



วิธีตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างง่ายโดยใช้เหล็ก(II)ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน

A Simple Method for Hydrogen Peroxide Determination Using Fe(II) with Norfloxacin

ธีรนนท์ ออประยูร* นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ และ สุเชาว์ ดอนพุดซา

Teeranon Orprayoon* Nuanlaor Ratanawimanwong and Suchao Donpudsa

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

Department of chemistry, Faculty of science, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author, E-mail: teeranon.orprayoon@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อย่างง่ายด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ Fe(II) ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการตรวจวัด ได้แก่ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด ลำดับการเติมรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ และเวลาในการทำปฏิกิริยา รวมทั้งการนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ คือ นำ H_2O_2 ไปตรวจวัดด้วยสารละลาย Fe(II) ความเข้มข้น 2.25 mM ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 4.00 mM เพื่อทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 3 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังสามารถนำวิธีการตรวจวัดนี้ไปใช้หาปริมาณ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ โดยได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 6.25 - 300 μM มีขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.402 μM และ 1.33 μM ตามลำดับ การตรวจวัด H_2O_2 ด้วยวิธีการนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย และสามารถตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ในระดับความเข้มข้นต่ำได้

คำสำคัญ: ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอร์ฟลอกซาซิน เหล็ก(II) สเปกโตรโฟโตเมตรี

Abstract

This study presents a simple spectrophotometric method for hydrogen peroxide (H_2O_2) determination using Fe(II) with Norfloxacin as a reagent. The aim was to optimize parameters affecting the quantitative analysis including the suitable wavelength for measurement, order of reagent adding, concentration of each reagent and reaction time. Detection of H_2O_2 content at various concentration was also investigated. The result of the optimal condition for H_2O_2



determination showed that H_2O_2 was mixed with 2.25 mM Fe(II) for 5 minutes, followed by adding 4.00 mM norfloxacin for 3 minutes. The colored complex was produced and measured with the absorbance at 440 nm. In addition, this method could be applied to the determination of the various concentration of H_2O_2 . Linear range of the developed method was at 6.25 - 300 μ M. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of this method were 0.402 μ M and 1.33 μ M, respectively. In conclusion, this method for H_2O_2 determination is simple, less time-consuming and able to determine the low concentration of H_2O_2 .

Keywords: Hydrogen peroxide, Norfloxacin, Fe(II), Spectrophotometry

1. บทนำ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) เป็นตัวออกซิไดซ์ที่นิยมนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น นำไปใช้ฟอกสีในการผลิตน้ำยาคัดสีผม เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำยาล้างแผล และใช้ในกระบวนการสเตอริไลซ์หรือพาสเจอไรส์น้ำนมดิบเพื่อฆ่าเชื้อโรค (Toyoda, Ito, Iwaida, & Fujii, 1982) โดย H_2O_2 จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (Peroxidation) ของลิพิดในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้การแพร่ของสารต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความผิดปกติ จนทำให้แบคทีเรียตายได้ในที่สุด (Ansari & Datta, 2003) นอกจากนี้ H_2O_2 ยังจัดเป็นสารอันตรายต่อมนุษย์ โดย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสูงจะก่อให้เกิดอันตรายเมื่อรับประทานหรือสัมผัสทางผิวหนัง และเป็นพิษเมื่อสูดดมไอรระเหย (Wei & Guo, 2007)

วิธีการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้วิธีทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) การทำโครมาโทกราฟี (Chromatography) ตลอดจนการใช้วิธีฟลูออโรเมตรี (Fluorometry) และเคมีลูมิเนสเซนซ์ (Chemiluminescence) แต่พบว่าวิธีเหล่านี้ต่างก็มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงที่มีราคาแพง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 ด้วยการใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากใช้อุปกรณ์ที่มีราคาไม่สูง ทำได้ง่าย และสะดวกกว่าวิธีอื่น ๆ โดยที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยที่พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 โดยอาศัยหลักการของไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) และตรวจวัดความเข้มข้นที่เกิดขึ้น โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้สารชนิดต่างๆเป็นสารตั้งต้นเพื่อทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนในรูปสารละลายที่มีสี ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Holt & Palcic, 2006; Szutowicz, Kobes, & Orsulak, 1984) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้เอนไซม์ซึ่งมีราคาสูงเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา จึงมีงานวิจัยใหม่ ๆ ที่พัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งไม่ต้องอาศัยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยา โดยนำ H_2O_2 มาทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ เพื่อทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีขึ้น เช่น การใช้กรดไนโตรฟีนิลโบโรนิก (4-Nitrophenyl boronic acid) (Su, Wei, & Guo, 2011) การใช้วานาเดียม-เพนทอกไซด์ (Vanadium pentoxide) (Zhang, Fu, Li, & Liu, 2013) และการพัฒนาวิธีการตรวจวัดไอรระเหยของ H_2O_2



