัก แสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

2.2.1.1 น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar)

(1) การสกัดน้ำอ้อย (Juice Extraction)

อ้อยจะถูกลำเลียงจากสะพานลำเลียงอ้อย ผ่านเครื่องสับอ้อย และเครื่องย่อยอ้อย แล้วผ่านเข้าชุดลูกหีบ (5 ชุด) เพื่อทำการสกัดน้ำอ้อย ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ น้ำอ้อย และกากอ้อย โดยกากอ้อยจากลูกหีบสุดท้าย จะถูกนำไปเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ในหม้อไอน้ำ เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตน้ำตาล

(2) การทำให้ใส (Juice Clarification)

น้ำอ้อยที่ได้จากการสกัดทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการทำให้ใส เพื่อแยกสิ่งสกปรกต่างๆออก โดยน้ำอ้อยจะถูกนำส่งเข้าหม้ออุ่นให้ความร้อนผสมกับปูนขาวเพื่อให้ตกตะกอนในถังพักใส จะได้น้ำอ้อยใส

(3) การระเหย (Evaporation)

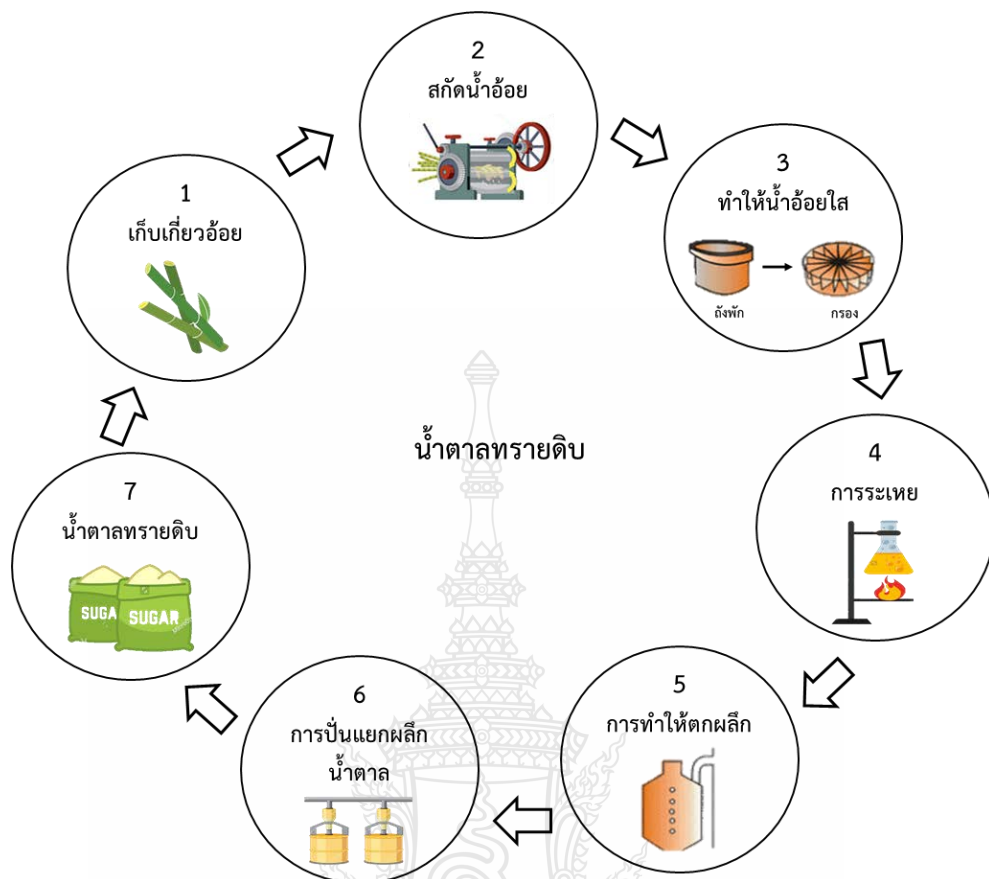
น้ำอ้อยที่ผ่านกระบวนการทำให้ใสแล้วจะนำเข้าสู่ชุดหม้อต้มเพื่อระเหยเอาน้ำออก จะได้น้ำเชื่อม (Syrup) ที่มีความเข้มข้นประมาณ 60 ถึง 65 บริกซ์ (Brix)

(4) การทำให้ตกผลึก (Crystallization)

น้ำเชื่อมจากการระเหยจะเข้าสู่หม้อเคี้ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออก จนน้ำเชื่อมอิมตัว จะเกิดผลึกน้ำตาลขึ้น โดยผลึกน้ำตาล และน้ำเลี้ยงผลึกที่เกิดขึ้น เรียกว่า แมสสิควิต (Massecurite)

(5) การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifuging)

แมสสิควิตจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากน้ำเลี้ยงผลึก โดยใช้หม้อปั่น (Centrifugals) ได้น้ำตาลทรายดิบ ซึ่งจะถูกจัดเก็บเพื่อรอการจำหน่าย และใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ต่อไป [16]



ภาพที่ 2.6 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ

2.2.1.2 น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

(1) การละลาย (Remelting)

นำน้ำตาลทรายดิบคุณภาพสูง มาละลายผลิตน้ำตาล ได้เป็นน้ำเชื่อมออกมา (Remelted Liquor)

(2) การทำความสะอาด และลดค่าสีของน้ำเชื่อม (Carbonatation Process)

นำน้ำเชื่อมที่ได้จากการละลายน้ำตาลทรายดิบมากรองผ่านตะแกรง แล้วผสมเข้ากับปูนขาวในหม้อฟอก (Caborator) โดยมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวฟอกสี เพื่อลดค่าสีของน้ำเชื่อม จากนั้นผ่านเข้าหม้อกรองแบบใช้ความดัน (Pressure Filter) เพื่อกรองตะกอนออกจากน้ำเชื่อม จากนั้นน้ำเชื่อมที่ได้จะผ่านการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Resin) เพื่อทำการลดสีขั้นสุดท้าย และจะได้เป็นน้ำเชื่อมรีไฟน์ (Fine liquor)

(3) การทำให้เกิดผลึก

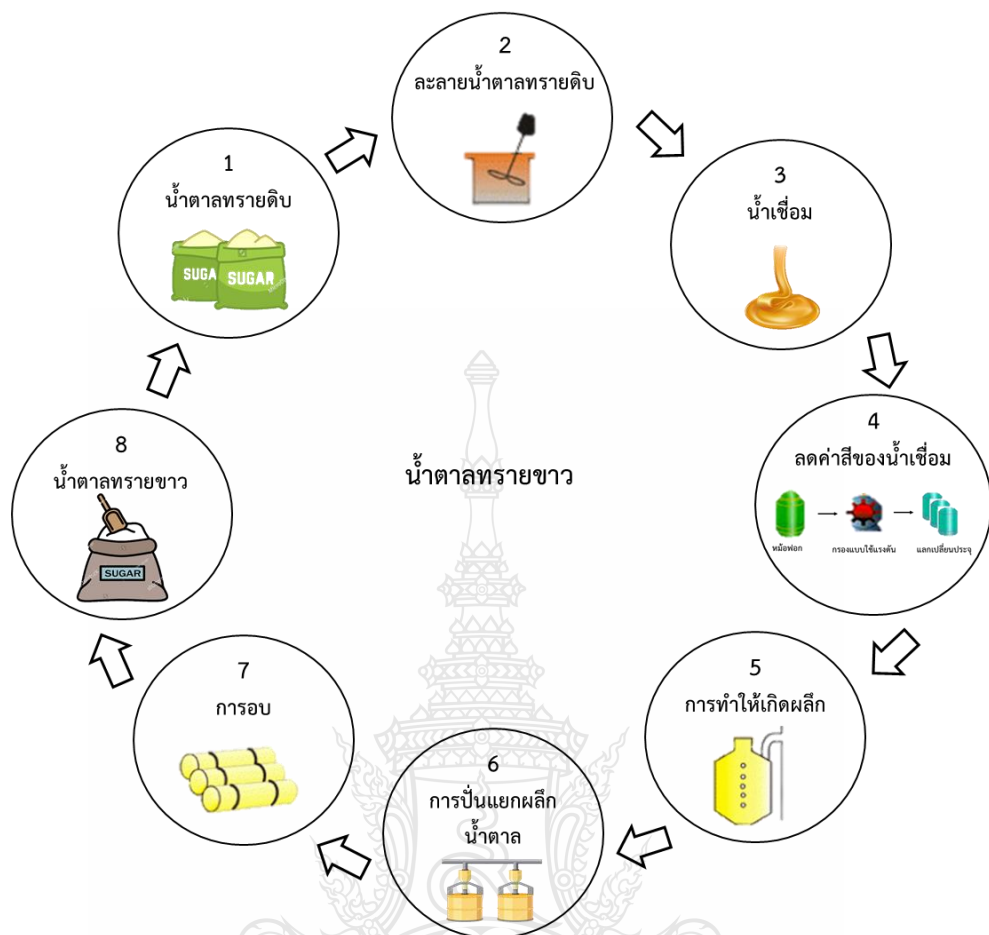
นำน้ำเชื่อมรีไฟน์เข้าหม้อเคี่ยวระบบสุญญากาศ เพื่อระเหยน้ำออก ทำให้เกิดผลึกน้ำตาลได้เป็นแมสสิควิท

(4) การปั่นแยกผลึกน้ำตาล

แยกผลึกน้ำตาลในแมสสิควิทออก โดยใช้หม้อปั่น จะได้ผลึกน้ำตาลทรายขาวและน้ำทรายทรายขาวบริสุทธิ์

(5) การอบ (Dry)

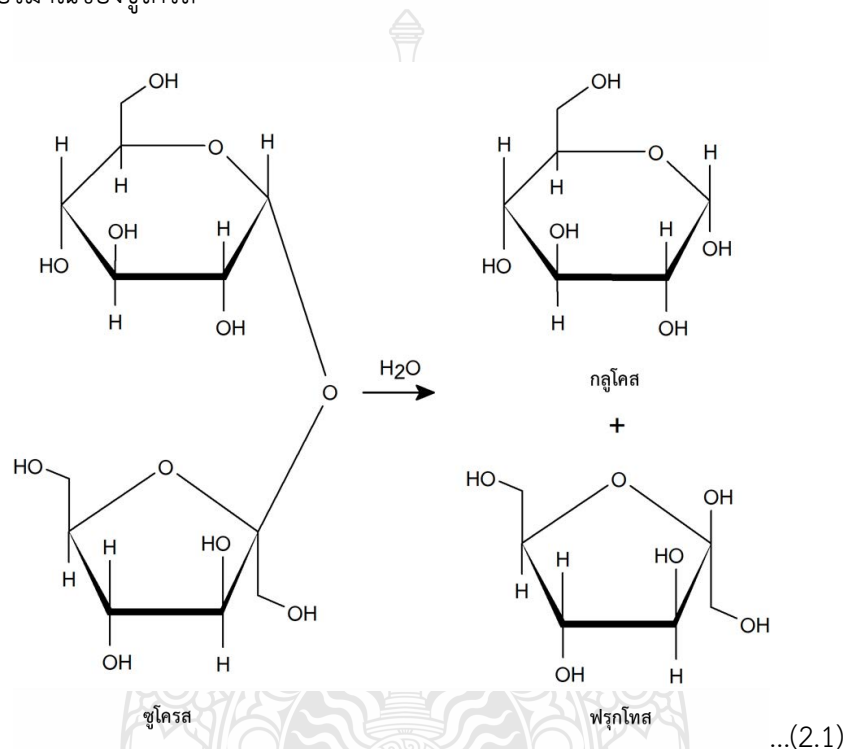
นำผลึกน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ผ่านเข้าหม้ออบ (Dryer) เพื่อไล่ความชื้นออก จากนั้นทำการบรรจุใส่กระสอบเพื่อทำการจำหน่ายต่อไป [17]



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว

2.3 การเกิดน้ำตาลอินเวอร์ท

ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย จะมีหลายขั้นตอนในกระบวนการผลิตที่สามารถเป็นปัญหาทำให้เกิดการสลายตัวทางเคมี หรือเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลง (Inversion) ของน้ำตาลซูโครส ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นน้ำตาลฟรุคโทส และน้ำตาลกลูโคส ดังสมการที่ 2.1 โดยน้ำตาลที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลซูโครสนั้นเรียกว่า “น้ำตาลอินเวอร์ท (Invert sugar)” ทำให้ส่งผลเสียต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำตาลทราย นั่นคือจะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลง เนื่องจากคุณภาพของน้ำตาลทรายจะขึ้นอยู่กับปริมาณของซูโครส



โดยการเกิดน้ำตาลอินเวอร์ทนั้นจะเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดน้ำตาลอินเวอร์ท ยกตัวอย่างเช่น ขั้นตอนการเติมปูนขาวพร้อมกับให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล พีเอช และระยะเวลาการผลิต ทำให้จำเป็นต้องป้องกัน หรือควบคุมปัจจัยต่างๆของการเกิดน้ำตาลอินเวอร์ท (ฟรุคโทส และกลูโคส) ให้เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายน้อยที่สุด

2.4 วิธีทั่วไปในการตรวจวัดซูโครส ฟรุกโทส และกลูโคส

2.4.1 วิธีทางโพลาไรเมตรี (Polarimetry)

ในปี ค.ศ. 2013 Hemant Desai และคณะ [18] ได้ตรวจวัดซูโครส ในตัวอย่างเมล็ดชัณท์ ด้วยวิธีโพลาไรเมตรี เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่าง 2.5 กรัม ในน้ำ 1.25 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วตกตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟต เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการกรองสารละลายที่ได้ นำไปตรวจวัดที่ 20 องศาเซลเซียส โดยใช้แสงสีเหลืองของโซเดียม-ดี (sodium-D) ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร จากการวิจัยพบว่า ซูโครสหมุนระนาบแสงที่ +66.7 องศา มีช่วงการตรวจวัดของซูโครสที่ความเข้มข้น 10 ถึง 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชีตจำกัดในการตรวจพบที่ 0.076 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชีตจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ 0.231 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4.2 วิธีทางโครมาโทกราฟี (Chromatography)

2.4.2.1 โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยการใช้การกระเจิงแสงเป็นตัวตรวจวัด (Evaporative Light Scattering Detector)

Chunmei Ma และคณะ [7] ทำการตรวจวัดฟรุกโทส ซอร์บิทอล กลูโคส และซูโครสในผลไม้ ได้แก่ ลูกพีช แอปเปิ้ล แตงโม และเชอร์รี่ เตรียมตัวอย่างโดยใช้เนื้อเยื่อชั้นกลาง ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารแขวนลอยไปปั่นเหวี่ยง และกรองด้วยมิลลิพอร์ เมมเบรน จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Phenomenex Luna 5u NH₂ 100A ใช้อะซิโตนไตรลต่อน้ำ (82.5:17.5 ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้การกระเจิงแสงในการตรวจวัด ด้วยการตั้งค่าระบบของตัวตรวจวัดการกระเจิงแสง ต่อไปนี้ ตั้งอุณหภูมิที่ 82 องศาเซลเซียส ให้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจนที่ 2 ลิตรต่อนาที จากผลการศึกษาพบว่า ช่วงความเข้มข้นที่สามารถวิเคราะห์ฟรุกโทส คือ 20 ถึง 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซอร์บิทอล 20 ถึง 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 20 ถึง 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 40 ถึง 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีชีตจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดของฟรุกโทส ซอร์บิทอล กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 0.07 0.27 0.07 และ 0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของฟรุกโทส ซอร์บิทอล กลูโคส และซูโครส ได้ 96.05 103.32 102.28 และ 98.53 ตามลำดับ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 25 นาที

2.4.2.2 โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ดรรชนีหักเหของแสงเป็นตัวตรวจวัด

จากงานวิจัยของ Miut Filip และคณะ [8] ทำการตรวจวัดซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส และซอร์บิทอล ในตัวอย่างใบ เปลือก และรากของแอปเปิ้ล ทำการเตรียมตัวอย่างโดยบดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านด้วยเครื่องสั่นด้วยเสียงความถี่สูง และกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ใช้คอลัมน์ Carbosep Coregel 87H3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ มีอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิคอลัมน์อยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วยดรรชนีหักเหของแสง จากการศึกษาพบว่า สามารถวิเคราะห์หาปริมาณซูโครส ได้ในช่วงความเข้มข้น 277 ถึง 5540 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคส 255 ถึง 5100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฟรุคโทส 255 ถึง 5100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และซอร์บิทอล และ 283 ถึง 5660 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.4.2.3 โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ดรรชนีหักเหของแสงเป็นตัวตรวจวัด

Wanxia Xu และคณะ [19] ทำการตรวจวัดฟรุคโทส กลูโคส และซูโครส ในตัวอย่างกากน้ำตาล ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้โมลโทสเป็น internal standard พร้อมกับใช้ดรรชนีหักเหของแสงเป็นตัวตรวจวัด เตรียมตัวอย่างโดยชั่งกากน้ำตาล 50 กรัม ในน้ำ 150 กรัม แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมข้างต้นและสาร internal standard ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction) C18 และกรองด้วย 0.22 ไมโครเมตร ก่อนทำการฉีด จากนั้นทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะที่ใช้ คือ ใช้คอลัมน์ชนิด C18 อนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาดคอลัมน์ 250 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไตรล่อน้ำ (75:25 ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และตัวตรวจวัดดรรชนีหักเหของแสง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากงานวิจัยพบว่าสามารถตรวจวัดฟรุคโทสได้ในช่วงความเข้มข้น 3.30 ถึง 16.48 กรัมต่อลิตร กลูโคส 1.80 ถึง 9.02 กรัมต่อลิตร และซูโครส 5.94 ถึง 29.70 กรัมต่อลิตร โดยมีขีดจำกัดในการตรวจพบของฟรุคโทส กลูโคส ซูโครส ที่ 0.16 0.04 และ 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และใช้เวลาในการตรวจวัด 18 นาที

2.4.3 วิธีทางสเปกโตรสโคปี

2.4.3.1 รามานสเปกโตรสโคปี

งานวิจัยของ Kerem Ilaslan และคณะ [20] ทำการวิเคราะห์ปริมาณ กลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสอย่างรวดเร็วในเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ โดยใช้เทคนิครามานสเปกโตรสโคปี ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่าง น้ำแร่ โซดา น้ำส้มคั้น และ Schorle (ทำจากการเจือจางน้ำแอปเปิ้ลด้วย น้ำอัดลม) เตรียมตัวอย่างโดยใส่แก๊สในเครื่องความถี่สูง เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างไป วิเคราะห์โดยไม่ต้องเจือจาง สภาวะที่ใช้ laser power 75 เมกกะวัตต์ จากการศึกษาพบว่า ให้ขีดจำกัดในการตรวจพบ 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ 0.7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

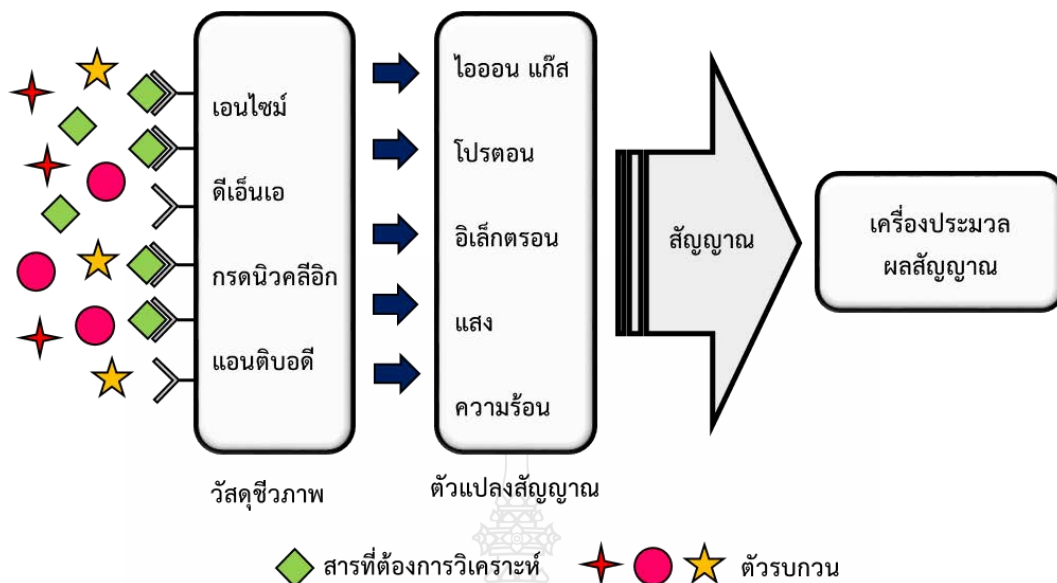
2.4.3.2 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ในปี ค.ศ. 2017 ได้มีงานวิจัยของ Borji และคณะ [21] ได้ทำการพัฒนาวิธี ในการตรวจวัดความเข้มข้นซูโครส ในระบบที่บริสุทธิ์และไม่บริสุทธิ์ (มีกลูโคส และฟรุคโทส) ด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการตรวจวัดตัวอย่างที่มีความยาวคลื่น 420 ไมโครเมตร จากการศึกษาพบว่า สามารถตรวจวัดซูโครสได้ในช่วง 0.3 ถึง 1.9 กรัมต่อมิลลิลิตร

จากวิธีดังกล่าวข้างต้นพบว่ามีข้อดี คือ มีไววิเคราะห์ และมีความแม่นยำสูง แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัด คือ ต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ เพื่อกำจัดตัวรบกวนต่างๆ ต้องส่งตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการเท่านั้น มีหลายขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ เครื่องมือมีราคาสูง และใช้เวลา ในการวิเคราะห์นาน จึงทำให้มีนักวิจัยสนใจที่พัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์ขึ้น เพื่อตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง และตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว

2.5 ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)

ไบโอเซนเซอร์เริ่มต้นในทศวรรษที่ 1960 โดย Clark และ Lyons [22] โดยไบโอเซนเซอร์ คือ อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพ เพื่อติดตามสารที่ต้องการวิเคราะห์ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ วัสดุชีวภาพ (Biological elements) และตัวตรวจวัด (Transducer) ซึ่งลักษณะการทำงานของไบโอเซนเซอร์ คือ วัสดุชีวภาพจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการตรวจวัด ทำให้ได้สัญญาณ หรือผลิตภัณฑ์ขึ้น จากนั้นตัวตรวจวัดจะแปลงสัญญาณที่เกิดจากการจับกันระหว่าง สารชีวภาพกับสารที่ต้องการตรวจวัด ซึ่งลักษณะสัญญาณที่เกิดขึ้นอาจเป็นไอออน อิเล็กตรอน และแสง เป็นต้น จากนั้นจะแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าแล้วผ่านเครื่องอ่านสัญญาณ อ่านค่าที่ได้แล้วนำมาประมวลผล จะได้ปริมาณสารที่ต้องการตรวจวัด แสดงดังภาพที่ 2.8 ซึ่งในปัจจุบัน ไบโอเซนเซอร์ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น ด้านชีวภาพและอุตสาหกรรม ด้านสิ่งแวดล้อม [23-25] และด้านการแพทย์ [26, 27] เป็นต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไววิเคราะห์สูง มีความจำเพาะเจาะจง และวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ทำให้เทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการ วิเคราะห์สารต่าง ๆ มากขึ้น



ภาพที่ 2.8 การทำงานของไบโอเซนเซอร์

2.5.1 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์

2.5.1.1 วัสดุชีวภาพ

วัสดุชีวภาพ (Biological elements) ทำหน้าที่เกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และให้สัญญาณทางชีวเคมี เคมี หรือฟิสิกส์ ยกตัวอย่างสารชีวภาพ อาทิเช่น เอนไซม์ (Enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) เนื้อเยื่อ (Tissue) และ แอนติบอดี (Antibody) เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันเอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดสาร เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ สามารถลดพลังงานก่อกัมมันต์ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น และมีความจำเพาะเจาะจงสูง

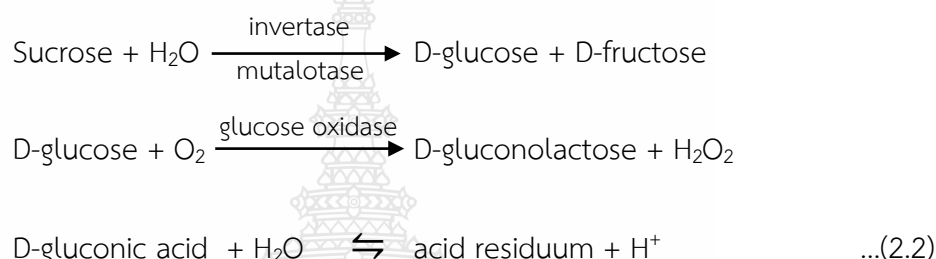
2.5.1.2 ตัวตรวจวัด

ตัวตรวจวัด (Transducer) เป็นส่วนสำคัญในการทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่เกิดจากการจับกันระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งชนิดของตัวตรวจวัดที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในทางไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical) เช่น โพลีเมตริก (Potentiometric) แอมเพโรเมตริก (Amperometric) ทางสี (Colorimetric) ทางแสง (Optical) ทางคลื่นเสียง (Acoustic) และทางความร้อน (Thermal) เป็นต้น สำหรับตัวตรวจวัดที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารในปัจจุบัน คือ ทางสี เนื่องจากมีข้อดี คือ ง่าย และรวดเร็ว [28]

2.5.2 ตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์

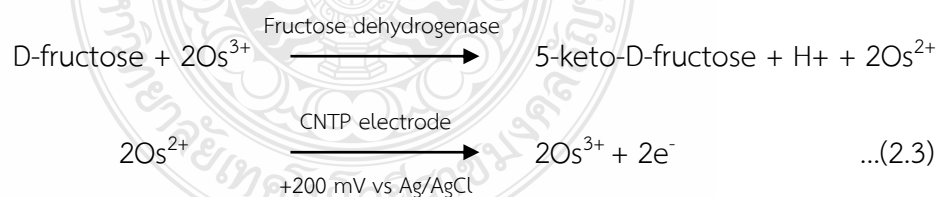
2.5.2.1 การตรวจวัดซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส มิวตาโรเทส และกลูโคสออกซิเดส

จากงานวิจัยตรวจวัดหาซูโครสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งทำการตรึงเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดบนขั้วไฟฟ้า (Interdigitated planar electrodes) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาดังนี้ ชั้นแรกซูโครสจะถูกย่อยสลายด้วยอินเวอร์เทส (Invertase) และมิวตาโรเทส (Mutarotase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส และฟรุคโทส จากนั้นกลูโคสทำปฏิกิริยากับออกซิเจน โดยมีกลูโคสออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และดี-กลูโคนแลกโทส (D-gluconolactose) ดังสมการที่ 2.2 [29]



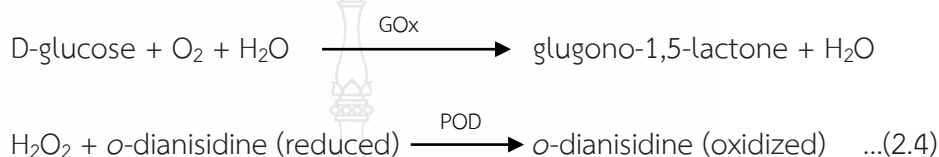
2.5.2.2 การตรวจวัดฟรุคโทสโดยใช้เอนไซม์ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส

งานวิจัย Riccarda และคณะ [30] ทำการตรวจวัดฟรุคโทสในการวิเคราะห์อาหาร ในตัวอย่างน้ำผึ้ง น้ำผลไม้ โซดา และเครื่องดื่มชูกำลัง โดยใช้เอนไซม์ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส ซึ่งในการตรวจวัดฟรุคโทสจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออสเมียม (Osmium; Os) โดยมีเอนไซม์ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-keto-D-fructose และออสเมียม (II) จากนั้นออสเมียมจะถูกรีดิวซ์ที่ขั้วไฟฟ้า (Carbon nanotube paste; CNTP) ที่ศักย์ +200 มิลลิโวลต์ ดังสมการที่ 2.3



2.5.2.3 การตรวจวัดกลูโคสโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

จากงานวิจัย Sabriye และคณะ [31] ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกันในการตรวจวัด ตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase; GOx) บน Selenium nanoparticle-mesoporous silica composite (MCM-41) จากนั้นเตรียมเป็นขั้วไฟฟ้า (Carbon paste electrode; CPE) ทำการทดลองทางเคมีไฟฟ้า โดยทดลองในขั้วไฟฟ้า แล้ววัดปฏิกิริยาทางอ้อมที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารที่ทำให้เกิดสี ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดส (Peroxidase; POD) แสดงดังสมการที่ 2.4



2.6 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

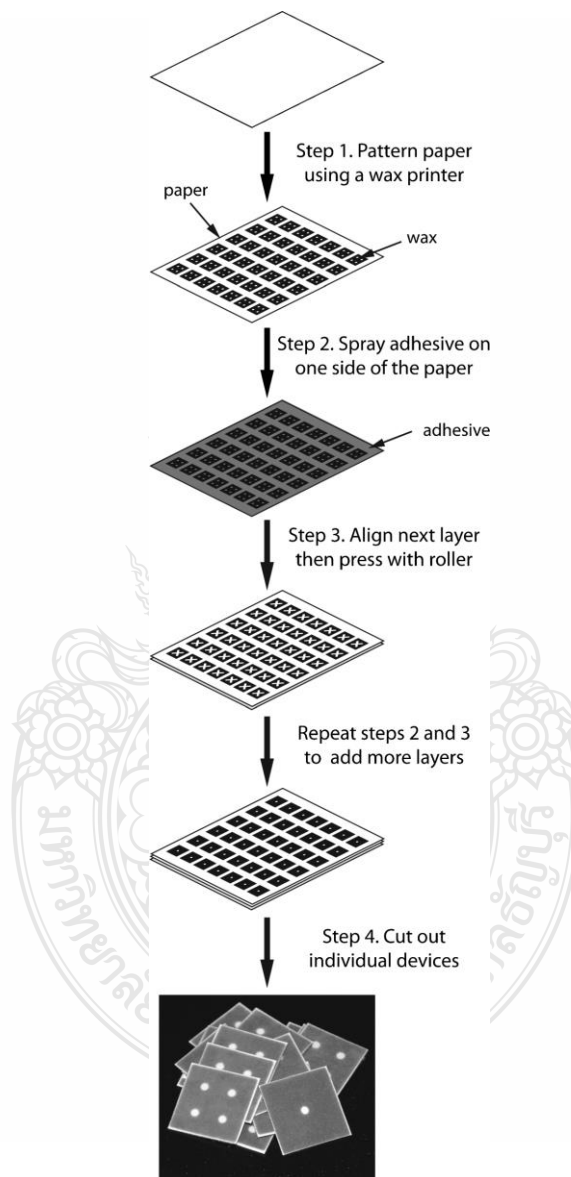
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามรูปแบบใหม่ โดยในปี คศ. 2007 Martinez และคณะ [32] ได้คิดค้นอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษขึ้น ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำการตรวจวัดสารบนกระดาษ เช่น กระดาษโครมาโทกราฟี อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) โดยส่วนที่ชอบน้ำจะเป็นส่วนที่สารละลายเกิดปฏิกิริยา สร้างเป็นช่องการไหลของสารละลายไปยังบริเวณที่ต้องการตรวจวัดได้ โดยจะควบคุมทิศทางการไหลของสารละลายบนกระดาษโครมาโทกราฟีด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สารละลายที่เคลื่อนที่ไปตามช่องการไหลบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะเคลื่อนที่ด้วยแรงแคปิลลารี (Capillary action) โดยไม่อาศัยแรงภายนอก [32, 33] นอกจากนี้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เป็นอุปกรณ์ที่สร้างได้ง่าย ขนาดเล็ก พกพาได้ง่าย ราคาถูก และใช้สารเคมีน้อย ทำให้เทคนิคอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายด้าน เช่น สิ่งแวดล้อม [34-37] ทางการแพทย์ [38-40] และอาหาร [41-43] เป็นต้น

