



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาแอมโมเนียไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัด
ปริมาณแอมโมเนียในน้ำอย่างง่าย

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี สำเภา และคณะ

มกราคม 2559

สัญญาเลขที่ RDG5750100

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาแอมโมเนียไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียใน
น้ำอย่างขึ้น

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี สำเภา
2. ดร. สราวุธ ประเสริฐศรี
3. นางสาวปริญญช บุตรมี

สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

โครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาแอมโมเนียไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียในน้ำยาง
ชั้น ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม และสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557 จัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ
แอมโมเนียในน้ำยางชั้นด้วยไบโอเซนเซอร์ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการวิจัยนี้จะสามารถพัฒนาเป็น
อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดได้จริงในอนาคตข้างหน้า ถ้ามีข้อผิดพลาดในตัวเล่มรายงานนี้โปรดแจ้งหัวหน้าโครงการ
จักขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาแอมโมเนียไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียในน้ำยาง
ชั้น ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม และสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557 จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้เนื่องจากการได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จากคณะ
วิทยาศาสตร์ และ จากอาจารย์และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมีทุกท่าน จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2559

Executive Summary

วัตถุประสงค์ : เพื่อสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียในรูปของแอมโมเนียมไอออน ด้วยระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ โดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชัน

วิธีการทดลอง : สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โดย Fe_3O_4 ทำหน้าที่เป็นแกน และทองอนุภาคนาโนทำหน้าที่เป็นเปลือก พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี เทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ เทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและส่องกราด ประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี และเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ ระยะเวลาในการตรึงสารบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ปริมาณคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณสารตั้งต้น ปริมาณโคแฟกเตอร์ ศักย์ไฟฟ้ากระตุ้น ความเป็นกรด-เบสของสารละลาย อุณหภูมิ และยังทำการศึกษาอัตราการไหลของสารละลาย ปริมาตรการฉีดสาร สำหรับระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ ประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ โดยศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ความไวของการวิเคราะห์ ชีตความสามารถในการตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณ ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์และของไบโอเซนเซอร์ อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตัวรบกวนการวิเคราะห์ และผลการเจือจางตัวอย่างต่อความถูกต้องในการวิเคราะห์ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชันด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต เทคนิคการวัดสี และขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน

ผลการทดลอง : อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร รูปร่างลักษณะเป็นทรงกลมกระจายตัวสม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 50 นาโนเมตร ให้สัญญาณการตอบสนองต่อสารตัวกลางทางไฟฟ้า NADPH ได้ดีที่ศักย์ช่วง 0.4 ถึง 0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์ ซิลเวอร์คลอไรด์ และให้กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเป็นแบบ Mass transfer เมื่อทำการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส พบว่าพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ถูกปกคลุมด้วยกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์ และขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ต่อการวิเคราะห์ในระบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ ดังตารางข้างล่างนี้

สภาวะการปรับปรุงชีวไฟฟ้า	ระบบปกติ	ระบบการไหลอัตโนมัติ
เวลาในการตรึงสาร (minute)	10	-
ปริมาณคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ($\text{mg Fe}_3\text{O}_4\cdot\text{cm}^{-2}$)	3×10^{-3}	1×10^{-4}
ปริมาณแอนไซม์ ($\text{unit}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0.1	0.3
ศักย์กระตุ้น (V versus Ag/AgCl)	0.6	0.7
ความเป็นกรด-เบสของสารละลาย	7.0	7.0
อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	25	25
ปริมาณสารตั้งต้น ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.03	0.4
ปริมาณโคแฟกเตอร์ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.04	0.8
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	1.2	
ปริมาตรการฉีดสาร (μL)	100	
สภาวะการวิเคราะห์	ระบบปกติ	ระบบการไหลอัตโนมัติ
ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (%)	0.04-0.22	0.01-0.50
ความไวของการวิเคราะห์ ($\mu\text{A per \%}\cdot\text{cm}^{-2}$)	3.6	35.7
ขีดความสามารถในการตรวจวัด (%)	0.01	0.001
ขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณ (%)	0.05	0.01
ความแม่นยำของการวิเคราะห์ (%RSD)	3.1 (n = 3)	2.6 (n = 10)
ความแม่นยำของไบโอเซนเซอร์ (%RSD)	4.1 (n = 3)	3.0 (n = 3)
อัตราเร็วในการวิเคราะห์ ($\text{samples}\cdot\text{h}^{-1}$)	72	130
ตัวรบกวนการวิเคราะห์	กรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก	
ปัจจัยการเจือจางตัวอย่าง	100 เท่า	

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชันเฉลี่ย 0.60 ± 0.02 และ 0.61 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต (0.63 ± 0.02) เทคนิคการวัดสี (0.62 ± 0.02) และเทคนิคโฟเทนซีโอเมทรี (0.58 ± 0.02) ด้วยสถิติ t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชันที่ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคมาตรฐานให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นยอมรับได้ว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและการไหลอัตโนมัติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการทดลอง : แอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและการไหลอัตโนมัติให้ความไวในการตรวจวิเคราะห์และความแม่นยำสูง ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้รวดเร็ว คาดหวังว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชันและตัวอย่างอื่นๆ ได้ ณ สถานที่จริง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ โดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอย่างขึ้น ทำการสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ และประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โดย Fe_3O_4 ทำหน้าที่เป็นแกน และทองอนุภาคนาโนทำหน้าที่เป็นเปลือก พบว่าอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร รูปร่างลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวสม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 50 นาโนเมตร ให้สัญญาณการตอบสนองต่อสารตัวกลางทางไฟฟ้า NADPH ได้ดีที่ศักย์ช่วง 0.4 ถึง 0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์ ซิลเวอร์คลอไรด์ และให้กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเป็นแบบการเคลื่อนที่โดยมวล (Mass transfer) เมื่อทำการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส พบว่าพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ถูกปกคลุมด้วยกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์ และขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ โดยทำการศึกษา 2 ระบบ

ระบบการวิเคราะห์แบบปกติ พบว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับตรึงเอนไซม์และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคือ 10 นาที ปริมาณคอร์เชลล์ 3×10^{-3} มิลลิกรัม Fe_3O_4 ต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณเอนไซม์ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศักย์กระตุ้น 0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ 0.03 และ 0.04 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ประเมินประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ พบช่วงความเป็นเส้นตรง 0.04-0.22 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ความไวในการวิเคราะห์ $3.6 \mu\text{A per \%cm}^2$ 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 ปริมาณเอนไซม์ 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 $35.7 \mu\text{A per \%cm}^2$ 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

ของไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชั้น พบว่าสารรบกวน คือกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก ตัวอย่างต้องถูกเจือจาง 100 เท่า ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ก่อนวัดด้วยวิธีการเดิมสามารถฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชั้นเฉลี่ย 0.60 ± 0.02 และ 0.61 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต (0.63 ± 0.02) เทคนิคการวัดสี (0.62 ± 0.02) และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี (0.58 ± 0.02) ด้วยสถิติ t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชั้นที่ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคมาตรฐานให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นยอมรับได้ว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและการไหลอัตโนมัติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คาดหวังว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชั้นและตัวอย่างอื่นๆ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanoparticles and alanine dehydrogenase enzyme (AlaDH). The core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanoparticles were synthesized, characterized and evaluated as a term of electron transfer. As the results, the core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 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 $3 \times 10^{-3} \text{ mg.cm}^{-2}$ core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 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 °C, 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 $3.6 \text{ } \mu\text{A per \%cm}^2$, 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 the optimal experimental conditions and analytical performances for the biosensor analysis. As the results, the $1 \times 10^{-4} \text{ mg.cm}^{-2}$ core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 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 $\%\text{cm}^2$, 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.

สารบัญ

หน้า

คำนำ	I
กิตติกรรมประกาศ	li
Executive Summary	iii
บทคัดย่อ	v
สารบัญ	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
1.3.1 ความหมายของไบโอเซนเซอร์	3
1.3.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์	3
1.3.3 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์	5
1.3.3.1 สารชีวภาพ	6
1.3.3.1.1 เอนไซม์	6
1.3.3.1.2 เซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์	7
1.3.3.1.3 สารต่อต้าน หรือแอนติบอดี	8
1.3.3.2 ตัวแปลงสัญญาณ	9
1.3.3.2.1 โฟเทนธีโอเมตริก ทรานสดิวเซอร์	9
1.3.3.2.2 แอมเพโรเมตริก ทรานสดิวเซอร์	9
1.3.3.2.3 ออปติคัล ทรานสดิวเซอร์	10
1.3.3.2.4 พีโซอิเล็กทริกคริสตัล ทรานสดิวเซอร์	10
1.3.3.2.5 ตัวแปลงสัญญาณชนิดอื่นๆ	10
1.3.4 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์	11
1.3.4.1 ความจำเพาะต่อประเภทของปฏิกิริยา	11
1.3.4.2 ความจำเพาะต่อซับสเตรต	11
1.3.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	13
1.3.6 การตั้งชื่อและการจัดจำแนกของเอนไซม์	14
1.3.6.1 กลุ่มออกซิโดรีดักเทส	14
1.3.6.2 กลุ่มทรานเฟอเรส	15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.3.6.3	กลุ่มไฮโดรเลส	15
1.3.6.4	กลุ่มไลเอส	16
1.3.6.5	กลุ่มไฮโซเมอเรส	16
1.3.6.6	กลุ่มไลเกส	16
1.3.7	เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส	17
1.3.8	วิธีการตรึงเอนไซม์	18
1.3.8.1	การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ	18
1.3.8.2	การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง	18
1.3.8.3	การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้	19
1.3.8.4	การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้	19
1.3.8.5	การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด	20
1.3.9	อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	20
1.3.9.1	แมกนีไทต์	21
1.3.9.2	ทองอนุภาคนาโน	21
1.3.10	ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน	22
1.3.11	ข้าวไฟฟ้าคาร์บอนเพส	23
1.3.12	ข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน	24
1.3.13	ระบบการตรวจวัดแบบปกติ	25
1.3.14	ระบบการตรวจวัดแบบการไหลอัตโนมัติ	25
1.3.14.1	หลักการทำงาน	26
1.3.14.2	การกระจายของโซนตัวอย่างในระบบการไหลอัตโนมัติ	27
1.3.14.3	องค์ประกอบของระบบการไหลอัตโนมัติ	28
1.3.15	เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	29
1.3.16	เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี	30
1.3.17	เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี	32
1.3.17.1	กฎแห่งการดูดกลืนแสง	32
1.3.17.2	การดูดกลืนแสงโดยอนุภาคโลหะนาโน	34
1.3.18	เทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี	35
1.3.19	เทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์	37

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1.3.20 เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	37
1.3.21 เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	38
1.3.22 น้ำยา	38
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	40
1.4.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	40
1.4.2 แอมโมเนียมไบโอเซนเซอร์	47
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	51
2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง	51
2.1.1 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 250 มิลลิลิตร	51
2.1.2 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 250 มิลลิลิตร	51
2.1.3 เตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์แก๊วหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	51
2.1.4 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ (0.1 M KCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	51
2.1.5 เตรียมสารละลาย 5 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	51
2.1.6 เตรียมสารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ NADPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	52
2.1.7 เตรียมสารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ ไพรูเวต ปริมาตร 25 มิลลิลิตร	52
2.1.8 เตรียมสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	52
2.1.9 เตรียมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	52
2.1.10 เตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร	52
2.1.11 เตรียมสารละลาย 2.5 เปอร์เซ็นต์ กลูตารัลดีไฮด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	52
2.1.12 เตรียมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ แนฟฟิออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	53
2.1.13 เตรียมสารละลาย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.1.14 เตรียมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ Stabilizer solution	53
2.1.15 เตรียมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์	53
2.1.16 เตรียมสารละลายน้ำยาล้าง	53
2.1.17 เตรียมสารละลายเนสเลอร์	53
2.1.18 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับกรดฟอร์มิก อัตราส่วน 1:1	54
2.1.19 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับกรดอะซิติก อัตราส่วน 1:1	54
2.1.20 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับคอปเปอร์ อัตราส่วน 1:1	54
2.1.21 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับแมกนีเซียม อัตราส่วน 1:1	54
2.2 การเตรียมอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	54
2.2.1 เตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์	54
2.2.2 เตรียมสารแขวนลอย 0.25 มิลลิโมลาร์ แมกนีไทด์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร	55
2.2.3 เตรียมสารละลาย 0.25 มิลลิโมลาร์ สารประกอบทอง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร	55
2.2.4 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมโบโรไฮไดรด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร	55
2.2.5 การสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยอัตราส่วนโมล Fe_3O_4 : Au เท่ากับ 1:0.8	55
2.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพส	56
2.3.1 เตรียมคาร์บอนเพส	56
2.3.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งาน	56
2.3.3 เตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	57
2.3.4 ตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ บนผิวหน้าคาร์บอนเพส	57
2.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน	57
2.4.1 ขั้วไฟฟ้าใช้งานพิมพ์สกรีนคาร์บอน	57
2.4.2 เตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	57
2.4.3 เตรียมสารละลายผสมของโคแฟกเตอร์และสารตั้งต้น	58

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.4 ตรึงเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โคแฟกเตอร์ และสารตั้งต้น บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน	58
2.5 วิธีการทดลอง	59
2.5.1 ศึกษาการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$	59
2.5.1.1 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี	59
2.5.1.2 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์	59
2.5.1.3 ศึกษาขนาดรูปร่างของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	59
2.5.1.4 ศึกษาประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	60
2.5.1.5 ศึกษากระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	60
2.5.2 ศึกษาการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$	61
2.5.2.1 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี	61
2.5.2.2 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	61
2.5.2.3 ศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	62
2.5.2.4 ศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอลลอยด์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี	63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.3	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ	64
2.5.3.1	ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า	64
2.5.3.2	ศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน	64
2.5.3.3	ศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน	65
2.5.3.4	ศึกษาศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า	65
2.5.3.5	ศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เกือหนุนฟอสเฟสบัฟเฟอร์	66
2.5.3.6	ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์	66
2.5.3.7	ศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม	67
2.5.3.8	ศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม	67
2.5.4	ศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ	68
2.5.4.1	ศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์	68
2.5.4.2	ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด	68
2.5.4.3	ศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด	68
2.5.4.4	ศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์	69
2.5.4.5	ศึกษาความแม่นยำของขั้วไฟฟ้า	69
2.5.5	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวัดในระบบการไหลอัตโนมัติ	69
2.5.5.1	ศึกษาชนิดของขั้วไฟฟ้าทำงานต่อการให้สัญญาณการวิเคราะห์	69
2.5.5.2	ศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน	70
2.5.5.3	ศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน	71

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.5.4	ศึกษาปริมาณของสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม	71
2.5.5.5	ศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม	72
2.5.5.6	ศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม	72
2.5.5.7	ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า	73
2.5.5.8	ศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา	73
2.5.5.9	ศึกษาปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างที่เหมาะสม	73
2.5.6	ศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	74
2.5.6.1	ศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์	74
2.5.6.2	ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด	74
2.5.6.3	ศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด	74
2.5.6.4	ศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์	74
2.5.6.5	ศึกษาความแม่นยำของขั้วไฟฟ้า	75
2.5.7	ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้น	75
2.5.7.1	ศึกษาตัวรบกวนการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน	75
2.5.7.2	ศึกษาปัจจัยการเจือจางตัวอย่าง (Dilution factor)	76
2.5.7.3	ศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง	76
2.5.7.4	ศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง	77
2.5.7.5	ศึกษาด้วยเทคนิคการไทเทรต	77
2.5.7.6	ศึกษาด้วยเทคนิคการวัดสี	78
2.5.7.7	ศึกษาด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน	78
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง		79
3.1	ผลการศึกษาการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	79

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.1 ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี	80
3.1.2 ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์	81
3.1.3 ผลการศึกษาขนาดรูปร่างของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	82
3.1.4 ผลการศึกษาการประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	83
3.1.5 ผลการศึกษากระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	84
3.2 ผลการศึกษาการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$	85
3.2.1 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี	85
3.2.2 ผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	87
3.2.3 ผลการศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี	88
3.2.4 ผลการศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี	89
3.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ	90
3.3.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า	91
3.3.2 ผลการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน	92

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้า ข้าวไฟฟ้าใช้งาน	93
3.3.4 ผลการศึกษาศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า	94
3.3.5 ผลการศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เกลือหนูนพอดเฟสบัฟเฟอร์	96
3.3.6 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์	97
3.3.7 ผลการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม	98
3.3.8 ผลการศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม	99
3.4 ผลการศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ใน ระบบปกติ	100
3.4.1 ผลการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์	100
3.4.2 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความ เข้มข้นต่ำสุด	102
3.4.3 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความ เข้มข้นต่ำสุด	102
3.4.4 ผลการศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์	103
3.4.5 ผลการศึกษาความแม่นยำของข้าวไฟฟ้า	103
3.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ใน ระบบการไหลอัตโนมัติ	104
3.5.1 ผลการศึกษาชนิดของข้าวไฟฟ้าทำงานต่อการให้สัญญาณการวิเคราะห์	104
3.5.2 ผลการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้า ข้าวไฟฟ้าใช้งาน	105
3.5.3 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้า ข้าวไฟฟ้าใช้งาน	106
3.5.4 ผลการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม	107
3.5.5 ผลการศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม	108
3.5.6 ผลการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม	109
3.5.7 ผลการศึกษาศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า	111
3.5.8 ผลการศึกษาศักยภาพความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา	112

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.9 ผลการศึกษาปริมาณการฉีดสารตัวอย่างที่เหมาะสม	113
3.6 ผลการศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	114
3.6.1 ผลการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์	114
3.6.2 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด	115
3.6.3 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด	116
3.6.4 ผลการศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์	116
3.6.5 ผลการศึกษาความแม่นยำของชีวไฟฟ้า	117
3.7 ผลการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชัน	117
3.7.1 ผลการศึกษาตัวรบกวนการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน	118
3.7.2 ผลการศึกษาปัจจัยการเจือจางตัวอย่าง	119
3.7.3 ผลการศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง	121
3.7.4 ผลการศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง	121
3.7.5 ผลการเปรียบเทียบการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและแบบการไหลอัตโนมัติ เทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต เทคนิคการวัดสี และเทคนิคโพเทนชิโอเมตรี ด้วยชีวไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน ด้วยสถิติ t-test	122
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	124
เอกสารอ้างอิง	126
ภาคผนวก	129
รูปภาพวิธีการทดลอง	130
ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ระหว่างไบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐาน	133
บทความเผยแพร่	134
ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผนไว้และผลของกิจกรรมที่ดำเนินการ	176

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมยางพาราเป็นอุตสาหกรรมที่มีการแข่งขันสูงในตลาด เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์จำนวนมากที่ทำมาจากยางพาราโดยตรง เช่น ถูมือ ถูยางอนามัย ลูกโป่ง โฟม กาว เป็นต้น น้ำยางธรรมชาติเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ มีทั้งน้ำตาล โปรตีน ฟอสโฟไลปิด และสารอื่นๆ สารเหล่านี้จะถูกทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย เกิดการบูดเน่าและแข็งตัว [1] ดังนั้นในกระบวนการเตรียมน้ำยางต้องมีการเติมสารละลายแอมโมเนียเพื่อรักษาสภาพของน้ำยาง โดยเติมให้อยู่ในระดับ 0.3% - 0.7% ต่อน้ำหนักน้ำยาง ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่ากระบวนการเตรียมน้ำยางชั้น เนื่องจากแอมโมเนียขัดขวางการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำยาง และด้วยความเป็นต่างของแอมโมเนีย จึงช่วยเพิ่มประจุลบรอบอนุภาคยางมากขึ้น ส่งเสริมสถานะเป็นของเหลวของน้ำยาง นอกจากนี้แอมโมเนียยังทำปฏิกิริยากับโลหะที่มีในน้ำยาง เช่น แมกนีเซียม ให้เป็นตะกอนของแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (Magnesium ammonium phosphate) ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถกำจัดโลหะที่อาจทำให้น้ำยางเสียสภาพได้ [2] อย่างไรก็ตามแอมโมเนียที่เติมมากเกินไปในน้ำยางทำให้น้ำยางมีความเสถียรจนเกินไป ส่งผลให้คุณภาพของน้ำยางต่ำลง รวมทั้งของเสียที่เกิดจากการเติมแอมโมเนียมากเกินไปจะถูกชะล้างและทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้

ดังนั้นการตรวจหาปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่จริงในน้ำยางชั้นก่อนและหลังนำเข้าสู่กระบวนการผลิตจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง รวมทั้งข้อมูลปริมาณของแอมโมเนียที่เกินจะต้องมีการกำจัดก่อนทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อลดมลพิษที่จะเกิดตามมา โดยพระราชบัญญัติส่งเสริมสุขภาพและสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2535 ระบุปริมาณแอมโมเนียปนเปื้อนในแหล่งน้ำผิวดินไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร [3]

วิธีวิเคราะห์แอมโมเนียในปัจจุบันตรวจวัดในรูปของแอมโมเนียมไอออน วิเคราะห์ด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method) เทียบกับสารละลายมาตรฐานโดยมีหลักการทำให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารละลายเนสเลอร์ (Nessler reagent) ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง*เมอคิวไรไโอไดด์* (HgI_2) และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ในสารละลายเบส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลือง [4] จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยการวัดสีหรือวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือวิเคราะห์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) จากข้อมูลวิเคราะห์นี้ ปฏิบัติใช้เวลาานเพื่อให้สารเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ต้นทุนการวิเคราะห์สูงเนื่องจากใช้สารเคมีหลายชนิด รวมทั้งเกิดของเสียที่มีความเป็นพิษสูงหลังการวิเคราะห์

ปัจจุบันไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) ได้ถูกนำมาใช้งานอย่างกว้างขวางกันมากในงานวินิจฉัยทางการแพทย์ การตรวจวัดทางสิ่งแวดล้อม กระบวนการแปรรูปอาหาร การตรวจวัดสารพิษในอาหาร รวมทั้งได้มีการนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆในน้ำยาง เป็นต้น