บนกระดาษที่เคลือบด้วยสารสกัดแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) จากกะหล่ำปลีม่วง (สุกัญญา เพชรศิริเวทย์, ปิยนันท์ น้อยรอด และกรณิการ์ แก้วกิม, 2560)

จากสาเหตุข้างต้น ผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลายซึ่งไม่ต้องอาศัยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่ง เพื่อเป็นการขยายขอบเขตของวิธีการตรวจวัด และลดค่าใช้จ่าย แต่ยังคงให้ประสิทธิภาพในการตรวจวัดสูง โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 โดยการใช้ Fe(II) ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกได้

2. วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกซึ่งมีการใช้ Fe(II) ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ โดยจะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการตรวจวัดนี้ ได้แก่ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ลำดับในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมของรีเอเจนต์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน และเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา รวมทั้งนำไปหาช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งาน (Working range) ของวิธีตรวจวัด

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

30% (w/w) H_2O_2 (Carlo Erba), นอร์ฟลอกซาซิน (TCI) ละลายใน 50 mM CH_3COOH , Fe(II) เตรียมจาก $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ใน 50 mM HNO_3 , Fe(III) เตรียมจาก $FeCl_3$ ใน 50 mM HNO_3 , เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ Double-beam จากบริษัท Shimadzu ใช้สำหรับหาสเปกตรัมค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 300 – 800 nm และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-1200 จากบริษัท Mapada ใช้สำหรับวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm เพื่อใช้ในการตรวจวัดเชิงปริมาณของ H_2O_2

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การหาสเปกตรัม (spectrum) ในการดูดกลืนแสงของสาร

เตรียมสารตัวอย่าง เพื่อใช้ในการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสง โดยผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกัน ทั้งหมด 6 กลุ่มการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำสารละลายแต่ละกลุ่มการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300 – 800 นาโนเมตร



ตารางที่ 1 กลุ่มการทดลองเพื่อใช้ในการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสง โดยผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกัน

กลุ่มการทดลองที่	องค์ประกอบของสารตัวอย่าง
1	1.00 mM Fe(II)
2	1.00 mM Fe(II) + 2.00 mM H ₂ O ₂
3	1.00 mM Fe(II) + 2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน
4	1.00 mM Fe(II) + 2.00 mM H ₂ O ₂ + 2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน
5	1.00 mM Fe(III) + 2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน
6	2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน

3.2.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์

เตรียมสารละลาย 1.35 mM H₂O₂ สารละลาย 2.25 mM Fe(II) และสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซิน จากนั้นนำสารละลายทั้ง 3 ชนิดมาปริมาตรอย่างละ 1.00 cm³ ผสมเข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งหลังจากผสมสารในขั้นตอนที่ 1 เข้าด้วยกัน และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำสารผสมในขั้นตอนที่ 1 มาเติมสารในขั้นตอนที่ 2 ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำสารผสมทั้งหมดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลาย 2.25 mM Fe(III) กับสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซินเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ซึ่งการทดลองนี้ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

ตารางที่ 2 กลุ่มการทดลองที่ผสมสารละลาย 1.35 mM H₂O₂ สารละลาย 2.25 mM Fe(II) และสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซินเข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน

กลุ่มการทดลองที่	สารที่ผสมเข้าด้วยกันในขั้นตอนที่ 1	สารที่เติมเพิ่มเข้าไปในขั้นตอนที่ 2
1	Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน	H ₂ O ₂
2	นอร์ฟลอกซาซิน และ H ₂ O ₂	Fe(II)
3	Fe(II) และ H ₂ O ₂	นอร์ฟลอกซาซิน