2.6.1 วิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ จะสร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) เพื่อจำกัดทิศทางการแพร่ของสารละลายบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับบริเวณที่เหลือของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะมีสมบัติชอบน้ำ จะใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อทดสอบสารที่ต้องการตรวจวัด วิธีที่ใช้ในการสร้างส่วนกันที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีหลายเทคนิค เช่น การพิมพ์ด้วยไข (Wax printing) [44] การพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด (Ink jet printing) [45] การจุ่มด้วยไข (Wax dipping) [46] การตัดกระดาษ (Paper cutting) [47] โฟโตลิโทกราฟี (Photolithography) [48] และการพิมพ์แบบสกรีน (Wax screen printing) [49, 50]

2.6.1.1 เทคนิคการพิมพ์ด้วยไข

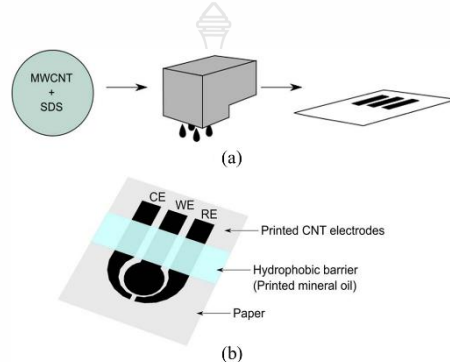
โดย Gregory และคณะ [44] ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไข ทำการสร้างรูปแบบโดยใช้เครื่องพิมพ์แว็กซ์ จากนั้นฉีดสเปรย์กาวด้านหนึ่งของกระดาษ ต่อไปจัดเรียงเป็นชั้นด้วยการกดลูกกลิ้ง สุดท้ายตัดอุปกรณ์แต่ละชิ้น แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไข ดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไข [44]

2.6.1.2 เทคนิคการพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด

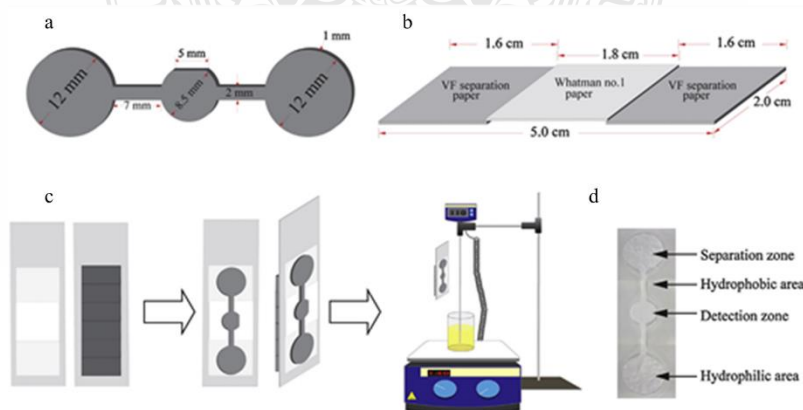
ต่อมา Tallis และคณะ [45] ได้ใช้วิธีการผสมหมึกคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้อัตราส่วนของ Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) กับ Sodium n-dodecyl sulfate (SDS) ในน้ำที่ปราศจากไอออน นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นด้วยความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที ต่อกันไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาทีที่ 12,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำส่วนใสใส่ตลับหมึก แล้วใช้เครื่องพิมพ์ทำการพิมพ์ด้วยหมึกคาร์บอนนาโนทิวบ์ลงบนกระดาษ จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ แสดงดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด [45]

2.6.1.3 เทคนิคการจุ่มด้วยไซ

เทคนิคการจุ่มด้วยไซ โดย Julaluk และคณะ [46] วิธีนี้ใช้แม่พิมพ์เหล็กในการจัดวางตำแหน่งของกระดาษกรองที่วางบนกระดาษสไลด์ และด้านหลังของกระดาษสไลด์ติดแม่เหล็ก เพื่อเป็นการยึดชั่วคราว จากนั้นนำไปจุ่มลงในไซที่หลอมละลายที่อุณหภูมิ 105 ถึง 130 องศาเซลเซียส ยกออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำกระดาษสไลด์และแม่พิมพ์เหล็กออก ก็จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ แสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการจุ่มด้วยไซ [46]

2.6.1.4 เทคนิคการตัด

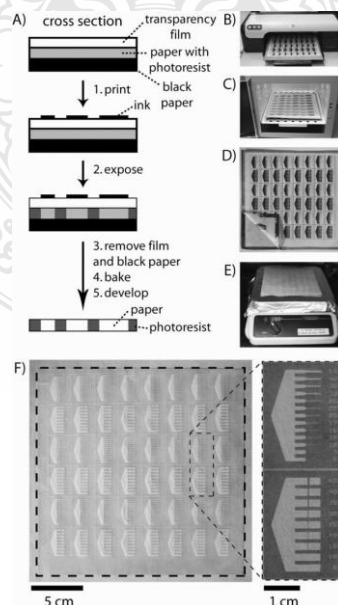
Erin และ คณะ [47] ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการตัด โดยทำการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษตามต้องการ จากนั้นทำการตัดอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเครื่องตัดกระดาษ (Knife plotter) เพื่อจำกัดทิศทางการไหลของสาร ให้เกิดปฏิกิริยาเฉพาะบริเวณที่ต้องการ แสดงดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการตัด [47]

2.6.1.5 เทคนิคโฟโตลิโทกราฟี

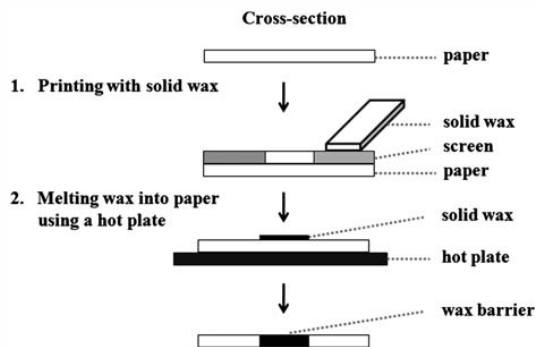
ในปี คศ. 2008 Andres และคณะ [48] ได้ทำการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยเทคนิคโฟโตลิโทกราฟี คือ การใช้แสงพิมพ์รูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ทำได้โดยออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ จากนั้นพิมพ์รูปแบบด้วยเครื่องพิมพ์เลเซอร์ ขึ้นต่อไปนำกระดาษโครมาโทกราฟีฉายแสงยูวี (UV) แล้วนำไปแช่สารละลายไวแสง (Photoresist) แล้วทำให้แห้งโดยใช้เตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 5 ถึง 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยอะซิโตน และ 70 เปอร์เซ็นต์ ไอโซโพรพานอล จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษพร้อมใช้งาน ขั้นตอนการสร้างแสดงดังภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคโฟโตลิโทกราฟี [48]

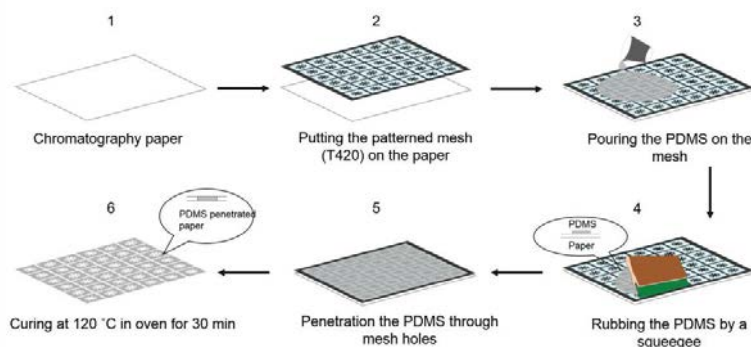
2.6.1.6 เทคนิคพิมพ์แบบสกรีน

ในปี ค.ศ. 2011 Dungchai และคณะ [49] สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคพิมพ์แบบสกรีนด้วยขี้ผึ้ง (Solid wax) โดยวางบล็อกสกรีนบนกระดาษโครมาโทกราฟี แล้วถูขี้ผึ้งบนบล็อกด้วยที่ปาดบล็อก จากนั้นขี้ผึ้งที่สกรีนลงกระดาษโครมาโทกราฟี จะถูกละลายด้วยเตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ขี้ผึ้งจะซึมไปยังกระดาษโครมาโทกราฟี เพื่อสร้างบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ แสดงดังภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.14 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคพิมพ์แบบสกรีนด้วยขี้ผึ้ง [49]

ต่อมา Saeed และคณะ [50] ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดกลูโคส และโปรตีน โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่สร้างด้วยเทคนิคพิมพ์สกรีนซึ่งใช้พอลิไดเมทิลซิลอกเซน (Polydimethylsiloxane; PDMS) เป็นสารที่สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเทคนิคพิมพ์สกรีน แสดงดังภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.15 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคพิมพ์แบบสกรีนด้วย PDMS [50]

จากการศึกษาวิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ พบว่า เทคนิคการพิมพ์ด้วยไข การพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีด การจุ่มด้วยไข การตัดกระดาษ และโฟโตลิโทกราฟี ยังมีข้อจำกัด คือ ไขมีราคาสูง มีขั้นตอนการให้ความร้อนหลังการพิมพ์ การพิมพ์ด้วยน้ำหมึกฉีดต้องมีขั้นตอนในการเตรียม น้ำหมึกหลายขั้นตอน ไม่เหมาะกับการพิมพ์ที่มีรูปแบบใหญ่ และอุปกรณ์มีราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้เทคนิคพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์ในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเนื่องจากมี ข้อดี คือ เป็นเทคนิคที่ง่าย อุปกรณ์ที่ใช้ต้นทุนต่ำ สามารถสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้รวดเร็ว

2.6.2 วิธีการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สำหรับการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยใช้อุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษ นิยมใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) และทางสี (Colorimetry) ตัวอย่างเช่น ได้มีงานวิจัยพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดกลูโคสในเครื่องดื่มสำเร็จรูป ร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ และตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีแบบตัด จากนั้นสร้างขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าวัด และขั้วไฟฟ้าอ้างอิง หลังจากนั้นตรึงกลูโคสออกซิเดส และสารช่วยส่งผ่านอิเล็กตรอนลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ซึ่งตรวจวัดกลูโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.30 โวลต์ พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างเพียง 0.5 ไมโครลิตร มีช่วงความเข้มข้นที่สามารถวิเคราะห์กลูโคสได้ คือ 0.25 ถึง 2.00 มิลลิโมลาร์ ชัดจำกัดในการตรวจพบ เท่ากับ 0.01 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวัดกลูโคสในเครื่องดื่มสำเร็จ ภาพที่ได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับเทคนิค Benedict's test พบว่าผลการตรวจวัดกลูโคสไม่แตกต่างกัน แต่เทคนิคอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีข้อดีกว่า คือ ใช้สารตัวอย่างน้อย และให้ความเที่ยงที่ดีกว่า [51]

นอกจากนี้ ใน ค.ศ. 2013 Noiphung และคณะ [46] ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ และตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีแบบการจุ่มด้วยไขสำหรับการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างเลือดครบส่วน (Whole blood sample) ตรวจวัดกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า -0.10 โวลต์ พบว่าสามารถตรวจวัดได้ในขั้นตอนเดียวโดยไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างด้วยการปั่นแยกเม็ดเลือด ทำให้ลดระยะเวลาการตรวจวัดลง และใช้ตัวอย่างเพียง 200 ไมโครลิตร

และต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Adkins และ Henry [52] ได้สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไขเพื่อตรวจวัดกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครส ในเครื่องดื่ม และตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ลวดทองแดงขนาดไมโครเมตรเป็นขั้วไฟฟ้า (Copper microwire electrode) เพื่อเพิ่มความไววิเคราะห์ทำให้เทคนิคนี้มีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึงระดับนาโนโมลาร์ นอกจากนี้ยังได้มีการสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้ตัวตรวจวัดทางสี สำหรับตรวจวัดกลูโคส เช่น ตรวจวัดกลูโคส และกรดยูริกในตัวอย่างเลือด สร้างอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้เทคนิคโฟโตลิโทกราฟี สำหรับการตรวจวัดกลูโคส [53] ได้ตรึงกลูโคสออกซิเดส และ 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-amino antipyrine) และ เอ็น-เอทิล-เอ็น (3-ซัลโฟโพรพิล)-3-เมทิล-อะนิลีน-โซเดียม (N-ethyl-N (3-sulfopropyl)-3-methyl-aniline sodium salt) ถ้าในตัวอย่าง

มีกลูโคส จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีม่วง และตรวจวัดความเข้มของสีโดยใช้โปรแกรม Gel Document system เพื่อถ่ายภาพ และประมวลผล ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่โรงพยาบาลใช้ พบว่าให้ค่าระดับกลูโคสไม่แตกต่างกัน แต่อุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษมีข้อดีกว่า คือ ใช้ตัวอย่างเลือดน้อยกว่าวิธีที่โรงพยาบาลใช้

นอกจากนั้น Dungchai และคณะ [54] ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ วิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แลคเตท และกรดยูริกในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะ สร้างอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้เทคนิคโฟโตลิโธกราฟี สำหรับการตรวจวัดกลูโคส ใช้กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สาร 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-aminoantipyrine) 3,5-ไดคลอโร-2-ไฮดรอกซิล-เบนซีนซัลโฟนิลแอซิด (3,5-dichloro-2-hydroxy-benzenesulfonic acid) โอ-ไดอะนิซีนไดไฮโดรคลอไรด์ (o-dianisidine dihydrochloride) และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) กรณีที่ในตัวอย่างมีกลูโคส อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะเปลี่ยนสีจากสีส้มแดงเป็นสีน้ำตาลอมเขียว จากนั้นวัดความเข้มของสีโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ไปสแกนภาพ และวัดความเข้มของสีโดยใช้โปรแกรมประมวลผลด้วยภาพ (Image J) พบว่าสามารถตรวจวัดกลูโคสอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 20 มิลลิโมลาร์ โดยมีข้อดี คือ ใช้สารตัวอย่างน้อย ง่ายต่อการใช้งาน ราคาถูก และสามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างจริงได้

จากการทบทวนวรรณกรรม ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างอ้อย และน้ำตาล โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ และใช้หลักการตรวจวัดทางสี ซึ่งจะสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคแบบพิมพ์สกรีน สำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างอ้อย และน้ำตาล

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase from *Aspergillus niger*, EC 1.1.3.4, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.2 เปอร็อกซิเดส (Peroxidase from horseradish, EC 1.11.1.7, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3 อินเวอร์เทส (Invertase from baker's yeast, EC 3.2.1.26, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.4 ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส (Fructose dehydrogenase from *Gluconobacter sp.*, EC 1.1.99.11, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5 กรดพอลิแลกติก (Polylactic acid, Nature Work, LLC, USA)
- 3.1.6 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, RCI Labscan Ltd., Thailand)
- 3.1.7 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-aminoantipyrine, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.8 ฟีนอล (Phenol, Fisher scientific, UK)
- 3.1.9 โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide, Ajax Finechem, Australia.)
- 3.1.10 เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride, PanReac AppliChem, Spain)
- 3.1.11 ซูโครส (Sucrose, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.12 กลูโคส (Glucose, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.13 ฟรุคโทส (Fructose, Sigma-Aldrich, USA)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

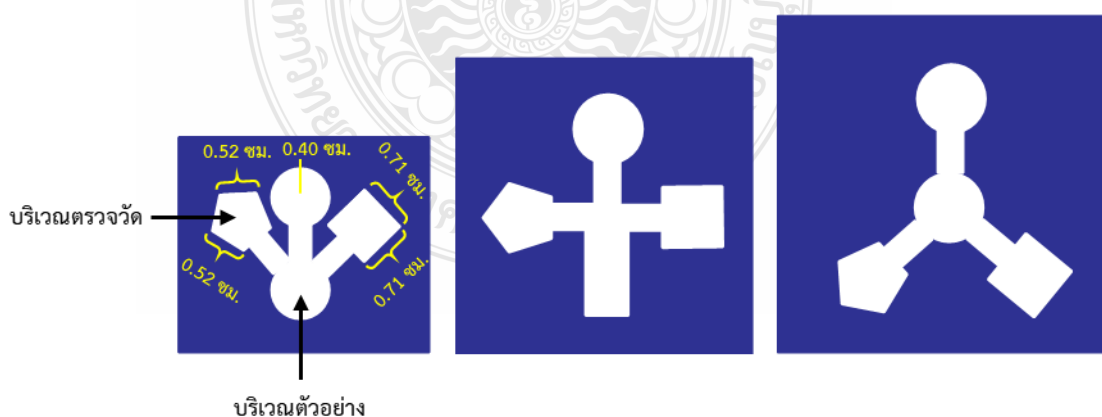
- 3.2.1 บล็อกสกรีน (Patterned screening blocks, Chaiboon Brother Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- 3.2.2 อุปกรณ์ปาดบล็อก (Squeegee, local shop in Thailand)
- 3.2.3 กระดาษโครมาโทกราฟี (Chromatography paper) เบอร์ 4, Whatman, UK)
- 3.2.4 ไมโครปิเปต (Micro pipet) ขนาด 20 และ 100 ไมโครลิตร (BRAND, Germany)
- 3.2.5 ไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ (Microcentrifuges tubes) ขนาด 0.6 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตร (Molecular Bio Product, USA)
- 3.2.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10 (Denver Instrument, USA)
- 3.2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยมสี่ตำแหน่ง รุ่น AZ Series (Sartorius, USA)
- 3.2.8 เครื่องสแกน Canon (CanoScan Lide 120, Vietnam)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.3.1.1 การออกแบบ (Pattern) อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ บริเวณตัวอย่าง (Sample zone) สำหรับหยดสารตัวอย่าง และบริเวณตรวจวัด (Detection zone) สำหรับเกิดปฏิกิริยา ออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้โปรแกรม Adobe Illustrator ทั้งหมด 3 รูปแบบ ดังภาพที่ 3.1 กำหนดให้บริเวณตัวอย่างและบริเวณตรวจวัดของทุกรูปแบบมีพื้นที่เท่ากัน สำหรับบริเวณตรวจวัดประกอบด้วยรูปทรงห้าเหลี่ยมสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส รูปทรงกลมสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส และรูปทรงสี่เหลี่ยมสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส



ภาพที่ 3.1 การออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.3.1.2 ประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์

ขั้นที่ 1 นำรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 ไปสร้างบล็อกสกรีนโดยบล็อกสกรีนมีขนาด 10×12 นิ้ว ใช้ผ้าพอลิเอสเตอร์ที่มีรูพรุนขนาด 100 mesh ซึ่งทนทานไม่ด้วยความตึง 10 นิวตัน

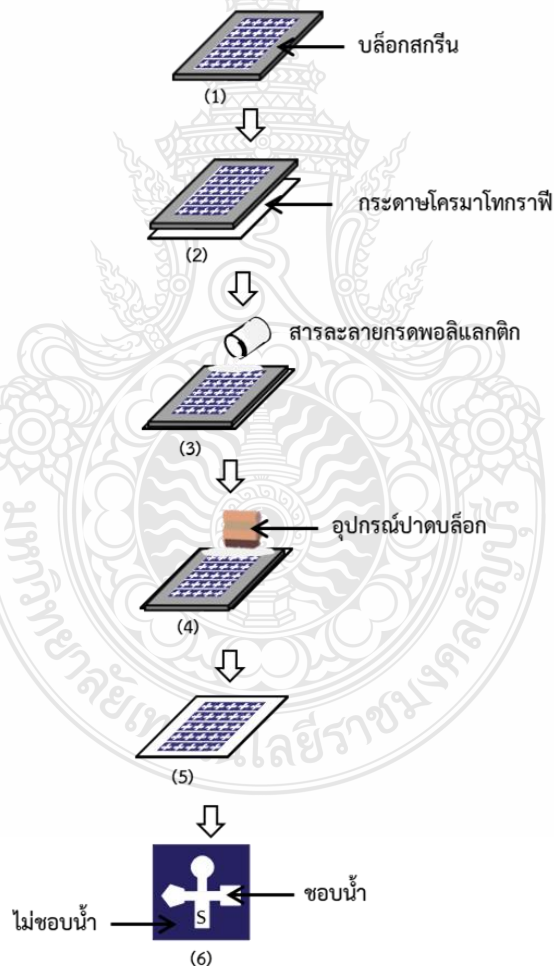
ขั้นที่ 2 วางบล็อกสกรีนลงบนกระดาษโครมาโทกราฟี

ขั้นที่ 3 ละลายกรดพอลิแลกติกในไดคลอโรมีเทน และเทลงบนบล็อกสกรีน

ขั้นที่ 4 ใช้อุปกรณ์ปาดบล็อกปาดสารละลายกรดพอลิแลกติก

ขั้นที่ 5 ปลอ่ยให้สารละลายกรดพอลิแลกติกแห้ง

ขั้นที่ 6 ได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยส่วนที่เป็นรูปแบบ (บริเวณสีขาว) มีสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) และบริเวณส่วนที่อยู่นอกรูปแบบ (สีน้ำเงิน) จะมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 วิธีการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์

3.3.1.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติก

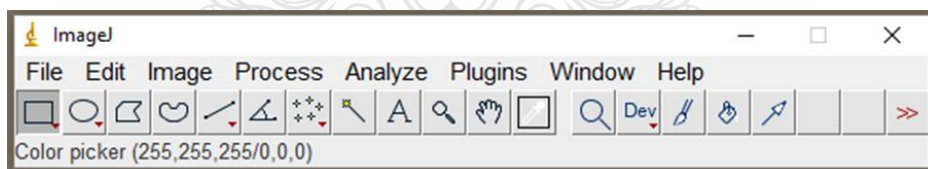
ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายกรดพอลิแลกติก โดยละลายกรดพอลิแลกติกในไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.5 1 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นเทสารละลายกรดพอลิแลกติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงบนบล็อกลูกกริ้งแล้วปาดสารละลายกรดพอลิแลกติกด้วยอุปกรณ์ปาดบล็อก ปล่อยให้สารละลายกรดพอลิแลกติกแห้ง จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษทั้ง 3 รูปแบบ ขึ้นต่อไปหดยดสารละลายเมทิลีนบลู (ใช้เป็นกรณีศึกษาเนื่องจากเป็นสารละลายที่มีสีชัดเจน) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในบริเวณตัวอย่าง เหนือในการพิจารณาจะเลือกจากการทดลองที่ให้รูปแบบที่ชัดเจนที่สุด

3.3.1.4 หารูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

หารูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เหมาะสม โดยนำรูปแบบทั้ง 3 รูปแบบที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 มาหดยดสารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบริเวณตัวอย่าง เหนือในการพิจารณาจะเลือกจากรูปแบบที่มีอัตราในการไหลของสารจากบริเวณตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัดที่เร็วที่สุด

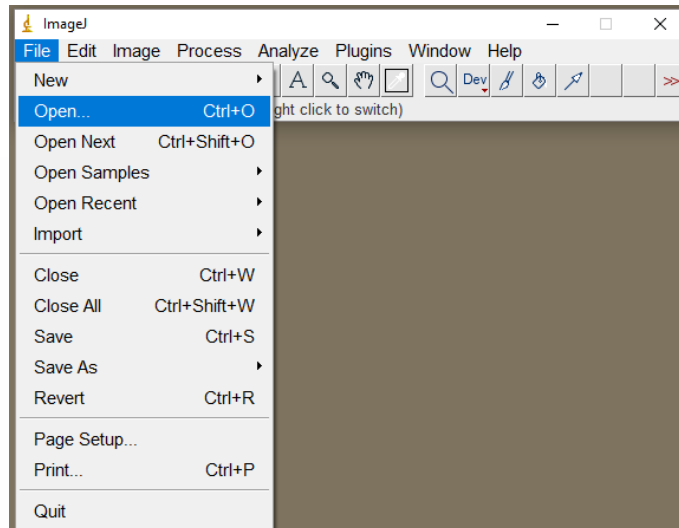
3.3.2 วิธีการแปลผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ

3.3.2.1 เปิดโปรแกรมประมวลผลภาพ จะแสดงหน้าต่างของโปรแกรม ดังภาพที่ 3.3 ซึ่งประกอบด้วยเมนูคำสั่งและไอคอนแสดงสัญลักษณ์ของเครื่องมือ



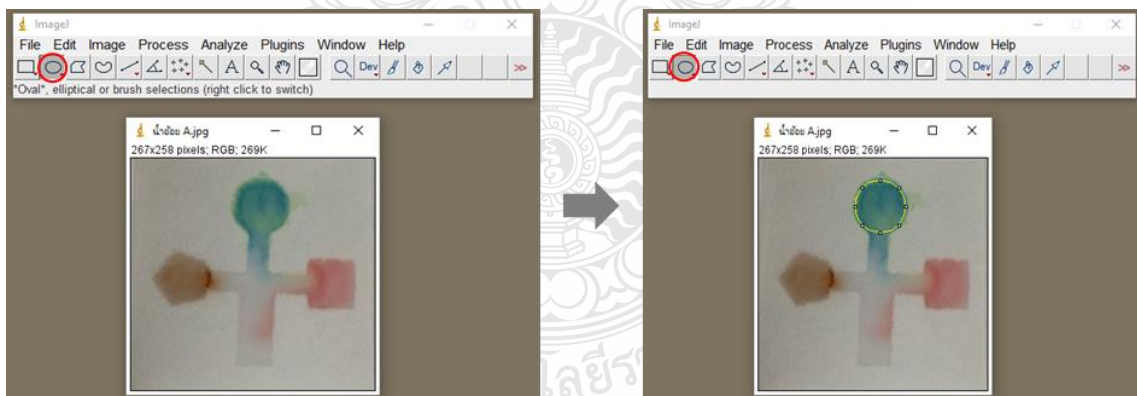
ภาพที่ 3.3 หน้าต่างโปรแกรมประมวลผลภาพ

3.3.2.2 การเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการแปรผล ไปที่ File → Open จากนั้นเลือกไฟล์ภาพที่ต้องการแปรผล ดังภาพที่ 3.4



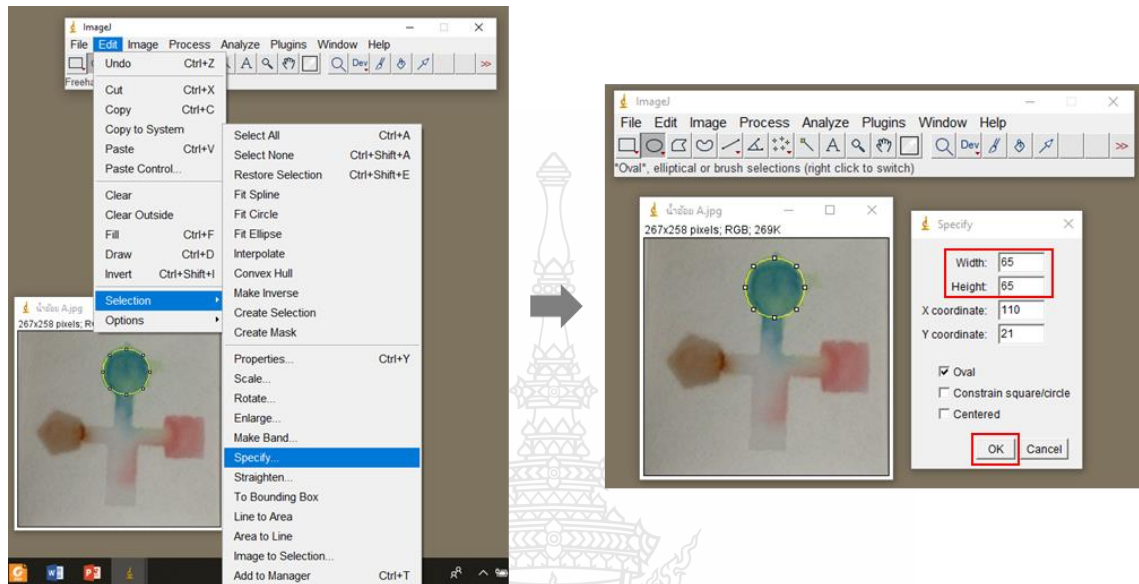
ภาพที่ 3.4 การเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการแปรผลจากโปรแกรมประมวลผลภาพ

3.3.2.3 เลือกไอคอนรูปแบบตามรูปทรงของบริเวณตรวจวัดที่ต้องการแปรผล แล้วนำไปวางที่บริเวณตรวจวัด ดังภาพที่ 3.5



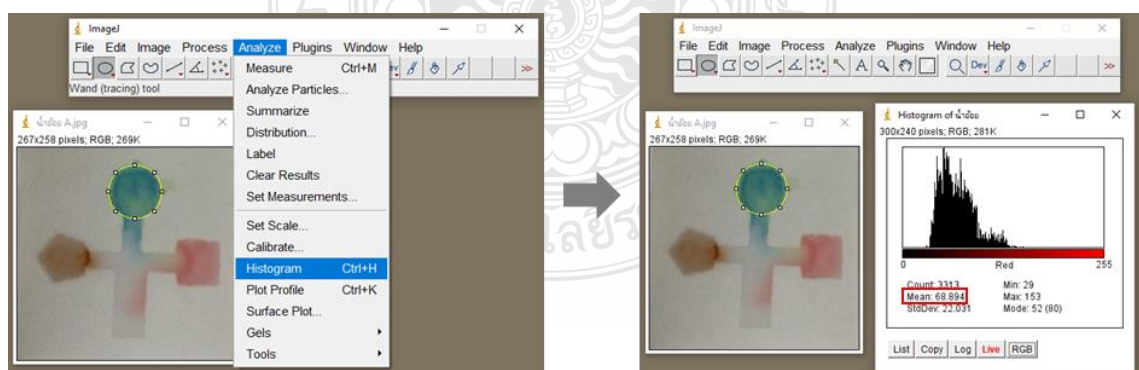
ภาพที่ 3.5 เลือกไอคอนรูปแบบเพื่อทำการแปรผล

3.3.2.4 ตั้งค่ากำหนดขนาดไอคอนรูปแบบตามรูปทรงของบริเวณตรวจวัดที่ต้องการแปรผล โดยไปที่ Edit → Selection → Specify จะปรากฏหน้าต่างขึ้นดังภาพที่ 3.6 จากนั้นกำหนดขนาดรูปทรงให้มีขนาดเท่ากับบริเวณตรวจวัดที่ต้องการแปรผลที่ Width และ Height แล้วคลิก OK



ภาพที่ 3.6 การตั้งค่ากำหนดขนาดรูปทรงในการแปรผล

3.3.2.5 วัดค่าความเข้มสี ให้ไปที่ Analyze → Histogram จะปรากฏหน้าต่างขึ้นดังภาพที่ 3.7 คลิก Live แล้วคลิกที่ RGB เพื่ออ่านค่าความเข้มสีที่ต้องการ จากนั้นอ่านค่าความเข้มสีที่ค่า Mean ปรากฏ ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการประมวลผลภาพ



ภาพที่ 3.7 การอ่านค่าความเข้มสี

3.3.2.6 หลักการเลือกอ่านค่าความเข้มข้นในการแปรผลเพื่อทำการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยจะเลือกอ่านค่าความเข้มข้น (RGB) ที่ให้ค่าความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละกรณีของการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ซึ่งค่าความเข้มข้น คำนวณได้จากค่าความเข้มข้นของสารละลายแบลงค์ ลบด้วยค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน

3.3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

3.3.3.1 ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตรวจวัด

ศึกษาหาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตรวจวัด ทำการศึกษาโดยปิเปตสารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ปริมาตรต่างๆ คือ 1 2 3 4 5 6 และ 7 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เหนือการพิจารณาจะเลือกปริมาตรของสารละลายที่แพร่ได้เต็มพื้นที่ของบริเวณตรวจวัด