นอกจากนี้ระบบการวิเคราะห์การไหลอัตโนมัติหรือระบบฟลว์อินเจกชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis) ได้นำมาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยนี้ อาศัยการผสมสารด้วยระบบควบคุมอัตโนมัติทำให้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่องโดยควบคุมการไหลของสารละลายด้วยปั๊ม (Peristaltic pump) มีระบบ

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรคงที่เข้าไปในระบบการไหลแบบต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้สารเกิดปฏิกิริยาในระบบการไหลนั้นและเข้าสู่ตัวตรวจวัด (Detector) แล้วตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นที่เวลาคงที่ ทำให้การวิเคราะห์รวดเร็วขึ้น มีความแม่นยำสูง ไม่ต้องรอให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังลดปัญหาการใช้สารเคมีที่ราคาแพง ลดต้นทุนการวิเคราะห์ และลดปริมาณของเสียที่จะเกิดพิษจากการใช้สารเคมี

งานวิจัยนี้เพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงสารชีวภาพด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส วิเคราะห์แอมโมเนียมไอออนในระบบการตรวจวัดแบบแบท (Batch system) และศึกษาการวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ (Flow injection system) โดยเปลี่ยนจากการใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเป็นขั้วไฟฟ้าแบบฟิล์มสกรีนคาร์บอน การวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติมีประโยชน์ ทำให้ใช้สารเคมีในปริมาณน้อย ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ ลดต้นทุนการวิเคราะห์ รวมทั้งลดของเสียลงสู่สิ่งแวดล้อม เป็นต้น ความคาดหวังของงานวิจัยนี้คาดว่าจะนำไปสู่การสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่มีขนาดเล็ก พกพาไปใช้ในภาคสนามได้ มีความถูกต้องสูง ราคาถูก ใช้งานง่าย และไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการใช้งาน

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอย่างขึ้นด้วยระบบการวิเคราะห์แบบปกติ
 - 1.2.1.1 เพื่อสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$
 - 1.2.1.2 เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส
 - 1.2.1.3 เพื่อศึกษาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น
 - 1.2.1.4 เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ
 - 1.2.1.5 เพื่อประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอย่างขึ้น
- 1.2.2 เพื่อสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอย่างขึ้นด้วยระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ
 - 1.2.2.1 เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้าฟิล์มสกรีนคาร์บอนด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส
 - 1.2.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น
 - 1.2.2.3 เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ
 - 1.2.2.4 เพื่อประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น สำหรับตรวจวัดปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอย่างขึ้น
- 1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนด้วยไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดในระบบ

การวิเคราะห์แบบปกติ และระบบการไหลอัตโนมัติ กับเทคนิคมาตรฐาน ได้แก่ เทคนิคการไทเทรต (Titration method) เทคนิคการวัดสี (Spectrophotometric method) และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion selective electrode)

1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ ซึ่งไบโอเซนเซอร์ประกอบไปด้วยอุปกรณ์สองส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพ และส่วนของตัวแปลงสัญญาณ โดยขอกล่าวถึงความหมายของไบโอเซนเซอร์ ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์ และหลักการทำงาน ดังนี้

1.3.1 ความหมายของไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) [5] เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดทางชีวภาพ ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดหรือวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทั้งยังสามารถตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด เครื่องมือที่ใช้หลักการทำงานแบบไบโอเซนเซอร์ในปัจจุบันมีความหลากหลาย และใช้ประโยชน์ในหลายด้าน มีทั้งที่อยู่ในขั้นของงานวิจัยและในเชิงพาณิชย์ มีแนวโน้มพัฒนาให้มีขนาดเล็ก ใช้งานง่าย และพกพาสะดวก ตัวอย่างของเครื่องตรวจวัด ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้งานเชิงพาณิชย์ในปัจจุบัน

- เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งถือได้ว่าเป็นเครื่องมือแรกๆ ที่ผลักดันให้มีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์จนถึงปัจจุบัน
- เครื่องตรวจวัดสารอื่นๆ ในร่างกาย เช่น ยูเรีย ฮอร์โมน กรด-เบส เป็นต้น
- เครื่องตรวจวัดสารปนเปื้อนในน้ำ
- เครื่องตรวจแบคทีเรียในอากาศ
- เครื่องตรวจจับเชื้อโรค ไวรัส
- เครื่องตรวจวัดวิตามินในอาหาร
- เครื่องตรวจวัดปริมาณยาในอาหาร เช่น ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต สารเร่งเนื้อแดง
- เครื่องตรวจวัดโปรตีนในอุตสาหกรรม

1.3.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์

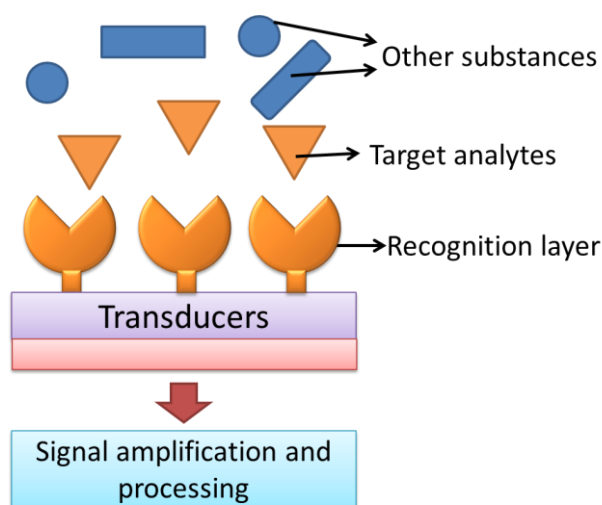
การทำงานของไบโอเซนเซอร์นั้นเริ่มจากการที่สารที่ต้องการวิเคราะห์เข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวภาพที่ตรึงบนผิวหน้าตัวแปลงสัญญาณ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกแปรเป็นสัญญาณที่ตัวแปลงสัญญาณ ตัวแปลงสัญญาณเป็นอุปกรณ์ทางไฟฟ้าที่ทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นให้เป็น

สัญญาณที่อ่านค่าออกมาได้ สัญญาณวิเคราะห์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และถูกนำไปดำเนินการต่อเพื่อแสดงผลออกมา มีขั้นตอนการทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ [6]

ขั้นตอนแรก ทำการตรึงสารชีวภาพเข้ากับตัวแปลงสัญญาณเพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องการวิเคราะห์

ขั้นตอนที่สอง นำไบโอเซนเซอร์ที่ได้มาทำการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในขั้นตอนนี้สารที่ต้องการวิเคราะห์จะจับกับไบโอเซนเซอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะเจาะจงตรงส่วนของสารชีวภาพที่ตรึงอยู่บนไบโอเซนเซอร์ เรียกขั้นตอนนี้ว่า กลไกการจดจำทางชีวภาพ (Biological recognition mechanism) จากการเข้าจับกันนี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีก่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์หรือสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวแปลงสัญญาณที่เหมาะสมกับชนิดและรูปของสัญญาณนั้นๆ โดยมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะ (Indicated signal) ซึ่งอาจเป็นอิเล็กตรอน แสง และอื่นๆ เข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ

ขั้นตอนที่สาม ตัวแปลงสัญญาณจะรับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเครื่องอ่านสัญญาณออกมา ทำให้สามารถอ่านค่าได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า เทคนิคการรับและแปลงสัญญาณทางกายภาพ (Physical transduction technique) และเมื่ออ่านค่าได้ก็ทำให้ทราบว่าสารที่วิเคราะห์นั้นเป็นสารใด กลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ [7]

พบว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวภาพที่บริเวณแอคทีฟไซต์ (Active sites) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา สามารถตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้แก่ สารที่เป็นตัวกลางทางไฟฟ้า ปริมาณไฮโดรเจนไอออน ความร้อน แสงที่เกิดขึ้น และมวลที่เปลี่ยนแปลง เป็นต้น ซึ่งสัญญาณที่เกิดขึ้นสามารถใช้ตัวแปลงสัญญาณที่เหมาะสมตรวจวัดออกมา โดยตัวแปลงสัญญาณจะทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเป็นสัญญาณที่แสดงค่าออกมา

จากหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ จึงทำให้มีกลุ่มงานวิจัยหลายกลุ่มได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์และเป็นประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ดังนี้ [6]

1. ด้านการแพทย์ การใช้ประโยชน์ไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสิ่งมีชีวิต ไบโอเซนเซอร์สามารถติดตามระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่จำเป็นต้องเจาะเลือดคนไข้ และที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้แอนติบอดีเป็นสารชีวภาพในการตรวจวัด เรียกว่า อิมมูโนเซนเซอร์ ได้นำมาใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์ เช่น การตรวจวัดสารก่อมะเร็งที่สามารถวัดความผิดปกติของสารพันธุกรรมในร่างกาย ซึ่งเป็นสัญญาณแรกที่ยกย่องการเกิดโรคทำให้การตรวจรักษาโรคต่างๆ อย่างทันท่วงทีในระยะต้นของโรค

2. ด้านการอุตสาหกรรม ไบโอเซนเซอร์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมหมัก และอุตสาหกรรมการยาง ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวัดและควบคุมอัตโนมัติเพื่อติดตามข้อมูลได้อย่างรวดเร็วในระหว่างการผลิตเพื่อให้กระบวนการผลิตดำเนินไปในทิศทางที่ต้องการและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ การตรวจวัดทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การตรวจวัดสารปนเปื้อนหรือสารพิษในวัตถุดิบ รวมทั้งสารปรุงแต่งในอาหารด้วย ส่วนการใช้ไบโอเซนเซอร์ในอุตสาหกรรมหมัก มักจะนำมาใช้ตรวจวัดปริมาณแลคเตทเพื่อควบคุมคุณภาพของไวน์และโยเกิร์ต หรือการตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนต่างๆ รวมทั้งการควบคุมกระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น

3. ด้านสิ่งแวดล้อม การประยุกต์ใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม นิยมพัฒนาขึ้นมาให้สามารถนำมาใช้งานในภาคสนามได้ มีขนาดเล็กและสามารถส่งข้อมูลออนไลน์ (On-line) ได้ เช่น ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนหรือไนเตรทในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียไว้ที่ส่วนหัววัดแล้วปิดผิวหน้าของหัววัดด้วยเยื่อเมมเบรน เมื่อไนโตรเจนหรือไนเตรทไอออนแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรน แบคทีเรียจะเปลี่ยนไอออนดังกล่าวให้กลายเป็นไนตรัสออกไซด์ ที่สามารถตรวจวัดทางเคมีได้ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในการตรวจวัดค่าบีโอดี (BOD) ของน้ำ ตรวจวัดสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น สารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น

1.3.3 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพ (Biological substance or recognition layer) และตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) [8] ตารางที่ 1.1 แสดงชนิดของสารชีวภาพที่นำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์และลักษณะของสารชีวะ (Biocatalytic component) ซึ่งจากลักษณะของสัญญาณที่เกิดขึ้นสามารถนำมาใช้ในการเลือกตัวแปลงสัญญาณให้เหมาะสมกับสัญญาณชีวะที่ต้องการตรวจวัด เช่น ถ้าสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นแสง ใช้ตัวแปลงสัญญาณที่เรียกว่า ออปโตอิเล็กทรอนิกส์ (Optoelectronics) เป็นต้น

ตารางที่ 1.1 ชนิดของสารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณที่ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ [8]

สารชีวภาพ	สัญญาณชี้นำ	ระบบการตรวจวัด	ตัวแปลงสัญญาณ
เอนไซม์	อิเล็กตรอน	แอมเพอโรเมตริก (Amperometric)	ขั้วไฟฟ้าชนิดต่างๆ เช่น ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส
เซลล์จุลินทรีย์	ไอออน แก๊ส	โพเทนชิโอเมตริก (Potentiometric)	ขั้วไฟฟ้าซึ่งออกแบบเฉพาะไอออน (ISE) ขั้วไฟฟ้าเยื่อแลกเปลี่ยนแก๊ส (Gas sensing electrode)
เซลล์เนื้อเยื่อพืช	ความร้อน	คาร์โลรีเมตรี (Calorimetric)	เทอร์มิสเตอร์ (Thermistor)
เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์	แสง	ออปติคัล (Optical)	ออปโตอิเล็กทรอนิกส์ (Optoelectronics)
แอนติเจน	มวล	วัดการเปลี่ยนแปลง มวล (Mass change)	พียโซอิเล็กทริกคริสตัล (Piezoelectric crystal)
แอนติบอดี			
สารรีเซปเตอร์			

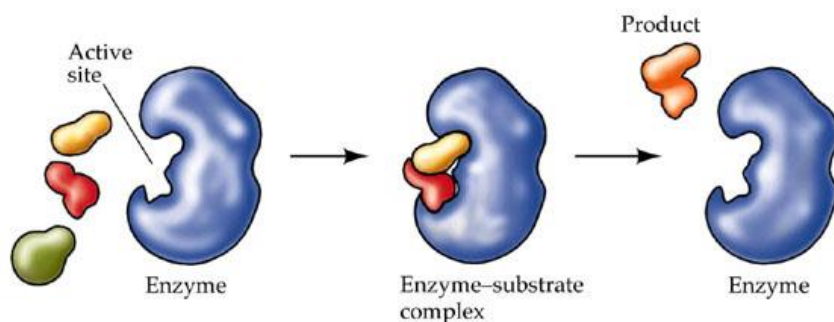
1.3.3.1 สารชีวภาพ

สารชีวภาพที่นำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์จะต้องเป็นวัสดุหรือสารที่มีความไวทางชีวภาพ ทำหน้าที่จับหรือทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เท่านั้น และทำให้เกิดสัญญาณชี้นำที่สามารถแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าโดยตัวแปลงสัญญาณ สารชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 ชนิด [8] คือ

1.3.3.1.1 เอนไซม์

เอนไซม์ (Enzyme) [8] เป็นสารประกอบอินทรีย์โปรตีนลักษณะก้อน (Globular protein) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งในสิ่งมีชีวิตและในหลอดทดลอง ปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เข้าร่วมจะเกิดขึ้นได้ช้าลง ในทางตรงกันข้าม หากปฏิกิริยานั้นมีเอนไซม์เข้าร่วมจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นได้ถึง 10^7 เท่า โดยปกติแล้วเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง (อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศและพีเอชเป็นกลาง) ซึ่งต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีที่จะเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะอุณหภูมิหรือความดันสูง หรือสภาวะที่เป็นกรดหรือเบสสูง บริเวณผิวของเอนไซม์จะมีบริเวณหนึ่งที่มีลักษณะเป็นโพรง (Pocket) หรือร่อง (Claft) บริเวณนี้เรียกว่า บริเวณแอคทีฟหรือบริเวณเร่ง (Active site) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเรสซิดิว (Amino acid residue) ชนิดต่างๆ บริเวณนี้ยังแบ่งเป็นบริเวณจำเพาะเพื่อจับกับสารโมเลกุลต่างๆ เช่น บริเวณจับกับซับสเตรต (Substrate binding site) รวมทั้งบริเวณจับกับโคแฟกเตอร์อีกด้วย ซับสเตรตจะจับกับเอนไซม์ที่บริเวณจับกับซับสเตรต โดยอาศัยแรงต่างๆ เช่น แรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic forces) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waal's force) พันธะไอออน (Ionic or electrostatic bond) และพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) เมื่อซับสเตรตเข้าจับที่บริเวณเร่งเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต (Enzyme-substrate complex) ดังรูปที่ 1.2 จะ

มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของซับสเตรต โดยกรดอะมิโนเรซิดิวที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับซับสเตรตนั้นๆ จะใช้หมู่ฟังก์ชันจับกับซับสเตรต ทำให้เกิดการสร้างพันธะขึ้นมาใหม่ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในสภาวะเปลี่ยน (Transition state) เรียกหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนเรซิดิวนี้ว่า หมู่แคทาลิติก (Catalytic group) และเรียกบริเวณที่หมู่แคทาลิติกทำปฏิกิริยานี้ว่า บริเวณแคทาลิติก (Catalytic site) หลังการเกิดปฏิกิริยาที่บริเวณเร่ง จะได้ผลิตภัณฑ์และเอนไซม์อิสระซึ่งสามารถเข้าจับกับซับสเตรตโมเลกุลใหม่และเริ่มวัฏจักรของการเร่งอีกครั้งหนึ่ง



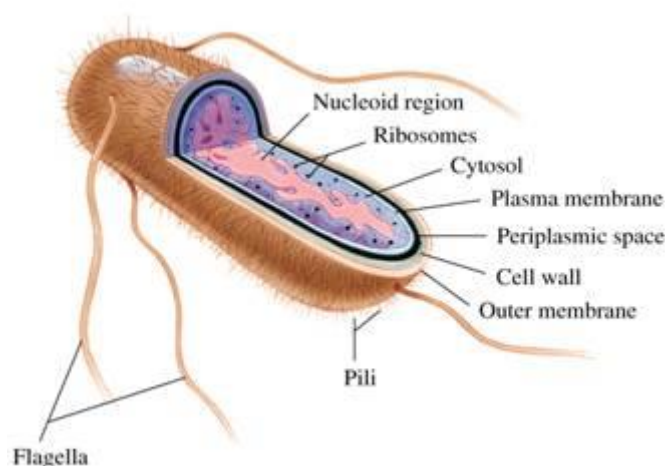
รูปที่ 1.2 การทำงานของเอนไซม์ [9]

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่ต้องการวิเคราะห์และมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นซึ่งถูกตรวจวัดด้วยตัวแปลงสัญญาณที่เหมาะสม โดยเอนไซม์อาจถูกตรึงอยู่บนตัวแปลงสัญญาณ เช่น พีเอชอิเล็กโทรด (pH electrode) หรือออกซิเจนอิเล็กโทรด โดยตรง หรืออาจถูกตรึงอยู่บนตัวยึดเกาะอื่น (Supporting material) เช่น แผ่นเยื่อบาง (Membrane) โดยวิธีดูดซับหรือเกาะ แล้วจึงนำแผ่นเยื่อบางนี้ไปเกาะยึดกับตัวแปลงสัญญาณอีกครั้งหนึ่ง เอนไซม์ที่ใช้อาจเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ เช่น การใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในการหาปริมาณกลูโคส การใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับเอนไซม์มีตาโรเทส และเอนไซม์อินเวอร์เทสในการหาปริมาณซูโครส

1.3.3.1.2 เซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์

เซลล์ (Cell) [8] คือหน่วยเล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต โดยเซลล์มาจากคำว่า Cella ในภาษาละติน ซึ่งมีความหมายว่าห้องเล็กๆ เซลล์มีอยู่หลายชนิดซึ่งมีรูปร่างและลักษณะที่แตกต่างกันไปตามตำแหน่งที่อยู่ของเซลล์และหน้าที่การทำงาน เซลล์มีโครงสร้างที่สำคัญอยู่ 3 ส่วนที่เหมือนกัน คือ เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ไซโตพลาซึม (Cytoplasm) และนิวเคลียส (Nucleus) โดยเยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์และกั้นเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ภายในเซลล์มีโครงสร้างเล็กๆ เรียกว่า ออร์แกเนลล์ (Organelle) ล่องลอยอยู่ในส่วนของเหลวที่เรียกว่า ไซโตซอล (Cytosol) และมีนิวเคลียส (Nucleus) เป็นศูนย์กลางควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ต่างๆ และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม โครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ ดังรูปที่ 1.3

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์นั้น เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ในเซลล์จุลินทรีย์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ การใช้เซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์อาจมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกจากเซลล์จุลินทรีย์ คือไม่ต้องเสียเวลาในการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์บางชนิดอาจต้องการตัวร่วม (Cofactor) เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งในเซลล์จุลินทรีย์จะมีตัวร่วมอยู่แล้ว ต่างจากกรณีของเอนไซม์ที่แยกออกมาซึ่งจำเป็นต้องเติมตัวร่วมลงไป ตัวอย่างเช่น การใช้ไอโคไลหาปริมาณของยาปฏิชีวนะจำพวกเตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (Tetracycline hydrochloride) สเตปโตไมซิน (Streptomycin) และนีโอมายซิน (Neomycin) นอกจากการใช้เซลล์จุลินทรีย์แล้ว เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์สามารถนำมาใช้เป็นสารชีวภาพได้ เช่น การใช้เนื้อเยื่อของเอลลีลสควอช (Yellow squash) หาปริมาณของกลูตาเมต

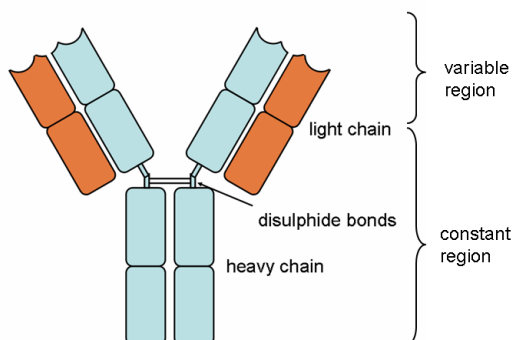


รูปที่ 1.3 โครงสร้างของเซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์ [10]

1.3.3.1.3 สารต่อต้าน หรือแอนติบอดี (Antibody)

สารต่อต้านหรือแอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) [8] เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่นๆ สร้างขึ้น มีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรียและไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันคือ แอนติเจน (Antigen) การใช้สารต่อต้านหรือตัวรับเป็นสารชีวภาพอาศัยหลักการจับกันระหว่างสารต่อต้านกับแอนติเจน และตัวรับลิแกนด์ (Ligand) การจับกันนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในมวลหรือความถี่ ที่สามารถตรวจจับได้โดยตัวแปลงสัญญาณ สารชีวภาพที่ใช้เป็นตัวรับอาจเป็นโปรตีนหรือสารประกอบของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ที่จะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับลิแกนด์ ซึ่งในที่นี้เป็นได้ทั้งสารโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอะมิโน สเตอรอยด์ หรือสารโมเลกุลใหญ่ เช่น เปปไทด์ โปรตีน หรือไวรัส ตัวอย่างของตัวรับ เช่น อะเซทิลโคลีน รีเซปเตอร์ (Acetylcholine receptor) ที่จับกับอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine) โครงสร้างของสารต่อต้านมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y) ดังรูปที่ 1.4 ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 4 เส้น คือ เส้นหนักสองเส้น (Heavy chains) และเส้นเบาสองเส้น (Light chains) ทั้งสี่เส้นจะ