3.2.3 การหาความเข้มข้นของ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

3.2.3.1 การหาความเข้มข้นของ Fe(II) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำสารละลาย 0.225 mM H₂O₂ ปริมาตร 1.00 cm³ มาเติมสารละลาย Fe(II) ปริมาตร 1.00 cm³ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.14 0.28 0.56 1.13 2.25 และ 3.38 mM ตามลำดับ จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จึงเติมสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 cm³ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ซึ่งการทดลองนี้ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.2.3.2 การหาความเข้มข้นของนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำสารละลาย 0.225 mM H₂O₂ ปริมาตร 1.00 cm³ มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe(II) ปริมาตร 1.00 cm³ ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จึงเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 cm³ ที่ความเข้มข้น



ต่าง ๆ ได้แก่ 0.14, 0.28, 0.56, 1.13, 2.25 และ 3.38 mM ตามลำดับ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ซึ่งการทดลองนี้ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.2.4 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน

3.2.4.1 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 และ Fe(II)

นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 cm³ มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe(II) ปริมาตร 1.00 cm³ ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที จึงเติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 cm³ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ซึ่งการทดลองนี้ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.2.4.2 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน

นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 cm³ มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe(II) ปริมาตร 1.00 cm³ ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็น 5 นาที จึงเติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 cm³ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ซึ่งการทดลองนี้ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.2.5 การตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe(II) ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน รวมทั้งการหาคุณสมบัติของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

นำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 300, 400 และ 500 μ M ตามลำดับ ปริมาตร 1.00 cm³ มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe(II) ปริมาตร 1.00 cm³ ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็น 5 นาที จึงเติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 cm³ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm จากนั้นคำนวณค่าต่างๆ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งาน (Working range) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantification; LOQ) ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีตรวจวัด โดยความแม่นยำของวิธีตรวจวัดรายงานในรูปร้อยละความคลาดเคลื่อน (Percentage error) สามารถหาได้จากวิธีทดสอบเปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิง (Reference material) ส่วนความเที่ยงของวิธีตรวจวัดรายงานในรูปสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation; CV) คำนวณได้จากการตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.15 mM โดยทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง

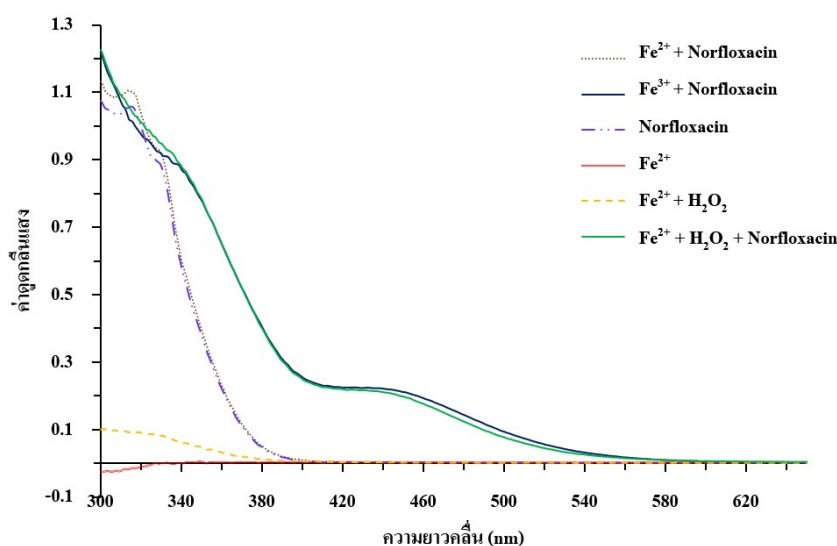
4. ผลการวิจัย

4.1 การหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร

ผลสเปกตรัมของสารละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ในช่วงความยาวคลื่น 300 – 800 nm แสดงดังรูปที่ 1 โดยผลการทดลองที่ได้พบว่า สารละลายที่มีส่วนผสมเฉพาะสารละลาย Fe(II) และ/หรือสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน พบความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ต่ำกว่า 400 nm ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นกับสารละลายผสม