3.3.3.2 ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่าง

ศึกษาหาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่าง 10 20 30 และ 40 ไมโครลิตร ทำการศึกษาโดยปิเปตสารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ปริมาตรต่างๆ ลงบริเวณตัวอย่าง เหนือการพิจารณาจะเลือกปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่างที่สามารถเคลื่อนที่จากบริเวณตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัด และเต็มพื้นที่ของบริเวณตรวจวัด

3.3.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส

1) ศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทส

ศึกษาหาความเข้มข้นของอินเวอร์เทสที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.08 0.10 0.20 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทสที่ความเข้มข้นต่างๆ กลูโคสออกซิเดส 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายไอโดอะนิซิน ความเข้มข้น 3.00 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อไปปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เหนือการพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของอินเวอร์เทสที่ให้ค่าความเข้มข้นในบริเวณตรวจวัดสูงสุด

2) ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

ศึกษาหาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.03 0.05 0.10 0.30 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทสความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) กลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายไอโดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 3.00 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อไปปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

3) ศึกษาความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาหาความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.06 0.20 0.40 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทสความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 2) เพอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายไอโดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 3.00 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อไปปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดสที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

4) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีน

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายไอโดอะนิซิดีน โดยศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีนที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 2.5 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ โดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส และเพอร์ออกซิเดส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) และข้อ 3) ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายไอโดอะนิซิดีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด และปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิดีนที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

5) ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ทำการทดลองโดยอินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดส จะศึกษาที่พีเอช 4.00 4.50 5.00 5.50 และ 6.00 โดยใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ สำหรับเปอร์ออกซิเดส ศึกษาที่พีเอช 5.00 5.50 6.00 6.50 และ 7.00 โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ จากนั้นปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายไอโดอะนิซิน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่างวางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกค่าพีเอชที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงสุด

6) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส

ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของซูโครสที่เหมาะสมที่เวลาต่างๆ คือ 1 5 10 15 20 และ 30 นาที ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายไอโดอะนิซิน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกเวลาที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงสุด

3.3.3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส

1) ศึกษาความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนส

ศึกษาความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนส ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนส ที่ความเข้มข้นต่างๆ สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนต์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายฟรุกโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนสที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงสุด

2) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ ที่ความเข้มข้น 1.0 10.0 15.0 20.0 และ 25.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปต ฟรูกโทสดีไฮโดรจีเนส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้น ปิเปตสารละลายฟรูกโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ที่ให้ค่าความเข้มสีใน บริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

3) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.003 0.005 0.010 0.020 และ 0.040 โมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตฟรูกโทสดีไฮโดรจีเนส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ ที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 2) และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณ ตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายฟรูกโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบ กระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การ พิจารณาจะเลือกความเข้มข้นสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

4) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรูกโทส

ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของฟรูกโทสที่เหมาะสมที่เวลาต่างๆ คือ 1 5 10 15 20 และ 30 นาที ทำการทดลองโดยปิเปตฟรูกโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลาย โพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลาย ฟรูกโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้ เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ และนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกเวลาที่ให้ค่าความเข้มสี ในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

3.3.3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส

1) ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.0001 0.001 0.003 0.005 0.007 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน ความเข้มข้น 2.50 มิลลิโมลาร์ และสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 7.50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้ จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร ที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวล ผลภาพ เหนือการพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณ ตรวจวัดสูงที่สุด

2) ศึกษาความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.001 0.003 0.005 0.007 0.01 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) เพอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน ความเข้มข้น 2.50 มิลลิโมลาร์ และสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 7.50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร ที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อปิเปตสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ประมวลผลภาพ เหนือการพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดสที่ให้ค่าความเข้มสีใน บริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

3) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) เพอร์ออกซิเดส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 2) สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 7.50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ประมวลผลภาพ เหนือการพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนที่ให้ค่า ความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

4) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอล

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 2.0 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 7.0 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 2) สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 3) และสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อไปปิเปตสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

5) ศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยศึกษาที่พีเอชต่างๆ คือ 5.00 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 จะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ ละลายกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด ต่อไปปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

6) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดกลูโคส

ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสที่เหมาะสมที่เวลาต่างๆ คือ 1 5 10 15 20 และ 30 นาที ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เกณฑ์การพิจารณาจะเลือกเวลาที่ให้ค่าความเข้มสีในบริเวณตรวจวัดสูงที่สุด

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ศึกษาในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สภาวะที่ศึกษา	การทดลอง						
1. ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตรวจวัด (ไมโครลิตร)	1	2	3	4	5	6	และ 7
2. ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	10	20	30	และ 40			
3. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยา-ซูโครส							
3.1 อินเวอร์เทส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.02	0.04	0.08	0.10	0.20	และ 0.60	
3.2 กลูโคสออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.03	0.10	0.30	0.50	และ 1.00		
3.3 เพอร์ออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.02	0.04	0.06	0.20	0.40	และ 0.60	
3.4 สารละลายไอโอดีนซิทิน (มิลลิโมลาร์)	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0	5.0	และ 7.0
3.5 พี่เอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา							
3.5.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์	4.00	4.50	5.00	5.50	และ 6.00		
3.5.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	5.00	5.50	6.00	6.50	และ 7.00		
3.6 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาทีก)	1	5	10	15	20	และ 30	
4. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยา-ฟรุคโทส							
4.1 ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.5	1.0	และ 1.5				
4.2 สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริก-ไฮยาไนต์ (มิลลิโมลาร์)	1	10	15	20	และ 25		
4.3 สารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ (โมลาร์)	0.003	0.005	0.01	0.02	และ 0.04		
4.4 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาทีก)	1	5	10	15	20	และ 30	
5. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยา-กลูโคส							
5.1 กลูโคสออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.0001	0.001	0.003	0.005	0.007	และ 0.01	
5.2 เพอร์ออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	และ 0.10	
5.3 สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน (มิลลิโมลาร์)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	และ 4.0
5.4 สารละลายฟีนอล (มิลลิโมลาร์)	2.0	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	7.0 และ 7.5
5.5 พี่เอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา							
5.5.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	5.00	5.50	6.00	6.50	7.00	7.50	และ 8.00
5.6 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาทีก)	1	5	10	15	20	และ 30	

3.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์

3.3.4.1 หาความเที่ยงของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์

1) ศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์

(1) ศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation : RSD) เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 3.7 เปอร์เซ็นต์ [55]

(2) ศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณฟลูออรีน ทำการทดลองโดยปิเปตฟลูออรีนไดไฮดรอกซีเนส สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไดโครเมต และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายฟลูออรีน ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.4 ข้อ 4) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 3.7 เปอร์เซ็นต์

(3) ศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.5 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 3.7 เปอร์เซ็นต์

2) ศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณ
ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

(1) ศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับ
ตรวจวัดปริมาณซูโครส ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส
และสารละลายไอโอดีน-อะซิไดน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4)
ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้น
20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้
จากข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และ
วัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่
แตกต่างกัน เช่น เปลี่ยนผู้ทดลอง แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วน
เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation : RSD) เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 3.7 เปอร์เซ็นต์ [55]

(2) ศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัด
ปริมาณฟรุคโทส ทำการทดลองโดยปิเปตฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์
และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่
ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายฟรุคโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์
ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4)
จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม
ประมวลผลภาพ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน เช่น เปลี่ยนผู้ทดลอง
แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 3.7 เปอร์เซ็นต์

(3) ศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับ
ตรวจวัดปริมาณกลูโคส ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส สารละลาย
4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3)
และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคส
ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยา
ที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน
และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลอง
ที่แตกต่างกัน เช่น เปลี่ยนผู้ทดลอง แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่า
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 3.7
เปอร์เซ็นต์

3.3.4.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และ กลูโคส

1) ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของซูโครสโดยตรวจวัดสารละลายซูโครส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05 0.10 0.30 0.50 0.70 0.90 1.0 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 20.0 25.0 และ 30.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายโอโดะนิซิดีน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายซูโครส ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จาก ข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครสกับค่าความเข้มสี เกณฑ์การพิจารณา คือ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995 ถึง 1.000 [56]

2) ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของฟรุคโทสโดยตรวจวัดสารละลายฟรุคโทส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05 0.10 0.30 0.50 0.70 0.90 1.0 1.5 2.0 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 20.0 25.0 และ 30.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลาย โพแทสเซียมเพอร์ริกโซยาไนต์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายฟรุคโทส ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จาก ข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟรุคโทสกับค่าความเข้มสี เกณฑ์การพิจารณา คือ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995 ถึง 1.000

3) ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกลูโคสโดยตรวจวัดสารละลายกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.001 0.01 0.10 0.30 0.50 0.70 0.90 1.0 1.5 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคส ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จาก ข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับค่าความเข้มสี เกณฑ์การพิจารณา คือ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995 ถึง 1.000

3.3.4.3 ศึกษาความไววิเคราะห์ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

1) ศึกษาความไววิเคราะห์โดยตรวจวัดสารละลายซูโครส ที่ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 20.0 และ 25.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส และสารละลายไอโดอะนิซิน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครสกับค่าความเข้มสี โดยช่วงความเข้มสีที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงจะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 จากนั้นหาค่าความไววิเคราะห์ได้จากสมการเส้นตรง

2) ศึกษาความไววิเคราะห์โดยตรวจวัดสารละลายฟรุคโทส ที่ความเข้มข้น 2.0 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกโซยานด์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายฟรุคโทสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4) นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟรุคโทสกับค่าความเข้มสี โดยช่วงความเข้มสีที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงจะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 จากนั้นหาค่าความไววิเคราะห์ได้จากสมการเส้นตรง

3) ศึกษาความไววิเคราะห์โดยตรวจวัดสารละลายกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.5 0.7 0.9 1.0 1.5 3.0 5.0 7.0 9.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับค่าความเข้มสี โดยช่วงความเข้มสีที่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงจะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 จากนั้นหาค่าความไววิเคราะห์ได้จากสมการเส้นตรง

3.3.4.4 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบ

1) ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับตรวจวัดซูโครส ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายโอโดอะนิซิน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายแบลงค์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลอง 7 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบโดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบ = $3SD$ [57] (SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายแบลงค์)

2) ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับตรวจวัดฟรุคโทส ทำการทดลองโดยปิเปตฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกโซยานด์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายแบลงค์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จำนวน 7 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบโดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบ = $3SD$

3) ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับตรวจวัดกลูโคส ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายแบลงค์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จำนวน 7 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบโดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบ = $3SD$

3.3.4.5 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

1) ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายโอโตอะนิซิติน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายแบลงค์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ทำการทดลอง 7 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ = 10SD [57] ซึ่งความเข้มข้นที่ได้ต้องมีความเที่ยงและเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ยอมรับได้ ณ ความเข้มข้นนั้น

2) ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทส ทำการทดลองโดยปิเปตฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายแบลงค์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกนและวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จำนวน 7 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ = 10SD ซึ่งความเข้มข้นที่ได้ต้องมีความเที่ยงและเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ยอมรับได้ ณ ความเข้มข้นนั้น

3) ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส ทำการทดลองโดยปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัด จากนั้นปิเปตสารละลายแบลงค์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ จำนวน 7 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยใช้สูตรขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ = 10SD ซึ่งความเข้มข้นที่ได้ต้องมีความเที่ยงและเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ยอมรับได้ ณ ความเข้มข้นนั้น

3.3.4.6 ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟลักโทส และกลูโคส

1) ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2.9 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริง ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เปรียบเทียบการพิจารณา คือ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ต้องอยู่ในช่วง 95 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์ [55]

$$\text{เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน} = \left[\frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \right] \times 100$$

โดย C_{sp} = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_s = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

C_a = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

2) ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณฟลักโทส การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานฟลักโทสที่มีความเข้มข้น 2.6 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริง ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดปริมาณฟลักโทสภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟลักโทส เปรียบเทียบการพิจารณา คือ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ต้องอยู่ในช่วง 95 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์

3) ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1.2 3.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริง ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดปริมาณกลูโคสภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคส เปรียบเทียบการพิจารณา คือ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ต้องอยู่ในช่วง 95 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์

3.3.4.7 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส ซึ่งเป็นสารที่คาดว่าจะมีผลต่อการตรวจวัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส และคาดว่าจะพบในตัวอย่าง ได้แก่ มอลโทส แล็กโทส กาแลกโทส และไซโลส [58, 59] ทำการทดลองโดยปิเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายโอโตอะนิซิติน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัดรูปทรงห้าเหลี่ยม ต่อมาปิเปตฟอสฟอรัสดีไฮโดรจีเนส สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ และสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และข้อ 3) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัดรูปทรงกลม และปิเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัดรูปทรงสี่เหลี่ยม จากนั้นปิเปตสารละลายตัวรบกวนต่างๆที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) ข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4) และ ข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) ตามลำดับ จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ เปรียบเทียบค่าความเข้มสีที่ได้ของตัวรบกวนกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส

3.3.4.8 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ศึกษาอายุของสารเคมีที่ใช้ในอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยศึกษาระยะเวลาในการนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปใช้งาน ในการตรวจวัดสารละลายซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลาจนกว่าการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เก็บสารเคมีไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทดสอบโดยใช้สถิติ t -test ทำการทดลองทุกๆ 1 เดือน ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยกำหนดให้ค่าการตอบสนองเดือนที่ 1 ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.3.5 การตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างจริง

เมื่อได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและสภาวะการทดลองที่เหมาะสมแล้ว นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างน้ำตาลทราย และน้ำอ้อย ทำการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยใช้ตัวอย่างจริงแทนสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยเริ่มต้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น แล้วตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

การตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ในตัวอย่างจริง ทำได้โดยสำหรับการตรวจวัดปริมาณซูโครส ปีเปตอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และสารละลายโอโตอะนิซิติน ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.3 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ตามลำดับ ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัดรูปทรงห้าเหลี่ยม การตรวจวัดปริมาณฟรุคโทสทำโดยปีเปตฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนต์ และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.4 ข้อ 1) ข้อ 2) และ ข้อ 3) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัดรูปทรงกลม และสำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ปีเปตกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 ข้อ 1) ข้อ 2) ข้อ 3) และ ข้อ 4) ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 ลงบริเวณตรวจวัดรูปทรงสี่เหลี่ยม จากนั้นปีเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 ลงบริเวณตัวอย่าง วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาที่ได้จากข้อที่ 3.3.3.3 ข้อ 6) สำหรับตรวจวัดซูโครส ข้อที่ 3.3.3.4 ข้อ 4) สำหรับตรวจวัดฟรุคโทส และข้อที่ 3.3.3.5 ข้อ 6) สำหรับตรวจวัดกลูโคส จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายซูโครส ฟรุคโทสและกลูโคส ตามลำดับ เปรียบเทียบผลของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับผลที่ได้จากวิธีทางโครมาโทกราฟี แล้วนำผลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาทดสอบด้วยสถิติ t -test

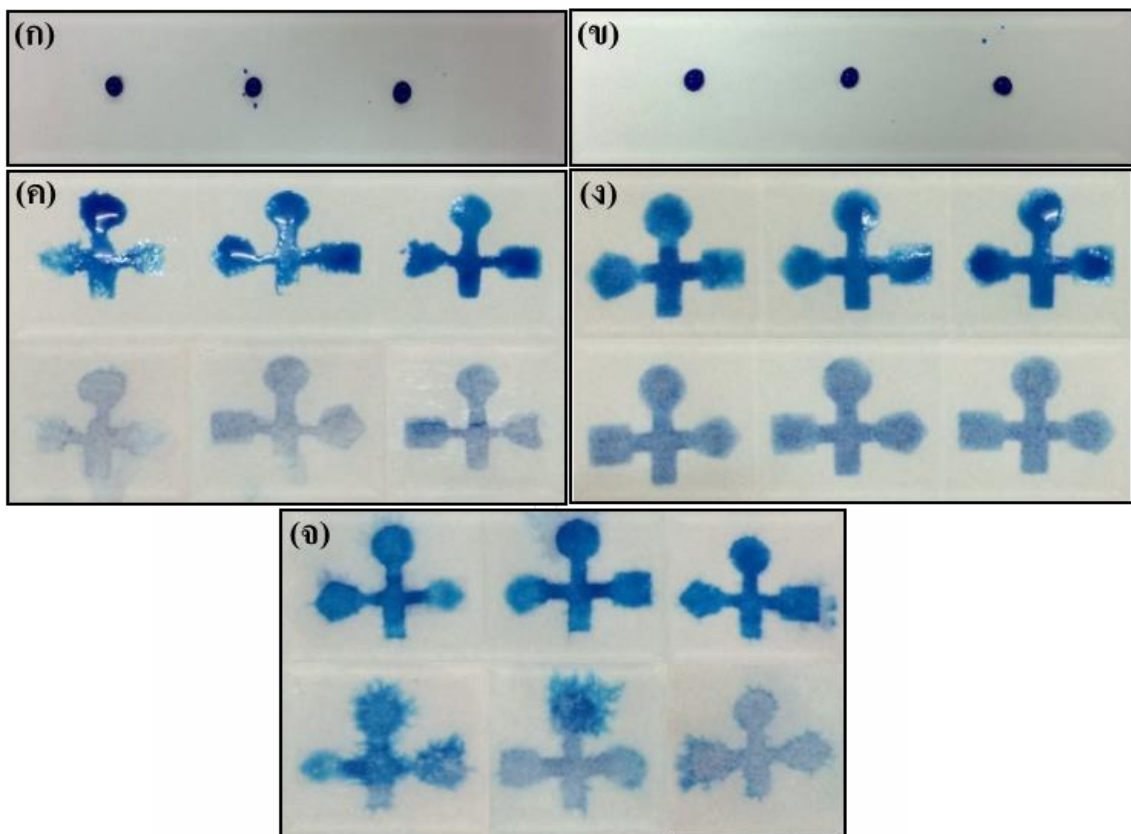
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

4.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติก

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายกรดพอลิแลกติกโดยใช้ความเข้มข้น 0.5 1 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ทำการสร้างบล็อกสกรีนโดยใช้สารละลายกรดพอลิแลกติกที่มีความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นหยดสารละลายเมทิลีนบลูลงในบริเวณตัวอย่างผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติก 0.5 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ไม่สามารถกันบริเวณที่ขอบน้ำกับไม่ขอบน้ำได้ ดังภาพที่ 4.1 (ก) ถึง (ค) เนื่องจากมีปริมาณของกรดพอลิแลกติกน้อย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติกเพิ่มขึ้น ก็จะมีปริมาณของกรดพอลิแลกติกเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถกันบริเวณที่ขอบน้ำและไม่ขอบน้ำได้ดี ดังภาพที่ 4.1 (ง) แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติกที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ดังภาพที่ 4.1 (จ) จะมีปริมาณของกรดพอลิแลกติกมากเกินไป ทำให้กรดพอลิแลกติกมีโครงสร้างสายโซ่พอลิเมอร์ที่ใหญ่จึงไม่สามารถซึมผ่านกระดาษโครมาโทกราฟีได้ ส่งผลให้ไม่สามารถกันบริเวณที่ขอบน้ำและไม่ขอบน้ำได้ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติกที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร

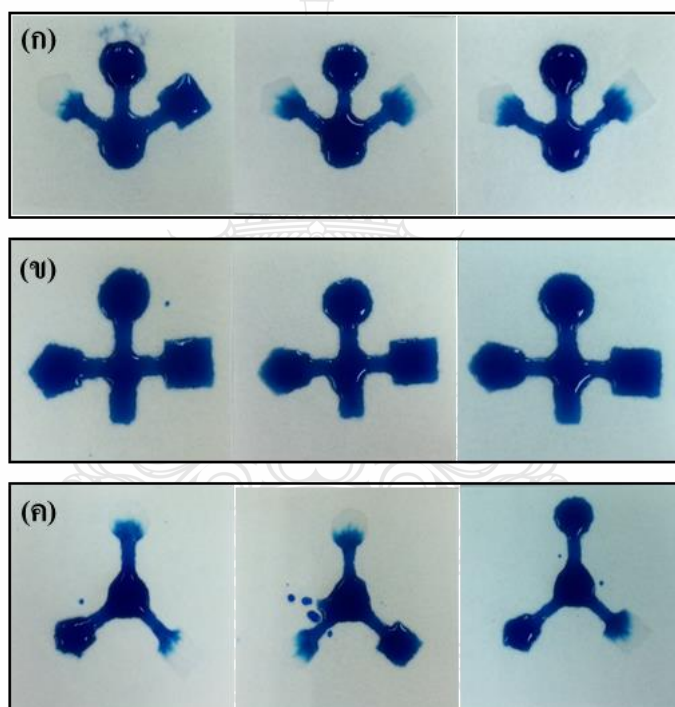


ภาพที่ 4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก

- (ก) ความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร
- (ข) ความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร
- (ค) ความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร
- (ง) ความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และ
- (จ) ความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแล็กติก 15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร

4.1.2 ศึกษาารูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศ

ทำการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศ ด้วยโปรแกรม Adobe Illustrator โดยกำหนดให้บริเวณตรวจวัดและบริเวณตัวอย่างของทุกรูปแบบมีพื้นที่เท่ากับ 50 ตารางเซนติเมตร ทั้งหมด 3 รูปแบบ จากนั้นหยดสารละลายเมทิลีนบลูลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศทั้ง 3 รูปแบบ จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบที่ 1 และรูปแบบที่ 3 สารละลายเมทิลีนบลูไม่สามารถเคลื่อนที่จากบริเวณตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัดได้เต็มรูปแบบ ดังภาพที่ 4.2 (ก) และ (ค) ตามลำดับ และมีอัตราการไหลช้ากว่ารูปแบบที่ 2 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกรูปแบบที่ 2 ดังภาพที่ 4.2 (ข) เนื่องจากมีอัตราในการไหลของสารจากบริเวณตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัดได้เร็วที่สุด และสารละลายสามารถเคลื่อนที่จากบริเวณตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัดได้เต็มรูปแบบ

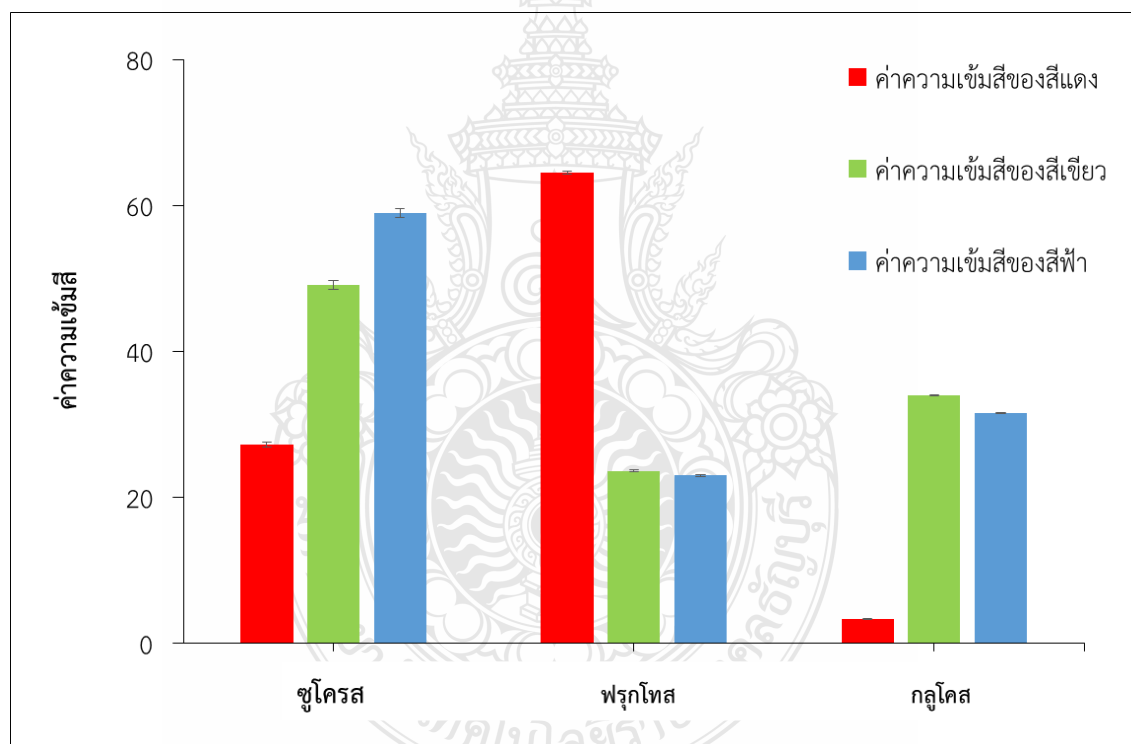


ภาพที่ 4.2 ผลการหารูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาศ

(ก) รูปแบบที่ 1 (ข) รูปแบบที่ 2 และ (ค) รูปแบบที่ 3

4.2 การแปรผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ จะให้สีของผลิตภัณฑ์ที่ต่างกัน โดยในการตรวจวัดปริมาณซูโครสจะให้ผลิตภัณฑ์สีน้ำตาล ฟรุคโทส สีฟ้า และกลูโคสสีชมพู ในบริเวณตรวจวัดที่มีรูปทรงห้าเหลี่ยม วงกลม และสี่เหลี่ยม ตามลำดับ จากนั้น นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ โดยทำการแปรผลตามข้อที่ 3.3.2 ผลจากการอ่านค่าความเข้มสีของซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าสำหรับการตรวจวัดซูโครสกราฟแท่งสีฟ้าให้ค่าความเข้มสีสูงสุด ฟรุคโทสกราฟแท่งสีแดงให้ค่าความเข้มสีสูงสุด และกลูโคสกราฟแท่งสีเขียวให้ค่าความเข้มสีสูงสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการแปรผลด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อทำการตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทสและกลูโคส จะเลือกอ่านค่าความเข้มสีของสีฟ้า สีแดง และสีเขียว ตามลำดับ

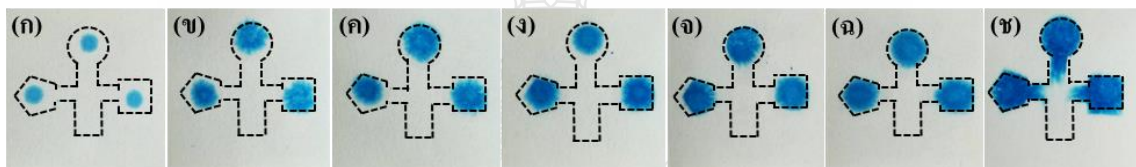


ภาพที่ 4.3 ผลการเลือกอ่านค่าความเข้มสีสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

4.3.1 ศึกษาปริมาณของสารละลายในบริเวณตรวจวัด

ปริมาณของสารละลายในบริเวณตรวจวัดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทำการศึกษาปริมาณของสารละลายในบริเวณตรวจวัด ด้วยสารละลายเมทิลินบลู (ใช้เป็นกรณีศึกษา เนื่องจากเป็นสารละลายที่มีสีชัดเจน) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 2 3 4 5 6 และ 7 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ผลการทดลองพบว่าปริมาตรที่ 1 ถึง 5 ไมโครลิตร ดังภาพที่ 4.4 (ก) ถึง (จ) สารละลายเมทิลินบลูมีปริมาตรไม่เพียงพอจึงแพร่ได้ไม่เต็มพื้นที่บริเวณตรวจวัด แต่ที่ปริมาตรมากกว่า 6 ไมโครลิตร ดังภาพที่ 4.4 (จ) สารละลายเมทิลินบลูแพร่ออกนอกบริเวณตรวจวัด ดังนั้นปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับบริเวณตรวจวัด คือ 6 ไมโครลิตร เนื่องจากสารละลายแพร่ได้เต็มพื้นที่บริเวณตรวจวัดพอดี ดังภาพที่ 4.4 (ฉ)

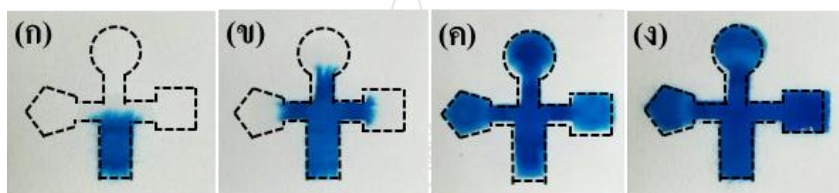


ภาพที่ 4.4 ผลการศึกษาปริมาณของสารละลายในบริเวณตรวจวัด

(ก) 1 ไมโครลิตร (ข) 2 ไมโครลิตร (ค) 3 ไมโครลิตร (ง) 4 ไมโครลิตร (จ) 5 ไมโครลิตร
(ฉ) 6 ไมโครลิตร และ (ฮ) 7 ไมโครลิตร

4.3.2 ศึกษาปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่าง

ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา ทำการศึกษาโดยโดยปิเปตสารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ปริมาตร 10 20 30 และ 40 ไมโครลิตร ลงบริเวณตัวอย่างของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ผลการศึกษาพบว่าปริมาตรสารละลายเมทิลีนบลูที่ 10 และ 20 ไมโครลิตร ไม่สามารถเคลื่อนที่จากบริเวณตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัดได้ ดังภาพที่ 4.5 (ก) และ (ข) แต่ถ้าปริมาตรสารละลายเมทิลีนบลูมากกว่า 30 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูจะล้นออกนอกพื้นที่บริเวณที่ขบน้ำ ดังภาพที่ 4.5 (ค) ดังนั้นปริมาตรของสารละลายในบริเวณตัวอย่างที่เหมาะสม คือ 30 ไมโครลิตร ดังภาพที่ 4.5 (ค)

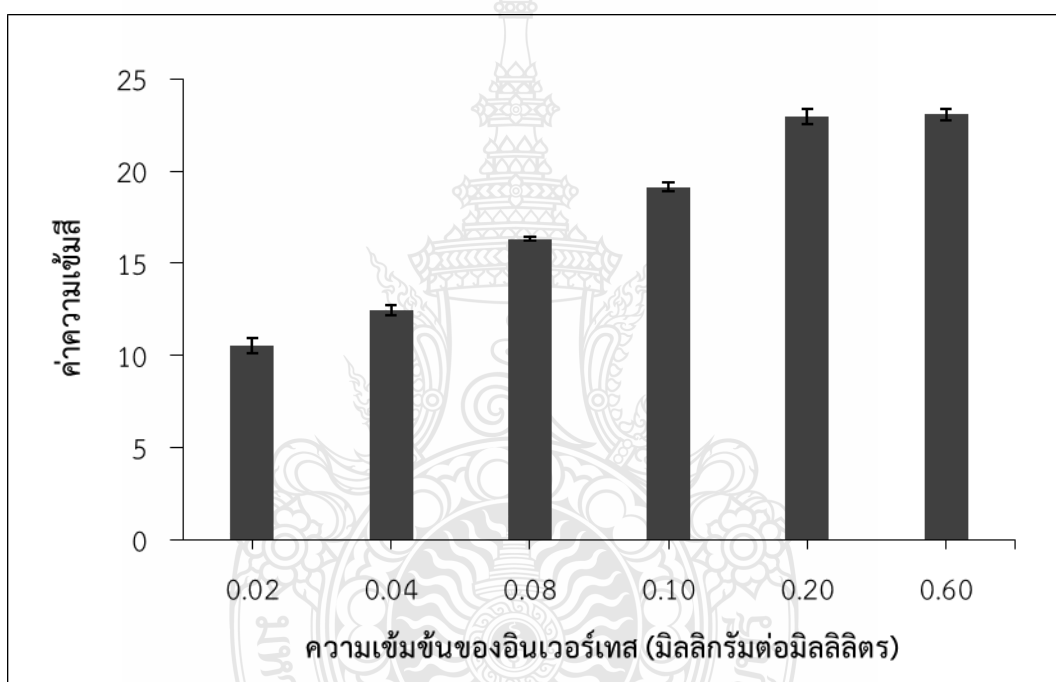


ภาพที่ 4.5 ผลการศึกษาปริมาตรในบริเวณตัวอย่าง (ก) 10 ไมโครลิตร (ข) 20 ไมโครลิตร (ค) 30 ไมโครลิตร และ (ง) 40 ไมโครลิตร