ประกอบด้วย Constant regions ซึ่งเป็นส่วนที่บ่งบอกถึงชนิดของสารต่อต้าน และอีกส่วนหนึ่งจะเรียกว่า Variable regions ซึ่งเป็นส่วนที่สารต่อต้านใช้ในการจับกับแอนติเจน



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของแอนติบอดี [11]

1.3.3.2 ตัวแปลงสัญญาณ

ตัวแปลงสัญญาณเป็นส่วนสำคัญที่ทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาหรือการจับกันระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ตัวแปลงสัญญาณที่ดีจะต้องมีความจำเพาะหรือคัดเลือกชนิดของสัญญาณได้ดี และมีความว่องไว รวมถึงสามารถตอบสนองได้ในช่วงปริมาณของสัญญาณขึ้นำเกิดขึ้นอย่างเหมาะสม ชนิดของตัวแปลงสัญญาณที่นิยมนำมาสร้างไบโอเซนเซอร์ [8] มีดังนี้

1.3.3.2.1 โปเทนชิโอเมตริก ทรานสดิวเซอร์ (Potentiometric transducer)

ตัวแปลงสัญญาณแบบโพเทนชิโอเมตริกจะทำงานภายใต้สภาวะสมดุล โดยวัดความหนาแน่นของประจุที่ใช้เป็นสัญญาณขึ้นำที่สะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า จึงต้องมีการควบคุมการคัดเลือกเฉพาะไอออนหรือแก๊สที่ต้องการวัด ตัวแปลงสัญญาณที่รู้จักกันดีและนำมาใช้งานด้านไบโอเซนเซอร์ คือ ขั้วไฟฟ้าขับเคลื่อนเฉพาะไอออน (Ion-selective electrode, ISE) ซึ่งเป็นขั้วไฟฟ้าที่ไว และคัดเลือกหรือเจาะจงเฉพาะไอออนเท่านั้น โดยมีแผ่นเยื่อทำหน้าที่คัดเลือกเฉพาะสารขึ้นำชนิดหนึ่งๆ เช่น พีเอซีอีเล็กโทรด มีชั้นเยื่อที่เป็นแก้ว (Glass membrane) คัดเลือกเฉพาะโปรตอน (H^+) ประจุของไอออนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน เมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง โดยศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไอออนในสภาวะสมดุล

1.3.3.2.2 แอมเพโรเมตริก ทรานสดิวเซอร์ (Amperometric transducer)

ตัวแปลงสัญญาณแบบแอมเพโรเมตริกอาศัยกระแสที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณขึ้นำ โดยวัดในรูปของกระแสไฟฟ้า แหล่งที่มาของกระแสไฟฟ้าเป็นผลมาจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากสารตัวอย่างเข้าสู่ขั้วไฟฟ้า อิเล็กตรอนเกิดจากผลของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน โดยการเร่งปฏิกิริยาของ

เอนไซม์ การถ่ายทอดอิเล็กตรอนเข้าสู่ตัวไฟฟ้าและขนาดของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของอิเล็กตรอนหรือสารตัวอย่าง

1.3.3.2.3 ออปติคัล ทรานสดิวเซอร์ (Optical transducer)

ทำงานโดยอาศัยสมบัติทางแสง ได้แก่ การดูดกลืนแสง การผ่านของแสง การสะท้อน และการเรืองแสง ตัวอย่างเช่น เครื่องตรวจวัดสีย้อมที่ไวต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH sensitive dye) ซึ่งเป็นเครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีหัววัดขนาดเล็กมาก หัววัดนี้ทำงานโดยนำเอาสารที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง มาตรึงที่ปลายหัววัดที่เป็นออปติกไฟเบอร์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง สารเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี ทำให้สมบัติทางแสงจากแหล่งกำเนิดเปลี่ยนไปสามารถตรวจจับได้โดยตัวตรวจจับ (Detector) ซึ่งจะนำไปหาค่าความเป็นกรด-ด่างต่อไป นอกจากนี้พีเอชเซนซิทีฟดาย ก็มีเครื่องมือที่ใช้ในการหาปริมาณแก๊สพิษ คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และไอออนของโลหะหนัก

1.3.3.2.4 พิโซอิเล็กทริกคริสตัล ทรานสดิวเซอร์ (Piezoelectric crystal transducer)

พิโซอิเล็กทริกคริสตัลทำงานโดยอาศัยสมบัติที่เป็นพิโซอิเล็กทริกซิตี (Piezoelectricity) ของผลึก กล่าวคือ เมื่อมีแรงกลมากระทำต่อผลึก ทำให้เกิดอิเล็กทริกไดโพล (Electric dipoles) เป็นผลให้เกิดความต่างศักย์หรือไดโพลโมเมนต์ (Dipole moment) ขึ้น ผลสุดท้ายที่เกิดขึ้นคือการสั่น (Oscillate) ทำให้เกิดความถี่ที่ตรวจจับได้โดยเครื่องตรวจวัดความถี่ (Frequency counter) ตัวอย่างของผลึกที่เป็นพิโซอิเล็กทริกซิตี เช่น ควอตซ์ ทัวร์มาลีน (Tourmaline) โรเชลซอลท์ (Rochelle salt) เซรามิก และโพลิเมอร์บางชนิด เมื่อนำสารชีวภาพที่มีความจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเคลือบบนผิวหน้าพิโซอิเล็กทริกคริสตัล ปฏิกริยาระหว่างสารชีวภาพกับตัวอย่างที่เกิดขึ้น จะได้ผลิตภัณฑ์หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงมวล ทำให้ค่าความถี่เปลี่ยนแปลงไป จากหลักการนี้จึงนำเอาพิโซอิเล็กทริกคริสตัลมาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารได้

1.3.3.2.5 ตัวแปลงสัญญาณชนิดอื่นๆ

การเลือกชนิดของตัวแปลงสัญญาณที่จะนำมาใช้กับสารชีวภาพ จะต้องดูที่ชนิดของผลิตภัณฑ์หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จากปฏิกริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ นอกเหนือจากไอออน แก๊ส อิเล็กตรอน หรือสมบัติทางแสงที่สามารถตรวจสอบโดยตัวแปลงสัญญาณแบบต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์ เช่น ความร้อนที่เกิดจากปฏิกริยาชีวเคมี ในกรณีดังกล่าว ตัวแปลงสัญญาณที่ใช้จะเป็นเทอร์มิสเตอร์ (Thermistor) ซึ่งใช้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือความร้อนเป็นตัววัดถึงปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สารชีวภาพที่ใช้กับตัวแปลงสัญญาณอาจเป็นเอนไซม์หรือเซลล์จุลินทรีย์

นอกจากนี้ยังมีสารหลายชนิดที่เมื่ออยู่ในสภาวะปกติมีสภาพการนำไฟฟ้าเป็นกลาง เมื่อเกิดปฏิกริยาจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวนำไฟฟ้า เช่น ยูเรีย เมื่อนำยูรีนไปทำปฏิกริยากับเอนไซม์ยูรีเอสจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารไอออนนิค (NH_4^+ , HCO_3^-) ที่นำไฟฟ้าได้ การเปลี่ยนแปลงการนำไฟฟ้าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์

จึงใช้การนำไฟฟ้าเป็นตัวชี้ปริมาณสารที่ต้องการวัดได้ ตัวแปลงสัญญาณที่ใช้ เรียกว่า คอนดักติมิเตอร์ (Conductimeter)

ประโยชน์ของโปโอเซนเซอร์ส่วนมากแล้วเกิดจากความจำเพาะเจาะจงที่ดีของสารทางชีวภาพ งานวิจัยหลายกลุ่มได้ใช้สารทางชีวภาพจำพวกเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับซับสเตรต ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการสร้างโปโอเซนเซอร์ เช่น เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส เอนไซม์กลูตาเมทออกซิเดส ใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูตาเมท เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณแอลกอฮอล์ เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้ได้ใช้สารทางชีวภาพ คือ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไอออนและตัวแปลงสัญญาณแบบแอมเพอโรเมตริก จะขอกล่าวถึงความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และชนิดของเอนไซม์ ในลำดับต่อไป

1.3.4 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง (High specificity) [12] ทั้งต่อชนิดของซับสเตรต ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและปฏิกิริยาเคมีที่เข้าร่วม ทำให้เอนไซม์ชนิดหนึ่งมักเร่งปฏิกิริยาเดียวหรือหลายปฏิกิริยาต่อเนื่องกัน ความจำเพาะของเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

1.3.4.1 ความจำเพาะต่อประเภทของปฏิกิริยา (Reaction specificity)

เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น เช่น เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์ทรานซามิเนส จะเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (Dehydrogenation) ของแอลกอฮอล์ และเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนระหว่างกรดอะมิโนและกรดคีโต ตามลำดับ ดังสมการที่ 1



1.3.4.2 ความจำเพาะต่อซับสเตรต (Substrate specificity)

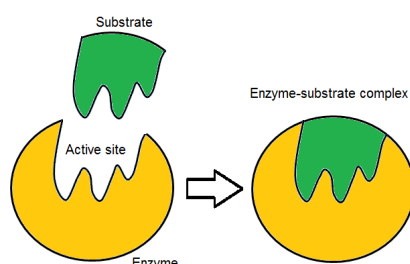
เอนไซม์มีความจำเพาะที่จะเร่งปฏิกิริยาที่มีซับสเตรตบางชนิด ทำให้เร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าการใช้ซับสเตรตชนิดอื่น เช่น เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส สามารถออกซิไดซ์ (Oxidized) แอลกอฮอล์ชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นพิเศษ หรือเอนไซม์ทรานซามิเนสชนิดหนึ่งๆ อาจเร่งปฏิกิริยาที่มีกรดอะมิโนและกรดคีโต ชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ ความจำเพาะต่อซับสเตรตนี้จะมีทั้งแบบจำเพาะมาก เช่น กรณีของเอนไซม์ยูรีเอส และแบบจำเพาะน้อย เช่น เอนไซม์เฮกโซไคเนส

เอนไซม์บางประเภทมีความจำเพาะต่อซับสเตรตที่มีลักษณะเป็นโครงสร้างเคมีสเตอริโอ (Stereochemical specificity) ซับสเตรตมีโครงสร้างได้ 2 แบบที่เป็นสเตอริโอไอโซเมอร์ (Stereoisomer) ซึ่งกันและกัน โดยที่ทั้งสองไอโซเมอร์นี้มีสมบัติทางเคมีเหมือนกันทุกประการ จะต่างกันแค่การจัดเรียงอะตอมในโครงสร้างเท่านั้น พบว่าเอนไซม์จะสามารถใช้ไอโซเมอร์ใดไอโซเมอร์หนึ่งเท่านั้นเป็นซับสเตรต เช่น เอนไซม์อะมิโนเอซิดออกซิเดสชนิดแอล (L-amino acid oxidase) จะใช้แค่กรดอะมิโนไอโซเมอร์แอล (L-

form) เท่านั้นเป็นซับสเตรตโดยจะไม่สามารถใช้กรดอะมิโนไอโซเมอร์ชนิดดี (D-form) ได้เลย หรือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) จะใช้ซับสเตรตได้เฉพาะกลูโคสไอโซเมอร์ดี (D-glucose) เท่านั้น จะไม่สามารถใช้น้ำตาลตัวอื่นๆ ได้เลย รวมทั้งเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) ที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายโปรตอนจากซับสเตรตสู่วงแหวนนิโคตินาไมด์ (Nicotinamide ring) เช่น เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนส เป็นต้น

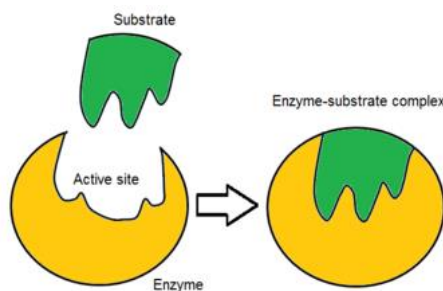
ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์สามารถอธิบายได้จากการจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต เพื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต มีอยู่ 2 สมมุติฐาน คือ

1. สมมุติฐานแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (Lock and key theory) ใน ค.ศ. 1894 อีมิล ฟิชเชอร์ (Emil Fischer) อธิบายว่า การที่เอนไซม์มีความจำเพาะกับซับสเตรตนั้น เนื่องจากซับสเตรตและบริเวณเร่งของเอนไซม์มีโครงสร้างจับกันได้พอดี เปรียบได้เช่นเดียวกับความพอดีของแม่กุญแจและลูกกุญแจ นั่นคือ โครงสร้างของทั้งซับสเตรตและเอนไซม์จะคงตัว ไม่เปลี่ยนแปลง และมีการเข้าสู่สัมผัส ซึ่งส่งเสริมให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้อย่างสมบูรณ์เมื่อมีการจับกันในตำแหน่งที่ถูกต้อง ดังรูปที่ 1.5 อย่างไรก็ตาม สมมุติฐานนี้ไม่สามารถอธิบายการผันกลับของปฏิกิริยานี้ได้ (Reversibility) เนื่องจากผลิตภัณฑ์จะไม่สามารถรวมกับบริเวณเร่งได้เพราะโครงสร้างต่างจากซับสเตรต



รูปที่ 1.5 การจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต ตามสมมุติฐานแม่กุญแจและลูกกุญแจ [13]

2. สมมุติฐานการเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (Induced-fit hypothesis) ใน ค.ศ. 1958 ดี อี โคชแลนด์ (D.E. Koshland) อธิบายว่า ซับสเตรตที่เข้าจับกับเอนไซม์สามารถเหนี่ยวนำให้บริเวณเร่งเปลี่ยนแปลงโครงรูป เพื่อให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตดีขึ้น ดังรูปที่ 1.6 นอกจากเอนไซม์จะปรับเปลี่ยนโครงรูปได้แล้ว ซับสเตรตยังสามารถเปลี่ยนโครงรูปเพื่อให้จับได้พอดีกับบริเวณเร่ง สารที่ไม่ใช่ซับสเตรตแต่มีลักษณะคล้ายกับซับสเตรตจึงสามารถเข้าจับที่บริเวณเร่งได้ แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงรูปที่เหมาะสม ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ สมมุติฐานนี้สามารถใช้อธิบายได้กว้างกว่าสมมุติฐานแรก เพราะแสดงถึงความยืดหยุ่นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น การจับกันระหว่างกลูโคสและเอนไซม์เฮกโซไคเนส (Hexokinase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกลูโคส ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาแรกในไกลโคไลซิส พบว่าถ้าไม่มีกลูโคส เอนไซม์จะมีโครงรูปเป็นตัวยู (U-shape structure) แต่เมื่อกกลูโคสเข้าจับกับเอนไซม์ จะเกิดการเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปให้เข้ากันได้พอดี



รูปที่ 1.6 การจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต ตามสมมุติฐานการเหนี่ยวนำให้เหมาะสม [14]

นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีประสิทธิภาพสูง (High efficiency) สามารถใช้ในปริมาณน้อยเพื่อเร่งปฏิกิริยา และสามารถกลับสู่สภาพเดิมหลังการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์จะลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา เมื่อเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นหรือซับสเตรต จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น ทำให้สารตั้งต้นเกิดการสลายหรือสร้างพันธะแล้วเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้เอนไซม์กลับคืนมา หลังจากเอนไซม์เปลี่ยนซับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว เอนไซม์โมเลกุลนั้นสามารถหมุนเวียนกลับมาเปลี่ยนซับสเตรตโมเลกุลต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้อีก โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์สามารถเปลี่ยนโมเลกุลของซับสเตรต 100-1,000 โมเลกุลไปเป็นผลิตภัณฑ์ภายในเวลา 1 วินาที ตัวอย่างเช่น คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) จำนวน 1 โมเลกุล สามารถหมุนเวียนซับสเตรตได้ถึง 36 ล้านโมเลกุล เพื่อเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ภายในเวลา 1 นาที จำนวนโมเลกุลของซับสเตรตที่ถูกเร่งต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ต่อ 1 หน่วยเวลานี้ เรียกว่า จำนวนหมุนเวียน หรือเทิร์นโอเวอร์นัมเบอร์ (Turnover number, k_{cat})

1.3.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ปัจจัยที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดี เช่น ความเข้มข้นของซับสเตรต ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเป็นกรด-เบสของสารละลาย อุณหภูมิ เป็นต้น อธิบายได้ดังนี้ [15]

1. ความเข้มข้นของซับสเตรต อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซับสเตรต จนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด แต่หากความเข้มข้นของซับสเตรตมากเกินไปก็อาจทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาลดลง
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ ในสภาวะที่ความเข้มข้นของซับสเตรต ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และบัฟเฟอร์ที่ใช้คงที่ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ความเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มขึ้นด้วย แต่จะต้องไม่มีสารยับยั้งเอนไซม์ปนอยู่
3. ผลของความเป็นกรด-เบสของสารละลาย การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายจะส่งผลต่อประจุบนโปรตีน ทำให้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะที่บริเวณแอคทีฟไซต์ ซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์เข้าจับกับซับสเตรต จึงต้องการค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่เหมาะสม

4. ผลของอุณหภูมิ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะแปรผันตามอุณหภูมิ หากสูงเกินไปก็จะทำให้โปรตีนเสียสภาพและทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเสียไป เพราะโครงสร้างบริเวณแอคทีฟไซต์เสียสภาพ ส่วนมากอุณหภูมิจะคงตัวอยู่ที่ประมาณ 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส

จากที่กล่าวมา เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เหมาะสม ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์จะเสียสภาพในสภาวะที่ไม่เหมาะสมทำให้ไม่สามารถทำงานได้ เอนไซม์จะเกิดการเสื่อมสภาพ (Denaturation) เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนทำให้ซับสเตรตเข้ารวมกับเอนไซม์ที่บริเวณแอคทีฟไซต์ไม่ได้ ทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นเปลี่ยนไป นั่นคือเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่สามารถใช้งานได้อีก เช่น กรณีที่เอนไซม์ได้รับอุณหภูมิสูง เนื่องจากว่าอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการสร้างพันธะโคเวเลนต์ระหว่างลูกโซ่โพลีเพปไทด์ และพันธะมีความคงตัวมากเป็นผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้และสูญเสียสภาพ ดังนั้นในงานวิจัยจึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานดีที่สุดและไม่เสื่อมสภาพ

1.3.6 การตั้งชื่อและการจัดจำแนกของเอนไซม์

การเรียกชื่อเอนไซม์โดยทั่วไปหรือชื่อสามัญ (Trivial name) [16] นิยมนำชื่อของซับสเตรตมาต่อท้ายด้วยคำว่า ‘-เอส’ (-ase) เช่น แอมิเลส (Amylase) แล็กเทส (Lactase) เซลลูเลส (Cellulase) ยกเว้นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) จะลงท้ายด้วยคำว่า ‘-อิน’ (-in) เช่น ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymo-trypsin) แต่ต่อมาใน ค.ศ. 1984 คณะกรรมาธิการเอนไซม์นานาชาติ (The enzyme commission, EC) ได้จัดระบบการจำแนกเอนไซม์ออกเป็น 6 กลุ่มตามชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเข้าทำปฏิกิริยา คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductases) กลุ่มที่ 2 กลุ่มทรานเฟอร์เรส (Transferases) กลุ่มที่ 3 กลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolases) กลุ่มที่ 4 กลุ่มไลเอส (Lyases) กลุ่มที่ 5 กลุ่มไอโซเมอเรส (Isomerases) และกลุ่มที่ 6 กลุ่มไลเกส (Ligases) และได้กำหนดการเรียกชื่อของเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสากลว่าชื่อตามระบบ (Systematic name) นอกจากนี้ยังได้กำหนดให้แต่ละเอนไซม์มีหมายเลขรหัสหรือหมายเลขอีซี (EC number) ซึ่งขึ้นต้นด้วย EC ตามด้วยตัวเลข 4 ชุด แต่ละชุดจะแยกจากกันด้วยจุด ชื่อของเอนไซม์แบบตัวเลขนี้ เรียกว่า ชื่อตามระบบตัวเลข (Number name) ตัวเลขทั้ง 4 ชุดมีความหมาย ดังนี้

- ตัวเลขชุดที่ 1 บอกให้ทราบว่าเอนไซม์นั้นอยู่ในกลุ่มใดของเอนไซม์ทั้ง 6 กลุ่ม
- ตัวเลขชุดที่ 2 บอกให้ทราบถึงกลุ่มย่อย (Subclass)
- ตัวเลขชุดที่ 3 แสดงกลุ่มย่อยภายในกลุ่มย่อยของตัวเลขชุดที่ 2 (Sub-subclass)
- ตัวเลขชุดที่ 4 เป็นอันดับของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยของตัวเลขชุดที่ 3

1.3.6.1 กลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductases)

เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมของไฮโดรเจน อะตอมของออกซิเจน หรืออิเล็กตรอนจากซับสเตรตตัวหนึ่ง (ซึ่งมักเป็นเอนไซม์หรืออาจเป็นออกซิเจนก็ได้) ไปยังซับสเตรตอีกตัวหนึ่ง

(ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน) ในการแบ่งกลุ่มย่อยมักแบ่งตามประเภทของซับสเตรต ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจน

ตัวอย่างเช่น เอนไซม์แลคเตส ดีไฮโดรจีเนส (Lactase dehydrogenase) (EC 1.1.1.27) มีชื่อเต็มตามระบบว่า (S) - lactase : NAD⁺ oxidoreductase แสดงว่ามีตัวให้อิเล็กตรอนคือ (S) - lactase และมีตัวรับอิเล็กตรอนคือ NAD⁺ จากชื่อจะเห็นว่าซับสเตรตเป็น L- lactase ดังสมการที่ 2

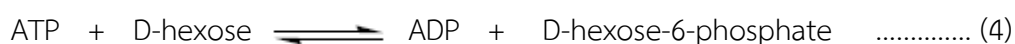


1.3.6.2 กลุ่มทรานเฟอเรส (Transfereases)

เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมหรือหมู่ (ที่ไม่ใช่โปรตอน) ที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลสองโมเลกุล โดยมากจะเคลื่อนย้ายจากซับสเตรตตัวหนึ่งไปยังซับสเตรตตัวรับที่ไม่ใช่ตัวน้ำ ดังสมการที่ 3 สำหรับการแบ่งกลุ่มย่อยมักแบ่งตามชนิดของหมู่เคมีที่ถูกโยกย้าย



ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เฮกโซไคเนส (Hexokinase) (EC 2.7.1.1) มีชื่อเต็มตามระบบว่า ATP : D-hexose-6-phosphotransferase แสดงว่ามีตัวให้อิเล็กตรอน คือ ATP และมีตัวรับอิเล็กตรอนคือ D-hexose-6-phosphate มีการเคลื่อนย้ายหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) บนคาร์บอนอะตอมที่ 6 ของเฮกโซส ดังสมการที่ 4



1.3.6.3 กลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolases)

เร่งปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (Hydrolytic reaction) ที่มีการสลายพันธะโคเวเลนต์ระหว่างพันธะ C-O, C-N, C-C, C-P, P-O และพันธะอื่นๆ ในซับสเตรตโดยมีน้ำเป็นตัวรับ ดังสมการที่ 5 ซึ่งมักเป็นการสลายพันธะที่สำคัญ เช่น พันธะเปปไทด์ในโปรตีน พันธะไกลโคซิดิกในคาร์โบไฮเดรต พันธะเอสเทอร์ในลิพิด และพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ในกรดนิวคลีอิก เป็นต้น สำหรับการแบ่งกลุ่มย่อยจะแบ่งตามพันธะที่ถูกย่อย



ตัวอย่างเช่น เอนไซม์อะดีโนซีนไตรฟอสฟาเตส (Adenosinetriphosphatase) (EC 3.6.1.3) มีชื่อเต็มตามระบบว่า ATP phosphohydrolase มี ATP เป็นซับสเตรต ถูกไฮโดรไลส์ปล่อย Orthophosphate ออกมา ดังสมการที่ 6



1.3.6.4 กลุ่มไลเอส (Lyases)

เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่ต่างๆ ออกจากซับสเตรตตรงบริเวณที่มีการสร้างพันธะคู่ โดยไม่ใช้น้ำมาเกี่ยวข้อง ส่วนมากเป็นการตัดพันธะ C-O, C-N, C-C และพันธะอื่นๆในซับสเตรต ทำให้เกิดการย้ายหมู่หรือกำจัดหมู่ออกจากซับสเตรต เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยพันธะคู่ ในการแบ่งกลุ่มย่อยมักแบ่งตามพันธะที่ถูกตัด ตัวอย่างเช่น Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) มีชื่อเต็มตามระบบว่า D-fructose-1,6-bisphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase มีซับสเตรตคือ D-fructose-1,6-bisphosphate เมื่อถูกตัดจะได้ผลิตภัณฑ์ D-glyceraldehyde-3-phosphate ดังสมการที่ 7



1.3.6.5 กลุ่มไอโซเมอเรส (Isomerases)

เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์ (Isomerization) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัว (ตำแหน่ง) ของอะตอมที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุล (Intramolecular rearrangement) ของซับสเตรต โดยไม่เปลี่ยนองค์ประกอบของโมเลกุล ในการแบ่งกลุ่มย่อยมักแบ่งตามประเภทของปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของหมู่ ตัวอย่างเช่น Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) มีชื่อเต็มตามระบบว่า D-glyceraldehyde-3-phosphate ketolisomerase ระบุว่า Aldose D-glyceraldehyde-3-phosphate ถูกไอโซเมอไรส์ (Isomeried) เป็น Ketose glycerone phosphate (Dihydroxyacetone phosphate) ดังสมการที่ 8



1.3.6.6 กลุ่มไลเกส (Ligases)

เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโมเลกุลเข้าด้วยกันโดยการสังเคราะห์พันธะขึ้นใหม่ ส่วนมากเป็นพันธะโคเวเลนต์ อาศัยพลังงานจากการสลายพันธะไพโรฟอสเฟตของ ATP หรือนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (Nucleoside triphosphate) ตัวอื่นๆ และมักเกิดร่วมเป็นปฏิกิริยาควบคู่ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังสมการที่ 9 และสมการที่ 10

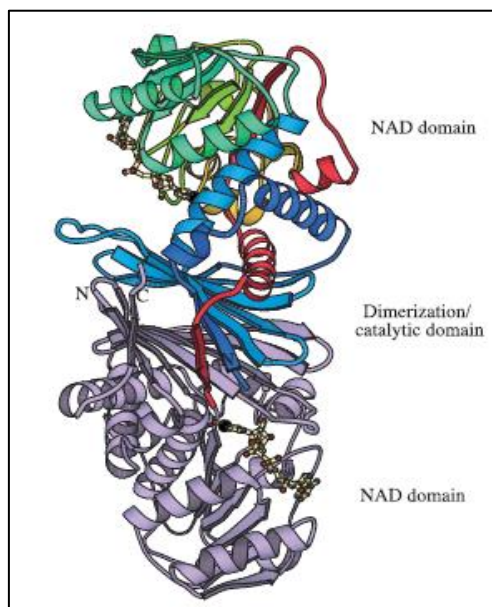


เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มเดียวที่ไม่มีการนำมาใช้งานในทางอุตสาหกรรม แต่จะมีความสำคัญอย่างมากในการศึกษาทางพันธุวิศวกรรม การแบ่งกลุ่มย่อยจะแบ่งตามพันธะที่ถูกเชื่อมต่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาไปโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดปริมาณของแอมโมเนียมไอออน โดยใช้สารทางชีวภาพคือเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในน้ำอย่างชัน เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแอมโมเนียมไอออน จะขอกกล่าวถึงรายละเอียดของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ในลำดับต่อไป

1.3.7 เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส (Alanine dehydrogenase) หรือใช้ตัวย่อ AlaDH เป็นเอนไซม์ประเภทออกซิโดรีดักเทส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมของไฮโดรเจน จากซัสเตรตตัวหนึ่งไปยังซัสเตรตอีกตัวหนึ่ง มีชื่อเต็มตามระบบว่า L-alanine : NAD^+ oxidoreductase แสดงว่ามีตัวให้อิเล็กตรอนคือ L-alanine และมีตัวรับอิเล็กตรอนคือ NAD^+ โครงสร้างของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ดังรูปที่ 1.7 ภายในโครงสร้างประกอบด้วย 2 บริเวณที่ใช้ในการจับกับโคแฟกเตอร์และซัสเตรต โคแฟกเตอร์นิโคตินาไมด์อะดีนไดนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (NAD(P)^+) จะจับกับเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสที่ตำแหน่งของคาร์บอนปลายสุดของเกลียวในโดเมนที่สอง ลักษณะคล้ายกับแซนวิช โดยแอกทีฟไซต์จะอยู่บริเวณช่องด้านข้างทั้งสองระหว่างเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ NAD(P)^+



รูปที่ 1.7 ริบบอน (Ribbon) ของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสจับกับโคแฟกเตอร์ NAD(P)^+ [17]

เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการขจัดหมู่อะมิโน หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีอะมิเนชัน (Oxidative determination) ของอะลานิน (L-alanine) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวต (Pyruvate) และแอมโมเนียมไอออน โดยมีโคแฟกเตอร์ NAD(P)^+ ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากการเร่งปฏิกิริยา

ของเอนไซม์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นนิโคตินาไมด์อะดีนไดนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ (NAD(P)H) [18] ดังสมการที่ 11



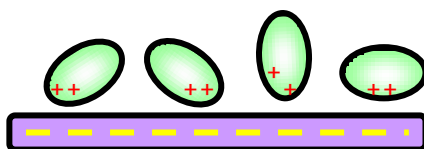
ดังนั้นจึงมีการนำเอาเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสมาใช้เป็นสารชีวภาพ เพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน โดยอาศัยการตรวจวัดปฏิกิริยาผันกลับ (Reductive amination) ของปฏิกิริยาข้างต้น ซึ่งเอนไซม์จะถูกตรึงอยู่บนผิวหน้าของตัวแปลงสัญญาณ จะขอกล่าวถึงวิธีการตรึงเอนไซม์ในลำดับต่อไป

1.3.8 วิธีการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization) หมายถึง การจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ด้วยวิธีทางกายภาพหรือจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ให้อยู่ในช่องว่างที่กำหนด โดยการตรึงเอนไซม์กับตัวยึดเกาะที่ไม่ละลายที่หลากหลาย โดยเอนไซม์นั้นยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการตรึงเอนไซม์มีวิธีพื้นฐานอยู่ 5 วิธี ดังนี้ [19]

1.3.8.1 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ

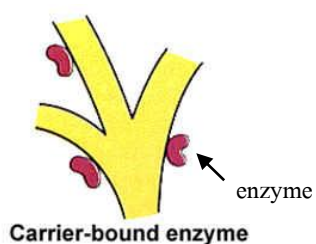
อาศัยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน คือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander waals forces) ระหว่างเอนไซม์กับตัวดูดซับใช้ตรึงเอนไซม์ ซึ่งเป็นข้อดีเพราะสามารถฟื้นฟูสภาพของตัวดูดซับได้ง่าย ดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ [19]

1.3.8.2 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง

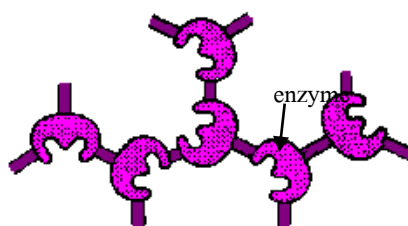
วัตถุหรือสารที่เป็นตัวกลางหรือตัวพุง (Carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำ โดยทำการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุงด้วยการตรึงแบบกายภาพหรือด้วยพันธะเคมีที่เรียกว่าพันธะไอออนิกหรือเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งจะไม่ทำให้โครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์เสียไป แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย ดังรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดติดกับสารตัวกลาง [19]

1.3.8.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้

การตรึงเอนไซม์วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุงแต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้มีความสามารถละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวางจะเกิดปฏิกิริยารุนแรง มีผลทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง ดังรูปที่ 1.10



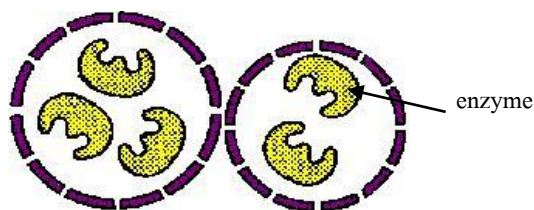
รูปที่ 1.10 การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้ [19]

1.3.8.4 การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้

การตรึงเอนไซม์โดยที่เอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้มและเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพุงหรือจับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

1. เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ในช่องตาค่ายของสารโพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ก็ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องเลือกชนิดของสารโพลิเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลิเมอร์จะมีปฏิกิริยารุนแรง จนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายได้

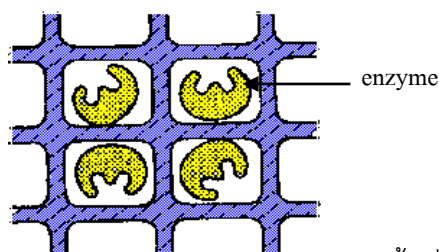
2. เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารโพลิเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ ลักษณะการห่อหุ้ม ดังรูปที่ 1.11



รูปที่ 1.11 การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ในแคปซูล [19]

1.3.8.5 การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด

โมเลกุลของเอนไซม์อยู่อย่างอิสระในสารละลายแต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่โดยโครงสร้างที่เป็นจุดแลตติซ (Lattice) ของเจล (Gel) โดยต้องควบคุมความพรุนของเจลแลตติซ (Gel lattice) ให้มีความเหมาะสมในการป้องกันการรั่วของเอนไซม์ออกมา และภายในเจลนั้นต้องมีที่ว่างพอให้มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระของซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 1.12

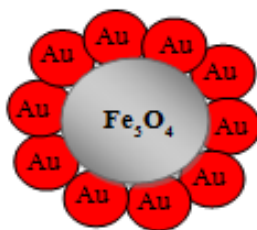


รูปที่ 1.12 การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด [19]

งานวิจัยนี้ทำการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนผิวหน้าตัวแปลงสัญญาณด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง โดยใช้สารตัวกลางคืออนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ นอกจากใช้เป็นสารตัวกลางในการตรึงเอนไซม์ให้อยู่บนผิวหน้าของตัวแปลงสัญญาณแล้วยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ได้ด้วย จะขอกล่าวถึงลักษณะและคุณสมบัติของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ในลำดับถัดไป

1.3.9 อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ หรือสารแมกเนติก-ทองคอร์เชลล์ขนาดนาโน ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$) เป็นโครงสร้างระดับนาโนที่ประกอบด้วยส่วนที่อยู่ด้านในทำหน้าที่เป็นแกน (Core) และส่วนที่หุ้มด้านนอกหรือเปลือก (Shell) ดังรูปที่ 1.13 ส่วนใหญ่อนุภาคจะมีขนาด 20 ถึง 200 นาโนเมตร ส่วนที่เป็นแกนและเปลือกสามารถเลือกใช้ได้หลากหลายตามคุณสมบัติต่างๆ คุณสมบัติของส่วนที่เป็นแกน ได้แก่ คุณสมบัติความเป็นแม่เหล็ก เรืองแสง ตัวกักเก็บสาร เป็นต้น คุณสมบัติของส่วนที่เป็นเปลือก ได้แก่ อนุภาคที่มีความเสถียรสามารถเข้ากับสารทางชีวภาพได้ คุณสมบัติทางแสง เป็นต้น โดยในงานวิจัยได้เลือกใช้แมกนีไทด์อนุภาคนาโน (Fe_3O_4) เป็นส่วนแกน และทองอนุภาคนาโน (Au NPs) เป็นส่วนเปลือก



รูปที่ 1.13 อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

1.3.9.1 แมกนีไทต์

แมกนีไทต์เป็นแร่แม่เหล็กมีสูตรทางเคมีคือ Fe_3O_4 หรือ $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ หรือบางครั้งเรียกว่าเหล็กออกไซด์ มีลักษณะเป็นก้อนสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ มีคุณสมบัติเป็นซูเปอร์พาราแมกเนติก (Super paramagnetic) เมื่ออยู่ในสนามแม่เหล็กใดๆ จะแสดงสมบัติความเป็นแม่เหล็กตอบสนองทันที จึงสามารถถูกดึงดูดจากสนามแม่เหล็กภายนอกได้ [20] ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็ก ความเป็นพิษต่ำและสามารถเข้ากันได้กับสารทางชีวภาพ แต่ว่าแมกนีไทต์มีพื้นที่ผิวขนาดใหญ่ที่ง่ายต่อการถูกออกซิไดซ์ เช่น สามารถตอบสนองอย่างรวดเร็วกับออกซิเจนที่มีอยู่ในอากาศและสามารถเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่างตัวเอง ดังนั้นจึงปรับปรุงพื้นผิวด้วยทองอนุภาคนาโน เนื่องจากทองอนุภาคนาโนสามารถเข้ากันได้กับสารทางชีวภาพและความเสถียร

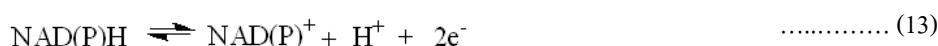
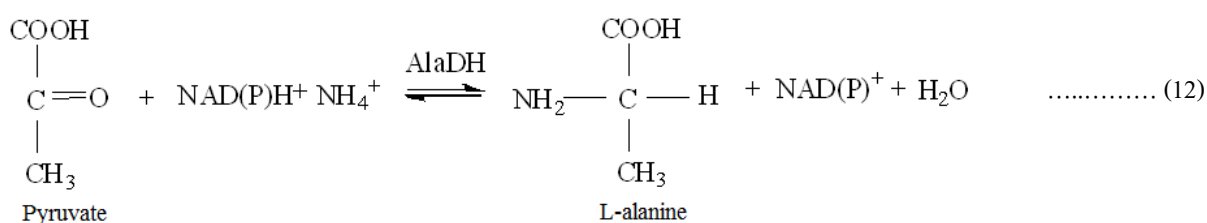
1.3.9.2 ทองอนุภาคนาโน

ทองอนุภาคนาโน (Gold nanoparticles, Au NPs) มีขนาดเล็กเป็นพิเศษ เป็นโลหะที่มีความเสถียร โดยปกติทองจะมีลักษณะเป็นสีเหลือง เมื่อทองถูกทำให้อยู่ในรูปที่มีอนุภาคนาโนจะมีลักษณะเปลี่ยนไป มีคุณสมบัติที่เรียกว่า เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance, SPR) ซึ่งทำให้อนุภาคทองเปลี่ยนไปดูดกลืนแสงสีเขียว (ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร) ส่งผลให้อนุภาคนาโนของทองมีสีแดงทับทิม (Ruby red) [21] นอกจากนี้ทองอนุภาคนาโนมีความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอน เมื่อนำมาปรับปรุงไบโอเซนเซอร์ช่วยให้ไบโอเซนเซอร์มีความไวในการตรวจวัดสูง และสามารถวิเคราะห์สารได้ในระดับที่ความเข้มข้นต่ำ

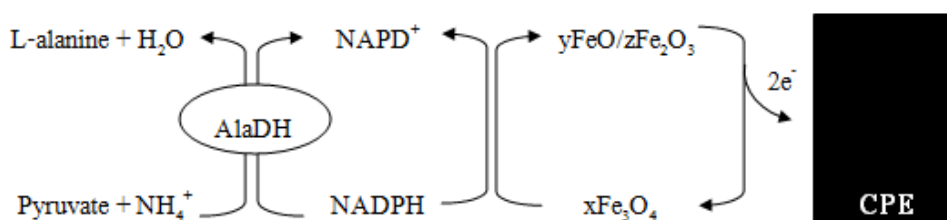
ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ เพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์ให้อยู่บนผิวหน้าของตัวแปลงสัญญาณ เนื่องจากคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็กของแมกนีไทต์ ทำให้สามารถตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสให้ยึดติดอยู่ที่ผิวหน้าของของตัวแปลงสัญญาณได้ดีขึ้นโดยใช้แม่เหล็กภายนอก และทองอนุภาคนาโนสามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่เอมีนและหมู่ไทออลในโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้ทองอนุภาคนาโนเปรียบเสมือนเป็นสะพานเชื่อมในการขนส่งอิเล็กตรอนได้โดยตรง ทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนรวดเร็วขึ้น มีส่วนช่วยทำให้ไบโอเซนเซอร์มีสภาพไวสูงขึ้น ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์ได้ผลดีและรวดเร็วขึ้น จะกล่าวถึงหลักการทำงานของแอมโมเนียมไบโอเซนเซอร์ ในลำดับต่อไป

1.3.10 ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน

ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำอย่างชัน ก่อนและหลังเข้าสู่กระบวนการผลิต โดยตรวจวัดในรูปของแอมโมเนียมไอออนเพื่อควบคุมกระบวนการผลิตอย่างพารา โดยในการตรวจวัดหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนได้อาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับแอมโมเนียมไอออน ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมิเนชัน (Reductive amination) ของไพรูเวต ในสถานะที่มี NAD(P)H เป็นโคแฟกเตอร์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะลานิน ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสใช้แอมโมเนียมไอออนเพื่อให้ไพรูเวตเกิดปฏิกิริยาอะมิเนชันได้อย่างจำเพาะเจาะจง และ NAD(P)H จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น NAD(P)⁺ และได้รับ 2 อิเล็กตรอน [22] ซึ่งจำนวนอิเล็กตรอนจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออน ดังปฏิกิริยาที่ 12 และ 13 ตามลำดับ ทำให้สามารถตรวจวัดด้วยตัวแปลงสัญญาณแบบแอมเพโรเมตริกได้



นอกจากนี้งานวิจัยได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยปรับปรุงพื้นผิวของตัวแปลงสัญญาณ ในงานวิจัยนี้ใช้ข้าวไฟฟ้าเป็นตัวแปลงสัญญาณ ด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ Fe₃O₄@Au เพื่อช่วยในการตรึงเอนไซม์และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสใช้แอมโมเนียมไอออนเพื่อให้ไพรูเวตเกิดปฏิกิริยาอะมิเนชันไปเป็นอะลานินได้อย่างจำเพาะเจาะจง ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาโคแฟกเตอร์ NAD(P)H จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น NAD(P)⁺ และได้รับอิเล็กตรอน จากนั้นแมกนีไทต์ช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังผิวหน้าข้าวไฟฟ้า ทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนรวดเร็วขึ้น ช่วยให้ไบโอเซนเซอร์มีสภาพไวสูงขึ้น การส่งผ่านอิเล็กตรอนเมื่อทำการปรับปรุงข้าวไฟฟ้าด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสและอนุภาคคอร์เชลล์ Fe₃O₄@Au [23] ดังรูปที่ 1.14



รูปที่ 1.14 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ถูกปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสและอนุภาคคอร์เชลล์ Fe₃O₄@Au สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน

งานวิจัยได้ใช้ตัวแปลงสัญญาณแบบแอมเพอโรเมตริก วัดในรูปของกระแสไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลมาจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ได้จากปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เข้าสู่ขั้วไฟฟ้าทำให้สามารถวัดปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของอิเล็กตรอนและปริมาณของแอมโมเนียมไอออน ตามลำดับ โดยจะใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสสำหรับตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบแบทช์ (Batch analysis) และขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ จะขอกล่าวถึงรายละเอียดของขั้วไฟฟ้าทั้งสอง ในลำดับถัดไป

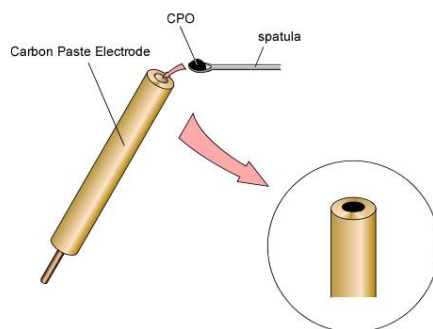
1.3.11 ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส

คาร์บอนเพส (Carbon paste) นิยมใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เนื่องจากมีช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กว้าง กระแสพื้นหลังต่ำ (Background current) ราคาถูก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารหลายชนิด ง่ายต่อการผสมกับสารหลายชนิดที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า องค์ประกอบของคาร์บอนเพส [24] มีดังนี้