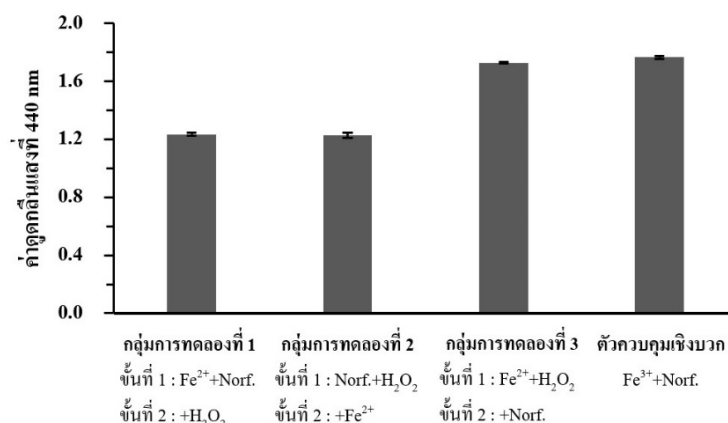
ระหว่าง Fe(II) และ H_2O_2 แต่เมื่อทำการผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกันประกอบด้วย Fe(II) H_2O_2 และนอร์ฟลอกซาซิน ผลการทดลองที่ได้พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการดูดกลืนแสง โดยสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-500 nm ได้ โดยสเปกตรัมของสารผสมจากปฏิกิริยาระหว่าง Fe(II) H_2O_2 และนอร์ฟลอกซาซิน ให้ผลการทดลองสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับการสารผสมระหว่างสารละลาย Fe(III) และสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน จึงแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-500 nm เกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Fe(III) และนอร์ฟลอกซาซิน โดย H_2O_2 สามารถไปออกซิไดซ์ Fe(II) ให้กลายเป็น Fe(III) ได้ ดังนั้นจึงสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับนอร์ฟลอกซาซิน และสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-500 nm ได้ จากการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 440 nm เพื่อใช้ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง H_2O_2 และ Fe(II) ร่วมกับการใช้นอร์ฟลอกซาซิน ในการหาปริมาณของ H_2O_2 ต่อไป



รูปที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆของสารละลายในปฏิกิริยา

4.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์

ในการหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโดยการสลับลำดับในการผสมรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2 และใช้สารละลายผสมระหว่าง Fe(III) กับนอร์ฟลอกซาซินเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ผลการทดลองที่ได้พบว่า ถ้านำ Fe(II) ไปทำปฏิกิริยากับนอร์ฟลอกซาซิน หรือนำ H_2O_2 ไปทำปฏิกิริยากับนอร์ฟลอกซาซิน ก่อนที่จะนำ Fe(II) ไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ลดลง เมื่อเทียบกับการบ่ม Fe(II) กับ H_2O_2 ก่อนที่จะเติมนอร์ฟลอกซาซินเพิ่มลงไป ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับสารละลายผสมระหว่าง Fe(III) กับนอร์ฟลอกซาซิน ดังแสดงในรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าลำดับการผสมสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาส่งผลต่อความสามารถในการตรวจวัดเช่นกัน โดยการผสม H_2O_2 กับ Fe(II) ก่อนแล้วจึงเติมนอร์ฟลอกซาซินจะส่งผลให้ Fe(II) ถูกออกซิไดส์เป็น Fe(III) ได้อย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาดังกล่าว ในการนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2

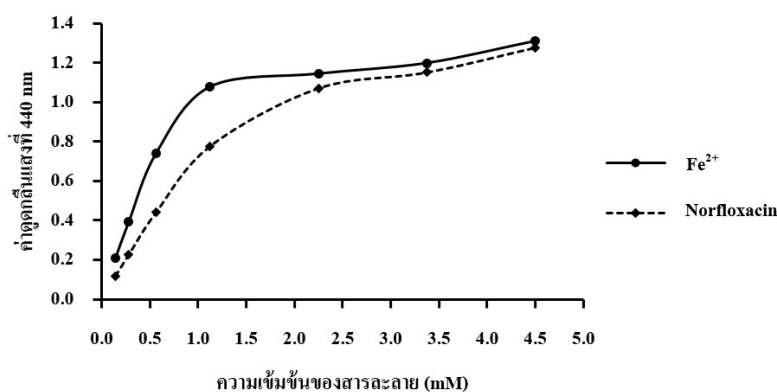


รูปที่ 2 ผลของลำดับการทำปฏิกิริยาค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ผสมสารละลายสองชนิดเข้าด้วยกันก่อน แล้วขั้นตอนที่ 2 จึงเติมสารละลายอีกชนิดหนึ่งเพิ่มลงไป โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาขั้นตอนละ 5 นาที