4.3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส

4.3.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทส

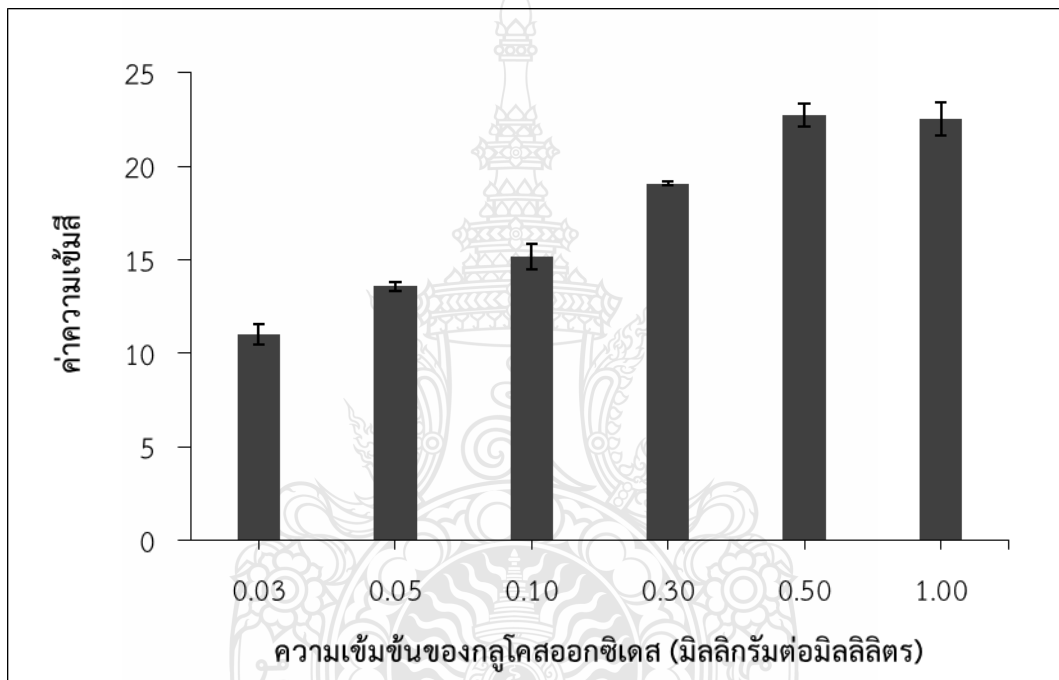
ศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทสที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.08 0.10 0.20 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของอินเวอร์เทส และให้ค่าความเข้มสีสูงสุดที่ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของอินเวอร์เทสมากกว่า 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มสีจะคงที่ เนื่องจากอินเวอร์เทสเกิดปฏิกิริยากับสารละลายซูโครสได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส คือ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.6 ผลการศึกษาความเข้มข้นของอินเวอร์เทส

4.3.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

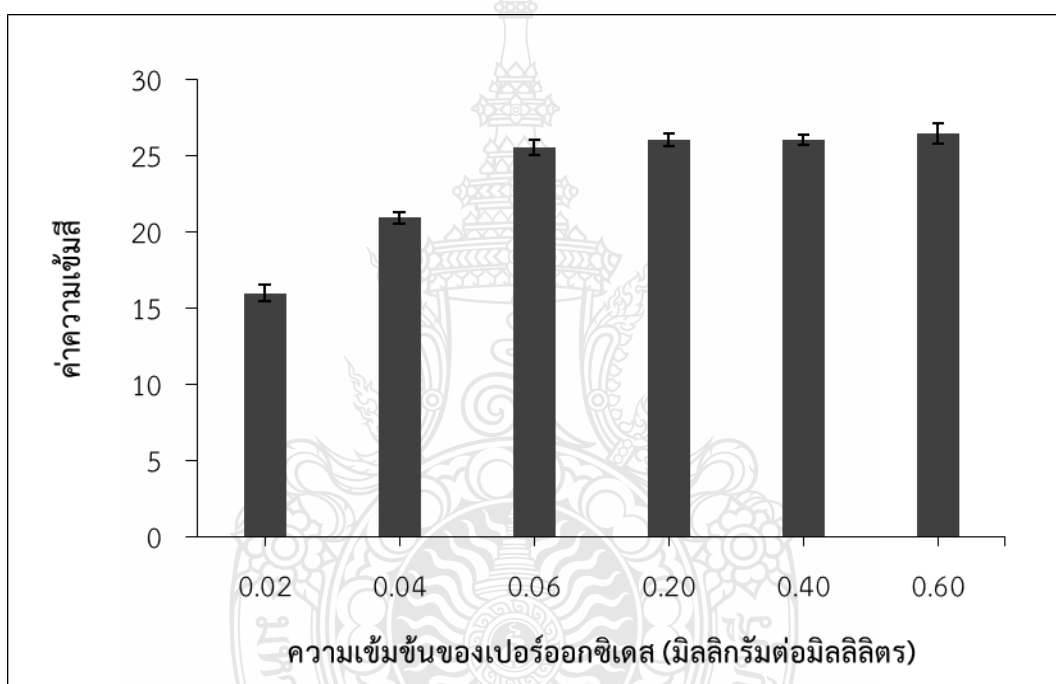
ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.03 0.05 0.10 0.30 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.7 พบว่าในช่วงความเข้มข้น 0.03 ถึง 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส แต่เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสมากกว่า 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าความเข้มสีคงที่เนื่องจากกลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้หมดพอดี ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลูโคสออกซิเดส คือ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

4.3.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส

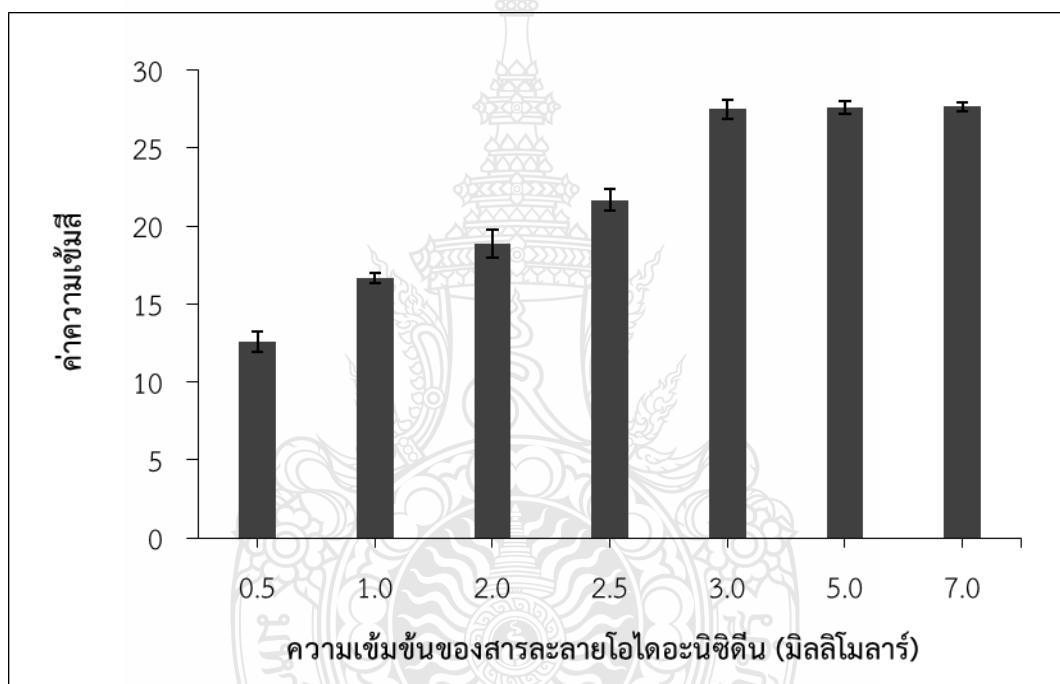
ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.06 0.20 0.40 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้ดังภาพที่ 4.8 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสและเพิ่มสูงสุดที่ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสมากขึ้น ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนได้มากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสมากกว่า 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มสีจะคงที่เนื่องจากเปอร์ออกซิเดสทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้หมดพอดี ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเปอร์ออกซิเดส คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.8 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส

4.3.3.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอโดะนิซิน

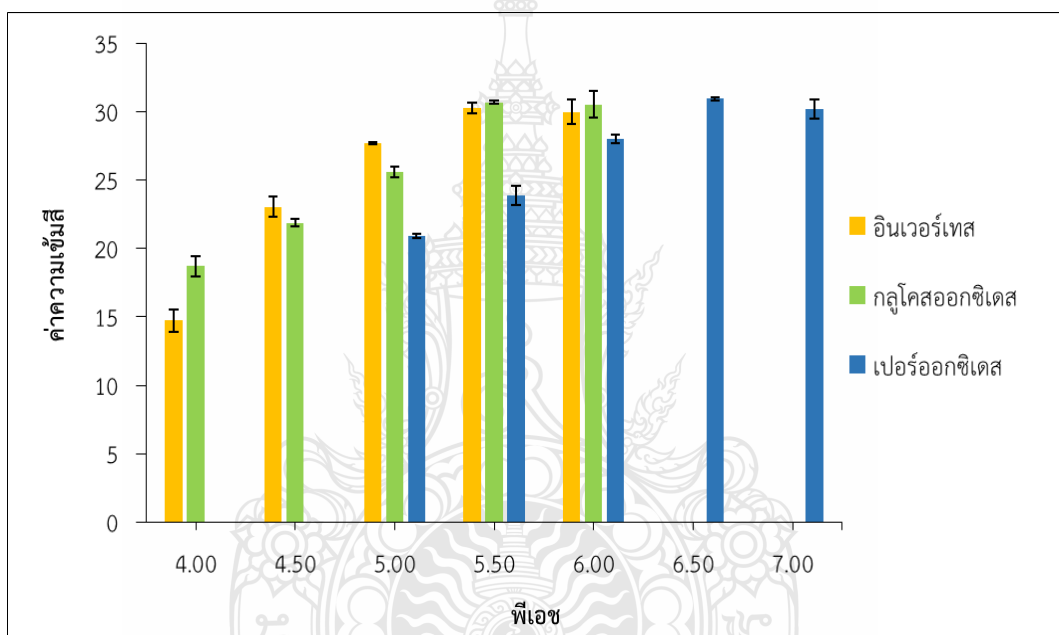
ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอโดะนิซินที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 2.5 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจวัดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้ดังภาพที่ 4.9 พบว่า ช่วงความเข้มข้นที่ 0.5 ถึง 3.0 มิลลิโมลาร์ ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายโอโดะนิซินและสูงสุดที่ 3.0 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากปริมาณของสารละลายซูโครสที่มีปริมาณจำกัด จึงทำให้ความเข้มข้นของสารละลายโอโดะนิซินที่เพิ่มขึ้นมากเกินไป ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายซูโครสได้ ทำให้ค่าความเข้มสีคงที่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายโอโดะนิซินที่เหมาะสม คือ 3.0 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอโดะนิซิน

4.3.3.5 ศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

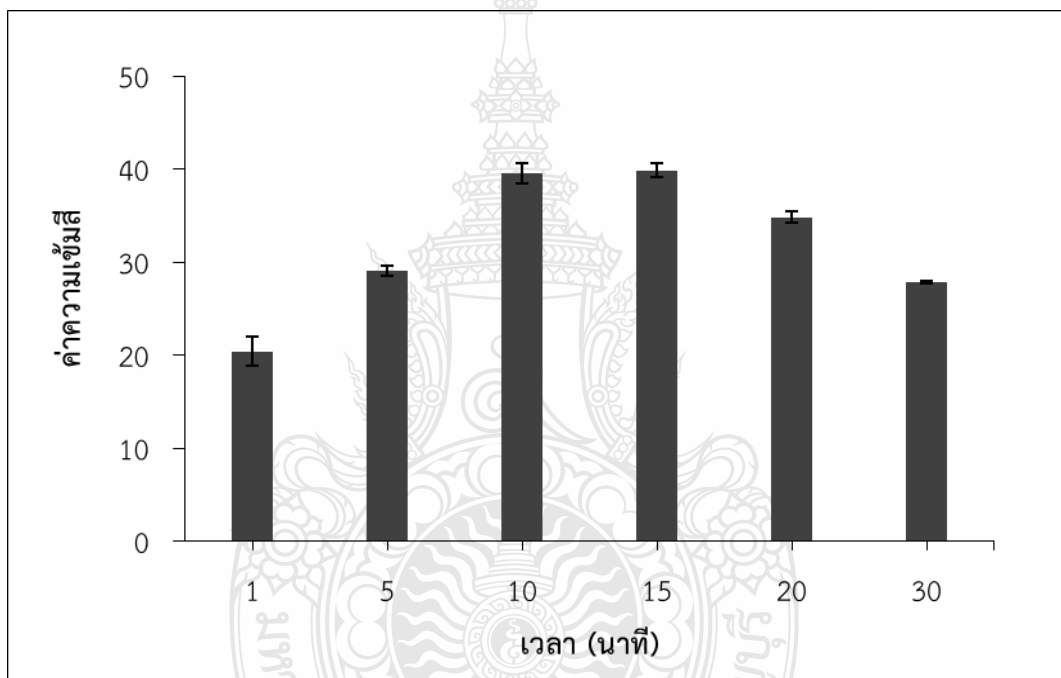
ศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส โดยอินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดส ศึกษาพีเอชที่ 4.00 4.50 5.00 5.50 และ 6.00 โดยใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ สำหรับเปอร์ออกซิเดส ศึกษาพีเอชที่ 5.00 5.50 6.00 6.50 และ 7.00 โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.10 พบว่าอินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดส เหมาะสมที่พีเอช 5.50 เนื่องจากอินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดสทำงานได้ดีที่พีเอช 5.50 [60, 61] และสำหรับเปอร์ออกซิเดสพีเอชที่เหมาะสม คือ 6.50 เนื่องจากเปอร์ออกซิเดสทำงานได้ดีที่พีเอช 6.50 [62]



ภาพที่ 4.10 ผลการศึกษาพีเอชของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4.3.3.6 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณซูโครสขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างสารละลายซูโครสกับสารละลายไอโอดีน-อะนิลีน โดยมีเอนไซม์อินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยศึกษาที่เวลา 1 5 10 15 20 และ 30 นาที จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.11 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น จนถึงเวลาที่ 10 ถึง 15 นาที และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นมากกว่า 15 นาที จะให้ค่าความเข้มสีลดลง เนื่องจากเกิดจากการสลายตัวของเอนไซม์ จึงทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานน้อยลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดซูโครสเกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ที่เวลา 10 นาที ถึง 15 นาที

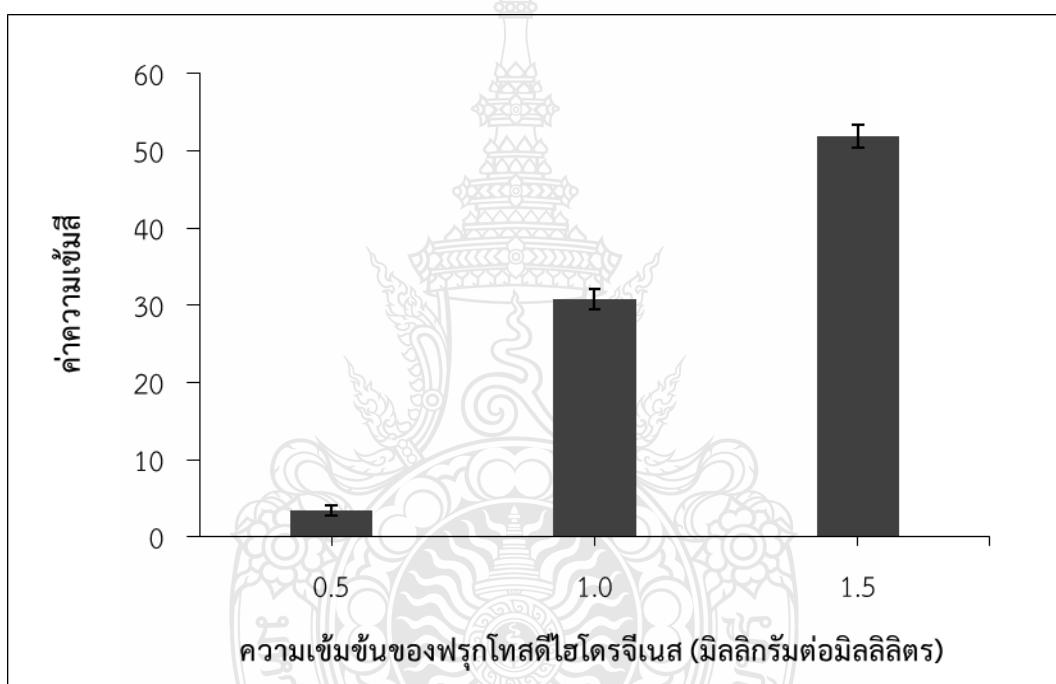


ภาพที่ 4.11 ผลเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส

4.3.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส

4.3.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนส

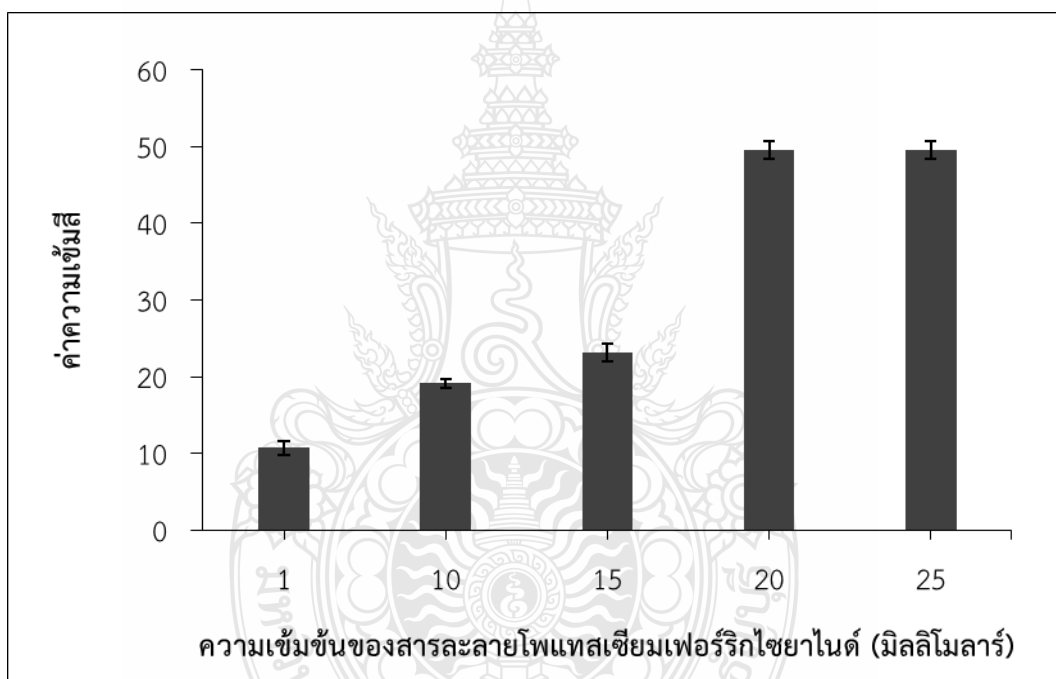
ศึกษาความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนสที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดสารละลายฟรุกโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.12 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนสและเพิ่มสูงสุดถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเนื่องด้วยความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนสที่ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสูงสุดจากบริษัท Sigma-Aldrich ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนสที่ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.12 ผลการศึกษาความเข้มข้นของฟรุกโทสดีไฮโดรจีเนส

4.3.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์

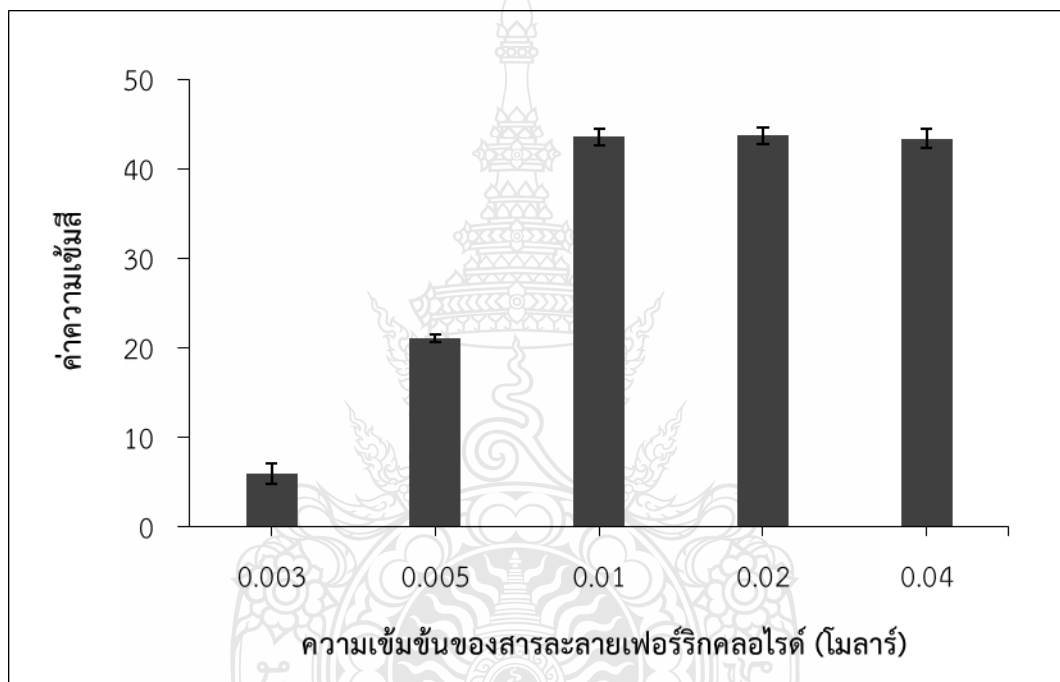
ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ ที่ความเข้มข้น 1.0 10.0 15.0 20.0 และ 25.0 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจวัดสารละลายฟรุทโทส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้ แสดงดังภาพที่ 4.13 พบว่าช่วงความเข้มข้น 1.0 ถึง 20.0 มิลลิโมลาร์ ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตาม ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์และเพิ่มสูงสุดที่ 20 มิลลิโมลาร์ และเมื่อ ความเข้มข้นสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์มากกว่า 20 มิลลิโมลาร์จะให้ค่าความเข้มสีคงที่ เนื่องจากสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ถูกรีดิวซ์ด้วยสารละลายฟรุทโทสหมด โดยมีฟรุทโทสดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ คือ 20 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.13 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์

4.3.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์

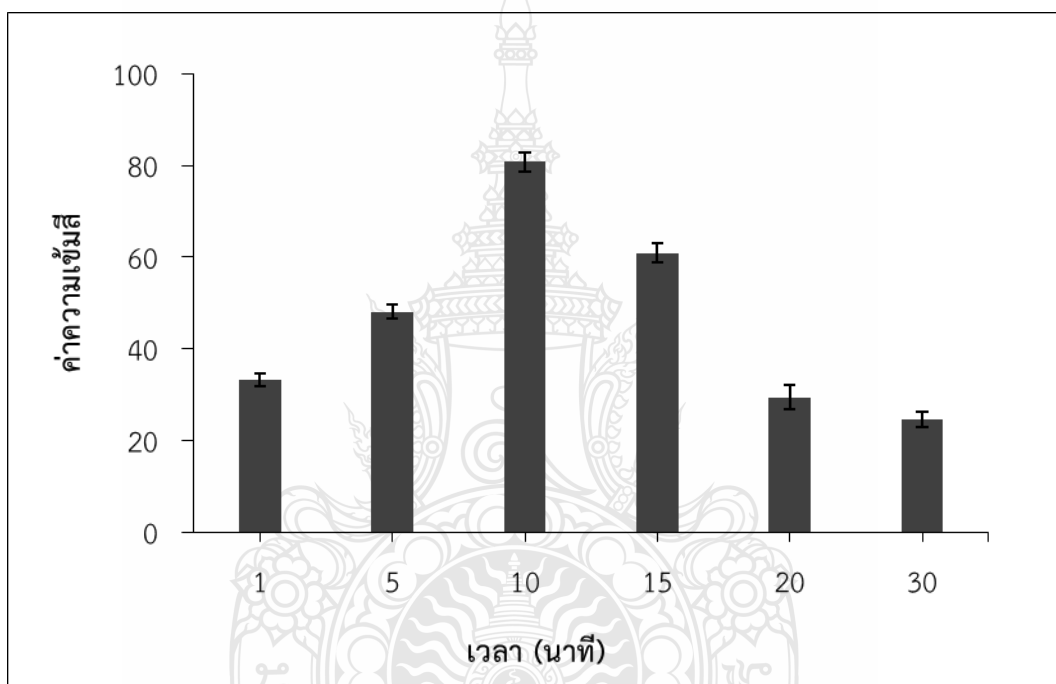
ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.003 0.005 0.01 0.02 และ 0.04 โมลาร์ ทำการตรวจวัดสารละลายฟรุทโทสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.14 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของละลายเฟอร์ริกคลอไรด์และเพิ่มสูงสุดที่ 0.01 โมลาร์ เมื่อความเข้มข้นของละลายเฟอร์ริกคลอไรด์มากกว่า 0.01 โมลาร์ ค่าความเข้มสีจะคงที่เนื่องจากสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ คือ 0.01 โมลาร์



ภาพที่ 4.14 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์

4.3.4.4 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณฟรุกโทสขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างสารละลายฟรุกโทสกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ โดยมีเอนไซม์ฟรุกโทสดีไฮโดรเจนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมจึงเป็นเวลาที่สารทำปฏิกิริยากันได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ที่เวลา 1 5 10 15 20 และ 30 นาที จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.15 พบว่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น จนถึงเวลาที่ 10 นาที เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 นาที จะให้ค่าความเข้มสีลดลง เนื่องจากการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณฟรุกโทสสมบูรณ์ที่เวลา 10 นาที

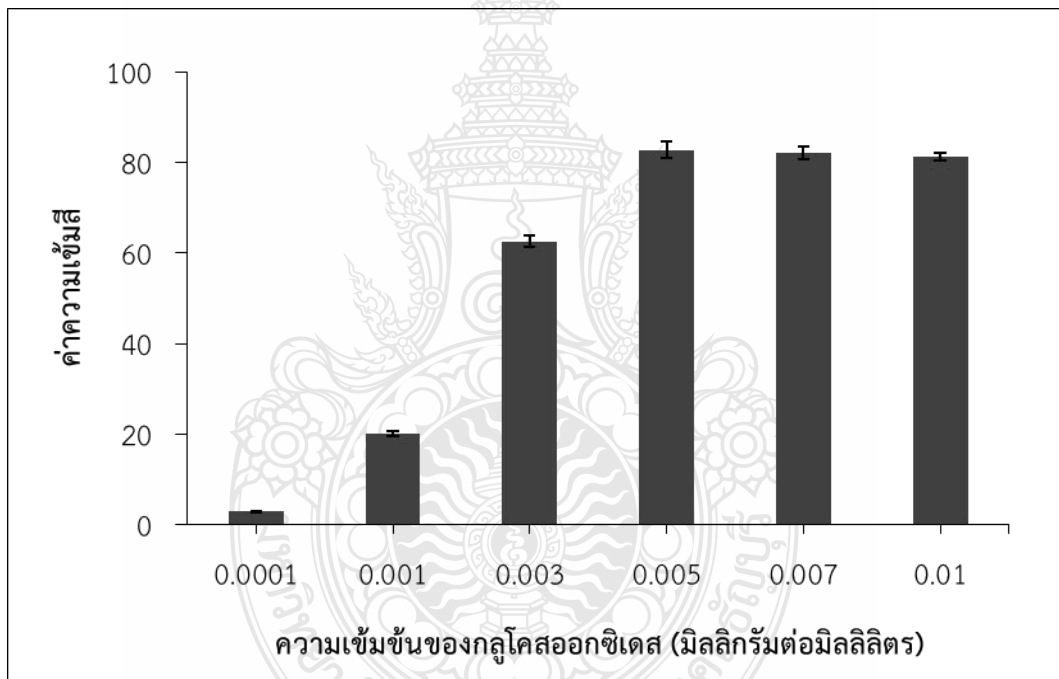


ภาพที่ 4.15 ผลเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส

4.3.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส

4.3.5.1 ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

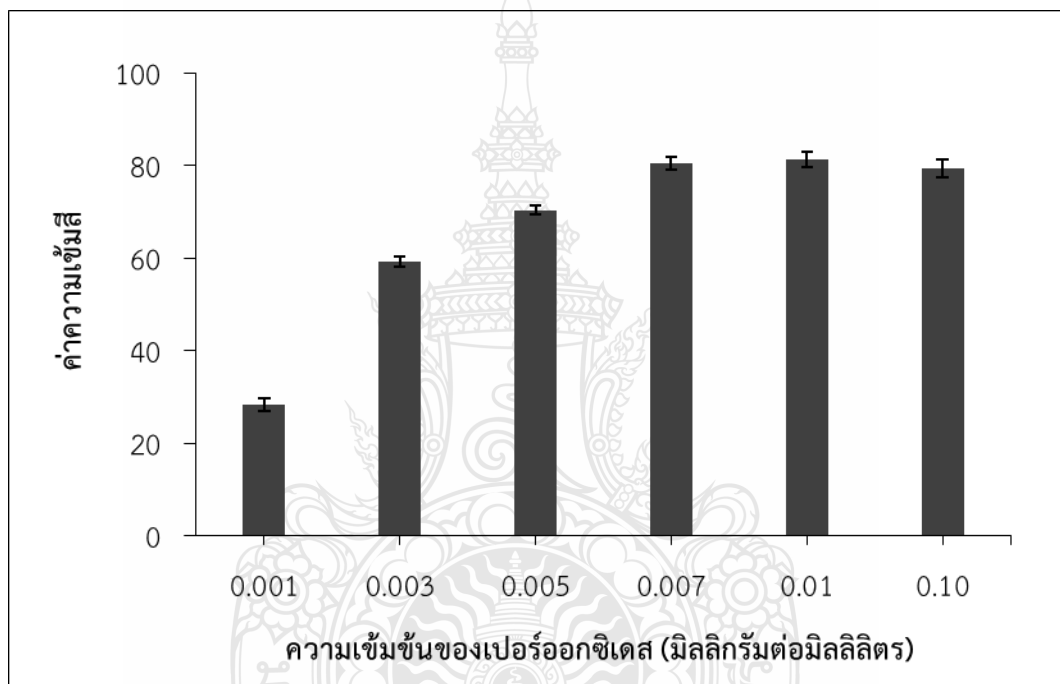
ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.0001 0.001 0.003 0.005 0.007 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.16 พบว่าในช่วงความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่ 0.0001 ถึง 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส เนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสมากขึ้นทำให้สามารถเร่งปฏิกิริยาสารละลายกลูโคสได้ดีขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสมากกว่า 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าความเข้มสีที่คงที่ เนื่องจากสารละลายกลูโคสทำปฏิกิริยากับกลูโคสออกซิเดสได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดสที่เหมาะสม คือ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.16 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส

4.3.5.2 ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส

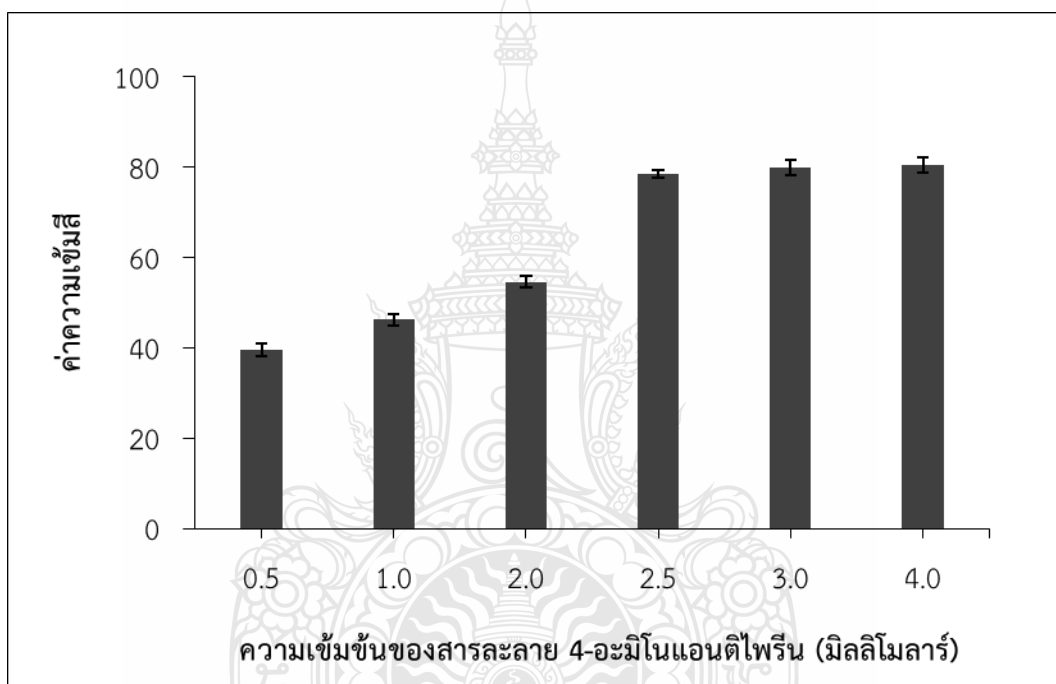
ศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.001 0.003 0.005 0.007 0.01 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.17 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสและเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสมากกว่า 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าความเข้มสีที่คงที่ อาจเนื่องจากสารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีนและสารละลายฟีนอลถูกใช้หมด ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้คงที่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสม คือ 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.17 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส

4.3.5.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน

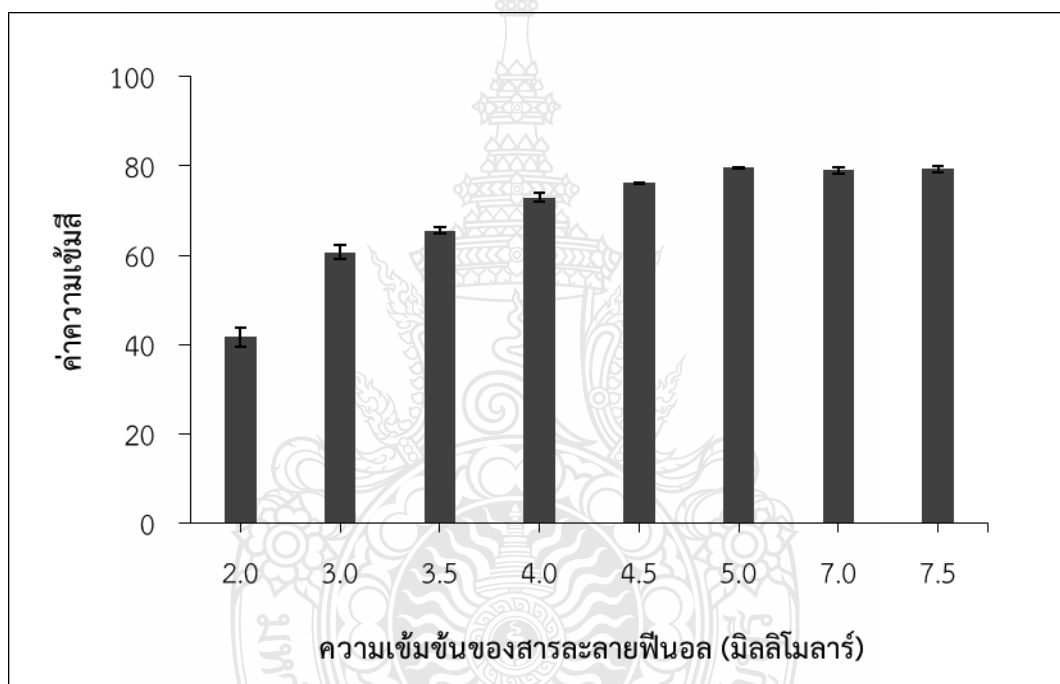
ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 2.5 3.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจวัดสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.18 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนและเพิ่มขึ้นจนถึง 2.5 มิลลิโมลาร์ เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนมากกว่า 2.5 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าความเข้มสีที่คงที่เนื่องจากสารละลายกลูโคสทำปฏิกิริยากับสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนจนหมด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีนที่เหมาะสม คือ 2.5 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.18 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน

4.3.5.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอล

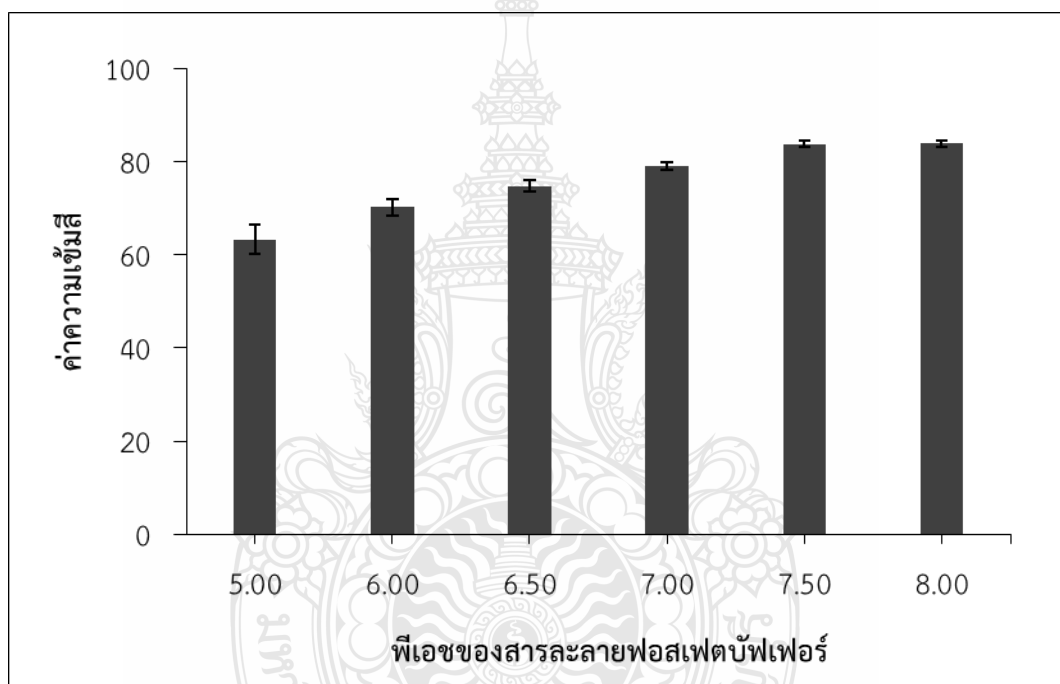
ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 2.0 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 7.0 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจวัดสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.19 พบว่าค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลและเพิ่มขึ้นจนถึง 5.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลมากกว่า 5.0 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าความเข้มสีที่คงที่เนื่องจากปริมาณของสารละลายกลูโคสมีปริมาณจำกัด จึงทำให้ความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลที่เพิ่มขึ้นมากเกินไปก็ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายกลูโคสได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายฟีนอลที่เหมาะสม คือ 5.0 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4.19 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟีนอล

4.3.5.5 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

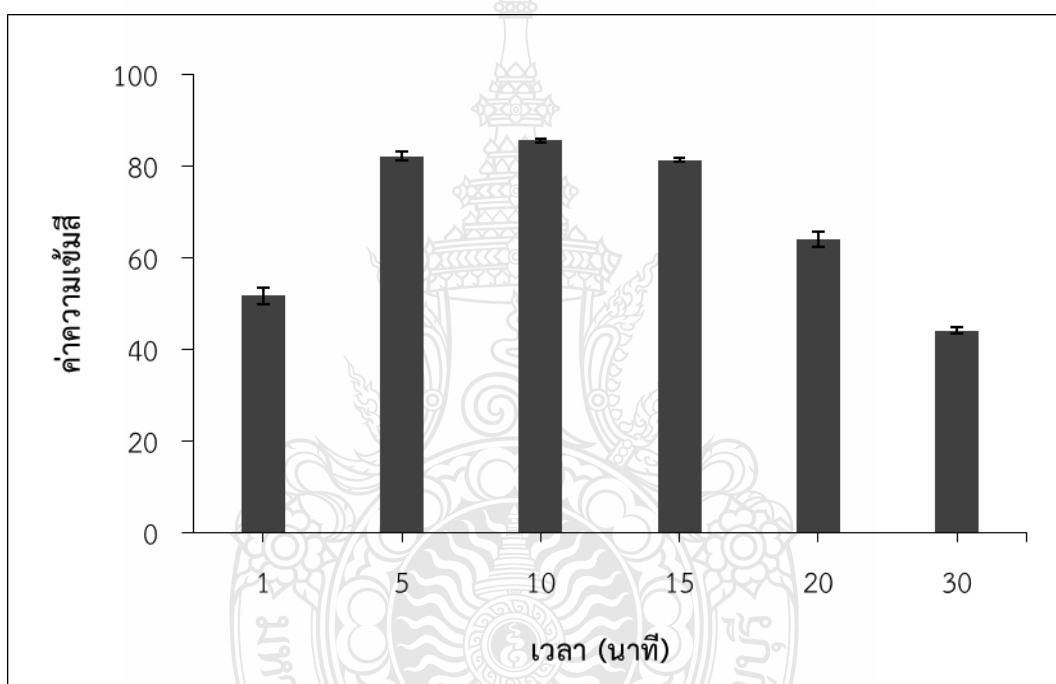
ศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส โดยศึกษาสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.00 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ทำการทดลองโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ละลายกลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส สารละลาย 4-อะมิโนแอนติไพรีน และสารละลายฟีนอล จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.20 พบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.00 ถึง 7.50 จะให้ค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพีเอชมากกว่า 7.50 จะให้ค่าความเข้มสีคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.50 [11]



ภาพที่ 4.20 ผลการศึกษาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4.3.5.6 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส

เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณกลูโคสขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างสารละลายกลูโคสกับสารละลาย 4-อะมิโนแอนติพรีนและฟีนอล โดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมจึงเป็นเวลาที่สามารถทำปฏิกิริยากันได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยศึกษาที่เวลา 1 5 10 15 20 และ 30 นาที จากนั้นวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.21 พบว่าที่เวลา 1 ถึง 10 นาที ค่าความเข้มสีมีการเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นหลังจากนาทีที่ 10 ค่าความเข้มสีลดลง แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสสมบูรณ์ที่เวลา 10 นาที ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เวลานี้เป็นเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.21 ผลเวลาในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 4.1 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สภาวะที่ศึกษา	ผลการทดลอง
1. ศึกษาปริมาณของสารละลายในบริเวณตรวจวัด (ไมโครลิตร)	6
2. ศึกษาปริมาณของสารละลายในบริเวณตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	30
3. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาซูโครส	
3.1 อินเวอร์เทส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.2
3.2 กลูโคสออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.5
3.3 เพอร์ออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.06
3.4 สารละลายไอโอดีนซิดีน (มิลลิโมลาร์)	3.0
3.5 พืเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา	
3.5.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์	
3.5.1.1 อินเวอร์เทส	5.50
3.5.1.2 กลูโคสออกซิเดส	5.50
3.5.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	
3.5.2.1 เพอร์ออกซิเดส	6.50
3.6 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาท)	10
4. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาฟรุคโทส	
4.1 ฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.5
4.2 สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกซายาไนต์ (มิลลิโมลาร์)	20.0
4.3 สารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ (โมลาร์)	0.01
4.4 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาท)	10
5. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยากลูโคส	
5.1 กลูโคสออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.005
5.2 เพอร์ออกซิเดส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.007
5.3 สารละลาย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน (มิลลิโมลาร์)	2.5
5.4 สารละลายฟีนอล (มิลลิโมลาร์)	5.0
5.5 พืเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา	
5.5.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	7.50
5.6 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาท)	10

4.4 ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

การหาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส เพื่อเป็นการยืนยันความเหมาะสม ความถูกต้อง และข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้ทำการหาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ดังนี้

4.4.1 ศึกษาความเที่ยงของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

4.4.1.1 ศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

ศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ศึกษาโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษตรวจวัดหาปริมาณของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ 20 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทำการทดสอบซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ แล้วนำค่าความเข้มสีที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส มีค่าเท่ากับ 1.3 1.9 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการทำซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

ครั้งที่	ค่าความเข้มสี		
	ซูโครส	ฟรุคโทส	กลูโคส
1	42.4	80.2	86.8
2	41.6	83.3	85.9
3	42.1	83.7	86.1
4	42.5	81.1	84.4
5	41.9	83.8	84.4
6	41.3	81.1	83.9
7	42.9	83.9	84.3
ค่าเฉลี่ย	42.1	82.4	85.1
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.5	1.6	1.1
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	1.3	1.9	1.3

4.4.1.2 ศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณ ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

ศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ศึกษาโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษตรวจวัดหาปริมาณของสารละลาย ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ 20 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน เช่น เปลี่ยนผู้ทดลอง จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส มีค่าเท่ากับ 3.1 3.4 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณ
ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

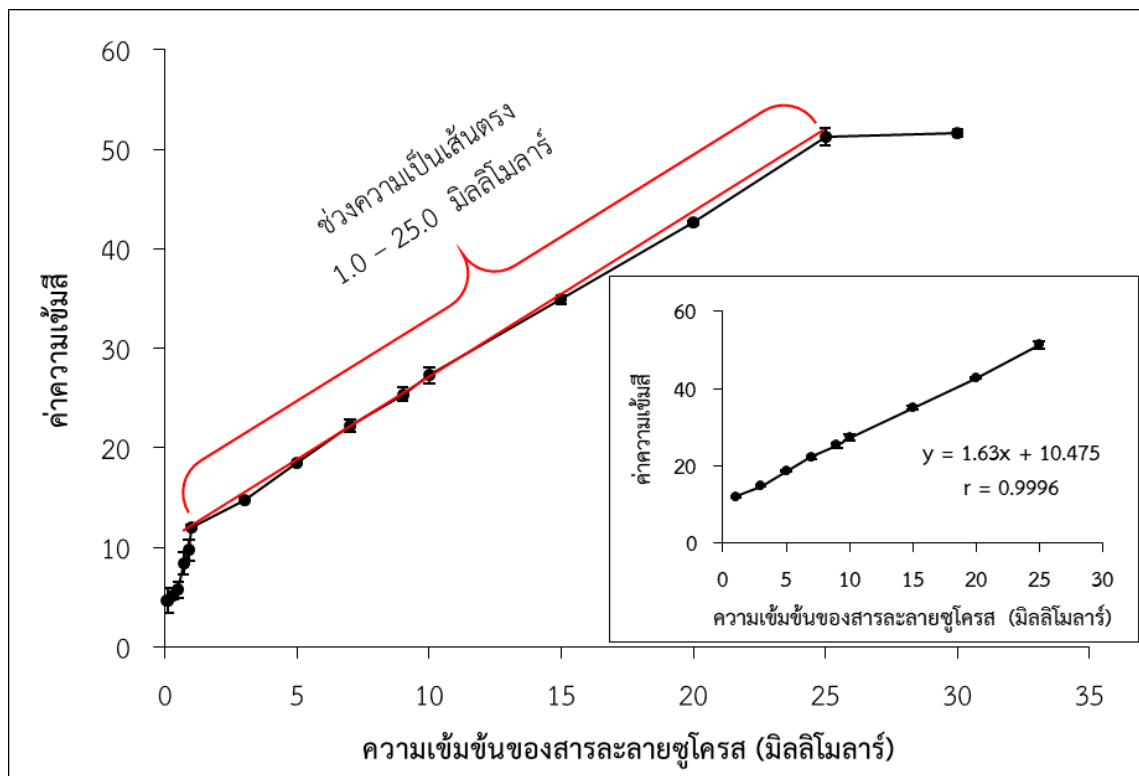
ครั้งที่	ค่าความเข้มข้น		
	ซูโครส	ฟรุคโทส	กลูโคส
1	39.3	77.7	85.3
2	41.2	78.5	86.0
3	40.9	85.2	84.1
4	41.5	82.9	86.3
5	42.7	81.1	84.4
6	41.9	79.5	84.4
7	43.3	83.1	87.6
ค่าเฉลี่ย	41.5	81.1	85.4
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.3	2.7	1.3
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	3.1	3.4	1.5

4.4.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

4.4.2.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส โดยตรวจวัดสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.0 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 20.0 25.0 และ 30.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ นำค่าความเข้มสีที่ได้จากการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครสกับค่าความเข้มสี ดังตารางที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.22 ซึ่งผลการทดลองพบว่าค่าความเข้มสีจะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารละลายซูโครส โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 1.0 ถึง 25.0 มิลลิโมลาร์ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดซูโครส

ความเข้มข้นสารละลายซูโครส (มิลลิโมลาร์)	ค่าความเข้มสี				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.05	4.3	5.0	4.6	4.6	0.3
0.1	4.6	6.0	3.5	4.7	1.3
0.3	5.3	5.4	4.8	5.2	0.3
0.5	6.3	6.1	4.8	5.7	0.8
0.7	8.2	9.7	7.4	8.4	1.1
0.9	10.8	9.7	8.7	9.8	1.1
1	12.2	11.9	12.1	12.1	0.1
3	14.7	15.1	14.6	14.8	0.2
5	18.6	18.3	18.7	18.5	0.2
7	21.7	22.9	22.0	22.2	0.6
9	26.1	25.2	24.8	25.4	0.7
10	26.4	27.9	27.7	27.3	0.8
15	35.2	34.4	35.2	34.9	0.4
20	42.6	42.5	42.8	42.6	0.2
25	52.0	50.3	51.6	51.3	0.9
30	51.2	51.7	51.9	51.6	0.4

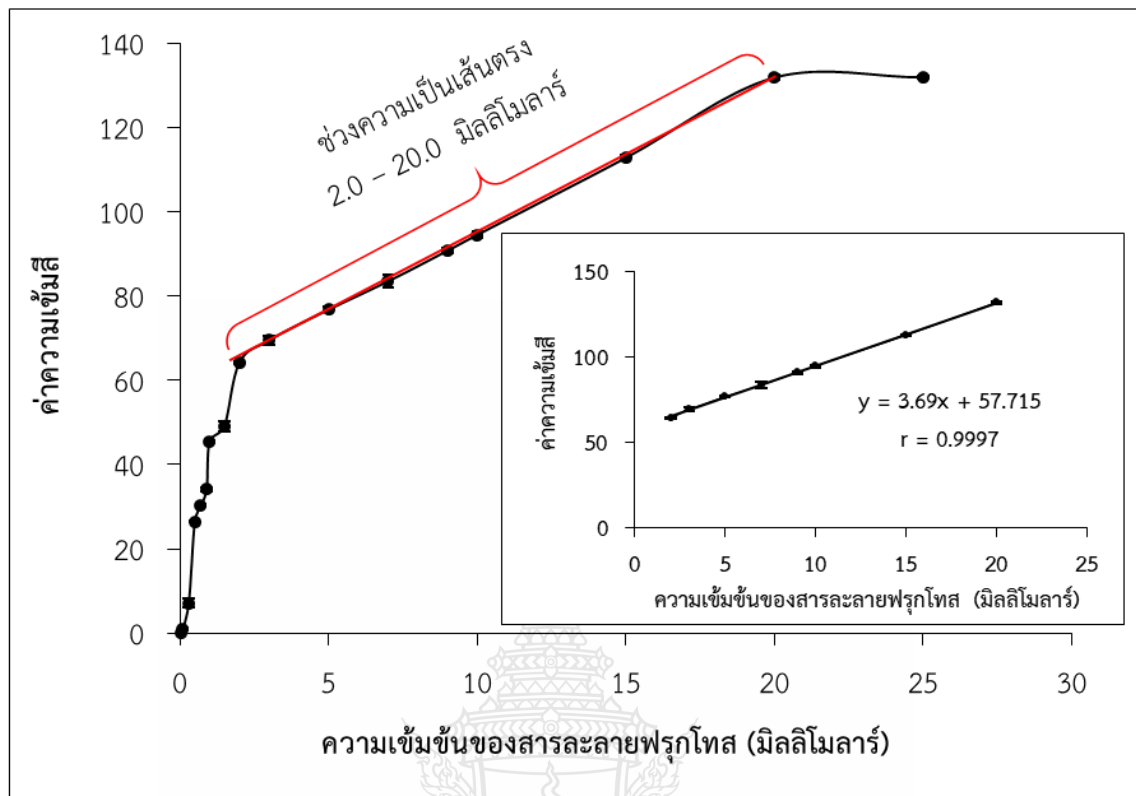


ภาพที่ 4.22 ช่วงความเป็นเส้นตรงสารละลายซูโครส

4.4.2.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส โดยตรวจวัดสารละลายฟรุกโทสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.0 1.5 2.0 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 15.0 20.0 และ 25.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ นำค่าความเข้มสีที่ได้จากการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโทสกับค่าความเข้มสี ดังตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.23 ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโทสเพิ่มขึ้นความเข้มสีของสีฟ้าจะเพิ่มขึ้น ค่าความเข้มสีจะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโทส โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 2.0 ถึง 20.0 มิลลิโมลาร์ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997

ตารางที่ 4.5 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดฟรุกโทส

ความเข้มข้นสารละลายฟรุกโทส (มิลลิโมลาร์)	ค่าความเข้มสี				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.05	0.4	0.0	0.0	0.1	0.3
0.1	0.9	0.6	1.4	1.0	0.4
0.3	6.6	6.3	8.4	7.1	1.1
0.5	26.6	26.3	26.4	26.4	0.2
0.7	30.5	30.2	29.9	30.2	0.3
0.9	33.9	34.7	33.8	34.1	0.5
1.0	45.8	45.2	45.4	45.5	0.3
1.5	50.2	47.8	49.6	49.2	1.2
2	64.3	64.0	64.5	64.3	0.2
3	70.8	68.6	69.1	69.5	1.1
5	77.0	77.4	76.1	76.8	0.6
7	85.1	83.3	82.1	83.5	1.5
9	90.2	91.5	90.7	90.8	0.6
10	95.3	94.0	94.3	94.5	0.7
15	112.5	112.4	113.5	112.8	0.6
20	131.9	132.5	131.3	131.9	0.6
25	131.9	132.1	131.7	131.9	0.2

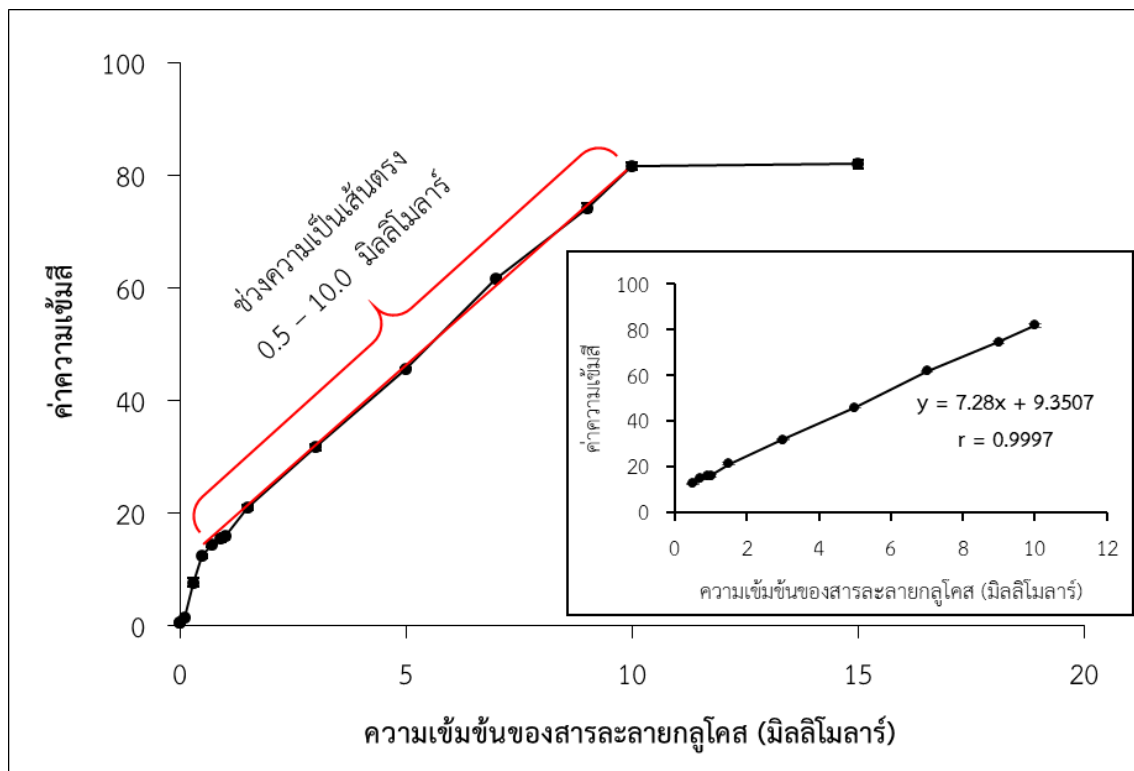


ภาพที่ 4.23 ช่วงความเป็นเส้นตรงสารละลายฟรุกโทส

4.4.2.3 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยตรวจวัดสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.001 0.01 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.0 1.5 3.0 5.0 7.0 9.0 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ นำค่าความเข้มสีที่ได้จากการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับค่าความเข้มสี ดังตารางที่ 4.6 และ ภาพที่ 4.24 ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มสีจะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 0.5 ถึง 10.0 มิลลิโมลาร์ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997

ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส

ความเข้มข้นสารละลายกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	ค่าความเข้มสี				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.001	0.6	1.1	0.5	0.8	0.3
0.01	0.3	0.2	0.4	0.3	0.1
0.1	0.9	2.0	1.5	1.5	0.5
0.3	8.9	7.5	7.1	7.8	0.9
0.5	12.2	12.8	12.2	12.4	0.3
0.7	14.8	14.1	14.4	14.5	0.3
0.9	16.1	14.8	16.0	15.6	0.7
1.0	15.9	15.4	16.5	15.9	0.5
1.5	20.9	21.6	20.8	21.1	0.4
3	31.3	32.4	31.6	31.8	0.5
5	45.8	45.6	45.8	45.7	0.1
7	61.2	61.7	61.7	61.6	0.3
9	74.8	74.7	73.4	74.3	0.8
10	82.3	81.5	81.0	81.6	0.6
15	81.9	82.9	81.4	82.1	0.8



ภาพที่ 4.24 ช่วงความเป็นเส้นตรงสารละลายกลูโคส

4.4.3 ศึกษาความไววิเคราะห์ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

ศึกษาความไววิเคราะห์ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสกับค่าความเข้มข้น จากความสัมพันธ์เชิงเส้นสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1.0 ถึง 25.0 มิลลิโมลาร์ ฟรุคโทส 2.0 ถึง 20.0 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 0.5 ถึง 10.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส มีความไววิเคราะห์ คือ ค่าความเข้มข้นเปลี่ยนไป 1.63 หน่วยต่อความเข้มข้นของสารละลายซูโครส 1.0 มิลลิโมลาร์ สำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทส มีความไววิเคราะห์ คือ ค่าความเข้มข้นเปลี่ยนไป 3.69 หน่วยต่อความเข้มข้นของสารละลายฟรุคโทส 1.0 มิลลิโมลาร์ และสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส มีความไววิเคราะห์ คือ ค่าความเข้มข้นเปลี่ยนไป 7.28 หน่วยต่อความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1.0 มิลลิโมลาร์

4.4.4 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยตรวจวัดสารละลายแบบลงค์ จำนวน 7 ข้ำ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผล ภาพ นำค่าความเข้มสีที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แสดงดังในตารางที่ 4.7 เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ซึ่งได้ เท่ากับ 0.9 มิลลิโมลาร์ 0.8 มิลลิโมลาร์ และ 0.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าความเข้มสีของสารละลายแบบลงค์ในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และ กลูโคส

ครั้งที่	ค่าความเข้มสี		
	ซูโครส	ฟรุคโทส	กลูโคส
1	0.0	0.2	0.0
2	0.5	0.1	0.2
3	0.0	0.4	0.1
4	0.4	0.2	0.0
5	0.1	0.2	0.2
6	0.0	0.1	0.0
7	0.2	0.3	0.1
ค่าเฉลี่ย	0.0	0.0	0.0
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.29	0.26	0.12

โดยขีดจำกัดในการตรวจพบคำนวณได้จากสูตร

$$LOD = 3SD$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัดของสารละลายแบบลงค์

สำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครสจะได้

$$LOD = 3(0.29) \\ = 0.9 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

สำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทสจะได้

$$LOD = 3(0.26) \\ = 0.8 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสจะได้

$$LOD = 3(0.12) \\ = 0.4 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

4.4.5 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยตรวจวัดสารละลายแบบลงค์ จำนวน 7 ซ้ำ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ นำค่าความเข้มสีที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แสดงดังในตารางที่ 4.7 เพื่อมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับตรวจวัดปริมาณ ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ซึ่งได้เท่ากับ 2.9 มิลลิโมลาร์ 2.6 มิลลิโมลาร์ และ 1.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

โดยขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณคำนวณได้จากสูตร

$$LOQ = 10SD$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวัดของสารละลายแบบลงค์

สำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครสจะได้

$$LOQ = 10(0.29) \\ = 2.9 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

และเมื่อศึกษาความเที่ยงที่ความเข้มข้นนี้ พบว่าให้ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.7 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 102 เปอร์เซ็นต์ สรุปว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครสมีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 2.9 มิลลิโมลาร์

สำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทสจะได้

$$LOQ = 10(0.26) \\ = 2.6 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

และเมื่อศึกษาความเที่ยงที่ความเข้มข้นนี้ พบว่าให้ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.3 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 103 เปอร์เซ็นต์ สรุปว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทสมีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 2.6 มิลลิโมลาร์

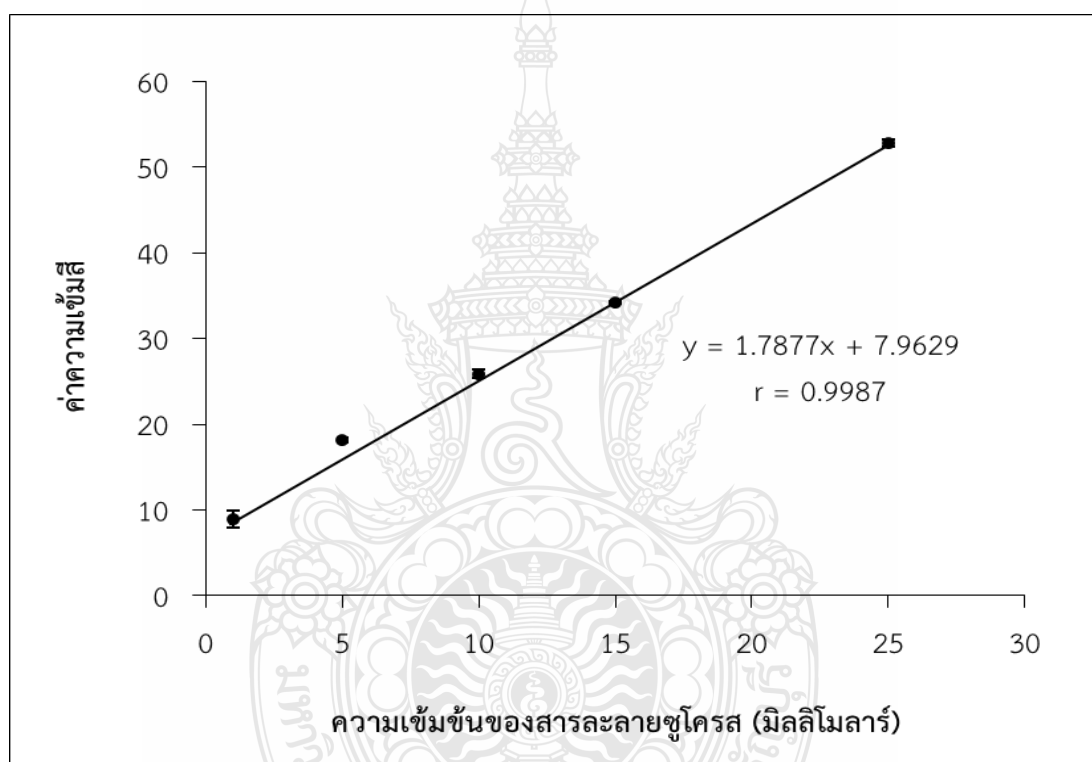
สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสจะได้

$$LOQ = 10(0.12) \\ = 1.2 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

และเมื่อศึกษาความเที่ยงที่ความเข้มข้นนี้ พบว่าให้ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.4 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 102 เปอร์เซ็นต์ สรุปว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสมีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 1.2 มิลลิโมลาร์