1. วัสดุคาร์บอน (Carbon powder) เป็นองค์ประกอบหลักของคาร์บอนเพสที่ใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูง อนุภาคมีการกระจายตัวที่ดี และแรงดูดซับน้อย คุณสมบัติในการตรวจวัดของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสขึ้นอยู่กับวัสดุคาร์บอนที่ใช้ในการเตรียม ซึ่งได้แก่ แกรไฟต์ (Graphite) คาร์บอนไมโครสเฟียร์ (Carbon microspheres) และคาร์บอนนาโนทิวป์ (Carbon nanotubes) เป็นต้น

2. ตัวเชื่อมประสาน (Binder) ทำหน้าที่เป็นตัวประสานให้ผงคาร์บอนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และทำหน้าที่ร่วมกับผงคาร์บอนเพื่อให้เกิดเป็นคาร์บอนเพส ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้ มีความเหนียวและไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น มีความหนืดสูง และละลายในน้ำได้น้อย ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ สารจำพวกน้ำมัน (Oil) เช่น น้ำมันพาราฟิน (Paraffin oil) น้ำมันซิลิกอน (Silicon oil) **โบรมอแนฟทาลีน** (Bromonaphthalene) และไตรครีซิลฟอสเฟต (Tricresyl phosphate) เป็นต้น

ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเป็นที่นิยมในการใช้งานทางด้านเซนเซอร์ตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าหรือด้านชีวเคมีไฟฟ้า ซึ่งออกแบบมาเพื่อใช้ทดแทนขั้วไฟฟ้าปรอท (Dropping mercury electrode) เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่าย โดยทั่วไปจะเตรียมโดยใช้แท่งเทฟลอน (Teflon rod) หลอดแก้ว (Glass tube) หรือหลอดฉีดยาพลาสติก (Polyethylene syringe) ทำเป็นขั้ว (Holder) แล้วเติมคาร์บอนเพสลงไป ซึ่งจะถูกเชื่อมติดกับลวดนำไฟฟ้า ดังรูปที่ 1.15 ในปัจจุบันมีกลุ่มงานวิจัยหลายกลุ่มใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสสำหรับสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดทั้งแบบโวลแทมเมตริก โพเทนชิโอเมตริก และแอมเพอโรเมตริก



รูปที่ 1.15 ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส [25]

1.3.12 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

เทคโนโลยีสกรีนปรินต์ (Screen-printing) [26] ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับผลิตเซนเซอร์เคมีไฟฟ้าเพราะมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารหลายชนิด เตรียมได้โดยพิมพ์หมึกคาร์บอน แพลทินัม ซิลเวอร์ หรือคาร์บอนนาโนทิวป์ ลงบนแผ่นซับสเตรต เช่น พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride, PVC) โดยการพิมพ์หนึ่งครั้งจะได้เซนเซอร์จำนวนหลายร้อยเซนเซอร์ และไม่เพียงแต่พิมพ์ขั้วไฟฟ้าใช้งานเพียงขั้วเดียว แต่ยังสามารถพิมพ์ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าช่วยลงบนแผ่นซับสเตรตอันเดียวกัน โดยปกติจะนิยมพิมพ์ซิลเวอร์คลอไรด์เพื่อทำเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และพิมพ์คาร์บอนหรือแพลทินัมเพื่อทำเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ซึ่งทำให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่มีขนาดเล็ก สามารถพกพาตรวจวัดภายนอกสนามได้ โดยเชื่อมต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดขนาดเล็ก ดังรูปที่ 1.16



รูปที่ 1.16 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน [27]

ในงานวิจัยใช้คาร์บอนเป็นตัวตรวจวัดเนื่องจากสามารถนำไฟฟ้าได้ดี มีความเสถียร มีระดับความบริสุทธิ์ทางเคมีสูง ให้ช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กว้าง กระแสพื้นหลังต่ำ (Background current) ประสิทธิภาพการทำงานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนดีกว่าขั้วไฟฟ้าแบบคาร์บอนเพส คือ มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากมีพื้นผิวคาร์บอนที่เรียบและสม่ำเสมอ ในปัจจุบันใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากมันมีราคาถูก ทำให้สามารถใช้แล้วทิ้งได้ โดยทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงบนขั้วไฟฟ้าใช้งาน ซึ่งสามารถทำได้ทั้งเคลือบเอนไซม์ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน หรือนำมาผสมกับหมึกพิมพ์ แล้วพิมพ์หมึกผสมเอนไซม์ลงบนแผ่นซับสเตรต

งานวิจัยทำการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ด้วยไฟฟ้าคาร์บอนเพสสำหรับตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ และไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ ทำการวิเคราะห์ในโหมดการตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมตริก จะขอกล่าวถึงรายละเอียดของการวิเคราะห์แบบแอมเพอโรเมตริกทั้งในระบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ ในลำดับถัดไป

1.3.13 ระบบการตรวจวัดแบบปกติ (Batch analysis)

ระบบการวิเคราะห์แบบแอมเพอโรเมตริก [28] เป็นการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) และ ขั้วไฟฟ้าช่วย (Auxiliary electrode) ในงานวิจัยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าแพลทินัม เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ติดตั้งระบบการวิเคราะห์โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์บรรจุสารละลาย (Vessel) ซึ่งบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนืดและแท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Bar) ที่วางอยู่บนเครื่องกวนสาร (Stirrer) ขั้วไฟฟ้าทั้งสามถูกเชื่อมต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat/Galvanostat) ที่เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 1.17 ทำการวิเคราะห์โดยให้ศักย์เข้าไปในระบบที่เพียงพอในการทำให้สารตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชัน แล้ววัดสัญญาณในรูปของกระแสไฟฟ้า ปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของอิเล็กตรอน และปริมาณของสารตัวอย่าง ตามลำดับ



รูปที่ 1.17 ระบบการวิเคราะห์แบบแอมเพอโรเมตริก [29]

1.3.14 ระบบการตรวจวัดแบบการไหลอัตโนมัติ

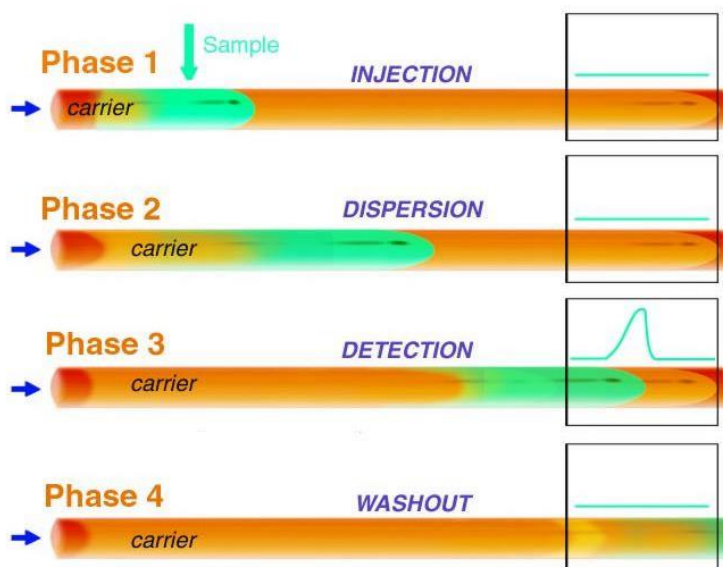
ระบบการไหลอัตโนมัติ หรือโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis) หรือเรียกว่า เอฟไอเอ (FIA) เป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่อาศัยหลักการฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ในระดับไมโครลิตรเข้าสู่กระแสตัวพา ซึ่งอาจเป็นรีเอเจนต์หรือตัวทำละลายหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไหลอย่างต่อเนื่องภายในระบบท่อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็ก ด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมและคงที่ สารตัวอย่างกับรีเอเจนต์จะทำปฏิกิริยาเคมีที่ส่วนผสม (Reaction coil) แล้วไหลเข้าสู่ส่วนตรวจวัด (Flow through cell) ของเครื่องตรวจวัดชนิดใดๆ การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบของกระแสรีเอเจนต์ เรียกว่า เอฟไอเอแบบปกติ (Normal FIA หรือ nFIA) ส่วนในกรณีที่มีการฉีดรีเอเจนต์เข้าสู่กระแสของสารตัวอย่าง เรียกว่า

เอฟไอเอแบบย้อนกลับ (Reverse FIA หรือ rFIA) การตรวจวัดในระบบการไหลอัตโนมัติเป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำและความถูกต้องสูง ให้ข้อมูลที่เชื่อถือได้ ประหยัดต้นทุน ใช้สารเคมีในปริมาณน้อย สามารถวิเคราะห์สารเคมีที่ไม่ซับซ้อน ราคาถูก มีประสิทธิภาพ และความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถประยุกต์และพัฒนาได้อย่างต่อเนื่อง [30]

คุณลักษณะที่สำคัญของระบบ FIA คือสามารถควบคุมการแพร่กระจายของสารตัวอย่างและทำซ้ำได้ดี ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกประมวลผลตามลำดับ ซึ่งให้สถานะการวิเคราะห์ที่เหมือนเดิม ปริมาณของสารตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปกติน้อยกว่า 1 มิลลิลิตร ต่อการทดสอบหนึ่งครั้ง ทำให้ไม่สิ้นเปลืองสารเคมีและยังเป็นการลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีที่เป็นพิษ

1.3.14.1 หลักการทำงาน

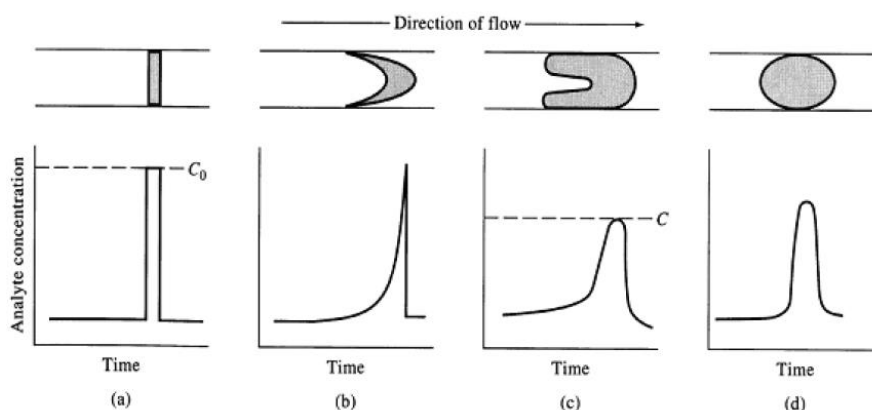
ระบบการไหลอัตโนมัติขึ้นอยู่กับ การฉีดสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวในระดับไมโครลิตรเข้าไปในกระแสตัวพาที่ไหลแบบลามินาร์ (Laminar flow) อย่างต่อเนื่องภายในท่อเล็กๆ ภายหลังจากการฉีดสารตัวอย่างแต่ละครั้ง ส่วนของของเหลว (Liquid segment) ที่เกิดขึ้นในกระแสตัวพาจะเคลื่อนที่ไปตามท่อในทิศทางที่ไปยังเครื่องตรวจวัด โซนตัวอย่าง (Sample zone) จะเคลื่อนที่อย่างคงที่ในระบบพร้อมกับการเกิดกระบวนการเคมี-กายภาพ เช่น การผสมปฏิกิริยาเคมี การสกัด เป็นต้น บริเวณรอยต่อของตัวอย่างและกระแสตัวพาจะเกิดการผสมกันได้ดีขึ้นในขดลวดสำหรับเกิดปฏิกิริยา (Mixing coil or reactor) การกระจาย (การแพร่และการเจือจาง) ของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในระบบเป็นไปอย่างเคร่งครัด ทำให้เกิดรูปแบบที่แน่นอน กระแสของของเหลวที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะไหลผ่านไปยังเซลล์ตรวจวัด (Detector cell) ซึ่งจะบันทึกพารามิเตอร์ทางกายภาพที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นชั่วคราว (ภายใต้สภาวะที่ไม่สมดุล) อย่างต่อเนื่อง เช่น ค่าการดูดกลืนแสง กระแสหรือศักย์ไฟฟ้า เป็นต้น ซึ่งระยะเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในระบบก่อนที่จะถูกตรวจวัดมีความสม่ำเสมอ ทำให้การตรวจวัดเป็นไปอย่างต่อเนื่องและคงที่ เมื่อโซนตัวอย่างไหลผ่านเครื่องตรวจวัดและถูกชะออกจากระบบ ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังกล่าวจะเปลี่ยนไป [31] แผนภาพขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหลอัตโนมัติ ดังรูปที่ 1.18



รูปที่ 1.18 ขั้นตอนของการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหลอัตโนมัติ [31]

1.3.14.2 การกระจายของโซนตัวอย่างในระบบการไหลอัตโนมัติ

เมื่อแทรกท่อนโซนของสารตัวอย่างลงในกระแสดำพาจะเกิดการแพร่กระจายบางส่วน (หรือเกิดการเจือจาง) โดยส่วนหัวและท้ายของโซนของสารตัวอย่างจะเกิดการกระจายเนื่องจากการแพร่ของโมเลกุล (Molecular dispersion) และการพาของโมเลกุล (Molecular convection) ส่วนกลางของโซนของสารตัวอย่างจะเกิดการกระจายเนื่องจากการพา (Molecular convection) เพียงอย่างเดียว รูปร่างของโซนตัวอย่างที่กำลังเคลื่อนที่ไปจะเป็นตัวกำหนดสัญญาณของสัญญาณที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ ดังรูปที่ 1.19 การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มข้นของโซนตัวอย่างในกระแสดำพาที่กำลังไหลเป็นฟังก์ชันเทียบกับเวลา (t_a) และรูปร่างของสัญญาณจากการวิเคราะห์ที่ได้แต่ละแบบ [32]

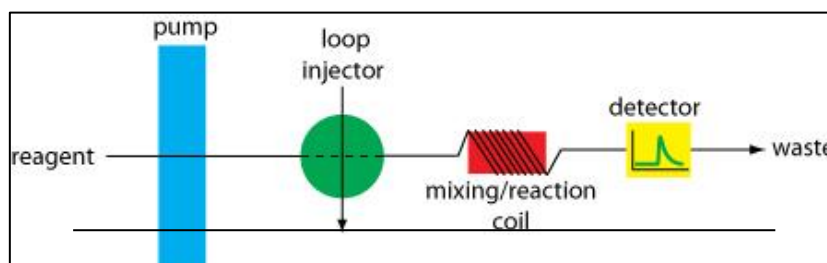


รูปที่ 1.19 รูปร่างของโซนตัวอย่างและสัญญาณที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ เมื่อ (a) โซนตัวอย่างไม่เกิดการพาหรือการแพร่ (b) โซนตัวอย่างเกิดการพาเพียงอย่างเดียว (c) โซนตัวอย่างเกิดการแพร่และการพา และ (d) โซนตัวอย่างเกิดการแพร่เพียงอย่างเดียว [33]

1.3.14.3 องค์ประกอบของระบบการไหลอัตโนมัติ

ระบบการวิเคราะห์แบบการไหลแบบอัตโนมัติอย่างง่าย [32] ดังรูปที่ 1.20 ประกอบไปด้วย

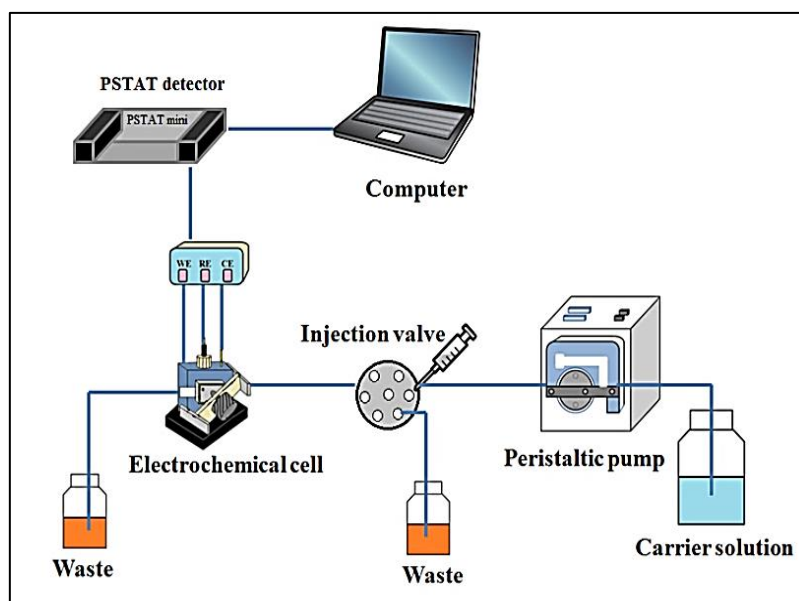
1. ระบบในการขับเคลื่อนสารละลาย (Propelling system) ทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลายตัวพาให้ไหลเข้าไปในท่อเล็กๆ (Narrow tube) อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ โดยปกติต้องการแรงดันไม่สูงมากนัก (น้อยกว่า 10 psi) เช่น เพอริสแตติกปั๊ม (Peristaltic pump) สามารถควบคุมอัตราการไหลของสารละลายตัวพาได้โดยปรับอัตราการหมุนของมอเตอร์ หรือปรับขนาดของท่อ
2. ระบบในการนำสารตัวอย่างเข้าระบบ (Injection system) เป็นส่วนที่ใช้ฉีดสารตัวอย่างหรือรีเอเจนต์เข้าสู่กระแสตัวพา สามารถควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปในระบบด้วยท่อ (Sample loop)
3. ระบบการขนส่ง มีทั้งหมด 3 ส่วน ได้แก่ ท่อกลวง (Open tube) จะต้องทำจากวัสดุที่ทนต่อสารเคมี เช่น พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride) ยางซิลิกอน เป็นต้น ตัวเชื่อมและข้อต่อ (Connectors) เชื่อมท่อกลวงเข้ากับระบบต่างๆ เช่น ระบบการขับเคลื่อนสารละลาย ระบบการนำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ และเครื่องปฏิกรณ์ (Reactor) เป็นส่วนที่ทำให้รอยต่อของสารตัวอย่างและกระแสตัวพาเกิดการผสมกันได้ดีขึ้น หรือเพื่อเตรียมสารตัวอย่างบางประเภท เช่น สารตัวอย่างที่มีความหนืด ซึ่งรูปทรงของรีแอคเตอร์เป็นตัวแปรหนึ่งที่มีผลต่อการกระจายของตัวอย่าง
4. ระบบตรวจวัด (Detector) ทำหน้าที่บันทึกผลและแปลงสัญญาณการวิเคราะห์ให้เป็นสัญญาณที่สามารถอ่านค่าได้ เช่น ค่าการดูดกลืนแสง ศักย์ไฟฟ้า กระแสไฟฟ้า เป็นต้น



รูปที่ 1.20 แผนภาพระบบการไหลอัตโนมัติ [34]

วิธีการวิเคราะห์สารที่ผู้วิจัยเลือกศึกษาคือการวิเคราะห์สารในระบบการไหลอัตโนมัติแบบปกติ เทคนิคการวิเคราะห์นี้ใช้สารเคมีที่ไม่ซับซ้อน ราคาถูก มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องและแม่นยำสูง สามารถประยุกต์และพัฒนาได้อย่างต่อเนื่อง โดยงานวิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยใช้อิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าสามขั้วภายในเซลล์ ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน ปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน นอกจากนั้นยังมีขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าแพลตินัม เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ซึ่งเซลล์นี้ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัดและมีตัวควบคุมศักย์และวัดกระแส (Potentiostat/Galvanostat)

เพื่อทำหน้าที่ให้ศักย์กระตุ้นสารให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันและวัดกระแสออกซิเดชันหรือรีดักชันของสาร ดังรูปที่ 1.21



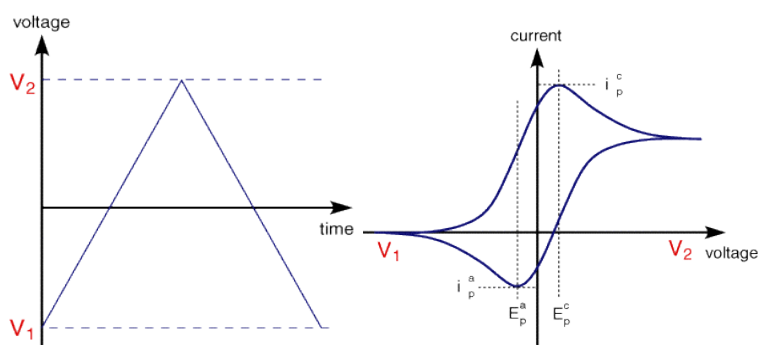
รูปที่ 1.21 วิธีการตรวจวัดในระบบการไหลอัตโนมัติในงานวิจัย

งานวิจัยประเมินคุณภาพการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนด้วยแอมโมเนียมไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีและเทคนิคโครโนแอมเพโรเมตรี จะขอลำถึงรายละเอียดของทั้งสองเทคนิค ในลำดับถัดไป

1.3.15 เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

ไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic voltammetry) [35] เป็นเทคนิคที่มีการให้ศักย์ไฟฟ้าในรูปศักย์กระแสตรงเชิงเส้นตรง (Linear scan) ไปข้างหน้าและย้อนกลับเป็นรูปสามเหลี่ยมแก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ซึ่งมีพื้นที่ผิวคงที่และจุ่มในสารละลายที่ไม่มีการคน และวัดสัญญาณกระแสออกซิเดชันหรือรีดักชันของสาร การสแกนสามารถเริ่มสแกนจากศักย์เริ่มต้นไปยังศักย์ไฟฟ้าย้อนกลับ (Switching potential) และย้อนกลับมายังศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นใหม่ครบ 1 รอบ โดยทั่วไปจะใช้อัตราการสแกน (Scan rate) เท่ากันทั้งการสแกนไปข้างหน้าและย้อนกลับ จะได้โวลแทมโมแกรมที่มีลักษณะเป็นพีก จากลักษณะพีกสามารถทำนายกลไกการเกิดปฏิกิริยาต่างๆได้ การเกิดปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์ที่ผิวของขั้วไฟฟ้าตามสมการเนินส์