4.3 การหาความเข้มข้นของ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ผลของความเข้มข้นของ Fe(II) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการหาปริมาณของ H_2O_2 เริ่มจากการนำ H_2O_2 มาเติมด้วยสารละลาย Fe(II) ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงค่อยเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซินลงไปต่อ และนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย Fe(II) จะทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลาย Fe(II) มีค่าเท่ากับ 1.125 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ที่วัดได้เริ่มคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 3 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลาย Fe(II) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.25 mM สำหรับใช้ในการหาปริมาณของ H_2O_2

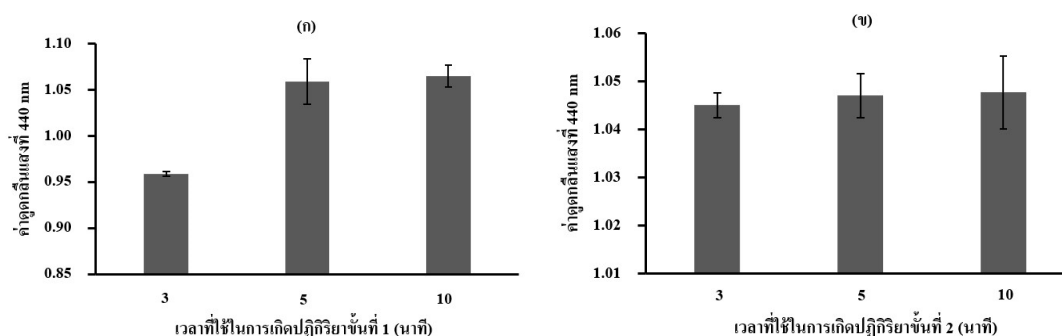
หลังจากที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Fe(II) ที่ใช้สำหรับหาปริมาณของ H_2O_2 แล้ว จึงได้ทำการหาความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมต่อไป โดยนำ H_2O_2 มาเติมด้วยสารละลาย 2.25 mM Fe(II) จากนั้นจึงเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซินที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน จะทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซินมีค่าเท่ากับ 2.25 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ที่วัดได้เริ่มคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 3 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลายนอร์ฟลอกซาซินที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4.00 mM สำหรับใช้ในการหาปริมาณของ H_2O_2



รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซินต่อการเกิดปฏิกิริยากับ 0.225 mM H₂O₂ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm

4.4 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H₂O₂ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน

การศึกษาผลของเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา เริ่มจากนำ H₂O₂ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน มาผสมกันตามลำดับ โดยมีการบ่มปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ ระหว่าง H₂O₂ และ Fe(II) และระหว่างสารผสมของ H₂O₂ กับ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน จากนั้นจึงนำสารผสมทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า ถ้าใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H₂O₂ และ Fe(II) เพียง 3 นาที จะทำให้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ลดลง แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H₂O₂ และ Fe(II) เป็น 5 นาที จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H₂O₂ และ Fe(II) เป็น 10 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4 (ก) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะแตกต่างกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาเวลาที่ใช้นบ่มปฏิกิริยาระหว่างสารผสมของ H₂O₂ กับ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน โดยทั้ง 3 เวลา คือ 3, 5 และ 10 นาที มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4 (ข) ดังนั้นเวลาที่ใช้นบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H₂O₂ และ Fe(II) และระหว่างสารผสมของ H₂O₂ กับ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน คือ 5 และ 3 นาที ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอสำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณของ H₂O₂

