บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ โดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4@Au และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้น ทำการสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ และประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4@Au โดย Fe_3O_4 ทำหน้าที่เป็นแกน และทองอนุภาคนาโนทำหน้าที่เป็นเปลือก พบว่าอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4@Au ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร รูปร่างลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวสม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 50 นาโนเมตร ให้สัญญาณการตอบสนองต่อสารตัวกลางทางไฟฟ้า NADPH ได้ดีที่ศักย์ช่วง 0.4 ถึง 0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์ ซิลเวอร์คลอไรด์ และให้กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเป็นแบบการเคลื่อนที่โดยมวล (Mass transfer) เมื่อทำการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส พบว่าพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4@Au ถูกปกคลุมด้วยกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์ และขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ โดยทำการศึกษา 2 ระบบ

ระบบการวิเคราะห์แบบปกติ พบว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับตรึงเอนไซม์และอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4@Au บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคือ 10 นาที ปริมาณคอร์เชลล์ 3×10^{-3} มิลลิกรัม Fe_3O_4 ต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณเอนไซม์ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศักย์กระตุ้น 0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายอิเล็กโตรไลต์เกื้อหนุนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ 0.03 และ 0.04 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ประเมินประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ พบช่วงความเป็นเส้นตรง 0.04-0.22 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ความไวในการวิเคราะห์ 3.6 μA per %.cm^2 ขีดความสามารถในการตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุด 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ (3 ซ้ำ) และขั้วไฟฟ้า (3 ขั้วไฟฟ้า) เท่ากับ 3.1 และ 4.1 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ตามลำดับ อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 72 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

ระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ พบว่าปริมาณคอร์เชลล์ 1×10^{-4} มิลลิกรัม Fe_3O_4 ต่อตารางเซนติเมตร ประมาณเอนไซม์ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศักย์กระตุ้น 0.7 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีดสาร 100 ไมโครลิตร ปริมาณสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ประเมินประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ พบช่วงความเป็นเส้นตรง 0.01-0.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ความไวในการวิเคราะห์ 35.7 μA per %.cm^2 ขีดความสามารถในการตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุด 0.001 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ (10 ซ้ำ) และขั้วไฟฟ้า (3 ขั้วไฟฟ้า) เท่ากับ 2.6 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ตามลำดับ อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 130 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ประเมินการทำงาน

ของไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้น พบว่าสารรบกวน คือ กรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก ตัวอย่างต้องถูกเจือจาง 100 เท่า ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ก่อนวัดด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางข้น เฉลี่ย 0.60 ± 0.02 และ 0.61 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต (0.63 ± 0.02) เทคนิคการวัดสี (0.62 ± 0.02) และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี (0.58 ± 0.02) ด้วยสถิติ t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางข้นที่ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคมาตรฐานให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นยอมรับได้ว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและการไหลอัตโนมัติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คาดหวังว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้นและตัวอย่างอื่นๆ ได้ ณ สถานที่จริง

Abstract

In this research, an ammonium ion biosensor has been developed for the determination of ammonium ion in concentrated latex samples based on batch and flow injection analysis (FIA) system by using the electrodes modified with core shell Fe_3O_4@Au nanoparticles and alanine dehydrogenase enzyme (AlaDH). The core shell Fe_3O_4@Au nanoparticles were synthesized, characterized and evaluated as a term of electron transfer. As the results, the core shell Fe_3O_4@Au nanoparticles was absorbed at the wavelength of 580 nm and the average diameter was about 50 nm. The size of nanoparticles clearly increase after their immobilized with AlaDH enzyme. The oxidation peak current of the mediator which is NADPH enhanced obviously at the potential between 0.4-0.6 V (versus Ag/AgCl) when the electrode modified with the core shell Fe_3O_4@Au nanoparticles by comparing the current with the bare electrode and the reactions on the modified electrode is mass transfer controlled. The amperometric technique was studied in terms of optimal conditions which were used for two systems (Batch and flow analysis system).

The batch system was investigated on the optimal experimental conditions and analytical performances for the biosensor analysis. From the results, the 3×10^{-3} mg.cm^{-2} core shell Fe_3O_4@Au nanoparticles and 0.1 unit.cm^{-2} AlaDH enzyme were immobilized on the electrode surface at 10 minutes, the operating potential at 0.6 V versus Ag/AgCl, 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0 as the supporting electrolyte, the operating temperature 20 ºC, an amount of substrate and cofactor as 0.03 and 0.04 mM, respectively, were obtained. The biosensor based on batch system in terms of a linear response range of 0.04-0.22 % by mass, sensitivity of 3.6 µA per %.cm^{2}, a detection limit of 0.01 % and a quantification limit of 0.05 % was experimentally evaluated. The repeatability (n=3) of 3.1 %RSD and reproducibility (n=3) of 4.1 %RSD were also validated. The sample throughput was 72 samples per hour.

The amperometric technique based on FIA was also carried he optimal experimental conditions and analytical performances for the biosensor analysis. As the results, the 1×10^{-4} mg.cm^{-2} core shell Fe_3O_4@Au nanoparticles and 0.3 unit.cm^{-2} AlaDH enzyme were immobilized on the electrode surface, the operating potential at 0.7 V versus Ag/AgCl, 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.0 as the carrier solution, the buffer flow rate at 1.2 mL.min^{-1},

100 µL injection volume, an amount of substrate and cofactor as 0.4 and 0.8 mM, respectively, were obtained. The biosensor based on FIA system in terms of a linear response range of 0.01-0.50 % by mass, sensitivity of 35.7 µA per %.cm^2, a detection limit of 0.001 % and a quantification limit of 0.01 % was experimentally evaluated. The repeatability (n=10) of 2.6 %RSD and reproducibility (n=3) of 3.0 %RSD were also validated. The sample throughput was 130 samples per hour.

Additionally, the biosensors for the ammonium ion determination in concentrated latex samples were proposed. Formic acid and Acetic acid were interferences for ammonium ion determination in latex samples. The concentrated latex samples were properly diluted 100 times with phosphate buffer before measurements were carried out by the standard addition method. The ammonium ion concentration of 0.60 ± 0.02 and 0.61 ± 0.02 % by mass were determined by biosensor based on batch and FIA system, respectively, and compared with the results from titration method (0.63 ± 0.02) colorimetric method (0.62 ± 0.02) and ammonium ion selective electrode (0.58 ± 0.02). The compared methods were shown that the t-test values showed no significant difference at the 95% confidence level. Therefore, the ammonium ion biosensor based on batch and FIA system could be proposed on ammonium ion determination in concentrated latex and other samples.