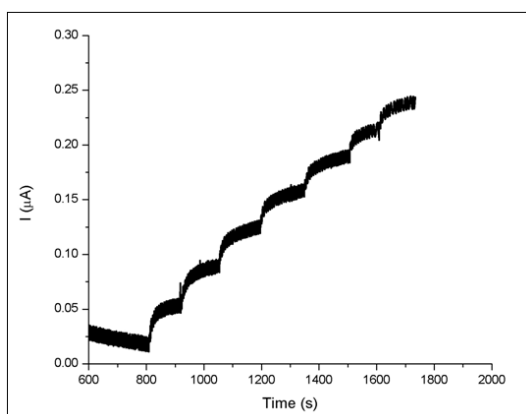
ปริมาณสัญญาณที่วัดออกมาเป็นตัวเลข ได้แก่ ศักย์ของพีกและกระแสของพีก โดยการสแกนไปทางศักย์ไฟฟ้าด้านลบจะได้พีกศักย์แคโทดิก (Cathodic peak potential, E_{pc}) และพีกกระแสแคโทดิก (Cathodic peak current, I_{pc}) ส่วนการสแกนไปทางศักย์ด้านบวกจะได้พีกศักย์แอโนดิก (Anodic peak potential, E_{pa}) และพีกกระแสแอโนดิก (Anodic peak current, I_{pa}) ดังรูปที่ 1.22



รูปที่ 1.22 การให้ศักย์ไฟฟ้าในรูปศักย์กระแสตรงเชิงเส้นตรงไปข้างหน้าและย้อนกลับเป็นรูปสามเหลี่ยมและไซคลิกโวลแทมโมแกรม [36]

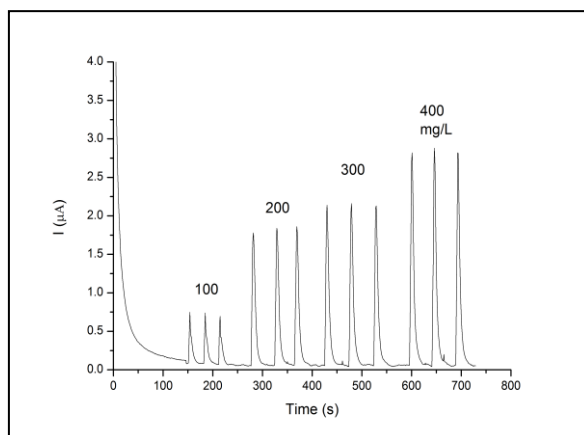
1.3.16 เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี (Chronoamperometry) [37] เป็นเทคนิคที่ประกอบไปด้วยพัลส์ไฟฟ้า 3 พัลส์ ได้แก่ พัลส์ไฟฟ้าทำงาน พัลส์ไฟฟ้าอ้างอิง และพัลส์ไฟฟ้าช่วย เป็นเทคนิคที่ศึกษาปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารที่สนใจ โดยให้ศักย์ที่คงที่ระหว่างพัลส์ไฟฟ้าทำงานและพัลส์ไฟฟ้าอ้างอิงที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของพัลส์ไฟฟ้า วัดสัญญาณกระแสที่ค่าความเข้มข้นต่างๆของสารตัวอย่าง เทคนิคนี้ทำภายใต้สภาวะที่มีการคนหรือการกวนซึ่งจะมีการขนส่งสารละลายใหม่ๆไปยังพัลส์ไฟฟ้าโดยวิธีกายภาพ เพื่อให้ทำให้เกิดกระบวนการรีดอกซ์อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นขั้นตอนของการแพร่จะถูกจำกัดโดยชั้นแคบๆ ทำให้เทคนิคนี้มีข้อดีคือ มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง เนื่องจากการขนส่งมวลสารภายใต้สภาวะไฮโดรไดนามิกดีมากขึ้น ทำให้สถานะคงตัวค่อนข้างเร็วและวัดกระแสได้แม่นยำสูง กระแสไฟฟ้าที่ได้จะขึ้นกับปริมาณสารที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์บนผิวหน้าของพัลส์ไฟฟ้าตามเวลา โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณกระแสเทียบกับเวลา โดยกระแสจะเกิดที่บริเวณกระแสการแพร่ (Diffusion current) จะมีค่าเป็นขั้นบันไดตามระดับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ดังรูปที่ 1.23



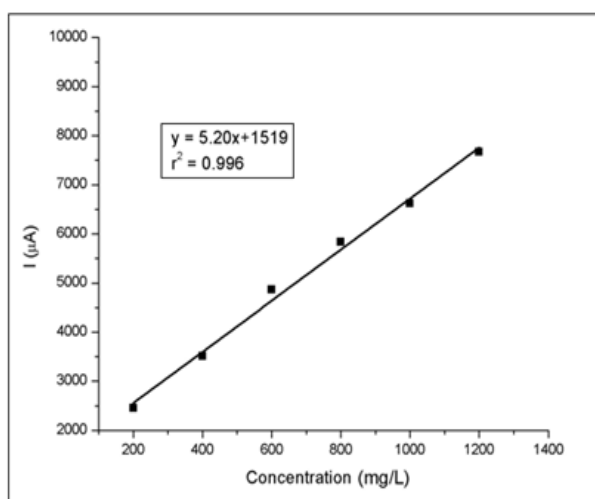
รูปที่ 1.23 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับเวลา ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

สำหรับการตรวจวัดในระบบการไหลอัตโนมัติ ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในระบบการไหลอัตโนมัติ ดังนั้นสัญญาณกระแสของสารที่ได้จะมีลักษณะเป็นพีก ดังรูปที่ 1.24 ความสูงของพีกจะแปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของสาร



รูปที่ 1.24 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับเวลา ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีในระบบการไหลอัตโนมัติ

จากสัญญาณกระแสที่ได้ สร้างความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับความเข้มข้นของสาร ดังรูปที่ 1.25 จะได้เป็นกราฟมาตรฐานที่ใช้เทียบวิเคราะห์หาปริมาณของสารในตัวอย่าง



รูปที่ 1.25 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี

นอกจากนี้งานวิจัยใช้อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ เพื่อช่วยในการตรึงเอนไซม์และปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของแอมโมเนียมไบโอเซนเซอร์ ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี เทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี เทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จะขอกล่าวถึงรายละเอียดของเทคนิคเหล่านี้ในลำดับต่อไป

1.3.17 เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี

เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี (UV-visible spectroscopy) [38] เป็นเทคนิคการตรวจวัดปริมาณแสงและค่าความเข้มแสงในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

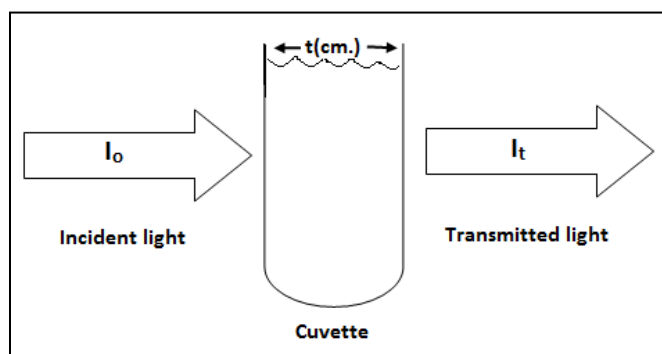
คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้เกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่นค่าต่างๆ ตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's law) ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

1.3.17.1 กฎแห่งการดูดกลืนแสง

1. กฎของแลมเบิร์ต กล่าวว่า แสงที่ถูกดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางที่แสงเดินทางผ่านตัวกลาง ดังสมการที่ 14 และรูปที่ 1.26 [38]

$$I_t = I_o \times 10^{-kt} \quad \dots\dots\dots (14)$$

- เมื่อ I_t = ปริมาณแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่าง
 I_o = ปริมาณแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่าง
 k = ค่าคงที่ของแลมเบิร์ต
 t = ระยะทางที่แสงเดินทางผ่านสารละลายในหน่วยเซนติเมตร



รูปที่ 1.26 การดูดกลืนแสงตามกฎของแลมเบิร์ต (Lambert's law) [38]

2. กฎของเบียร์ (Beer's law) กล่าวว่า แสงที่ถูกดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารในของเหลว ซึ่งเมื่อคำนวณเช่นเดียวกับกฎของแลมเบิร์ต จะได้สมการ 15

$$I_t = I_o \times 10^{-kc} \quad \dots\dots\dots (15)$$

เมื่อรวมกฎทั้งสองเข้าด้วยกัน (Beer-Lambert's law) โดยการบวกสมการที่ (14) และสมการที่ (15) จะได้สมการ 16 ดังนี้

$$I_t = I_o \times 10^{-kct} \quad \dots\dots\dots (16)$$

แต่แสงส่องผ่าน (Transmittance) มีค่าเท่ากับ I_t/I_o และแสงที่ถูกดูดกลืน (Absorbance หรือ Optical density) มีค่าเท่ากับ $\log (I_o/I_t)$ ดังนั้นจะได้ความสัมพันธ์ตามสมการที่ 17 และ 18 ตามลำดับ

$$A = \epsilon ct \quad \dots\dots\dots (17)$$

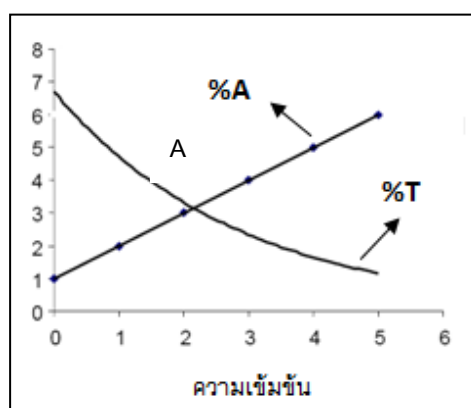
หรือ $A = -\log T \quad \dots\dots\dots (18)$

เมื่อ ϵ = โมลาร์แอบซอร์ปติวิตี (Molar absorptivity)

c = ความเข้มข้นของสารในหน่วยโมลต่อลิตร

t = ระยะทางที่แสงเดินทางผ่านสารละลายในหน่วยเซนติเมตร

ถ้าเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A) กับความเข้มข้น (c) จะได้กราฟเป็นเส้นตรง แต่ถ้าเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน ($\%T$) กับความเข้มข้น (c) จะได้กราฟเป็นเส้นโค้ง ดังรูปที่ 1.27



รูปที่ 1.27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านกับความเข้มข้น [38]

1.3.17.2 การดูดกลืนแสงโดยอนุภาคโลหะนาโน

สมบัติทางแสงของอนุภาคโลหะนาโนที่ว่าด้วยการเกิดอันตรกิริยาของกลุ่มประจุอิเล็กตรอนที่ผิวอนุภาคกับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า การดูดกลืนแสงโดยอนุภาคโลหะนาโนสามารถที่จะวิเคราะห์ด้วยภาคตัดขวางของการดูดกลืน (Absorption cross-section, Cabs) ซึ่งภาคตัดขวาง (Cross-sections) นี้เป็นสมบัติของอนุภาคที่สัมพันธ์กับสัมประสิทธิ์การดูดกลืน [39] ดังสมการ 19

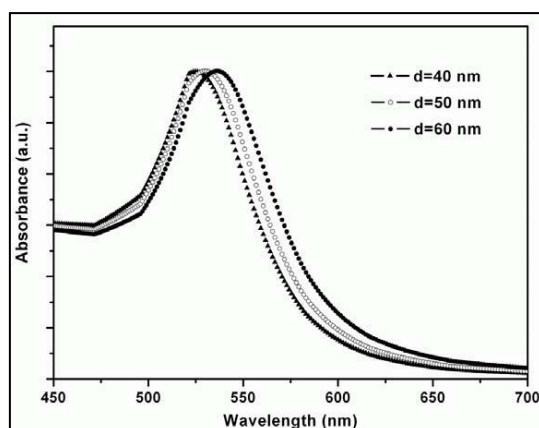
$$\mathcal{E} = N_A C \ln 10 (10^{-3} L / \text{cm}^{-3}) \quad \dots\dots\dots (19)$$

จากสมการ 17 และ 19 สร้างความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนกับภาคตัดขวาง ดังสมการ 20

$$A = \frac{c B N_A C \ln 10}{10^{-3}} \quad \dots\dots\dots (20)$$

- เมื่อ
- C = ความเข้มข้น (M)
 - B = ระยะทางที่รังสีเคลื่อนที่ในสารละลาย (Path length)
 - N_A = เลขอาโวกาโด (Avogadro number = $6.0221415 \times 10^{23} \text{ (M}^{-1}\text{)}$)
 - C = ภาคตัดขวาง (cm^2)

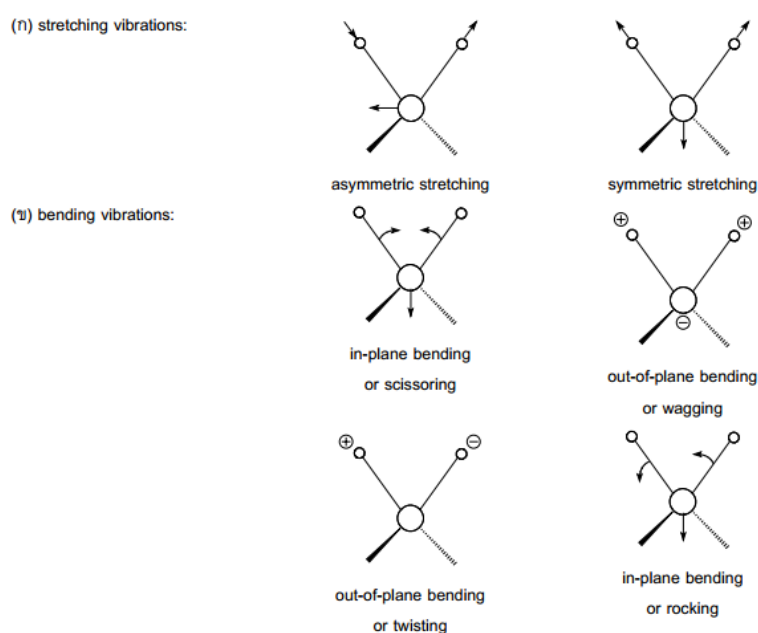
สมบัติทางแสงซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวของทองคำนาโนที่มีค่าการดูดกลืนสูงสุดประมาณ 520 นาโนเมตร สำหรับอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นก็จะมีค่าการดูดกลืนในความยาวคลื่นที่สูงขึ้น หรือมากกว่า 520 นาโนเมตร อธิบายได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น และภาคตัดขวางของการดูดกลืนดังรูปที่ 1.28 จะเห็นว่าเมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น จะมีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด ในตำแหน่งที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น เรียกว่า เรดชิฟ (Red shift) แต่กรณีที่อนุภาคมีขนาดเล็กลงจะปรากฏค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุดในตำแหน่งที่ความยาวคลื่นต่ำลง เรียกว่า บลูชิฟ (Blue shift) ดังนั้นตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุดจึงสัมพันธ์กับขนาดของอนุภาค และสามารถอธิบายแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของขนาดอนุภาคได้ จึงนิยามวัดขนาดของทองคำนาโนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี



รูปที่ 1.28 สเปกตรากการดูดกลืนแสงของทองคำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40, 50 และ 60 นาโนเมตร [39]

1.3.18 เทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี

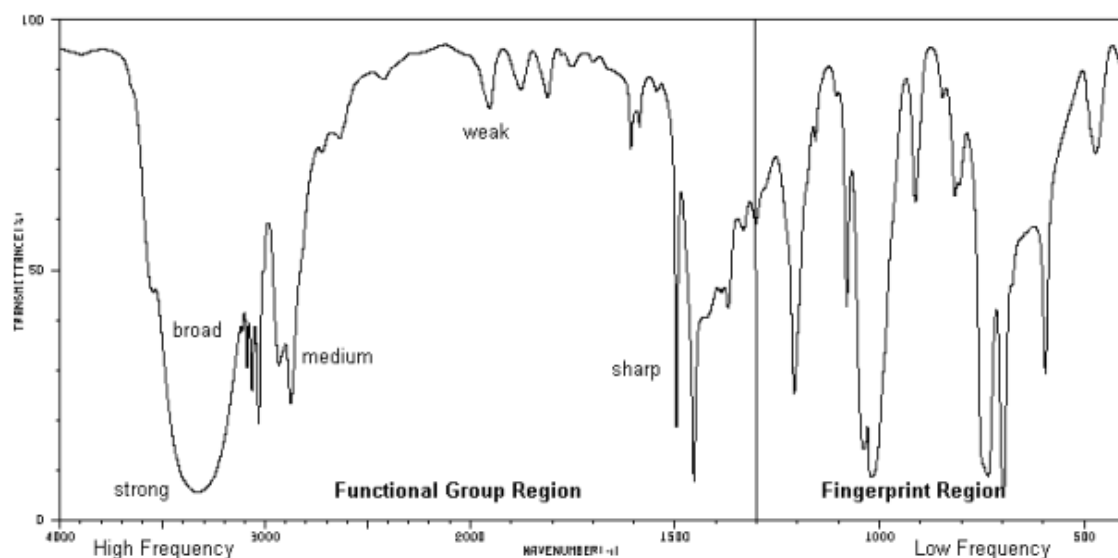
รังสีอินฟราเรด (Infrared radiation) (IR) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งมีความถี่อยู่ระหว่างช่วงของรังสีไมโครเวฟและแสงที่ตามองเห็น การอ้างอิงถึงความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงนี้จะใช้ค่าที่เรียกว่า เวฟเนัมเบอร์ (Wave number) ซึ่งมีหน่วยเป็นคลื่นต่อหน่วยเซนติเมตร (cm^{-1}) [40] ตัวอย่างเช่น รังสีอินฟราเรดที่มีความถี่ 3000 cm^{-1} หมายถึงในระยะทาง 1 เซนติเมตรที่คลื่นนี้เดินทางไปจะมีจำนวนลูกคลื่นทั้งหมด 3000 ลูกคลื่น ดังนั้นตัวเลขยิ่งมากย่อมหมายถึงพลังงานของรังสีก็ยิ่งมากด้วย ช่วงของรังสีอินฟราเรดที่เป็นประโยชน์ต่อนักเคมีจะอยู่ในช่วง $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ พลังงานของรังสีอินฟราเรดจะอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับการสั่น (Vibration) ของพันธะภายในโมเลกุล หากการสั่นของพันธะใดเกิดที่ความถี่ตรงกับความถี่ของรังสีอินฟราเรดก็จะเกิดการดูดกลืน ตัวอย่างของรูปแบบของการสั่นแสดงในรูปที่ 1.29



รูปที่ 1.29 การสั่นของโมเลกุลในรูปแบบต่างๆ [40]

จากรูปที่ 1.29 จะเห็นได้ว่าการสั่นของโมเลกุลสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ ได้แก่ การยืด-หด หรือเรียกว่าการสั่นแบบยืดหด (Stretching) และการงอ หรือการสั่นแบบโค้งงอ (Bending) เป็นการเคลื่อนที่อย่างเป็นจังหวะตามแนวแกนพันธะของอะตอมที่ต่อกันอยู่ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความยาวพันธะ ซึ่งมีได้สองรูปแบบย่อย คือยืดหดแบบสมมาตร (Symmetric) และแบบอสมมาตร (Asymmetric) ส่วนโค้งงอเป็นการเคลื่อนที่ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมุมพันธะ การสั่นทั้งหมดนี้อาจเกิดการเคลื่อนที่อยู่ในระนาบเดียวกัน (In-plane) หรือต่างระนาบ (Out-of-plane) ก็ได้

การสั่นในลักษณะต่างๆ เหล่านี้จะมีการดูดกลืนพลังงานที่เป็นค่าเฉพาะ ซึ่งมักอยู่ในช่วงคลื่นอินฟราเรด แต่เนื่องจากในโมเลกุลหนึ่งๆ มีพันธะได้หลายแบบ และพันธะแต่ละพันธะก็มีรูปแบบการสั่นได้อีกหลายแบบ ทำให้โมเลกุลหนึ่งๆ จะแสดงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้หลายช่วงคลื่นพร้อมๆ กัน ลักษณะการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดจะเป็นแถบ (Band) หรือพีก (Peak) หลายๆ แถบหรือพีก ซึ่งแสดงถึงค่าปริมาณรังสีอินฟราเรดที่ถูกดูดกลืนในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ ทรานสมิตแตนซ์ (%Transmittance) หมายถึงปริมาณรังสีที่สามารถทะลุผ่านตัวอย่างออกไปได้เทียบกับเวฟนัมเบอร์ มักอยู่ในช่วง $4000-400\text{ cm}^{-1}$ กราฟที่ได้จะเรียกว่าอินฟราเรดสเปกตรัม แต่ละแถบการดูดกลืนสามารถบ่งบอกลักษณะเฉพาะลงไปได้อีก เช่น หากตัวเลขทรานสมิตแตนซ์มีค่ามาก เรียกว่าสัญญาณนั้นอ่อน (Weak ใช้ตัวย่อ w) ในทางกลับกัน หากตัวเลขทรานสมิตแตนซ์มีค่าน้อย เรียกว่าสัญญาณนั้นเข้ม (Strong ใช้ตัวย่อ s) สัญญาณที่มีความเข้มปานกลางจะเรียกว่า Medium (m) นอกจากนี้แถบการดูดกลืนยังอาจมีลักษณะกว้าง (Broad) หรือแคบ (Sharp) โดยการสั่นของพันธะแต่ละแบบก็จะมีลักษณะเฉพาะของพีกที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งนำมาใช้ประกอบการพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลนอกเหนือจากการพิจารณาจากค่าเวฟนัมเบอร์ที่เกิดการดูดกลืนแต่เพียงอย่างเดียว ตัวอย่างของอินฟราเรดสเปกตรัม ดังรูปที่ 1.30



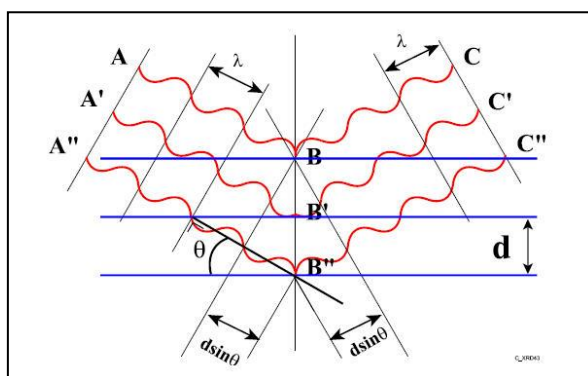
รูปที่ 1.30 ตัวอย่างอินฟราเรดสเปกตรัมของเบนซิลแอลกอฮอล์ [40]