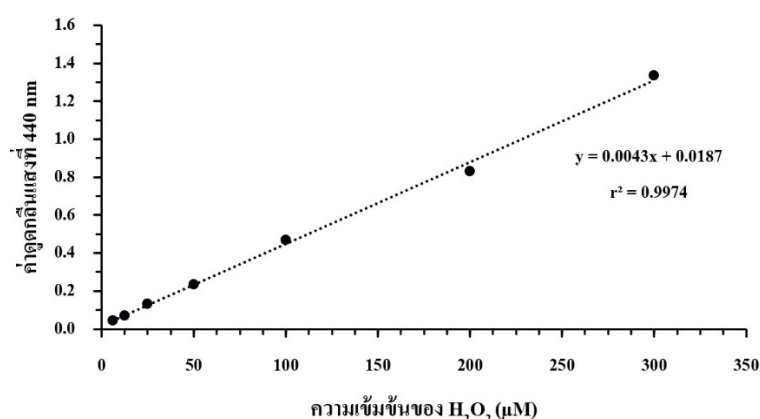


รูปที่ 4 (ก) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 1 คือ การผสมสารละลาย Fe(II) และ H₂O₂ เข้าด้วยกัน (ข) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 2 คือ การเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซินลงในสารละลายผสมระหว่าง Fe(II) และ H₂O₂



4.5 การตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ $Fe(II)$ ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน รวมทั้งการหาคุณสมบัติของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

การตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เริ่มจากนำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยากับ สารละลาย 2.25 mM $Fe(II)$ จากนั้นบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที จึงเติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน และ บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถ ตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยพบว่าในช่วงความเป็นเส้นตรงหรือ ช่วงการใช้งานในช่วงความเข้มข้น 6.25 - 300 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9974 คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ เท่ากับ 0.402 μM และ 1.33 μM ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีตรวจวัดได้ร้อยละความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 0.11% และความเที่ยงของวิธีการตรวจวัดซึ่งแสดงในรูปสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) มีค่าเท่ากับ 5.87 %



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 6.25 - 300 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 440 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ $Fe(II)$ ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน

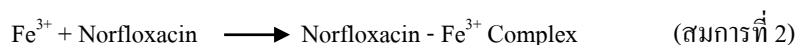
5. การอภิปรายผล

การทดลองตรวจวัด H_2O_2 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นการประยุกต์ใช้ความรู้เรื่องการบำบัดน้ำเสียด้วยปฏิกิริยา เฟนตัน (Fenton reaction) ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จาก H_2O_2 และ $Fe(II)$ ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำ โดย H_2O_2 จะ กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ $Fe(II)$ ให้เปลี่ยนเป็น $Fe(III)$ พร้อมทั้งสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl Radical; $OH^\bullet$) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังสมการที่ 1 ซึ่งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลนี้จะเข้าไปเหนี่ยวแน่นทำให้เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันของสารอินทรีย์ในน้ำ และจะเกิดการเหนี่ยวแน่นต่อไปเรื่อย ๆ ในลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้โมเลกุลของ สารอินทรีย์ทั้งหมดในน้ำมีขนาดและความเป็นพิษลดลง (สุชนม์ แก้วมดย์ และบุญสร้าง ดิเรกสถาพร, 2555)

จากสมการที่ 1 จะสังเกตเห็นได้ว่าปริมาณ $Fe(III)$ ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณ H_2O_2 เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี $Fe(II)$ มากเกินพอ ผู้วิจัยจึงนำหลักการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้โดยการนำประโยชน์จากปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง $Fe(III)$ และนอร์ฟลอกซาซินซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่ง สารทั้งสองสามารถทำปฏิกิริยาคีเลชัน (Chelation) กัน โดยนอร์ฟลอกซาซินที่มีหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) และหมู่คีโตน ($-C=O$) ในโครงสร้างจะทำหน้าที่เป็นสารคีเลต



(Chelating agent) ล้อมรอบ Fe(III) ไปได้ และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้ม ซึ่งสามารถนำไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีได้ ดังแสดงในสมการที่ 2 (Bhowal & Das, 1991) โดยค่าดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ Fe(III) ทั้งหมดที่อยู่ในสารละลายได้ ดังนั้นหากทดลองนำสารมาทำปฏิกิริยาตามสมการที่ 1 และ 2 แบบต่อเนื่องกัน โดยให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารกำหนดปริมาณ จะได้ว่าค่าดูดกลืนแสงที่ได้ซึ่งเป็นผลจากสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกันกับปริมาณ H_2O_2