4.4.6 ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส

4.4.6.1 ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยเติมสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้น 2.9 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริงตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครส ภาพที่ 4.25 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน อยู่ในช่วง 100 ถึง 103 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.8 ซึ่งผลที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ช่วงที่ยอมรับ 95 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์) [55] แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องสูง

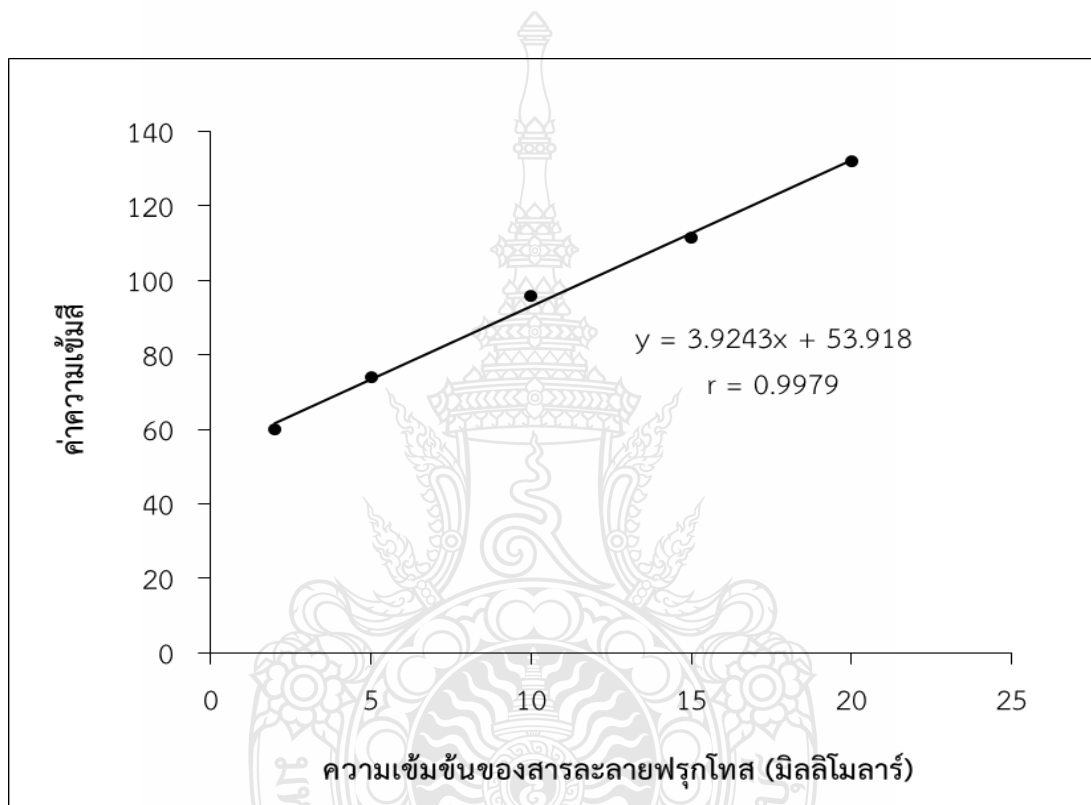


ภาพที่ 4.25 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณซูโครส

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (มิลลิโมลาร์)			เปอร์เซ็นต์การได้
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	กลับคืน
น้ำอ้อย A	16.5 ± 0.02	2.9	19.4 ± 0.3	102 ± 1.2
	16.5 ± 0.02	5.0	21.5 ± 0.2	100 ± 0.6
	16.5 ± 0.02	10.0	26.8 ± 0.1	103 ± 1.3

4.4.6.2 ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยเติมสารละลายมาตรฐานฟรุกโทสที่ความเข้มข้น 2.6 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริงตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟรุกโทส ภาพที่ 4.26 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน อยู่ในช่วง 98 ถึง 103 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.9 ซึ่งผลที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ช่วงที่ยอมรับ 95 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องสูง

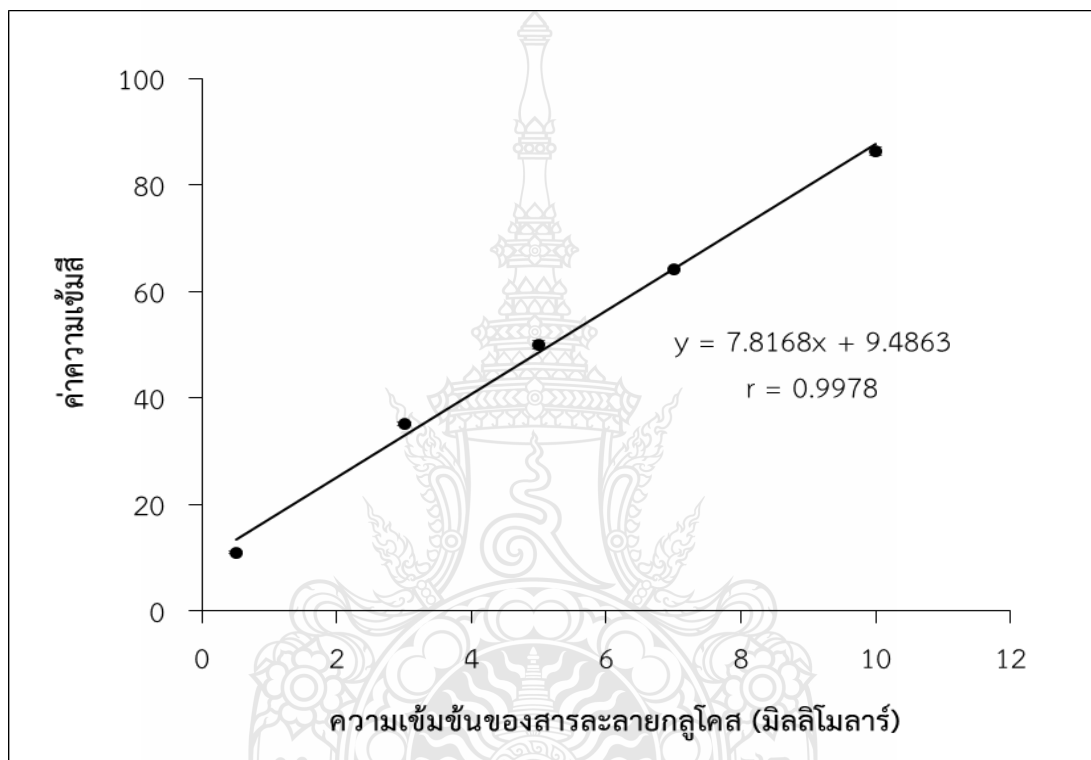


ภาพที่ 4.26 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟรุกโทสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.9 ผลการศึกษาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณฟรุกโทส

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโทส (มิลลิโมลาร์)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
น้ำอ้อย A	3.1 ± 0.1	2.6	5.8 ± 0.04	103 ± 1.5
	3.1 ± 0.1	5.0	8.0 ± 0.1	98 ± 2.0
	3.1 ± 0.1	10.0	13.1 ± 0.2	99 ± 1.8

4.4.6.3 ศึกษาความถูกต้องของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.2 3.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างจริงตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ภาพที่ 4.27 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน อยู่ในช่วง 100 ถึง 102 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.10 ซึ่งผลที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ช่วงที่ยอมรับ 95 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องสูง



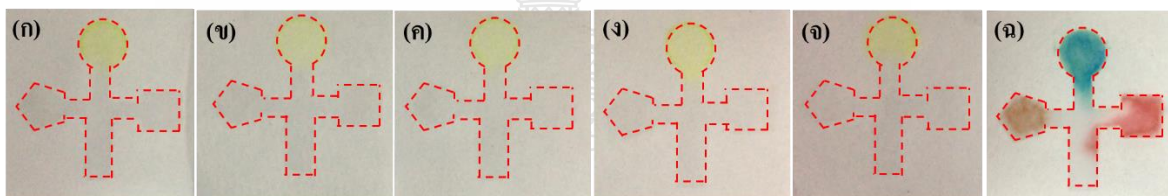
ภาพที่ 4.27 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (มิลลิโมลาร์)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
น้ำอ้อย A	2.0 ± 0.0003	1.2	3.2 ± 0.02	102 ± 0.6
	2.0 ± 0.0003	3.0	5.0 ± 0.02	101 ± 0.6
	2.0 ± 0.0003	7.0	9.0 ± 0.01	100 ± 0.1

4.4.7 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณ ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

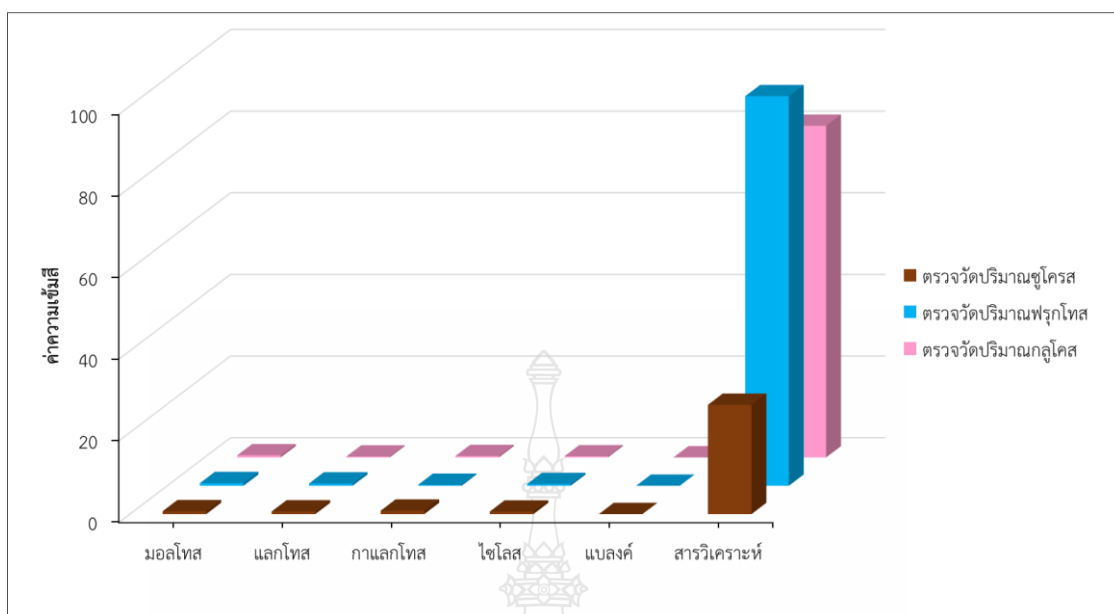
ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณ
ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ซึ่งเป็นสารที่คาดว่าจะมีผลต่อการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส
และคาดว่าจะพบในตัวอย่าง ได้แก่ มอลโทส แล็กโทส กาแล็กโทส และไซโลส เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้น
และค่าความเข้มข้นที่ได้จากการวัดค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพของตัวรบกวนกับ
สารละลายมาตรฐานซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 10 มิลลิโมลาร์ ผลการ
ทดลองที่ได้ดังภาพที่ 4.28 และตารางที่ 4.11 พบว่า มอลโทส แล็กโทส กาแล็กโทส และไซโลส ไม่มีผล
ต่ออุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส เนื่องจากไม่
สามารถเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับแอนไซม์ของซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสได้ สรุปได้ว่าอุปกรณ์
ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีจำเพาะเจาะจงสูงต่อการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และ
กลูโคส



ภาพที่ 4.28 ผลการศึกษาตัวรบกวน (ก) มอลโทส (ข) แล็กโทส (ค) กาแล็กโทส (ง) ไซโลส และ
(จ) แบลงค์ และ (ฉ) ซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าความเข้มข้นของสารทดสอบต่างๆ

สารทดสอบ	ครั้งที่			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
มอลโทส	1.0	0.1	1.0	0.7	0.5
แล็กโทส	0.1	0.9	1.0	0.6	0.5
กาแล็กโทส	0.8	0.7	1.0	0.8	0.1
ไซโลส	0.9	0.9	0.0	0.6	0.6
แบลงค์	0.0	0.0	0.0	0.0	0.02
ซูโครส	26.5	26.1	27.7	26.8	0.8
มอลโทส	0.6	0.8	0.6	0.6	0.1
แล็กโทส	0.8	0.4	0.4	0.6	0.2
กาแล็กโทส	0.1	0.1	0.5	0.2	0.2
ไซโลส	0.0	0.0	1.3	0.4	0.7
แบลงค์	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1
ฟรุคโทส	96.2	95.4	94.8	95.5	0.7
มอลโทส	0.2	0.7	1.0	0.5	0.6
แล็กโทส	0.0	0.3	0.3	0.2	0.2
กาแล็กโทส	0.1	0.5	0.4	0.3	0.2
ไซโลส	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1
แบลงค์	0.1	0.4	0.3	0.0	0.3
กลูโคส	81.0	80.6	82.2	81.3	0.8



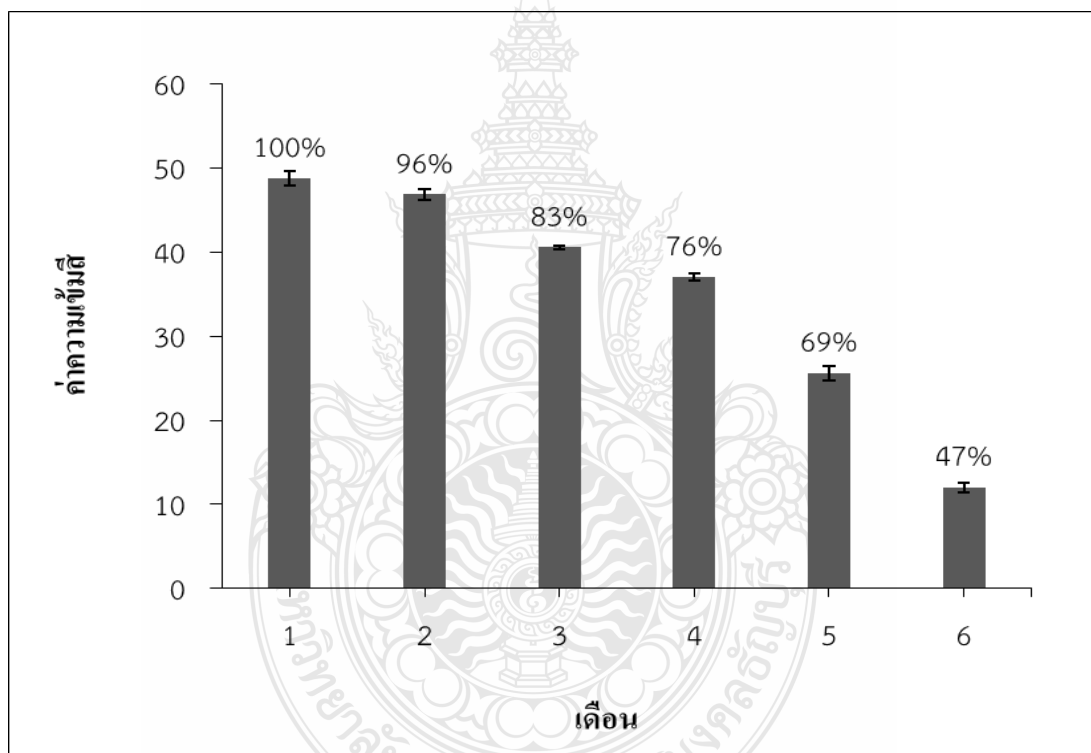
ภาพที่ 4.29 ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงสำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส

4.4.8 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ศึกษาอายุของสารเคมีที่ใช้ในอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยศึกษาระยะเวลาในการนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปใช้งานในการตรวจวัดสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลาจนกว่าการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เก็บสารเคมีไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพลดลง ทำการทดลองทุกๆ 1 เดือน ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยกำหนดให้ค่าการตอบสนองเดือนที่ 1 ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 4.12 4.13 และ 4.14 และภาพที่ 4.30 4.31 และ 4.32 สำหรับตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสตามลำดับ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการทำงานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ทำงานได้ลดลง พบว่าอายุการเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เก็บรักษาได้เป็นเวลา 3 เดือน ที่ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีความสามารถในการตอบสนองได้ 83 เปอร์เซ็นต์ สำหรับซูโครส 89 เปอร์เซ็นต์ สำหรับฟรุคโทส และ 91 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลูโคส

ตารางที่ 4.12 การศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส

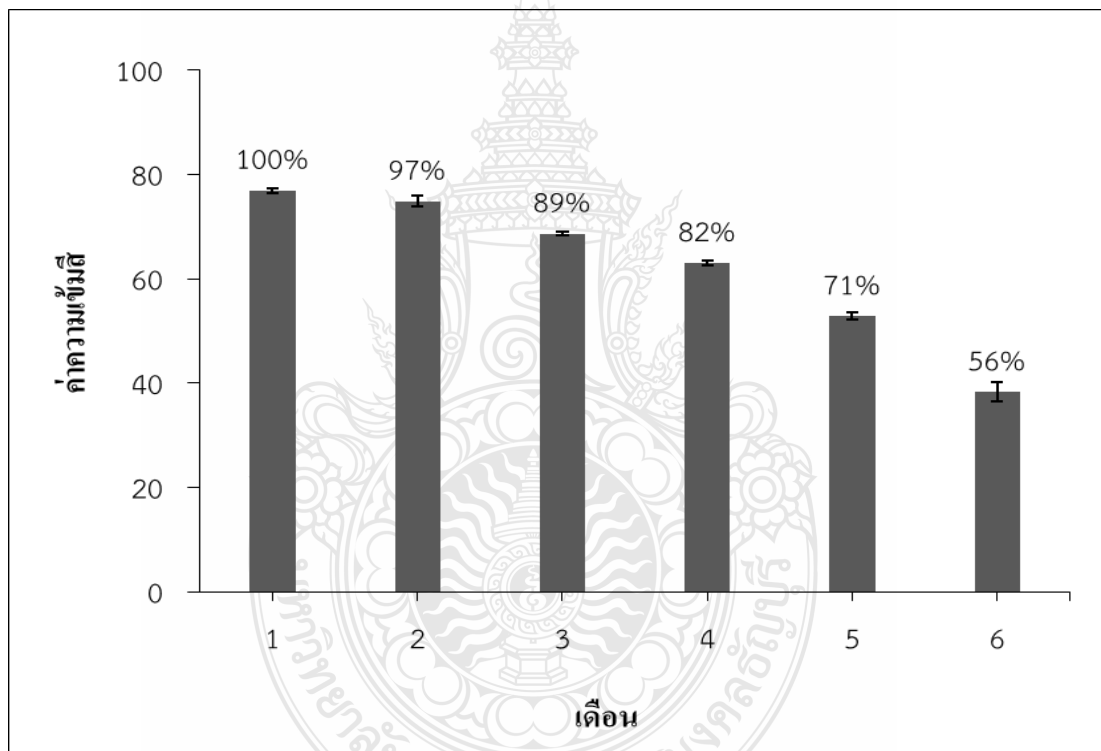
เดือน	ครั้งที่			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ ตรวจวัดแบบกระดาษ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
1	49.5	47.8	49.1	48.8	0.9	100
2	46.6	46.4	47.5	46.9	0.6	96
3	40.5	40.4	40.9	40.6	0.3	83
4	37.3	36.6	37.2	37.0	0.4	76
5	24.7	25.7	26.5	25.6	0.9	69
6	11.8	12.7	11.6	12.1	0.6	47



ภาพที่ 4.30 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส

ตารางที่ 4.13 แสดงการศึกษาอายุเก็บรักษางานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดฟรุกโทส

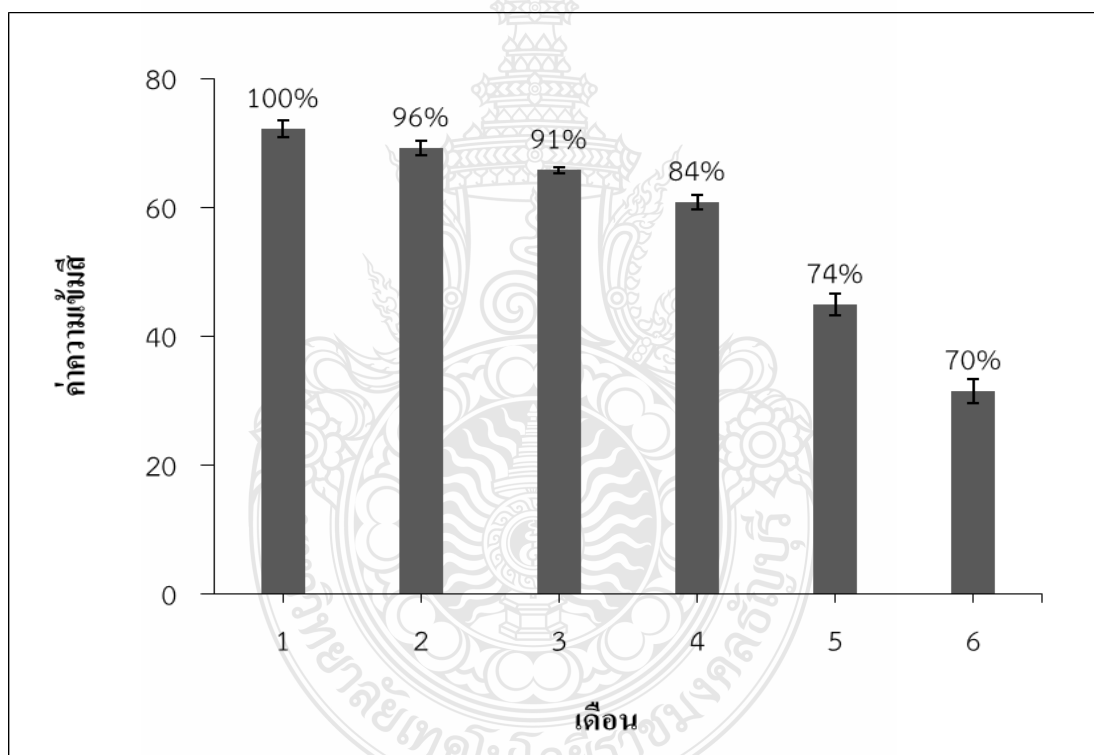
เดือน	ครั้งที่			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ ตรวจวัดแบบกระดาษ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
1	77.1	77.3	76.5	77.0	0.4	100
2	74.6	76.0	74.0	74.9	1.0	97
3	69.1	68.3	68.7	68.7	0.4	89
4	63.7	62.8	62.7	63.1	0.5	82
5	52.1	53.0	53.4	52.8	0.7	71
6	37.9	36.8	40.3	38.3	1.8	56



ภาพที่ 4.31 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดฟรุกโทส

ตารางที่ 4.14 แสดงการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดกลูโคส

เดือน	ครั้งที่			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (เปอร์เซ็นต์)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
1	73.6	70.9	72.0	72.1	1.3	100
2	70.5	68.5	68.6	69.2	1.1	96
3	65.7	65.2	66.3	65.7	0.5	91
4	61.8	59.7	61.0	60.8	1.1	84
5	43.1	45.2	46.3	44.9	1.6	74
6	31.1	29.8	33.5	31.5	1.9	70



ภาพที่ 4.32 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดกลูโคส

ตารางที่ 4.15 ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฟอสฟอรัส และกลูโคส

ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	ผลการศึกษา
1. ศึกษาความเที่ยง (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์))	
1.1 การทำซ้ำ	
1.1.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์	1.3
1.1.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส	1.9
1.1.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส	1.3
1.2 การทวนซ้ำ	
1.2.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์	3.1
1.2.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส	3.4
1.2.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส	1.5
2. ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง	
2.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (มิลลิโมลาร์)	1.0 ถึง 25.0
2.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิโมลาร์)	2.0 ถึง 20.0
2.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	0.5 ถึง 10.0
3. ศึกษาความไววิเคราะห์	
3.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (มิลลิโมลาร์)	1.63
3.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิโมลาร์)	3.69
3.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	7.28
4. ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ	
4.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (มิลลิโมลาร์)	0.9
4.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิโมลาร์)	0.8
4.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	0.4
5. ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ	
4.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (มิลลิโมลาร์)	2.9
4.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิโมลาร์)	2.6
4.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส (มิลลิโมลาร์)	1.2
6. ศึกษาความถูกต้อง	
6.1 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน)	100 ถึง 103
6.2 ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน)	98 ถึง 103
6.3 ตรวจวัดปริมาณกลูโคส (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน)	100 ถึง 102
7. ความจำเพาะเจาะจง	มีความจำเพาะเจาะจงสูง
8. ศึกษาอายุการเก็บรักษา (เดือน)	3

4.5 การตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างจริง

เมื่อได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส และสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดแล้ว จึงนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างน้ำตาลทรายและน้ำอ้อย โดยคำนวณหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสที่ตรวจวัดได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายซูโครสจะต้องหักลบกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ผลการทดลองที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ที่ตรวจวัดได้ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน (โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง) ดังตารางที่ 4.16 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองวิธีมาทดสอบความแตกต่างของวิธีด้วยสถิติ t -test ผลการทดลองพบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด ปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างจริงได้ ซึ่งอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนี้มีข้อดี คือ มีความจำเพาะเจาะจงต่อซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ตรวจวัดได้รวดเร็ว ง่ายต่อการใช้งาน และสามารถนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในภาคสนามได้

ตารางที่ 4.16 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่าง	สารวิเคราะห์	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)		$t_{คำนวณ}$ ($t_{ตาราง} = 2.920$)
		อุปกรณ์ตรวจวัด แบบกระดาษ	วิธีมาตรฐาน	
น้ำตาลทราย	ซูโครส	99.7 ± 0.1	99.4 ± 0.3	1.0
	ฟรุคโทส	0	0	
	กลูโคส	0	0	
น้ำอ้อย A	ซูโครส	14.7 ± 0.3	14.6 ± 0.4	1.0
	ฟรุคโทส	0.83 ± 0.03	0.83 ± 0.02	0.8
	กลูโคส	0.920 ± 0.002	1.035 ± 0.007	0.8
น้ำอ้อย B	ซูโครส	12.1 ± 0.3	12.9 ± 0.1	1.0
	ฟรุคโทส	0.54 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.8
	กลูโคส	0.54 ± 0.02	0.620 ± 0.001	0.8

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ทั่วไปกับอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น

การเปรียบเทียบ	วิธีวิเคราะห์	
	โครมาโทกราฟี	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น
เวลาในการวิเคราะห์	20 นาที / สารวิเคราะห์	10 นาที / 3 สารวิเคราะห์
ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์	2,000 บาท / สารวิเคราะห์	100 บาท / 3 สารวิเคราะห์



บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสได้พร้อมกันในอุปกรณ์เดียว โดยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสร้างด้วยวิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ง่ายต่อการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ สำหรับงานวิจัยที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส จะอาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ ทำให้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงสูง สำหรับการตรวจวัดปริมาณซูโครส จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เปอร็อกซิเดส และสารละลายไอโอดีนไดนาสโตริกซีสมาตอล สำหรับการตรวจวัดปริมาณฟรุคโทส เกิดปฏิกิริยาระหว่างฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส โพแทสเซียมเพอร์ริกซายาไนต์ และเพอร์ริกคลอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสีฟ้า และสำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคส อาศัยการเกิดปฏิกิริยากลูโคสออกซิเดส เปอร็อกซิเดส 4-อะมีโนแอนทิไพรีน และฟีนอล จะได้ผลิตภัณฑ์สีชมพู โดยสำหรับการตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ค่าความเข้มข้นที่ได้จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสตามลำดับ จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกน และวัดค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ สำหรับการตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสทำได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสกับค่าความเข้มข้น

ขั้นแรกทำการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์แบบสกรีนด้วยพอลิเมอร์ สร้างได้โดยเทสารละลายกรดพอลิแลกติกลงบนบล็อกสกรีนที่วางไว้บนกระดาษโครมาโทกราฟี แล้วทิ้งให้สารละลายกรดพอลิแลกติกแห้ง จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ โดยความเข้มข้นของสารละลายกรดพอลิแลกติกที่เหมาะสม คือ 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้แล้ว ขั้นต่อไปทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมในบริเวณตรวจวัดและบริเวณตัวอย่าง คือ 6 ไมโครลิตร และ 30 ไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส คือ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคสออกซิเดส คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปอร็อกซิเดส คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีนไดนาสโตริกซีสมาตอล คือ 3.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมของอินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส และเปอร็อกซิเดส โดยค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 5.50 5.50 และ 6.50 ตามลำดับ สำหรับตรวจวัดปริมาณฟรุคโทสความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส โพแทสเซียมเพอร์ริกซายาไนต์ และเพอร์ริกคลอไรด์ คือ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 20.0 มิลลิโมลาร์ และ 0.01 โมลาร์ ตามลำดับ และสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลูโคสออกซิเดส คือ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปอร็อกซิเดส คือ

0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 4-อะมิโนแอนทิไพรีน คือ 2.5 มิลลิโมลาร์ และฟีนอล คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 7.50 และเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส คือ 10 นาที

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาศึกษาหาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส โดยผลการศึกษา พบว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 3.7 เปอร์เซ็นต์) มีความถูกต้องสูง โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส อยู่ในช่วง 100 ถึง 103 เปอร์เซ็นต์ 98 ถึง 103 เปอร์เซ็นต์ และ 100 ถึง 102 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 1.0 ถึง 25.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 สำหรับซูโครส 2.0 ถึง 20.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 สำหรับฟรุคโทส และ 0.5 ถึง 10.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 สำหรับกลูโคส มีความไววิเคราะห์เท่ากับ 1.63 3.69 และ 7.28 หน่วยค่าความเข้มข้นต่อมิลลิโมลาร์ สำหรับซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ตามลำดับ มีขีดจำกัดในการตรวจพบของซูโครส เท่ากับ 0.9 มิลลิโมลาร์ ฟรุคโทส เท่ากับ 0.8 มิลลิโมลาร์ และ กลูโคส 0.4 มิลลิโมลาร์ ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณสำหรับซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส เท่ากับ 2.9 มิลลิโมลาร์ 2.6 มิลลิโมลาร์ และ 1.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีอายุการเก็บรักษาของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส 3 เดือน

สุดท้ายนำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสในตัวอย่างจริง คือ น้ำตาลทรายและน้ำอ้อย เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับวิธีทางโครมาโทกราฟี พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีทางโครมาโทกราฟี โดยมีข้อดี คือ สามารถตรวจวัดหาปริมาณซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสได้พร้อมกัน ในอุปกรณ์เดียว ใช้เวลาเพียง 10 นาที (วิธีทางโครมาโทกราฟีใช้เวลา 20 นาที) มีความจำเพาะเจาะจง มีต้นทุนต่ำ ราคา 100 บาท ต่อการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคสใน 1 ตัวอย่าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากปฏิกิริยาในการตรวจวัดซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อินเวอร์เทส กลูโคสออกซิเดส เพอร์ออกซิเดส และฟรุคโทสดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นจึงต้องระมัดระวัง และควบคุมปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ในทุก ๆ ขั้นตอน เพื่อประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยา

5.2.2 เพื่อประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ จึงควรเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในที่แห้ง เนื่องจากสารกรดพอลิแลกติก มีคุณสมบัติย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ

5.2.3 ในการสแกนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่ออ่านค่าความเข้มข้น ควรสแกนในตำแหน่งเดิมในทุก ๆ การทดลอง เพื่อลดความคลาดเคลื่อนในการอ่านค่าความเข้มข้น

บรรณานุกรม

- [1] Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture (Online), 2019. Available: www.fas.usda.gov/data/sugar-world-markets-and-trade, (12 December 2019).
- [2] X. Yu, J. Ye, J. Hu, X. Liao, and J. Gao, "Fractal behavior in the clarification process of cane sugar production," *Mathematical Problems in Engineering*, vol. 16, pp. 1-9, Nov 2013.
- [3] ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลทราย. 2552, 10 กันยายน. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 132 ง. หน้า 15.
- [4] R. Höfer, "Sugar- and starch-based biorefineries," in *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, A. Pandey, R. Höfer, M. Taherzadeh, K. M. Nampoothiri, and C. Larroche, Eds., ed Amsterdam: Elsevier, 2015, pp. 157-235.
- [5] M. Naderi-Boldaji, M. Fazeliyan-Dehkordi, S. A. Mireei, and M. Ghasemi-Varnamkhasti, "Dielectric power spectroscopy as a potential technique for the non-destructive measurement of sugar concentration in sugarcane," *Biosystems Engineering*, vol. 140, pp. 1-10, Dec 2015.
- [6] V. Singleton, J. Horn, C. B. and, and M. Adlard, "A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose," *Journal American Society of Sugarcane Technologists*, vol. 22, pp. 112-119, Jan 2002.
- [7] C. Ma, Z. Sun, C. Chen, L. Zhang, and S. Zhu, "Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD," *Food Chemistry*, vol. 145, pp. 784-788, Feb 2014.
- [8] M. Filip, M. Vlassa, V. Coman, and A. Halmagyi, "Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method," *Food Chemistry*, vol. 199, pp. 653-659, May 2016.
- [9] J. L. Luther, V. H. d. Frahan, and M. Lieberman, "Paper test card for detection of adulterated milk," *Analytical Methods*, vol. 9, pp. 5674-5683, Sep 2017.
- [10] J. Biscay, E. Costa Rama, M. B. Gonzalez Garcia, A. Julio Reviejo, J. M. Pingarron Carrazon, and A. C. Garcia, "Amperometric fructose sensor based on ferrocyanide modified screen-printed carbon electrode," *Talanta*, vol. 88, pp. 432-438, Jan 2012.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [11] A.-M. G. Vasilarou and C. A. Georgiou, "Enzymatic spectrophotometric reaction rate determination of glucose in fruit drinks and carbonated beverages," *Journal of Chemical Education* vol. 77, pp. 1327-1329, Oct 2000.
- [12] J. Lim and A. J. Pullicin, "Oral carbohydrate sensing: Beyond sweet taste," *Physiology & Behavior*, vol. 202, pp. 14-25, Apr 2019.
- [13] M. Wojtczak, J. Biernasiak, and A. Papiewska, "Evaluation of microbiological purity of raw and refined white cane sugar," *Food Control*, vol. 25, pp. 136-139, May 2012.
- [14] O. A. E. Shahaby, A.-N. A. Zohri, M. A. Mohamed, E. E. Hafez, and M. M. Youse, "Determination of sucrose losses in beet sugar manufacturing at Dakahlia sugar company, Egypt," *Egyptian Sugar Journal*, vol. 7, pp. 28-50, Dec 2014.
- [15] T. Silalertruksa, P. Pongpat, and S. H. Gheewala, "Life cycle assessment for enhancing environmental sustainability of sugarcane biorefinery in Thailand," *Journal of Cleaner Production*, vol. 140, pp. 906-913, Jan 2017.
- [16] P. Rein, "White cane sugar production," *International Sugar Journal*, vol. 111, pp. 1-15, Jan 2009.
- [17] M. A. Clarke, L. A. Edye, and G. Eggleston, "Sucrose decomposition in aqueous solution, and losses in sugar manufacture and refining," *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 52, pp. 441-470, 1997.
- [18] H. Desai, M. Sevak, V. Panchal, K. P. and, and N. Patel, "A new polarimetric method for the analysis of sucrose - in iron sucrose raw material, iron sucrose injection and inprocess bulk formulations," *International journal of pharmaceutical sciences and research*, vol. 4, pp. 3208-3213, Aug 2013.
- [19] W. Xu, L. Liang, and M. Zhu, "Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction," *International Journal of Food Properties*, vol. 18, pp. 547-557, Dec 2014.
- [20] K. Ilaslan, I. H. Boyaci, and A. Topcu, "Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy," *Food Control*, vol. 48, pp. 56-61, Feb 2015.
- [21] A. Borji, F. Borji, and A. Jourani, "A new method for the determination of sucrose concentration in a pure and impure system: spectrophotometric method," *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2017, pp. 1-6, Dec 2017.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [22] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications - A review," *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 6, pp. 153-159, Jan 2016.
- [23] G. J. Chee, "Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers," *Talanta*, vol. 117, pp. 366-370, Dec 2013.
- [24] N. Cennamo, L. Zeni, P. Tortora, M. E. Regonesi, A. Giusti, M. Staiano, *et al.*, "A high sensitivity biosensor to detect the presence of perfluorinated compounds in environment," *Talanta*, vol. 178, pp. 955-961, Feb 2018.
- [25] H. Shahar, L. L. Tan, G. C. Ta, and L. Y. Heng, "Detection of halogenated hydrocarbon pollutants using enzymatic reflectance biosensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 281, pp. 80-89, Feb 2019.
- [26] E. F. Gabriel, P. T. Garcia, T. M. Cardoso, F. M. Lopes, F. T. Martins, and W. K. Coltro, "Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices," *Analyst*, vol. 141, pp. 4749-4756, May 2016.
- [27] M. Oubaha, A. Gorin, C. McDonagh, B. Duffy, and R. Copperwhite, "Development of a multianalyte optical sol-gel biosensor for medical diagnostic," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 221, pp. 96-103, Dec 2015.
- [28] V. S. A. Piriya, P. Joseph, S. C. G. K. Daniel, S. Lakshmanan, T. Kinoshita, and S. Muthusamy, "Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, pp. 1231-1245, Sep 2017.
- [29] O. O. Soldatkin, V. M. Peshkova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, and A. V. El'skaya, "Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 28, pp. 959-964, Jul 2008.
- [30] R. Antiochia, G. Vinci, and L. Gorton, "Rapid and direct determination of fructose in food: a new osmium-polymer mediated biosensor," *Food Chemistry*, vol. 140, pp. 742-747, Oct 2013.
- [31] S. Yusan, M. M. Rahman, N. Mohamad, T. M. Arrif, A. Z. A. Latif, A. M. M, *et al.*, "Development of an amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucoseoxidase on the Se-MCM-41 mesoporous composite," *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2018, pp. 1-8, May 2018.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [32] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 46, pp. 1318-1320, Feb 2007.
- [33] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, and E. Carrilho, "Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices," *Analytical chemistry*, vol. 82, pp. 3-10, Dec 2010.
- [34] B. M. Jayawardane, S. Wei, I. D. McKelvie, and S. D. Kolev, "Microfluidic paper-based analytical device for the determination of nitrite and nitrate," *Analytical chemistry*, vol. 86, pp. 7274-7279, Jun 2014.
- [35] N. Ratnarathorn, O. Chailapakul, C. S. Henry, and W. Dungchai, "Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices," *Talanta*, vol. 99, pp. 552-557, Sep 2012.
- [36] M. Li, R. Cao, A. Nilghaz, L. Guan, X. Zhang, and W. Shen, ""Periodic-table-style" paper device for monitoring heavy metals in water," *Analytical chemistry*, vol. 87, pp. 2555-2559, Feb 2015.
- [37] V. Mani, K. Kadimisetty, S. Malla, A. A. Joshi, and J. F. Rusling, "Paper-based electrochemiluminescent screening for genotoxic activity in the environment," *Environmental Science & Technology*, vol. 47, pp. 1937-1944, Jan 2013.
- [38] R. A. G. de Oliveira, F. Camargo, N. C. Pesquero, and R. C. Faria, "A simple method to produce 2 D and 3 D microfluidic paper-based analytical devices for clinical analysis," *Analytica Chimica Acta*, vol. 957, pp. 40-46, Mar 2017.
- [39] H. Torul, H. Ciftci, D. Cetin, Z. Suludere, I. H. Boyaci, and U. Tamer, "Paper membrane-based SERS platform for the determination of glucose in blood samples," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, pp. 8243-8251, Sep 2015.
- [40] D. Sechi, B. Greer, J. Johnson, and N. Hashemi, "Three-dimensional paper-based microfluidic device for assays of protein and glucose in urine," *Analytical chemistry*, vol. 85, pp. 10733-10737, Oct 2013.
- [41] W. Liu, J. Kou, H. Xing, and B. Li, "Paper-based chromatographic chemiluminescence chip for the detection of dichlorvos in vegetables," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 52, pp. 76-81, Feb 2014.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [42] W. Liu, Y. Guo, J. Luo, J. Kou, H. Zheng, B. Li, *et al.*, "A molecularly imprinted polymer based a lab-on-paper chemiluminescence device for the detection of dichlorvos," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 141, pp. 51-57, Apr 2015.
- [43] C. S. Kuek Lawrence, S. N. Tan, and C. Z. Floresca, "A "green" cellulose paper based glucose amperometric biosensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 193, pp. 536-541, Mar 2014.
- [44] G. G. Lewis, M. J. DiTucci, M. S. Baker, and S. T. Phillips, "High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 2630-2633, May 2012.
- [45] T. H. da Costa, E. Song, R. P. Tortorich, and J.-W. Choi, "A paper-based electrochemical sensor using inkjet-printed carbon nanotube electrodes," *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, vol. 4, pp. S3044-S3047, Jan 2015.
- [46] J. Noiphung, T. Songjaroen, W. Dungchai, C. S. Henry, O. Chailapakul, and W. Laiwattanapaisal, "Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 788, pp. 39-45, Jul 2013.
- [47] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. Lopez, and S. S. Sibbett, "Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 1, pp. 124-129, Nov 2009.
- [48] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Benjamin J. Wiley, Malancha Gupta, and George M. Whitesides, "FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 8, pp. 2146-2150, Aug 2008.
- [49] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing," *Analyst*, vol. 136, pp. 77-82, Sep 2011.
- [50] S. Mohammadi, M. Maeki, R. M. Mohamadi, A. Ishida, H. Tanib, and M. Tokeshi, "An instrument-free, screen-printed paper microfluidic device that enables bio and chemical sensing," *Analyst*, vol. 140, pp. 6493-6499 Jul 2015.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [51] N. Chandra Sekar, S. A. Mousavi Shaegh, S. H. Ng, L. Ge, and S. N. Tan, "A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 204, pp. 414-420, Dec 2014.
- [52] J. A. Adkins and C. S. Henry, "Electrochemical detection in paper-based analytical devices using microwire electrodes," *Analytica Chimica Acta*, vol. 891, pp. 247-254, Sep 2015.
- [53] X. Chen, J. Chen, F. Wang, X. Xiang, M. Luo, X. Ji, *et al.*, "Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 35, pp. 363-368, May 2012.
- [54] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 674, pp. 227-233, Aug 2010.
- [55] I. Taverniers, M. De Loose, and E. Van Bockstaele, "Trends in quality in the analytical laboratory. II. analytical method validation and quality assurance," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 535-552, Sep 2004.
- [56] J. Van Loco, M. Elskens, C. Croux, and H. Beernaert, "Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient," *Accreditation and Quality Assurance*, vol. 7, pp. 281-285, Jul 2002.
- [57] A. Shrivastava and V. B. Gupta, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods," *Chronicles of Young Scientists*, vol. 2, p. 21, Apr 2011.
- [58] J. Bradley, A. Kidd, P. Anderson, A. Dear, R. Ashby, and A. Turner, "Rapid determination of the glucose content of molasses using a biosensor," *Analyst*, vol. 114, pp. 375-379, 1989.
- [59] W. Suksom, W. Wannachai, S. Boonchiangma, S. Chanthai, and S. Srijaranai, "Ion chromatographic analysis of monosaccharides and disaccharides in raw sugar," *Chromatographia*, vol. 78, pp. 873-879, Feb 2015.
- [60] K. K. Essel and Y. D. Osei, "Investigation of some kinetic properties of commercial invertase from yeast," *Natural Products Chemistry & Research*, vol. 2, pp. 1-5, Oct 2014.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [61] J. Singh and N. Verma, "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: production, characterization and immobilization for glucose oxidation," *Advances in Applied Science Research*, vol. 4, pp. 250-257, Nov 2013.
- [62] G. P. Mizobutsi, F. L. Finger, R. A. Ribeiro, R. Puschmann, L. L. d. M. Neves, and W. F. d. Mota, "Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp," *Scientia Agricola*, vol. 67, pp. 213-217, Apr 2010.



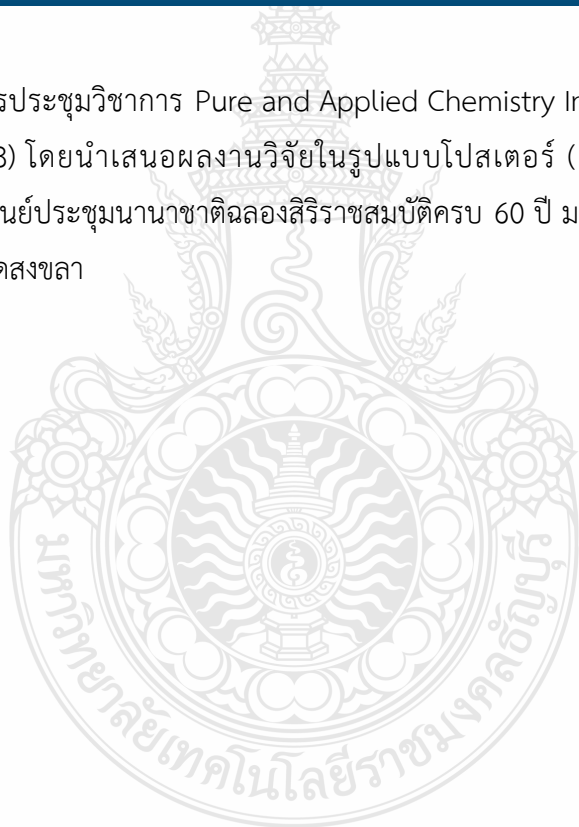


ภาคผนวก

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ



เข้าร่วมในการประชุมวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018) โดยนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ (Poster) ระหว่างวันที่ 7-9 กุมภาพันธ์ 2561 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา





The development of glucose biosensor using paper-based analytical device



Jinakan Aksorn¹ and Siriwan Teepool^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology Rajamangala, University of Technology

Thanyaburi, Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand

*E-mail : siriwan@mail.rmutt.ac.th

Abstract

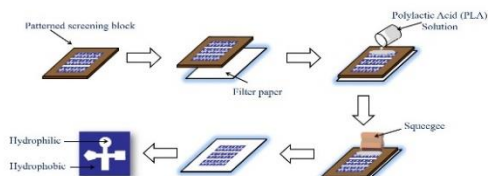
A biosensor for determination of glucose has been fabricated by employing paper-based analytical device (PAD). A PAD was fabricated by wax screen-printing technique. Glucose oxidase and peroxidase were used as catalysis the oxidation reaction of glucose resulting in gluconic acid and hydrogen peroxide. Then this product reacted with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine lead to blue color solution. The color intensity was measured by the imaging J program. Under optimum conditions, the PAD glucose biosensor showed a good linear relationship between the color intensity and glucose concentration ranging from 5 mM to 30 mM. The developed PAD might be an alternative tool for detection of glucose on field work due to its simplicity, low cost, disposability and portability.

Objectives

- ❖ To develop a biosensor for detection of glucose

Methodology

Fabrication a paper-based device by wax screen printing



The detection of glucose



Results and Discussion

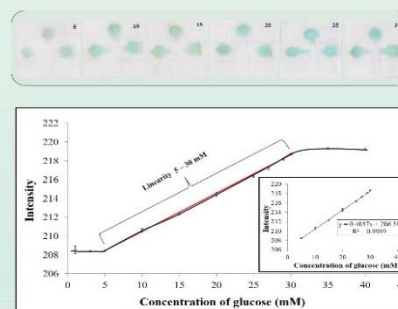


Fig. 2 Calibration curve for the glucose detection

Conclusion

The development of glucose biosensor using paper-based analytical device; glucose oxidase, peroxidase and TMB showed high selectivity and short analysis time (6 minutes). The intensity value was proportional to the concentration of glucose it exhibited a linear response to glucose over the range 5-30 mM. The biosensor appeared to be suitable for glucose detection in industrial and agricultural applications.

Acknowledgment

1. Research and Researcher for Industry (MAG) supported by The Thailand Research Fund (TRF)
2. Science and Technology faculty, Rajamangala University of Technology Thanyaburi
3. Nano-sensor Research Group (NSR)

โปสเตอร์นำเสนอผลงานวิจัยในงาน PACCON 2018 หัวข้อ “The development of glucose biosensor using paper-based analytical device”



ประกาศนียบัตรการเข้าร่วมในการประชุมวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018) “CHEMISTRY TOWARD A SUSTAINABLE FUTURE”





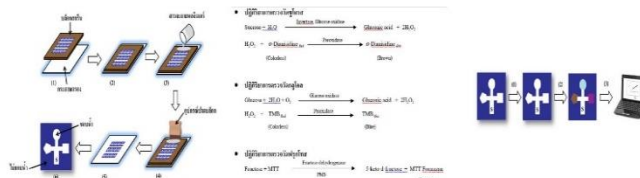
เข้าร่วมกิจกรรม “RRi University Forum 2018” โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พอว.) ภายใต้สังกัดของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยนำเสนอความก้าวหน้างานวิจัยและแลกเปลี่ยนความคิดเห็น ในรูปแบบโปสเตอร์ เมื่อวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 ณ ห้องประชุม ชั้น M โรงแรมปทุมวันปริ๊นเซส จังหวัดกรุงเทพมหานคร

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส แบบกระดาษ สำหรับอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส ได้พร้อมกัน โดยใช้เอนไซม์ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสเท่านั้น ทำให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดที่มีความจำเพาะเจาะจง ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว ราคาถูก สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน

เนื้อหาบทวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส ซึ่งที่ผ่านมาพบว่าโรงงานผลิตน้ำตาลประสบปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้ มีเปอร์เซ็นต์ซูโครสไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาล ซูโครสสามารถเกิดกระบวนการการเปลี่ยนแปลง หรือสลายตัวได้ง่าย เช่น อุณหภูมิ ที่เอชที่ใช้ในการเคี่ยวน้ำอ้อย ระยะเวลาและระดับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล ไม่เหมาะสม ซูโครสจะสลายตัวเกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคสและฟรุกโทส ทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณซูโครส ส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ลดลง ทำให้โรงงานผลิตน้ำตาลเกิดความเสียหาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคสและฟรุกโทส โดยใช้เทคนิคแบบกระดาษ เพื่อให้สามารถตรวจวัดซูโครส กลูโคสและฟรุกโทสได้พร้อมกัน โดยผลที่คาดว่าจะได้รับของงานวิจัยจะได้อุปกรณ์ตรวจวัดซูโครส กลูโคสและฟรุกโทส ที่สามารถผลิตได้เองในประเทศเพื่อช่วยในการตรวจติดตามและควบคุมคุณภาพและกระบวนการผลิตน้ำตาลของอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลจากอ้อย ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ใหม่และงานวิจัยสามารถตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง จากนั้นวิธีการตรวจวัดงานวิจัยนี้จะใช้เอนไซม์ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสในการตรวจวัด ชิ้นงานที่ได้ของงานวิจัยนี้ คือ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส และข้อดี คือ ราคาถูกรวดเร็ว สามารถสร้าง pattern บนแผ่นกระดาษโครมาโทกราฟีได้ครั้งละหลายชิ้น ใช้สารตัวอย่างและสารเคมีปริมาณน้อย และอุปกรณ์มีขนาดเล็กสามารถพกพาไปใช้ได้ภาคสนาม



คำสำคัญ

ซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ



ผู้วิจัย

นางสาวฉวีมาศ กัทธนา

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.ศิริวรรณ หิญา

สังกัด

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ที่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

กาญจนาภิเษก

ผู้ประกอบการ

บริษัท นวัตกรรม วิทยาศาสตร์

เลขที่ 55/10039

ติดต่อ

ice_8312@hotmail.com

(081) 263-8904

• ผู้วิจัยและผู้ประกอบการได้ร่วมกันพัฒนา

จากโครงการงานวิจัยและนวัตกรรม

เพื่อพัฒนาและส่งเสริมการวิจัย

โดย ภาควิชาเคมีและเทคโนโลยี

โครงการพัฒนากิจการวิจัยและงานวิจัย

เพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.)

เข้าร่วมงานประชุมวิชาการ “โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม ครั้งที่ 4” ในหัวข้องานที่ว่า “หลายทีมงานวิจัยด้วยกลยุทธ์นวัตกรรม” โดยนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ เมื่อวันที่ 23 กรกฎาคม พ.ศ. 2561 ณ ห้องบอลรูม โซนเอ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ





Development of the simultaneous colorimetric enzymatic detection of sucrose, fructose and glucose using a microfluidic paper-based analytical device

Jinakan Aksorn, Siriwan Teepoo*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thanyaburi, Pathumthani, 12110, Thailand



ARTICLE INFO

Keywords:

Sucrose
Fructose
Glucose
Microfluidic paper-based analytical device
Biosensor

ABSTRACT

Herein, we propose the first fabrication of a microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) as a simple, rapid and selective method for the simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose for quality monitoring in the sugar industry. Multiplex detection of the three analytes was achieved by three detection zones designed on a single device. Each detection zone on the μ PAD was modified with enzymes, chromogenic reagents and specific substrates. The enzymatic reactions between the specific enzymes, chromogenic reagents and their corresponding substrates yielded different colored products: brown for sucrose, blue for fructose and pink for glucose. All the reaction conditions were evaluated. The limits of detection were determined to be 0.9 mM, 0.8 mM and 0.4 mM for sucrose, fructose and glucose, respectively. The proposed μ PAD successfully monitored sucrose, fructose and glucose within 11 min using a signal device and obtained a spike recovery of 100–103% for sucrose, 98–103% for fructose, and 100–102% for glucose. The μ PAD was applied to detect sucrose, fructose and glucose in real samples, and the results were in good agreement with those obtained using high-performance liquid chromatography (HPLC). The proposed μ PAD provides several advantages, including ease of use, fast results and low cost. Therefore, the developed μ PAD is suitable for application in the sugar industry for monitoring sucrose, fructose and glucose in parallel.

1. Introduction

Sugar is produced from sugarcane, sugar beets, palm trees and maple trees [1–3]. Most sugar worldwide is produced from sugarcane [4,5]. Therefore, sugarcane is an important resource and serves as the world's primary source for industrial sugar [6]. Sugar quality depends on the sucrose content [7,8]. During the sugar manufacturing process, the conversion of sucrose to fructose and glucose decreases this quality [9,10]. Therefore, monitoring sucrose, fructose and glucose is quite important for quality control in sugar manufacturing. Many methods have been used to measure sucrose, fructose and glucose, including polarimetry [11–13], spectroscopy [14–16], high-performance liquid chromatography (HPLC) [17–21], and optical [22–25] and electrochemical enzymatic methods [26–28]. Polarimetry is generally used to detect sucrose in sugar factories, but this method requires sample preparation and lacks sensitivity. Spectroscopy is sensitive but has limitations, such as the need for expensive instrumentation and the inability to detect sucrose, fructose and glucose simultaneously. Although simultaneous detection is possible with HPLC, this method requires

expensive instruments and specialized technicians, and it is time-consuming. Recently, optical methods have been used for sugar detection. This assay is based on the synthesis of gold nanoparticles in the presence of glucose as a reducing agent. However, this method is non-selective towards other reducing compounds. In addition, electrochemical enzymatic methods continue to be used for sugar analysis due to their high sensitivity and selectivity. These methods have some drawbacks, such as the need for several steps, skilled personnel and expensive instruments. In comparison with the methods mentioned above, microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) detect multiple targets simultaneously using a single strip, which increases the detection speed and decreases the cost [29–33]. Such devices provide many advantages over traditional methods, such as faster analysis time, lower reagent and sample consumption, lower cost, simple operation and better suitability for on-site detection. However, the μ PAD applications have some limitations regarding sensitivity, accuracy, and mass production [34,35]. Since the early 1990s, biosensors have been developed for applications in environmental [36–40], medical [41–43], biotechnological and industrial fields due to their sensitive, selective

* Corresponding author.

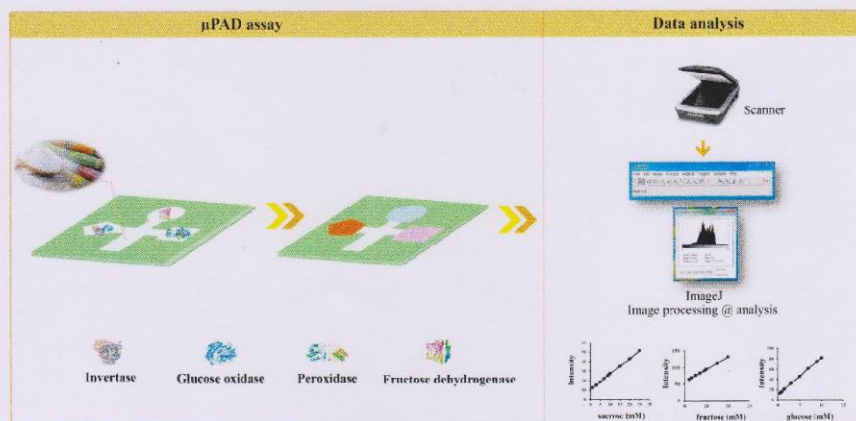
E-mail address: siriwan@mail.mut.ac.th (S. Teepoo).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120302>

Received 10 June 2019; Received in revised form 26 August 2019; Accepted 27 August 2019

Available online 28 August 2019

0039-9140/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. Principles of the μ PAD-based simultaneous analysis of sucrose, fructose and glucose detection.

and rapid methods. Now, μ PADs are becoming the preferred devices for biosensors because of their many advantages.

Here, we describe the simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose using a single paper-based device, as shown in Scheme 1. We achieved simultaneous detection by distributing samples from the sample zone (S) to three detection zones (A, B and C) for three assays (Fig. 1A). Each detection zone was modified with chemicals that caused

specific enzymatic reactions, as well as their substrates, to form colored products. Then, we obtained photographs of the resultant colors using a scanner and evaluated the average color intensities of the detection zones using ImageJ software to calculate the concentration of each analyte.

To the best of our knowledge, this is the first simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose on a μ PAD based on the biosensor

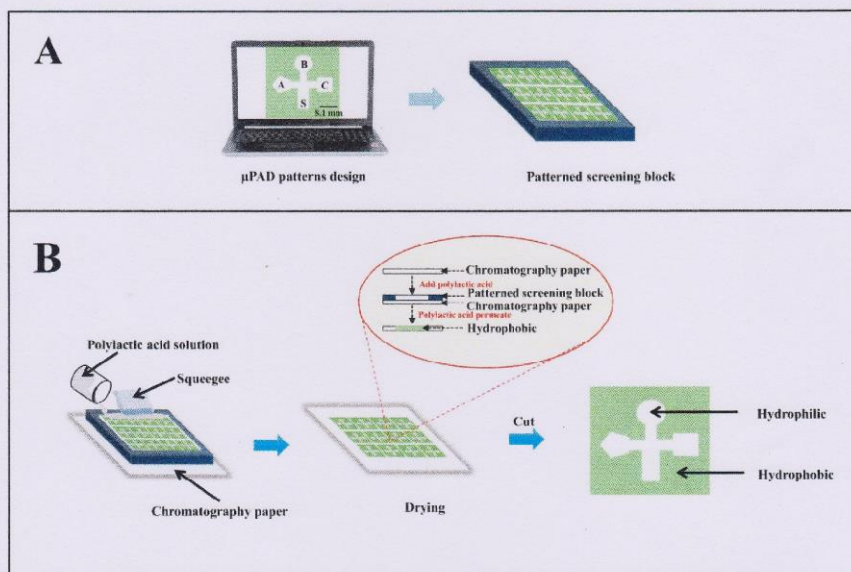


Fig. 1. Design of the μ PAD for sucrose, fructose and glucose detection on one-step (A). The μ PAD production process using the polymer screen-printing technique (B).

technique. The proposed analytical device detects sucrose, fructose and glucose in real samples within 11 min using a simple, portable and inexpensive device.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and instruments

Invertase from baker's yeast (*S. cerevisiae*) ≥ 300 unit/mg solid (EC 3.2.1.26), glucose oxidase from *Aspergillus niger* 163,314 unit/g (EC 1.1.3.4), peroxidase from horseradish 327 units/mg (EC 1.11.1.7), D-fructose dehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 162 units/mg (EC 1.1.99.11), sucrose, D-fructose, *o*-dianisidine and 4-aminoantipyrine were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Phenol was obtained from Fisher scientific (Leicestershire, UK). D-glucose, sodium dodecyl sulfate and potassium ferricyanide were purchased from Ajax Finechem (Taren Point, Australia). Iron (III) chloride 6-hydrate pure was purchased from PanReac AppliChem (Barcelona, Spain). Poly(lactic acid) was purchased from Nature Works LLC. (Minnetonka, USA). All other chemicals used were analytical grade. Sugar and sugarcane juice samples were collected from Thai Sugar Industry (Rajburi, Thailand). Whatman Chromatography paper grade 4 was obtained from GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK). A block screen was fabricated by Chaiyaboon (Bangkok, Thailand). A scanner (CanoScan Lide 120) was acquired from Canon Marketing (Thailand) Co., Ltd. (Bangkok, Thailand). The HPLC apparatus consisted of a Waters 2690 Alliance HPLC with refractive index detector and Shodex Asahipak NH2P-50 4E column (Waters, Milford, MA, USA).

2.2. Design and fabrication of the μ PAD for simultaneous assay of sucrose, fructose and glucose

The μ PAD patterns were designed with Adobe Illustrator and then used to create a screen. A μ PAD consists of a central sample loading zone connected by microchannels to three detection zones, as shown in Fig. 1A. Three detection zones were designed for the simultaneous assay of multiple analytes: zone A detected sucrose, zone B detected fructose and zone C detected glucose. The green part of the pattern was used to generate a hydrophobic area on the paper, and the white areas indicated the hydrophilic area.

The pattern screen was made from 100 mesh polyester with a thickness of 290 ± 10 μ m on a wood frame (purchased from a local screen-printing printing shop in Bangkok, Thailand). Fig. 1B shows the μ PAD fabrication process. To create a hydrophobic area on the μ PAD, the patterned screen was placed on chromatography paper. A 10% w/v poly(lactic acid) solution, prepared by dissolving poly(lactic acid) in dichloromethane, was poured over the screen. Subsequently, the poly(lactic acid) solution was squeezed through the mesh of the screen to create a hydrophobic area on the chromatography paper. Then, the chromatography paper was separated from the screen and was dried at room temperature. Finally, the patterned paper was cut into $3.5 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$ squares to use for sucrose, fructose and glucose detection.