1.3.19 เทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์

เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์หรือ X-ray diffractometer (XRD) [41] เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติของวัสดุ โดยอาศัยหลักการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ โดยสามารถทำการวิเคราะห์ได้ทั้งสารประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และนำมาใช้ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างผลึกของสารตัวอย่างได้อีกด้วย ในผลึกของตัวอย่างแต่ละชนิด จะมีขนาดของยูนิตเซลล์ (Unit Cell) ที่ไม่เท่ากัน ทำให้แพทเทิร์น (Pattern) ของการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ที่ออกมาไม่เท่ากัน ทำให้เราสามารถหาความสัมพันธ์ของสารประกอบต่างๆ กับแพทเทิร์นการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ได้ ซึ่งจะทำให้เราทราบว่าในตัวอย่างนั้นๆ มีสารประกอบอะไรบ้าง นอกจากผลการวิเคราะห์ของ XRD จะสามารถหาค่าประกอบของตัวอย่างได้แล้ว ยังสามารถคำนวณหาปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง คำนวณหาขนาดอนุภาคของแต่ละยูนิตเซลล์ ความเครียดของตัวอย่าง ค่าความเป็นผลึกของตัวอย่างได้อีกด้วย

เครื่อง XRD เป็นเครื่องมือวิเคราะห์เลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ในผลึกของตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของแบรกก์ (Bragg's law) ในการคำนวณค่าการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ ที่ยังผ่านชั้นผลึกที่อยู่ในตัวอย่าง โดยจะใช้เครื่องตรวจจับวัดความเข้มของรังสีเอกซ์ที่เกิดจากการเลี้ยวเบนในมุมต่างๆ ของการทดสอบ กล่าวคือถ้ามีคลื่นระนาบซึ่งมีความยาวคลื่น λ วิ่งชนระนาบผลึกแล้วสะท้อนจากระนาบที่ขนานกันของผลึก จะเกิดการแทรกสอดแบบเสริมสร้างของรังสีที่กระเจิงจากระนาบที่เรียงตัวขนานกันเป็นระยะ d ตามสมการที่ 21 และรูปที่ 1.31 เมื่อ n มีค่าเป็นเลขจำนวนเต็มบวก

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad \dots\dots\dots (21)$$



รูปที่ 1.31 การเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ตามกฎของแบรกก์ (Bragg's law) [41]

1.3.20 เทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) [42] เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายสูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร การสร้างภาพทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็น

ภาพลักษณะของ 3 มิติ ดังนั้นเครื่อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น

หลักการทำงานของเครื่อง SEM จะประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (Condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอนซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ หากต้องการภาพที่มีความคมชัดจะปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะถูกปรับระยะโฟกัสโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการศึกษา หลังจากลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary electron) ขึ้น ซึ่งสัญญาณจากอิเล็กตรอนทุติยภูมินี้จะถูกบันทึก และแปลงไปเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์และถูกนำไปสร้างเป็นภาพบนจอโทรทัศน์ต่อไป ซึ่งสามารถบันทึกภาพจากหน้าจอโทรทัศน์ได้เลย

1.3.21 เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) [43] เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนั่นเอง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (กำลังขยายสูงสุดประมาณ 0.1 นาโนเมตร) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (Condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ จากนั้นลำอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านตัวอย่างที่จะศึกษา (Specimen) ซึ่งจะต้องมีลักษณะที่แบนและบางมาก (อยู่ในช่วงระหว่าง 1-100 นาโนเมตร) จากนั้นจะเกิดการกระเจิงอนุภาคขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนทะลุผ่านตัวอย่างไป และอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนี้ก็จะถูกปรับโฟกัสของภาพโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective lens) ซึ่งเป็นเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพให้ได้รายละเอียดมากที่สุด จากนั้นจะได้รับการขยายด้วยเลนส์ทอดภาพไปสู่จอรับ (Projector lens) และปรับโฟกัสของลำอนุภาคอิเล็กตรอนให้ยาวพอดีที่จะปรากฏบนฉากเรืองแสง สุดท้ายจะเกิดการสร้างภาพขึ้นมาได้

1.3.22 น้ายาง

น้ายางสด (Fresh or field latex) [44] จากต้นยางพารามีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวหรือสีครีม ในทางเคมีจัดเป็นสารแขวนลอย มีความหนาแน่น 0.975 ถึง 0.980 กรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นกรด-

ต่าง (pH) ประมาณ 6.5 ถึง 7.0 ความหนืดไม่แน่นอน มีส่วนประกอบของสารอื่นๆที่ไม่ใช่น้ำยางไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น พันธุ์ยาง อายุต้นยาง ระบบและวิธีการกรีด ฤดูกาล เป็นต้น ตัวอย่างส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ แสดงดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ส่วนประกอบของน้ำยางธรรมชาติ

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)
สารที่เป็นของแข็งทั้งหมด (Total solid content, TSC)	36
เนื้อยางแห้ง (Dry rubber contents, DRC)	33
สารโปรตีน	1 – 1.5
สารเรซิน	1 – 2.5
เถ้า	สูงถึง 1
น้ำตาล	1

ในน้ำยางมีส่วนของสารอื่นๆที่ไม่ใช่น้ำยาง เช่น โปรตีน ส่วนหนึ่งของสารโปรตีนนี้จะดูดซับอยู่รอบผิวของอนุภาคยาง พอร์มเป็นชั้นหรือเปลือกห่อหุ้ม (Hydrate protein envelope) อนุภาคยางไว้ ชั้นห่อหุ้มนี้มีความสำคัญต่อสถานะความคงตัวของเหลว หรือความเสถียร (Stability) ของน้ำยาง เพราะชั้นโปรตีนนี้จะป้องกันไม่ให้เกิดอนุภาคนวมตัวและจับกันเป็นก้อน (Coagulation) นอกจากชั้นโปรตีนจะห่อหุ้ม ทำหน้าที่รักษาสถานการณ์เป็นของเหลวให้น้ำยางแล้ว ในชั้นโปรตีนนี้ยังมีอนุมูลลบของคาร์บอกซีเลต (Carboxylate, RCOO^-) ซึ่งก่อให้เกิดการผลักกันระหว่างอนุภาคยาง ดังนั้นการเสถียรภาพ (Destability) ของน้ำยางจะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำลายปัจจัยสำคัญทั้งสองดังกล่าว เช่น การสูญเสียไนโตรเจนของโปรตีนและการทำลายอนุมูลลบของคาร์บอกซีเลต

เพื่อป้องกันน้ำยางจับตัวเป็นก้อนก่อนเวลาที่ต้องการ หรือเพื่อให้น้ำยางอยู่ในสภาพของของเหลว จึงจำเป็นต้องเติมสารรักษาสภาพน้ำยาง (Preservatives) โดยสารที่จะใช้รักษาสภาพน้ำยางควรมีสมบัติดังต่อไปนี้

1. มีประสิทธิภาพในการทำลาย หรือสามารถระงับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในน้ำยาง
2. ควรมีสภาพเป็นด่างเพื่อส่งเสริมสถานะสารแขวนลอยให้น้ำยาง
3. ทำให้อนุมูลของโลหะหนักไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา เพราะอนุมูลเหล่านี้จะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์
4. สามารถระงับการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยการเจริญของจุลินทรีย์
5. ไม่รบกวนต่อกระบวนการขึ้นรูปของผลิตภัณฑ์ และควรมีราคาที่เหมาะสม
6. ไม่เป็นพิษต่อสุขภาพของคนและต่อคุณภาพของยาง อีกทั้งยังสามารถกำจัดออกจากน้ำยางได้ง่ายและสะดวกเมื่อถึงช่วงเวลาที่ไม่ต้องการ

สารชนิดแรกที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางได้คือแอมโมเนีย ซึ่งมีบันทึกการจดสิทธิบัตรโดย Johnson และ Norris ในปี พ.ศ. 2396 ปริมาณแอมโมเนีย 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำยาง (Low ammonia, LA) พอเพียงสำหรับรักษาสภาพน้ำยางช่วงเวลาสั้นๆ ถ้าต้องการรักษาสภาพในช่วงระยะเวลายาวนานควรใช้ปริมาณ 0.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำยาง (High ammonia, HA)

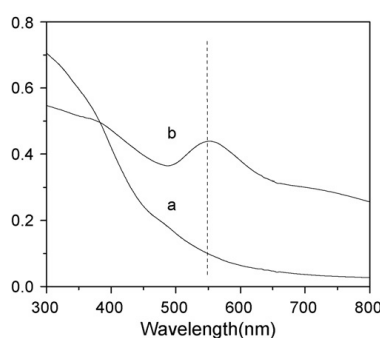
อย่างไรก็ตามการเติมแอมโมเนียมากเกินไปก็มีผลต่อคุณภาพของน้ำยาง รวมทั้งการทิ้งแอมโมเนียลงสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมตามมา เป็นต้น ดังนั้นการหาปริมาณของแอมโมเนียในน้ำยางขึ้นก่อนและหลังเข้าสู่กระบวนการผลิตจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

1.4.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

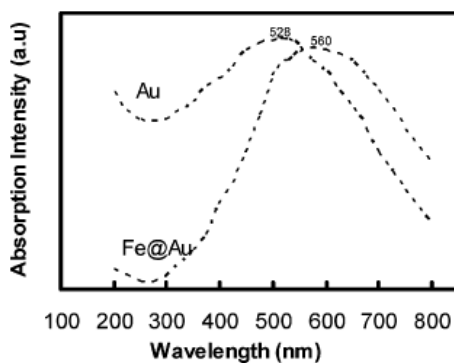
Qiu J. D. และคณะ [45] ศึกษาวิธีการสังเคราะห์และคุณลักษณะของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ เพื่อใช้ปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส เนื่องจาก Fe_3O_4 มีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติความเป็นแม่เหล็ก ความเป็นพิษที่ต่ำและสามารถเข้ากันได้กับสารทางชีวภาพ ทองอนุภาคนาโนมีคุณสมบัติที่เข้ากันได้กับสารทางชีวภาพและความเสถียร จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี พบว่า Fe_3O_4 ไม่พบพีกการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิล แต่เมื่อ Fe_3O_4 ถูกเคลือบด้วยทองอนุภาคนาโนจะทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550 นาโนเมตร ดังรูปที่ 1.32 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทองอนุภาคนาโนเคลือบอยู่บนผิวของ Fe_3O_4



รูปที่ 1.32 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Fe_3O_4 (a) และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (b) ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี [45]

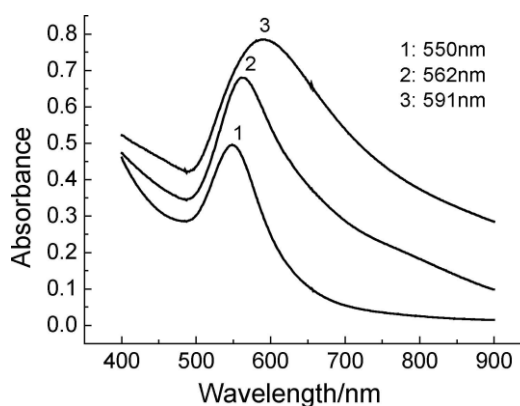
Irudayaraj J. และคณะ [46] ศึกษาวิธีการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ เทียบกับทองอนุภาคนาโน ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี พบว่าแถบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของทองอยู่ที่ 528 นาโนเมตร ในขณะที่อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ มีแถบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 560 นาโนเมตร ดังรูปที่ 1.33 เป็นผลมาจากอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงในความยาว

คลื่นที่สูงขึ้น เรียกว่า เรดชิฟต์ (Red shife) ซึ่งเป็นสมบัติทางแสงของทองที่อธิบายได้ด้วยปรากฏการณ์ เซอร์เฟส พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance)



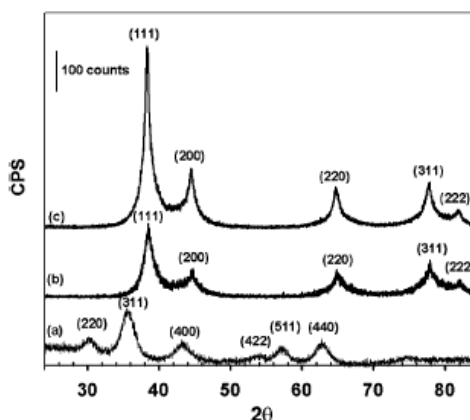
รูปที่ 1.33 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของทองอนุภาคนาโนและอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี [46]

Cui Y. และคณะ [47] ศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ สามารถควบคุมได้จากสถานะในการสังเคราะห์ อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะการกระจายตัวที่สม่ำเสมอและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 50 นาโนเมตร จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี พบว่าอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ มีคุณสมบัติทางแสงคล้ายกับทองอนุภาคนาโน มีแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 550 นาโนเมตร เมื่ออนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ มีขนาดใหญ่มากขึ้นจะทำให้ฟีกการดูดกลืนแสงมีลักษณะที่กว้างขึ้น (Broader) และมีค่าการดูดกลืนแสงในความยาวคลื่นที่สูงขึ้น ดังรูปที่ 1.34 เนื่องจากขนาดของอนุภาคมีผลต่อลักษณะของฟีกการดูดกลืนแสงและตำแหน่งในการดูดกลืนแสงสูงสุด



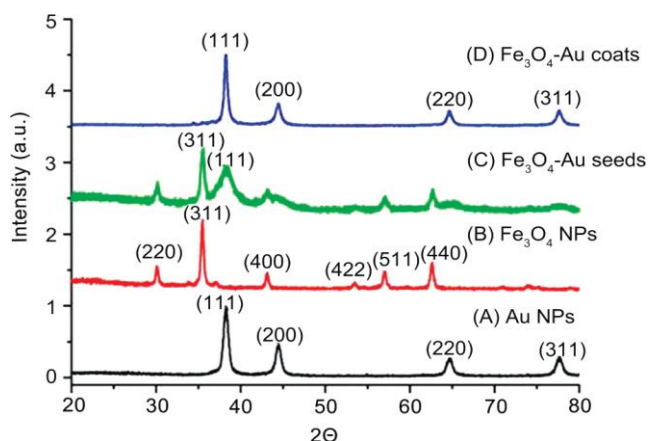
รูปที่ 1.34 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกัน (1) 50 นาโนเมตร (2) 70 นาโนเมตร และ (3) 100 นาโนเมตร [47]

Zhong C. J. และคณะ [48] ศึกษาวิธีการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (XRD) พบว่าพีคการเลี้ยวเบนที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 30.08, 35.38, 43.08, 53.48, 56.98 และ 62.58 บ่งชี้ว่าเป็นแผนการเลี้ยวเบน (220), (311), (400), (422), (511) และ (440) ตามลำดับ ของ Fe_3O_4 ในโครงสร้างผลึกที่เป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ (Face centered cubic) และพีคการเลี้ยวเบนที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 38.2, 44.4, 64.6, 77.5 และ 81.7 บ่งชี้ว่าเป็นแผนการเลี้ยวเบน (111), (200), (220), (311) และ (222) ตามลำดับ ของทองอนุภาคนาโนในโครงสร้างผลึกที่เป็นแบบคิวบิก (Cubic phase) สำหรับอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ มีพีคการเลี้ยวเบนคล้ายกับของทองอนุภาคนาโน และไม่พบพีคการเลี้ยวเบนใดๆของ Fe_3O_4 ดังรูปที่ 1.35 แสดงให้เห็นว่าทองอนุภาคนาโนเคลือบอยู่บนผิวของ Fe_3O_4 อย่างสมบูรณ์



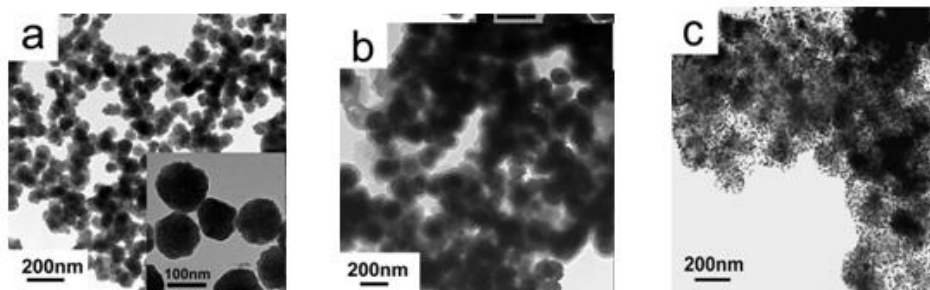
รูปที่ 1.35 สเปกตรัม XRD ของ Fe_3O_4 (a) ทองอนุภาคนาโน (b) และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (c) [48]

Xie H. Y. และคณะ [49] สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โดยใช้โพลีเอทิลีนไดเอมีน (Polyethyleneimine, PEI) เป็นตัวเชื่อมโยง (Linker) พบว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีการกระจายตัวและมีคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็กที่ดี ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (XRD) พบว่าทองอนุภาคนาโนและ Fe_3O_4 มีพีคการเลี้ยวเบนที่ตำแหน่ง 2θ ทั้งหมด 4 และ 6 พีค ตามลำดับ สำหรับอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ที่มีทองเกาะติด (Au seeds) อยู่บนพื้นผิวของ Fe_3O_4 จะพบพีคการเลี้ยวเบนของทั้ง Fe_3O_4 และทองอนุภาคนาโน และเมื่อ Fe_3O_4 ถูกเคลือบด้วยทองอย่างสมบูรณ์ (Au coats) จะพบเฉพาะพีคการเลี้ยวเบนของทอง ดังรูปที่ 1.36



รูปที่ 1.36 สเปกตรัมการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (XRD) ของ (A) ทองอนุภาคนาโน (B) แมกนีไทต์ (C) แมกนีไทต์เกาะติดด้วยทอง (Fe_3O_4 -Au seeds) และ (D) แมกนีไทต์เคลือบด้วยทอง (Fe_3O_4 -Au coats) [49]

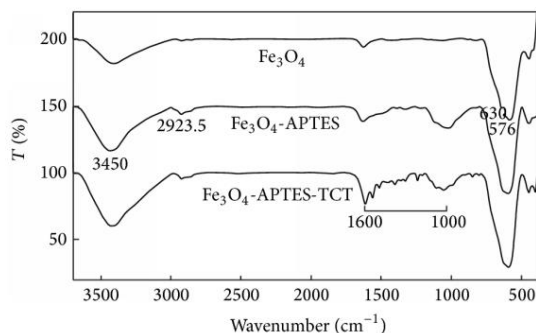
Xu J. J. และคณะ [50] สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4 /PPy/Au โดยมีแมกนีไทต์เป็นคอร์ (Core) ใช้พอลิไพโรล (Polypyrrole, PPy) กับทองอนุภาคนาโนทำหน้าที่เป็นเชลล์ (Shell) พิสูจน์เอกลักษณ์โดยการศึกษารูปร่างของ Fe_3O_4 , Fe_3O_4 /PPy และอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4 /PPy/Au ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการศึกษาดังรูปที่ 1.37 แสดงให้เห็นว่าทองอนุภาคนาโนเคลือบอยู่บนพื้นผิวของ Fe_3O_4 มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ



รูปที่ 1.37 รูปร่างของ Fe_3O_4 (a) Fe_3O_4 /PPy (b) และอนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4 /PPy/Au (c) ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [50]

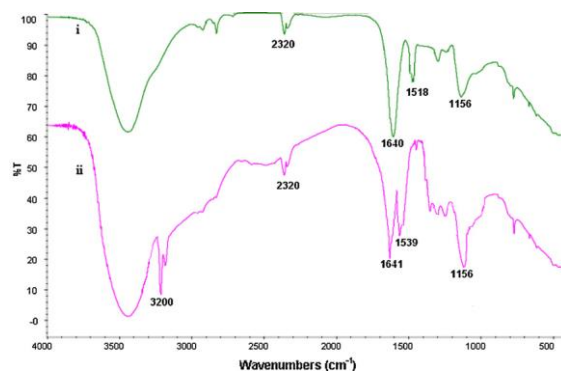
Bordbar A. K. และคณะ [51] สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ Fe_3O_4 /APTES โดยมีแมกนีไทต์เป็นคอร์ (Core) ใช้อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (Aminopropyltriethoxysilane, APTES) ทำหน้าที่เป็นเชลล์ (Shell) และปรับปรุงพื้นผิวด้วย 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (TCT) เพื่อช่วยในการตรึงโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี พบพีกการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ Fe_3O_4 ที่ 576 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีกการสั่นแบบยืดหด (Stretching) ของพันธะ Fe-O และพีกการดูดกลืนที่ $3300\text{--}3450\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีกการสั่นแบบยืดหดของ -OH ซึ่งเกิดมาจากการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวของอนุภาค และเมื่ออนุภาค Fe_3O_4 ถูกเคลือบด้วย APTES จะพบพีกการดูดกลืนแสงอิน

ฟารีดที่ 1109 cm^{-1} (พีการสั่นแบบยืดหดของ C-N), 2923.5 cm^{-1} (พีการสั่นแบบยืดหดของ C-H) และ 3450 cm^{-1} (พีการสั่นยืดหดของ N-H) บ่งชี้ให้เห็นว่า APTES เกาะติดอยู่บนพื้นผิวของอนุภาค Fe_3O_4 และเมื่อทำการตรึง TCT จะพบพีการดูดกลืนแสงระหว่าง 1000 และ 1600 cm^{-1} เป็นผลมาจากการสั่นแบบยืดหดของพันธะ C-N ใน TCT ดังรูปที่ 1.38



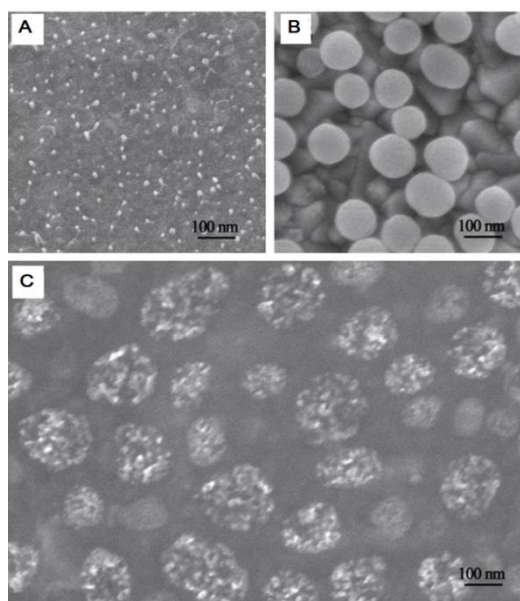
รูปที่ 1.38 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (FT-IR spectrums) ของ Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -APTES และ Fe_3O_4 -APTES-TCT [51]