ทั้งนี้ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นมีจุดเด่น คือ สามารถใช้ตรวจวัด H_2O_2 ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ มีความแม่นยำของวิธีตรวจวัดสูง (ร้อยละความคลาดเคลื่อน เท่ากับ 0.11%) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ก็ยังคงมีข้อจำกัดในด้านความเที่ยง (CV = 5.87%) และเมื่อพิจารณาสมการที่ 1 จะสังเกตได้ว่าเมื่อ H_2O_2 ออกซิไดส์ Fe(II) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น $OH^\bullet$ ซึ่งอาจทำให้ค่าพีเอช (pH) ของระบบเปลี่ยนแปลงไป และส่งผลต่อการตกตะกอนของ Fe(II) และ Fe(III) ได้ ดังนั้นผู้วิจัยเห็นว่าควรจะศึกษาผลของพีเอชที่มีผลต่อวิธีตรวจวัด และพัฒนาวิธีตรวจวัดให้มีความเที่ยงสูงขึ้นเพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ในตัวอย่างจริงได้ต่อไป

6. บทสรุป

การทดลองนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 อย่างง่ายโดยใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 และทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีขึ้น คือ Fe(II) และนอร์ฟลอกซาซิน โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีการตรวจวัด H_2O_2 คือ นำสารละลาย H_2O_2 ที่ต้องการตรวจวัดปริมาณมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe(II) ความเข้มข้น 2.25 mM เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 4.00 mM เพื่อทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ผลจากการศึกษาคุณลักษณะของวิธีทดสอบให้ค่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 6.25 - 300 μM ซึ่งให้ค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9974 มีขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.402 μM และ 1.33 μM ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ได้จริง

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2562 (089/2563) และทุนการศึกษาสำหรับนายธีรนนท์ ออประยูร จากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สคว.) โดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)



8. เอกสารอ้างอิง

- สุกัญญา เพชรศิริเวทย์, ปิยนันท์ น้อยรอด และกรรณิการ์ แก้วกิม. (2560). การพัฒนาวิธีการตรวจวัดไอระเหยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยกระดาษแอนโทไซยานิน. ใน *รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 5*. (หน้า 601-606). 25 พฤษภาคม 2560 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ ประเทศไทย.
- สุขนัม แก้วมาตย์ และบุญสร้าง ดิเรกสถาพร. (2555). การบำบัดน้ำเสียจากสีย้อมผ้าด้วยกระบวนการฟentonแบบฉายแสงโดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์. ใน *รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50*. (หน้า 190-197). 31 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2555 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ ประเทศไทย.
- Ansari, I. A., & Datta, A. K. (2003). An Overview of Sterilization Methods for Packaging Materials Used in Aseptic Packaging Systems. *Food and Bioproducts Processing*, 81(1), 57-65. doi: 10.1205/096030803765208670
- Bhowal, S. K., & Das, T. K. (1991). Spectrophotometric Determination of some Recently Introduced Antibacterial Drugs Using Ferric Chloride. *Analytical Letters*, 24(1), 25-37. doi: 10.1080/00032719108052881
- Holt, A., & Palcic, M. M. (2006). A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes. *Nature Protocols*, 1(5), 2498-2505. doi: 10.1038/nprot.2006.402
- Su, G., Wei, Y., & Guo, M. (2011). Direct colorimetric detection of hydrogen peroxide using 4-nitrophenylboronic acid or its pinacol ester. *Am. J. Anal. Chem.*, 2(8), 879-884. doi: 10.4236/ajac.2011.28101
- Szutowicz, A., Kobes, R. D., & Orsulak, P. J. (1984). Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 86-94. doi: 10.1016/0003-2697(84)90773-5
- Toyoda, M., Ito, Y., Iwaida, M., & Fujii, M. (1982). Rapid procedure for the determination of minute quantities of residual hydrogen peroxide in food by using a sensitive oxygen electrode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 346-349. doi:10.1021/jf00110a033
- Wei, Y., & Guo, M. (2007). Hydrogen Peroxide Triggered Prochelator Activation, Subsequent Metal Chelation, and Attenuation of the Fenton Reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(25), 4722-4725. doi:10.1002/anie.200604859
- Zhang, Q., Fu, S., Li, H., & Liu, Y. (2013). A novel method for the determination of hydrogen peroxide in bleaching effluents by spectroscopy. *BioResources*, 8(3), 3699-3705, 3697 pp. doi:10.15376/biores.8.3.3699-3705