Sucrose was detected in zone A using a mixture of 1 μ L of 60 U/mL invertase, 1 μ L of 82 U/mL glucose oxidase, 1 μ L of 20 U mg/mL peroxidase, and 3 μ L of 3.0 mM *o*-dianisidine. To detect fructose, 4 μ L of 240 U/mL fructose dehydrogenase in pH 4.50 McIlvaine buffer, 1 μ L of 20.0 mM potassium ferricyanide and 1 μ L of 0.01 M ferric chloride were added to zone B. For the glucose test, 6 μ L of a mixture of 0.8 U/mL glucose oxidase, 2 U/mL peroxidase, 5.0 mM phenol and 2.5 mM 4-aminoantipyrine was applied to zone C. Next, a 30 μ L sample or a standard solution (sucrose, fructose and glucose) was introduced to the sample zone. Then, all the enzymatic reactions on the detection zones proceeded for 10 min. After the color developed, the μ PAD dried for 1 min at room temperature and was imaged using a scanner. ImageJ software (The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was

used to evaluate the color intensity using the blue channel for sucrose, the red channel for fructose and the green channel for glucose. The average intensities of zones A, B and C were used to assess the concentrations of sucrose, fructose and glucose, respectively. The quantitative detections of sucrose, fructose and glucose in real samples were calculated from the regression equations of their calibration curves.

2.3. Sample preparation

For the sugar sample, a 0.1 g of sample was weighed and then dissolved in 1 mL of distilled water. For sugarcane juice A and B, 100 μ L of each sample was diluted with distilled water. The sample solution was diluted with distilled water to match the detection range of the calibration curve prior to the analysis. Before the analysis, the sugar sample was diluted 30 times, and the sugarcane juice samples were diluted 19 times with distilled water. The analysis for each sample was carried out in triplicate.

2.4. The detection of sucrose, fructose and glucose using HPLC as a reference method

The quantitative determination of the sucrose, fructose and glucose in real samples was performed under the following conditions: a Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm ID $\times$ 250 mm) column; a column temperature of 30 $^{\circ}$ C; a mobile phase of 75% acetonitrile and 25% water; and a flow rate of 1.0 mL/mL. The detection was performed using an RID-10A refractive index detector.

3. Results and discussion

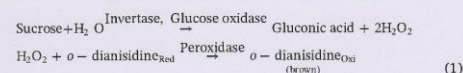
3.1. Fabrication of the μ PAD

The μ PAD fabrication was performed in one-step (Fig. 1B), and the poly(lactic acid) solution was applied through the patterned screen to create hydrophobic barriers on the μ PADs. The polymer solution was passed through the patterned screen into the chromatography paper. After the solvent evaporated, hydrophobic regions were formed, which provided hydrophobic barriers and hydrophilic channels on the chromatography paper. The concentrations of the poly(lactic acid) solution used were 1, 5, 10 and 15% w/v. Fig. 2 shows the top view of the μ PADs after we applied methylene blue solution to indicate the hydrophilic regions. Concentrations lower than 10% w/v provided an incomplete three-dimensional hydrophobic barrier due to the reduction in the viscosity, and the permeability of the solution on the hydrophilic portion appeared to be insufficient. Poly(lactic acid) at higher concentrations resulted in higher viscosity and did not penetrate the cellulose fibers of the chromatography paper. When a droplet of reagent was deposited on the paper, the solution penetrated the paper's inner layer. Therefore, we used a concentration of 10% w/v to fabricate the μ PADs.

3.2. Principles of the μ PAD-based sucrose, fructose and glucose detection

The simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose was achieved via the cascades of enzymatic reactions shown in equations (1)–(3). Three enzymes were used to detect sucrose, one enzyme to detect fructose, and two enzymes to detect glucose.

The analysis of sucrose was achieved by using invertase, glucose oxidase and peroxidase for the catalytic reaction. Sucrose is decomposed into gluconic acid and hydrogen peroxide (H_2O_2) by invertase and glucose oxidase, and *o*-dianisidine_{red} is then oxidized to brown *o*-dianisidine_{oxi} by H_2O_2 in the presence of peroxidase [44].



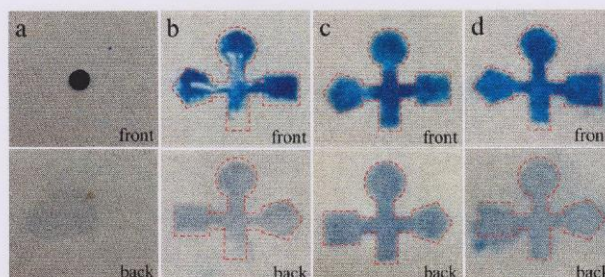
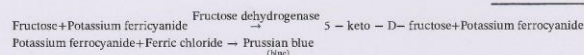


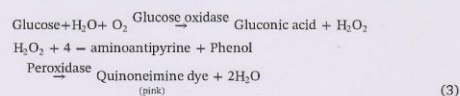
Fig. 2. Experiment poly(lactic acid) concentrations used to create the μ PAD: (a) 1% (w/v), (b) 5% (w/v), (c) 10% (w/v) and (d) 15% (w/v).

For the fructose analysis, fructose dehydrogenase uses fructose and potassium ferricyanide as substrates to produce 5-keto-D-fructose and potassium ferrocyanide. The potassium ferrocyanide then reacts with ferric chloride, resulting in Prussian blue production causing a color change to blue [45]



(2)

Finally, for the glucose assay, glucose is oxidized by glucose oxidase to form gluconic acid and H_2O_2 . The H_2O_2 then reacts with 4-aminopyridine to produce the pink color of quinoneimine dye [46].



(3)

To demonstrate the feasibility of the proposed μ PAD, the specific enzymes and substrates were dropped onto each detection zone in the presence of sucrose, fructose and glucose in the sample zone. The colorimetric results were captured with a digital camera, as shown in Fig. 3A. The μ PAD yielded multiple colors for the three analytes. Sucrose produced a brown color at zone A, while fructose and glucose produced blue and pink colors at zone B and zone C, respectively. The color was analyzed using a scanner, and the color intensity (RGB) values were determined using ImageJ software. Fig. 3B shows the RGB intensities of sucrose, fructose and glucose. The blue channel provided the highest intensity for sucrose detection, and the red and green channels provided the best signals for fructose and glucose analysis, respectively. Therefore, the blue, red and green values were selected for the quantitative analysis of sucrose, fructose and glucose, respectively. The intensity signal was calculated from $I_s - I_b$, where I_b is the control value obtained by measuring the white filter paper (blank) and I_s the measured intensity value of the sample. The concentrations of all the analytes were calculated via the calibration curve of intensity versus analyte concentration. The concentration of sucrose was calculated by subtracting the glucose signal from the sucrose signal.

3.3. Study of the reagent volume and sample volume

The reagent volume in the detection zone is an important factor that influences reactions. The reagent and sample volumes were optimized using methylene blue solution. To study of the reagent volume, a series of 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 μL of methylene blue solution were applied to the detection zone. As shown in Fig. 4A, volumes ranging from 1 to 5 μL

were insufficient for the color to fully cover the detection zone. However, volumes greater than 6 μL caused the reagent to spread outside the detection zone. Thus, 6 μL was selected as the optimal reagent volume. To determine the sample volume required to reach the reagent zone and develop the color, various volumes of methylene blue were dropped

onto the sample zone. As shown in Fig. 4B, sample volumes of 10–20 μL did not reach the detection zone. The sample with a volume of 30 μL successfully moved to the reaction zone, whereas volumes exceeding 30 μL caused the reagent to spread over the hydrophilic area. Therefore, the sample volume was fixed at 30 μL for the subsequent experiments.

3.4. Optimization of the experimental conditions

To achieve the best performance of the μ PAD for detecting sucrose, fructose and glucose, the parameter effects on the analytical signal were

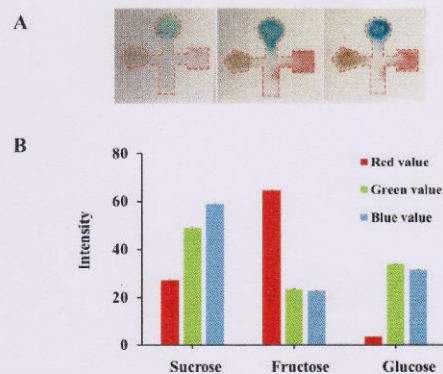


Fig. 3. Image of the μ PADs used to detect sucrose (1, 10 and 25 mM), fructose (2, 10 and 10 mM), and glucose (0.5, 7 and 10 mM) (A). Quantitative RGB profiles of the three analytes (B).

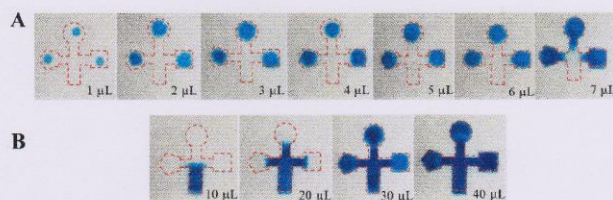


Fig. 4. Effects of reagent volume (A) and sample volume (B).

studied. All the experiments were performed in triplicate and averaged. The effects of the invertase, glucose oxidase and peroxidase concentrations played important roles. For the enzymatic reaction of sucrose, 60 U/mL invertase, 82 U/mL glucose oxidase and 20 U/mL peroxidase were chosen as the conditions for sucrose detection, because they provided the greatest color intensity (Fig. S1A, B and C). Fig. S1D shows that, as the concentration of *o*-dianisidine increased in the range of 0.5–3.0 mM, the color intensity increased as a result of increasing *o*-dianisidine_{ox} products. With a further increase in the *o*-dianisidine concentration, the color intensity became saturated; a concentration of 3.0 mM was thus selected as the optimum condition. Subsequently, the pH value of each enzyme was optimized by varying the pH from 4.00 to 7.00. As shown in Fig. S1E, the highest color intensity was achieved at pH 5.50 (acetate buffer) for the invertase and glucose oxidase and pH 6.50 (phosphate buffer) for the peroxidase.

Several parameters, including the concentrations of fructose dehydrogenase, potassium ferricyanide and ferric chloride, allowed us to create a highly sensitive μ PAD for the analysis of fructose. The fructose dehydrogenase concentration was optimized by testing three concentrations (80, 160 and 240 U/mL). However, concentrations higher than 240 U/mL could not be studied, because this was the original stock solution. A concentration of 240 U/mL was selected because it provided the highest intensity, as shown in Fig. S2A. Then, various concentrations of potassium ferricyanide were examined, and the results showed a complete reaction at a potassium ferricyanide concentration of 20 mM, which was considered an optimum condition (Fig. S2B). As shown in Fig. S2C, increasing the ferric chloride concentration also increased the color intensity, and there were no significant changes when the concentration of ferric chloride was increased higher than 0.01 M. Thus, a ferric chloride concentration of 0.01 M was selected.

Finally, several effects were evaluated, including the concentrations of the enzymes glucose oxidase and peroxidase and the concentrations of the substrates 4-aminoantipyrine and phenol. The concentrations of glucose oxidase and peroxidase were optimized on detection zone C. As illustrated in Figs. S3A–B, the optimized concentrations of glucose oxidase and peroxidase were 0.8 U/mL and 2 U/mL, respectively. At concentrations higher than the optimized value, the color intensity did not change significantly. The effect of the substrates 4-aminoantipyrine and phenol were studied. As shown in Fig. S3C, the color intensity increased as the concentration of 4-aminoantipyrine increased from 0.5 to 2.5 mM, reached peak intensity at 2.5 mM, and then became steady. Next, the phenol concentration, was investigated in the range of 2.0–7.5 mM (Fig. S3D). The intensity reached its maximum value at 5.0 mM. As a result, the substrate concentrations for 4-aminoantipyrine and phenol were optimized at 2.5 mM and 5.0 mM, respectively.

The reaction times for all three analytes were studied in the range of 1–30 min. Fig. S4 shows that the reactions were complete within 10 min for all three assays. Therefore, a reaction time of 10 min was selected as the reaction time for the simultaneous analysis of the three compounds.

3.5. Analytical performance

We evaluated the analytical features, including the μ PAD precision,

linearity, limit of detection (LOD), selectivity, accuracy and stability, under the optimum conditions. These features are summarized in Table 1.

3.5.1. Calibration and linear ranges

Fig. S5A, B and C show typical calibration curves for sucrose, fructose and glucose, respectively. The calibration curves provided linear ranges of 1–25 mM, 2–20 mM and 0.5–10 mM for sucrose, fructose and glucose, respectively.

3.5.2. LOD

The LOD was calculated using signal-to-noise ratios of 3. The LOD values were 0.9 mM for sucrose, 0.8 mM for fructose and 0.4 mM for glucose.

3.5.3. The selectivity of the μ PAD

To evaluate the μ PAD selectivity for sucrose, fructose and glucose detection, the possible interfering compounds, including maltose, lactose, galactose and xylose, were introduced by adding the interfering compounds or analytes on the sample zone. All the experiments used the same concentration of 10 mM. Fig. 5 shows the results. The intensities of all the interfering compounds were not significantly changed, whereas high intensities were obtained for the three analytes. This phenomenon occurred because a specific catalysis was achieved by each enzyme towards each analyte; invertase, fructose dehydrogenase and glucose oxidase catalyzed the reactions involving sucrose, fructose and glucose, respectively. Thus, our developed μ PAD showed high specificity towards sucrose, fructose and glucose and is suitable for detection of all sugars in real samples.

3.5.4. Precision and accuracy of μ PAD

To evaluate the precision of the developed μ PADs, we studied the repeatability and reproducibility. We evaluated the repeatability of the developed assay by averaging 7 replicate analyses of 20 mM sucrose, 20 mM fructose and 10 mM glucose and determining the relative standard deviation (%RSD). The %RSD was 1.3 for sucrose, 1.9 for fructose and 1.3 for glucose. The reproducibility of the instrumental measurements, the determinations and the preparation of the devices were studied for the detection of 20 mM sucrose, 20 mM fructose and 10 mM glucose. The reproducibility of the instrumental measurements was determined using four different scanners (Canon G2000, HP DeskJet Ink Advantage 3835, HP DeskJet 2621 and Brother DCT-T310). The %RSD was 2.9 for sucrose, 1.2 for fructose and 1.1 for glucose. In addition, the reproducibility of the determinations and preparation of the devices was analyzed using 7 different μ PADs, and the RSD values obtained were 3.1%, 3.4% and 1.5% for sucrose, fructose and glucose, respectively. All the results indicated that the μ PADs had high precision. The μ PAD accuracy was evaluated via a recovery test; three concentration levels of sucrose, fructose and glucose were spiked into a sample of sugarcane juice A. Based on Table 2, the recovery ranges were 100–103% for sucrose, 98–103% fructose and 100–102% for glucose. All the results indicated that the μ PADs had high precision.

3.5.5. Stability of μ PAD

The storage stability of the μ PAD was determined by measuring the color intensity of sucrose, fructose and glucose. The color intensity

Table 1
Summary of μ PADs' analytical performance.

Analytes	Linear range (mM)	Regression equation	r	LOD (mM)	Accuracy (%)
Sucrose	1.0–25	$y = 1.6305x + 10.475$	0.9996	0.9	100 ± 0.6 – 103 ± 1.3
Fructose	2.0–20	$y = 3.6962x + 57.715$	0.9997	0.8	98 ± 2.0 – 103 ± 1.5
Glucose	0.5–10	$y = 7.2806x + 9.3507$	0.9997	0.4	100 ± 0.1 – 102 ± 0.6

remained at 76, 82 and 84% of its initial value for the analysis of sucrose, fructose and glucose, respectively, after a storage period of 4 months at 4 °C.

3.6. Analysis of sucrose fructose and glucose in real samples

The μ PAD performance was further evaluated by testing its detection ability in three real samples, one made from sugar and two made from sugarcane juice, and the analytical results were compared with those of the HPLC method. The sucrose, fructose and glucose concentrations were calculated using the calibration curve of the standard solution (Fig. 6A). Fig. 6B shows the μ PAD images of real samples for simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose. As shown in Table 3, the concentrations of sucrose, fructose and glucose obtained by the μ PADs were not significantly different from those obtained with the HPLC method, based on a statistics *t*-test at 95% confidence. The proposed μ PAD required less analysis time compared to that of HPLC. The average analysis time for the μ PAD was 11 min, while for HPLC it was 20 min. The preparation procedure for the μ PAD included only dilution, whereas the HPLC samples were filtered through a nylon membrane prior to analysis. However, the developed μ PAD is limited in term of mass production for commercial use.

4. Conclusions

In summary, we demonstrated that our colorimetric μ PAD is the first method to facilitate the simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose using one device. The μ PAD was fabricated on chromatography

Table 2
The recovery of sucrose, fructose and glucose in the spiked sugarcane juice A sample using the proposed μ PADs.

Analyte	Initially detected (mM)	Add (mM)	Total found (mM)	Recovery (%)
Sucrose	16.5 ± 0.0	2.9	19.4 ± 0.0	102 ± 1.2
	16.5 ± 0.0	5.0	21.5 ± 0.0	100 ± 0.6
	16.5 ± 0.0	10.0	26.8 ± 0.1	103 ± 1.3
Fructose	3.1 ± 0.1	2.6	5.8 ± 0.0	103 ± 1.5
	3.1 ± 0.1	5.0	8.0 ± 0.1	98 ± 2.0
	3.1 ± 0.1	10.0	13.1 ± 0.2	99 ± 1.8
Glucose	2.0 ± 0.0	1.2	3.2 ± 0.0	102 ± 0.6
	2.0 ± 0.0	3.0	5.0 ± 0.0	101 ± 0.6
	2.0 ± 0.0	7.0	9.0 ± 0.0	100 ± 0.1

paper using a polymer screening method; the materials were readily available, simple to fabricate, and the process was equipment-free and cost-effective. All the analytes were detected via enzymatic reactions with selective substrates of each analyte. The change in color on the detection zone of each assay was recorded with a scanner, and the concentrations were derived from the color intensity using ImageJ software. After the experimental conditions were optimized, the limits of detection of sucrose, fructose and glucose were 0.9, 0.4 and 0.8 mM, respectively. All the analytes were detected within 11 min without any preconcentration or clean-up steps. The total cost for the materials, including the paper devices, enzymes, reagents, chromatography paper and polylactic acid is estimated to be approximately \$3/device for three analytes. Our μ PAD showed excellent performance in terms of stability,

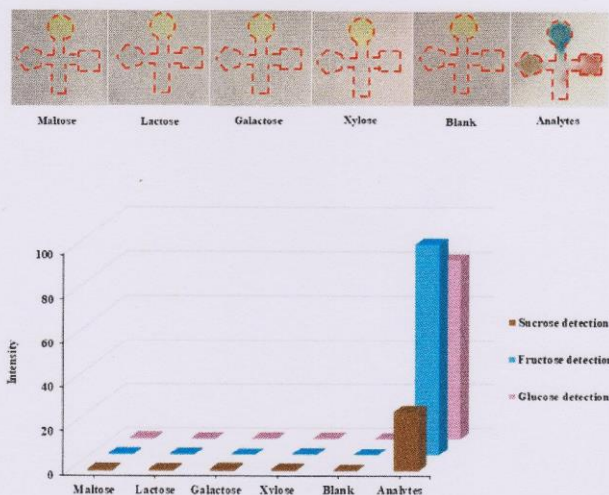


Fig. 5. Selectivity tested with maltose, lactose, galactose and xylose, which were compared with a blank μ PAD and the three analytes.

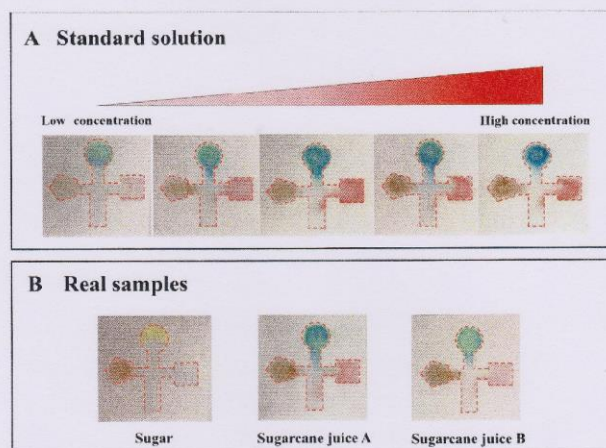


Fig. 6. Image of the μ PADs tested with various concentrations of sucrose, fructose and glucose standard solution (A) and real samples (B).

Table 3
Comparison of sucrose, fructose and glucose content in real samples using μ PADs and the HPLC method.

Samples	Analytes	μ PADs	HPLC method	t_{cal}
		% $\pm$ SD	% $\pm$ SD	($t_{table} = 2.920$)
Sugar	Sucrose	99.7 $\pm$ 0.1	99.4 $\pm$ 0.3	1.0
	Fructose	N/A	N/A	
	Glucose	N/A	N/A	
Sugarcane juice A	Sucrose	14.7 $\pm$ 0.3	14.6 $\pm$ 0.4	1.0
	Fructose	0.83 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.02	0.8
	Glucose	0.92 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 0.01	0.8
Sugarcane juice B	Sucrose	12.1 $\pm$ 0.3	12.9 $\pm$ 0.1	1.0
	Fructose	0.54 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.01	0.8
	Glucose	0.54 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.01	0.8

N/A: not detected.

recovery, repeatability and reproducibility for the simultaneous detection of sucrose, fructose and glucose. Additionally, we used the μ PAD to analyze sucrose, fructose and glucose in real samples. This technology provides a promising alternative method for monitoring sucrose, fructose and glucose in sugar industry.

Acknowledgements

This work was financially supported by Research and Researcher for Industry (RRI), Thailand Research Fund (TRF) (Grant no. MSD5910039).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120302>.

References

- [1] O. Saito, Assessment of sugarcane industry: suitability for production, consumption, and utilization, *Ann. Agrar. Sci.* 16 (4) (2018) 389–395.
- [2] R. Höfer, Chapter 4A - sugar- and starch-based biorefineries, in: A. Pandey,

- R. Höfer, M. Taherzadeh, K.M. Nampoothiri, C. Larroche (Eds.), *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 157–235.
- [3] M. Doble, A.K. Kruthiventri, Chapter 9 - Industrial examples, in: M. Doble, A.K. Kruthiventri (Eds.), *Green Chemistry and Engineering*, Academic Press, Burlington, 2007, pp. 245–296.
- [4] R.B. Melati, A.A. Schmatz, F.C. Pagnocca, J. Condeiro, M. Brienza, Sugarcane bagasse: production, composition, properties, and feedstock potential, in: R. Murphy (Ed.), *Sugarcane: Production Systems, Uses and Economic Importance*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2017, pp. 1–38.
- [5] M. Wojcik, J. Biernasiak, A. Papiewska, Evaluation of microbiological purity of raw and refined white cane sugar, *Food Control* 25 (1) (2012) 136–139.
- [6] O.A. El Shahaby, A. N. Zohri, M.A. Mohamed, E. Hafez, M.M. Youse, Determination of sucrose losses in beet sugar manufacturing at Dakahlia sugar company, Egypt, *Egyptian Sugar Journal* 7 (2014) 28–50.
- [7] S. Patilola, R.E. Goodhue, R.J. Sexton, Managing quantity, quality, and timing in Indian cane sugar production: ex post marketing permits or ex ante production contracts? *World Bank Econ. Rev.* 29 (3) (2015) 606–630.
- [8] T. Silalertruksa, P. Pongpat, S.H. Gheewala, Life cycle assessment for enhancing environmental sustainability of sugarcane biorefinery in Thailand, *J. Clean. Prod.* 140 (2017) 906–913.
- [9] R.B. Lima, P. Rela, V. Arthur, J.A. Souza, M.P. Prezotto, A.S. Baptista, C.L. Aguiar, Aspect of sucrose and its monomers from sugarcane juice submitted to different doses of cobalt-60 irradiation, in: Y. Amano (Ed.), *International Nuclear Atlantic Conference, International Nuclear Information System*, Belo Horizonte, Brazil, Vienna, 2011, pp. 1–7 Oct 24–28.
- [10] M.A. Clarke, I.A. Edye, G. Eggleston, Sucrose decomposition in aqueous solution, and losses in sugar manufacture and refining, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 52 (1997) 441–470.
- [11] M. Naderi-Badaj, M. Fazeliyan-Dehkordi, S.A. Mirrezaei, M. Chasemi-Varnamkhasti, Dielectric power spectroscopy as a potential technique for the non-destructive measurement of sugar concentration in sugarcane, *Biosyst. Eng.* 140 (2015) 1–10.
- [12] V. Singleton, J. Hom, C. Bucke, M. Adlard, A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose, *ASSCT* 22 (2002) 112–119.
- [13] L.C. Anyika, S.I. Okonkwo, E.N. Ijike, Comparative analysis of monosaccharide and disaccharide using different instrument refractometer and polarimeter, *Int. J. Res. Chem. Environ.* 2 (4) (2012) 270–274.
- [14] K. Taslan, I.H. Boyaci, A. Topcu, Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy, *Food Control* 48 (2015) 56–61.
- [15] A. Borji, F. Borji, A. Jourati, A new method for the determination of sucrose concentration in a pure and impure system: spectrophotometric method, *Int. J. Anal. Chem.* 2017 (2017) 1–6.
- [16] L. Pan, Q. Zhu, R. Lu, J.M. McGrath, Determination of sucrose content in sugar beet by portable visible and near-infrared spectroscopy, *Food Chem.* 167 (2015) 264–271.
- [17] M. Filip, M. Vlasea, V. Coman, A. Hadravsky, Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method, *Food Chem.* 199 (2016) 653–659.
- [18] P. Shanmugavelan, S.Y. Kim, J.B. Kim, H.W. Kim, S.M. Cho, S.N. Kim, S.Y. Kim, Y.S. Cho, H.R. Kim, Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD,

- Carbohydr. Res. 380 (2013) 112–117.
- [19] A.A. Ferreira Zielinski, C.M. Braga, I.M. Demiate, F.L. Beltrame, A. Nogueira, G. Wosiacki, Development and optimization of a HPLC-RI method for the determination of major sugars in apple juice and evaluation of the effect of the ripening stage, *Food Sci. Technol.* 34 (1) (2014) 38–43.
 - [20] L.R.V. de Sá, M.A.L. de Oliveira, M.C. Cammarota, A. Matos, V.S. Ferreira-Leitão, Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative bihydrogen production, *Int. J. Hydrogen Energy* 36 (23) (2011) 15177–15186.
 - [21] R. Hadjilkinova, N. Petkova, D. Hadjilkinov, P. Denev, D. Hrusavov, Development and validation of HPLC-RID method for determination of sugars and polyols, *J. Pharm. Sci. Res.* 9 (8) (2017) 1263–1269.
 - [22] F. Della Pelle, A. Scroccarello, S. Scarano, D. Compagnone, Silver nanoparticles-based plasmonic assay for the determination of sugar content in food matrices, *Anal. Chim. Acta* 1051 (2019) 129–137.
 - [23] M. Scampicchio, A. Arcelli, S. Mannino, Optical nanoprobe based on gold nanoparticles for sugar sensing, *Nanotechnology* 20 (13) (2009) 135501.
 - [24] A. Scroccarello, F. Della Pelle, L. Neri, P. Pittia, D. Compagnone, Silver and gold nanoparticles based colorimetric assays for the determination of sugars and polyphenols in apples, *Food Res. Int.* 119 (2019) 359–368.
 - [25] G. Palazzo, L. Pacchini, A. Maillardi, Colorimetric detection of sugars based on gold nanoparticle formation, *Sens. Actuators B Chem.* 161 (1) (2012) 366–371.
 - [26] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, S. Yao, Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review, *RSC Adv.* 3 (14) (2013) 4473–4491.
 - [27] M. Stredansky, L. Redivo, P. Magdolen, A. Stredansky, L. Navarin, Rapid sucrose monitoring in green coffee samples using multienzymatic biosensor, *Food Chem.* 254 (2018) 8–12.
 - [28] R. Antiochia, G. Vinc, L. Gorton, Rapid and direct determination of fructose in food: a new osmium-polymer mediated biosensor, *Food Chem.* 140 (4) (2013) 742–747.
 - [29] R.-X. Bian, X.-T. Wu, F. Chal, L. Li, L.-Y. Zhang, T.-T. Wang, C.-G. Wang, Z.-M. Su, Facile preparation of fluorescent Au nanoclusters-based test papers for recyclable detection of Hg^{2+} and Pb^{2+} , *Sens. Actuators B Chem.* 241 (2017) 592–600.
 - [30] P. Rattanarat, W. Dungehal, D. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul, C.S. Henry, Multilayer paper-based device for colorimetric and electrochemical quantification of metals, *Anal. Chem.* 86 (7) (2014) 3555–3562.
 - [31] E.L. Rossini, M.I. Milani, R. Carrilho, L. Pezza, H.R. Pezza, Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device, *Anal. Chim. Acta* 997 (2018) 16–23.
 - [32] P. Rattanarat, W. Dungehal, D.M. Cate, W. Slangroch, J. Volckens, O. Chailapakul, C.S. Henry, A microfluidic paper-based analytical device for rapid quantification of particulate chromium, *Anal. Chim. Acta* 800 (2013) 50–55.
 - [33] G. Lisak, J. Cui, J. Bobacka, Paper-based microfluidic sampling for potentiometric determination of ions, *Sens. Actuators B Chem.* 207 (2015) 933–939.
 - [34] A.T. Singh, D. Lantigua, A. Meika, S. Taling, M. Pandher, G. Camel-Unal, Paper-based sensors: emerging themes and applications, *Sensors* 18 (9) (2018) 1–22.
 - [35] T. Akyazi, L. Basabe-Desmonts, F. Benito-Lopez, Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation, *Anal. Chim. Acta* 1001 (2018) 1–17.
 - [36] N. Bhalila, P. Jolly, N. Fornisano, P. Estrella, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60 (1) (2016) 1–8.
 - [37] E.B. Bahadri, M.K. Sezginturk, Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biotreat/bio warfare analyses, *Anal. Biochem.* 478 (2015) 107–120.
 - [38] G.J. Chee, Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers, *Talanta* 117 (2013) 366–370.
 - [39] N. Cennamo, L. Zeni, P. Tortora, M.E. Regonesi, A. Giusti, M. Sialano, S. D'Auria, A. Varriale, A High Sensitivity Biosensor to detect the presence of perfluorinated compounds in environment, *Talanta* 178 (2018) 955–961.
 - [40] H. Shahar, L.L. Tan, G.C. Ta, L.Y. Heng, Detection of halogenated hydrocarbon pollutants using enzymatic reflectance biosensor, *Sens. Actuators B Chem.* 281 (2019) 80–89.
 - [41] E.F.M. Gabriel, P.T. Garcia, T.M.G. Cardoso, F.M. Lopes, F.T. Martinsa, W.K.T. Coltro, Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices, *Analyst* 141 (2016) 4749–4756.
 - [42] J. Shen, D.J. Burgess, Advances in drug delivery related biosensors and medical devices, *Int. J. Pharm.* 544 (2018) 307–308.
 - [43] M. Oubaha, A. Gorin, C. McDonagh, B. Duffy, R. Copperwhite, Development of a multianalyte optical sol-gel biosensor for medical diagnostic, *Sens. Actuators B Chem.* 221 (2015) 96–103.
 - [44] Janile L. Luther, V. Henry de Frahan, M. Lieberman, Paper test card for detection of adulterated milk, *Anal. Methods* 9 (38) (2017) 5674–5683.
 - [45] J. Biscay, E. Costa Rama, M.B. Gonzalez Garcia, A. Julio Reviejo, J.M. Pingarron Carrazon, A.C. Garcia, Amperometric fructose sensor based on ferrocyanide modified screen-printed carbon electrode, *Talanta* 88 (2012) 432–438.
 - [46] A.-M.G.V.a.C.A. Georgiou, Enzymatic spectrophotometric reaction rate determination of glucose in fruit drinks and carbonated beverages, *J. Chem. Educ.* 77 (2000) 1327–1329.

ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน	นางสาวจินากานต์ อักษร
วัน เดือน ปีเกิด	30 สิงหาคม 2536
ที่อยู่	213-214 หมู่ 1 ตำบลพรหมบุรี อำเภอพรหมบุรี จังหวัดสิงห์บุรี 16160
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เบอร์โทรศัพท์	081-2638904
อีเมล	ice_8312@hotmail.com