Pundir C. S. และคณะ [52] พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช (Organophosphorus, OP) ด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{c-MWCNT}$ โดยมีแมกนีไทด์เป็นคอร์ (Core) ใช้คาร์บอกซิเลตมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (Carboxylated multi walled carbon nanotubes, c-MWCNT) ทำหน้าที่เป็นเชลล์ (Shell) ช่วยในการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลรีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี พบพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ c-MWCNTs ที่ 1518 , 1156 และ 2320 cm^{-1} ตามลำดับ เป็นผลมาจากการสั่นของแกรไฟต์ใน c-MWCNTs และพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1640 cm^{-1} เกิดจากการสั่นของหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) บนพื้นผิวของ MWCNTs หลังจากตรึงเอนไซม์ AChE ลงบนพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{c-MWCNT}$ พบพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1641 cm^{-1} (พีการสั่นแบบยืดหดของหมู่คาร์บอนิล) และ 1539 cm^{-1} (พีการสั่นแบบโค้งงอของ N-H) นอกจากนี้ยังพบพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3200 cm^{-1} เนื่องจากการสั่นของพันธะไฮโดรเจนของหมู่เอมีนในเอนไซม์



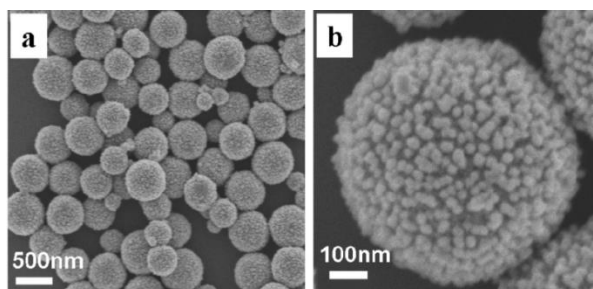
รูปที่ 1.39 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (FT-IR spectra) ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{c-MWCNT}$ ที่ไม่มีเอมีน (i) และมีเอมีน (ii) [52]

Du D. และคณะ [53] ศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โดยใช้ Fe_3O_4 เป็นแกน (Core) เนื่องจากสามารถแยกออกจากสารละลายตัวอย่างได้ง่ายโดยใช้แรงจากแม่เหล็กภายนอก และทองอนุภาคนาโนเป็นเปลือก (Shell) เนื่องจากมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ช่วยในการตรึงเอนไซม์ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารกำจัดแมลง (Organophosphates) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางขนาดและสัณฐานวิทยาของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เปรียบเทียบกับทองอนุภาคนาโน และ Fe_3O_4 พบว่าทองอนุภาคนาโนและ Fe_3O_4 มีการกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 12 นาโนเมตร และ 115 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.40 หลังจากเคลือบทองลงบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 พบว่ามีจุดเล็กๆ ขนาดนาโนจำนวนมากบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 แสดงให้เห็นว่าทองเกาะติดอยู่บนพื้นผิวของ Fe_3O_4 และมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นประมาณ 150 นาโนเมตร



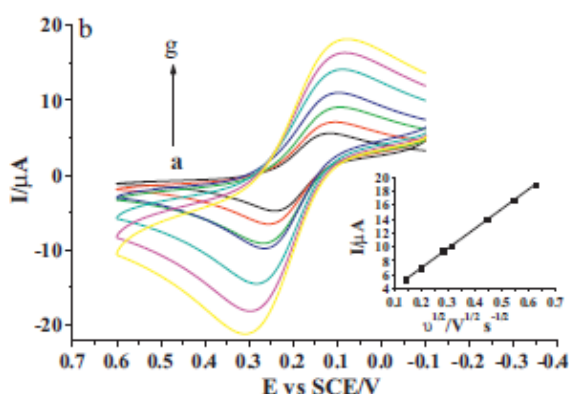
รูปที่ 1.40 ภาพ SEM ของทองอนุภาคนาโน (A), Fe_3O_4 (B) และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (C) [53]

Dong S. และคณะ [54] ศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ โดยทำการปรับปรุงพื้นผิวของ Fe_3O_4 ก่อนโดยใช้พอลิเมอร์ด้วยเทคนิค layer-by-layer จากนั้นเกาะติดทองอนุภาคนาโนลงบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ มีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ และมีความหนาของพื้นผิวสูงเนื่องจากมีทองอนุภาคนาโนเกาะติดที่พื้นผิว ดังรูปที่ 1.41 (a) โดยทองอนุภาคนาโนเกาะติดที่พื้นผิวของอนุภาค $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ มีลักษณะเป็นเมล็ดหนาแน่น ดังรูปที่ 1.41 (b)



รูปที่ 1.41 ภาพ SEM (a) และภาพ SEM ความละเอียดสูง (b) ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ [54]

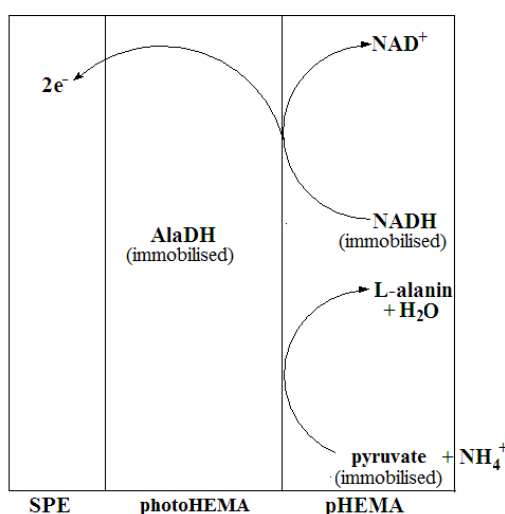
Gu H. Y. และคณะ [55] สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ใช้ปรับปรุงไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hb) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์ที่ถูกปรับปรุงด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ตรวจวัดในสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ศึกษาอัตราการสแกนจาก 20 ถึง 400 มิลลิโวลต์ต่อวินาที พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อเพิ่มอัตราการสแกน ดังรูปที่ 1.42 บ่งชี้ได้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ถูกพัฒนาขึ้นเป็นแบบผันกลับได้และถูกควบคุมด้วยกระบวนการการแพร่ (Diffusion controlled)



รูปที่ 1.42 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ถูกปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ แสแกนในสารละลาย 1 มิลลิโมลาร์ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ที่อัตราการสแกนจาก 20 ถึง 400 มิลลิโวลต์ต่อวินาที [55]

1.4.2 แอมโมเนียมไบโอเซนเซอร์

Lee Y. H. และคณะ [56] พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (AlaDH) สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน โดยใช้ไพรูเวตเป็นสารตั้งต้นและ NADH เป็นโคแฟกเตอร์ ทำการตรึงเอนไซม์ลงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน โดยใช้ไฮดรอกซีเอทิลเมทาคริเลตเมมเบรน (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) หรือ pHEMA) ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ AlaDH กับสารตั้งต้นไพรูเวต แอมโมเนียมไอออนจะถูกใช้ไปเพื่อทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจง จากนั้นทำการตรวจวัดสัญญาณที่ได้จากการเกิดออกซิเดชันของ NADH ที่ศักย์ +0.55 โวลต์ ซึ่งสัญญาณทางไฟฟ้าที่ได้จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออน กลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น แสดงดังรูปที่ 1.43 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนระหว่าง 10 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ ขีดจำกัดในการตรวจวัด 0.18 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการทำซ้ำของขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นให้ค่าที่ต่ำในช่วง 1.4 ถึง 4.9 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ พบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้จากไบโอเซนเซอร์สอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคมาตรฐานเนสเลอร์ สเปกโตรโฟโตเมตริก (Nessler spectrophotometric method)



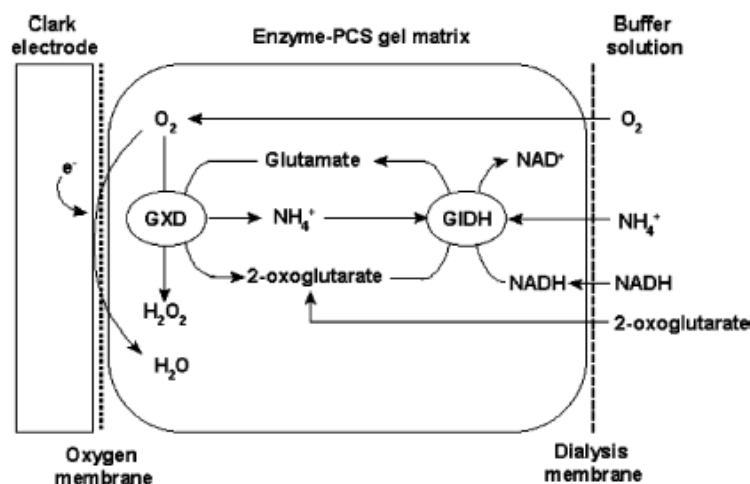
รูปที่ 1.43 แผนภาพกลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส [56]

Tan L. L และคณะ [22] พัฒนาแอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน โดยตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสในเมทาคริลิกเมมเบรน (Methacrylic membrane) บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน ตรวจวัดในระบบการไหลอัตโนมัติ จากผลการศึกษาพบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถทำงานได้ดีที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ และความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 ภายใต้สภาวะการทำงานที่เหมาะสมสามารถตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนในช่วงความเป็นเส้นตรง 0.03 ถึง 1.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) 8.52 ไมโครกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำโดยปราศจากการเตรียมตัวอย่าง (Pretreatment)

Bertocchi P. และคณะ [57] พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนและยูเรีย โดยตรึงเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase) และเอนไซม์ยูรีเอส (Urease) ลงบนขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (Pt electrode) พบว่าสามารถตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนและยูเรียได้ในช่วง 10^{-5} ถึง 3×10^{-4} โมลาร์ ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีมากเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี (Potentiometry) นอกเหนือจากนี้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไม่มีผลรบกวนจากโพแทสเซียมไอออน ซึ่งมีผลกระทบต่อการวัดด้วยแอมโมเนียมไอออนซีเล็กทีฟอิเล็กโทรด (Ammonium ion selective electrode)

Kwan R. C. H. และคณะ [58] พัฒนาแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณแอมโมเนียมไอออน โดยตรึงเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส (Glutamate oxidase, GXD) และเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase, GLDH) ด้วยไฮโดรเจลของ Poly(carbamoyl) sulfonate (PCS) ในเทฟลอนเมมเบรน บนขั้วไฟฟ้าคลาร์กออกซิเจน (Clark-type oxygen electrode) เอนไซม์ GLDH จะใช้แอมโมเนียมไอออนสำหรับเกิดปฏิกิริยาอะมิเนชันของออกโซกลูตาเรท (2-oxoglutarate) ในสภาวะที่มี NADH เป็นโคแฟกเตอร์ ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูตาเมต (Glutamate) จากนั้นเอนไซม์ GXD จะใช้ออกซิเจนที่ถูกละลาย (Dissolved oxygen) สำหรับเกิดปฏิกิริยาการขจัดหมู่อะมิโน (Oxidative deamination) ของกลูตาเมต ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ดังนั้นสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะขึ้นอยู่กับอัตราการใช้ออกซิเจนที่ถูกละลายของเอนไซม์ ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของแอมโมเนียมไอออน กลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์แสดงดังรูปที่ 1.44 จากผลการศึกษาพบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้การตอบสนองอย่างรวดเร็ว (2 วินาที) สามารถตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนในช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 10 และ 300 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดในการตรวจวัด 2.06 ไมโครโมลาร์ ประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดตัวอย่างน้ำเสียพบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้สอดคล้องกับชุดทดสอบแอมโมเนียมไอออน (Commercial ammonium testing kit)



รูปที่ 1.44 แผนภาพกลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์กลูตาเมตออกซิเดส (GXD) และเอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (GIDH) [58]

Abdullah J. และคณะ [59] พัฒนาไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดทางแสง (Optical biosensor) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมต ดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase, GIDH) ตรึงในฟิล์มไซโตซาน สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำ ทำการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่มีความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ในสภาวะที่มีแอลฟาคีโตกลูตาเรต (α -ketoglutaric acid) เป็นสารตั้งต้นพบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงจาก 0.005 ถึง 0.5 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดในการตรวจวัด 0.005 มิลลิโมลาร์ ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) ที่ดีคือ 5.9 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และมีความเสถียรอย่างน้อย 1 เดือน

Choodum A. และคณะ [60] พัฒนาเทคนิคการตรวจวัดทางสีแสดงผลเป็นภาพดิจิทัล (Digital image colourimetry) เพื่อประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนเตรตเชิงกึ่งปริมาณ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง 5 ถึง 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ต่ำ 1.34 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นให้ความถูกต้องที่สูงสำหรับตรวจวัดหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างดินและให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับอุปกรณ์ถ่ายภาพอื่นๆ และเทคนิคมาตรฐานสเปกโตรโฟโตเมตริก

Chamarro J. A. และคณะ [61] ออกแบบไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติระดับไมโคร โดยใช้ระบบการตรวจวัดแบบโพเทนทิโอเมตริก (Continuous flow potentiometric micro analyzer) สำหรับหาปริมาณของแอมโมเนียไอออนในตัวอย่างน้ำรีไซเคิล ระบบการวิเคราะห์ประกอบไปด้วยไมโครฟลูอิดิกส์ (Microfluidics) ส่วนสำหรับแยกสาร (Gas-diffusion) และระบบการตรวจวัด (Potentiometric detection) ซึ่งรวมอยู่ในขั้นตอนเดียวกัน ภายใต้สภาวะการทำงานที่เหมาะสม

สามารถตรวจวัดหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนในช่วง 0.15 ถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดในการตรวจวัดคือ 0.07 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

Ling T. L. และคณะ [62] สร้างเซนเซอร์ตรวจวัดทางแสงแบบใหม่สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนอย่างรวดเร็ว โดยตรึง p-nitrobenzene-diazonium chloride ลงบนเม็ดบีทระดับไมโคร (Microbeads) ทำการตรวจวัดโดยอาศัยวิธีการสะท้อนแสงของวัสดุ (Reflectance spectrophotometry) พบว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้การตอบสนองที่รวดเร็ว (2 นาที) มีช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรง 10 ถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และความสามารถในการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 7.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้การตอบสนองดีที่สุดที่ pH 7 นอกจากนี้ยังมีความแม่นยำ 4.2 ถึง 5.7 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ($n = 3$) ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำที่ได้จากเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ สอดคล้องกับวิธีการไตเตรทซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

Shim J. H. และคณะ [63] พัฒนาเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน โดยใช้ Thiazole benzo-crown ether ethylamine-thioctic acid (TBCEAT) เป็นไอโอโนฟอร์ (Ionophore) ตรึงแบบเรียงตัวชั้นเดียว (Self-assembled monolayers) เกิดเป็นฟิล์ม (SAM film) อยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทอง ซึ่งทำหน้าที่เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนอย่างจำเพาะเจาะจง ทำการตรวจวัดโดยอาศัยการทำงานของเทคนิคโวลแทมเมทรี (Voltammetric) การตอบสนองของเซนเซอร์ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงอัตราการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของปฏิกิริยารีดอกซ์ของไอออน $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ ก่อนและหลังเกิดปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไอออนบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย TBCEAT ซึ่งแรงผลักดันทางไฟฟ้าสถิตระหว่างสารเชิงซ้อน $\text{NH}_4^+ \text{-TBCEAT}$ และ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ จะเหนี่ยวนำให้อัตราการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเปลี่ยนแปลงไป ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณของแอมโมเนียมไอออน จากการศึกษาพบว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงที่ 0.018 ถึง 0.072 มิลลิโมลาร์

Abdullah J. และคณะ [64] พัฒนาออปติคัลไบโอเซนเซอร์ (Optical biosensor) สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน โดยตรึงเอนไซม์กลูตาเมต ดีไฮโดรจีเนส (Glutamate dehydrogenase, GDH) และเอนไซม์ไดอะฟอเรส (Diaphorase) ในฟิล์มไซโตซานซึ่งถูกเคลือบอยู่บนแก้วสไลด์ที่มี Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) ทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์ (Color indicator) ซึ่งความเข้มสีที่ตรวจวัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออน พบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 16 ถึง 70 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.9955$) และความสามารถในการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่ 11 ไมโครโมลาร์

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($0.1\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 6.72xx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ตัดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

2.1.2 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($0.1\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่งโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 3.45xx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ตัดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

2.1.3 เตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือหนุ่นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (Phosphate buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสม 0.1 โมลาร์ สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น ปริมาตร 51 มิลลิลิตร (การเตรียม 2.1.1) กับ 0.1 โมลาร์ สารละลายโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 49 มิลลิลิตร (การเตรียม 2.1.2) จากนั้นตรวจสอบ pH ของสารละลายด้วยเครื่องวัด pH เมื่อได้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 เก็บสารละลายที่ได้ในขวดเก็บสาร ตัดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม รอการใช้งานต่อไป

2.1.4 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ (0.1 M KCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.505x กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ตัดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

2.1.5 เตรียมสารละลาย 5 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต ($5\text{ mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต 0.082x กรัม ละลายด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ (การเตรียม 2.1.4) และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ตัดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

2.1.6 เตรียมสารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ NADPH (2 mM NADPH) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง NADPH 0.002x กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสารสีชาเนื่องจากเป็นสารที่ไวต่อแสง ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.7 เตรียมสารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ ไพรูเวต (2 mM Pyruvate) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ชั่งไพรูเวต 0.001x กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.8 เตรียมสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แอมโมเนียมไอออน (2 % by mass NH_4^+) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.9 เตรียมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แอมโมเนียมไอออน (0.1 % by mass NH_4^+) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.10 เตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (4.28 unit AlaDH) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

ปิเปตเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส 0.01 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิดและปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม เก็บสารละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.11 เตรียมสารละลาย 2.5 เปอร์เซ็นต์ กลูตารัลดีไฮด์ (0.25 % Glutaraldehyde) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิดและปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้

เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม เก็บสารละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.12 เตรียมสารละลาย 1 เปอร์เซนต์ แนฟฟิออน (1 % Nafion) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายแนฟฟิออน 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิด ปรับให้สารเป็นเบสเล็กน้อยด้วย 0.1 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ตรวจสอบค่า pH ให้ได้ประมาณ 7-8 ด้วยกระดาษทดสอบค่า pH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม เก็บสารละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.13 เตรียมสารละลาย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (0.1 N HCl)

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 37 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.14 เตรียมสารละลาย 5 เปอร์เซนต์ Stabilizer solution

ชั่งสาร alkyl phenol polyethylene oxide 2.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.15 เตรียมสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ (0.1 % NH_4Cl)

ชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.025x กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.16 เตรียมสารละลายน้ำยางชัน

ชั่งน้ำยางชัน 0.2xxx กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยถ้วยกรอง (Filter crucible) เก็บสารละลายที่กรองได้ในขวดเก็บสาร ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.17 เตรียมสารละลายเนสเลอร์ (Nessler reagent)

ละลาย HgI_2 1 กรัม และ KI 0.7 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร และเติมของผสมนี้เข้าพร้อมคนลงในสารละลายที่เย็นของ NaOH 1.6 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร

ด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ระบุชื่อ วันเดือนปี ที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.18 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับกรดฟอร์มิก อัตราส่วน 1:1

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ผสมกับกรดฟอร์มิกเข้มข้น 1 % ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปี ที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.19 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับกรดอะซิติก อัตราส่วน 1:1

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น 1 % ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปี ที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.20 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับคอปเปอร์ (Cu) อัตราส่วน 1:1

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) เข้มข้น 1 % ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปี ที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.1.21 เตรียมสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับแมกนีเซียม (Mg) อัตราส่วน 1:1

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) เข้มข้น 1 % ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ระบุชื่อ วันเดือนปี ที่เตรียม แล้วนำสารละลายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการใช้งานต่อไป

2.2 การเตรียมอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

2.2.1 เตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์

1. เตรียมสารละลายกรดกัดทอง (Aqua regia) โดยผสม กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นกับ กรดไนตริกเข้มข้นในอัตราส่วน 3 ต่อ 1
2. กาล้างอุปกรณ์เครื่องแก้วและแช่ไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างอุปกรณ์ด้วยน้ำปราศจากไอออนจนสะอาดปราศจากกรด แล้วนำเครื่องแก้วเหล่านั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 °C

2.2.2 เตรียมสารแขวนลอย 0.25 มิลลิโมลาร์ แมกนีไทต์ ($0.25 \text{ mM Fe}_3\text{O}_4$) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

1. ชั่งแมกนีไทต์ $0.001 \times$ กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนอุณหภูมิ 0°C แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 20 มิลลิลิตร
2. ติดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม

2.2.3 เตรียมสารละลาย 0.25 มิลลิโมลาร์ สารประกอบทอง (0.25 mM HAuCl_4) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

1. ชั่งสารประกอบทอง ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) $0.001 \times$ กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนอุณหภูมิ 0°C และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 20 มิลลิลิตร
2. ติดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม

2.2.4 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (0.1 M NaBH_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1. ชั่งโซเดียมโบโรไฮไดรด์ $0.018 \times$ กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนอุณหภูมิ 0°C และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร
2. ติดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม

2.2.5 การสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยอัตราส่วนโมล $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Au}$ เท่ากับ 1:0.8

1. ปิเปตสารแขวนลอยแมกนีไทต์ (การเตรียม 2.2.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปิเปตน้ำปราศจากไอออนอุณหภูมิ 0°C ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. ทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที
3. ปิเปตสารละลายสารประกอบทอง (การเตรียม 2.2.3) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
4. ทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 5 นาที
5. รีดิคซ์สารประกอบทองด้วยสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (การเตรียม 2.2.4) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร
6. ทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที
7. ติดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม เก็บสารละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C รอการใช้งานต่อไป

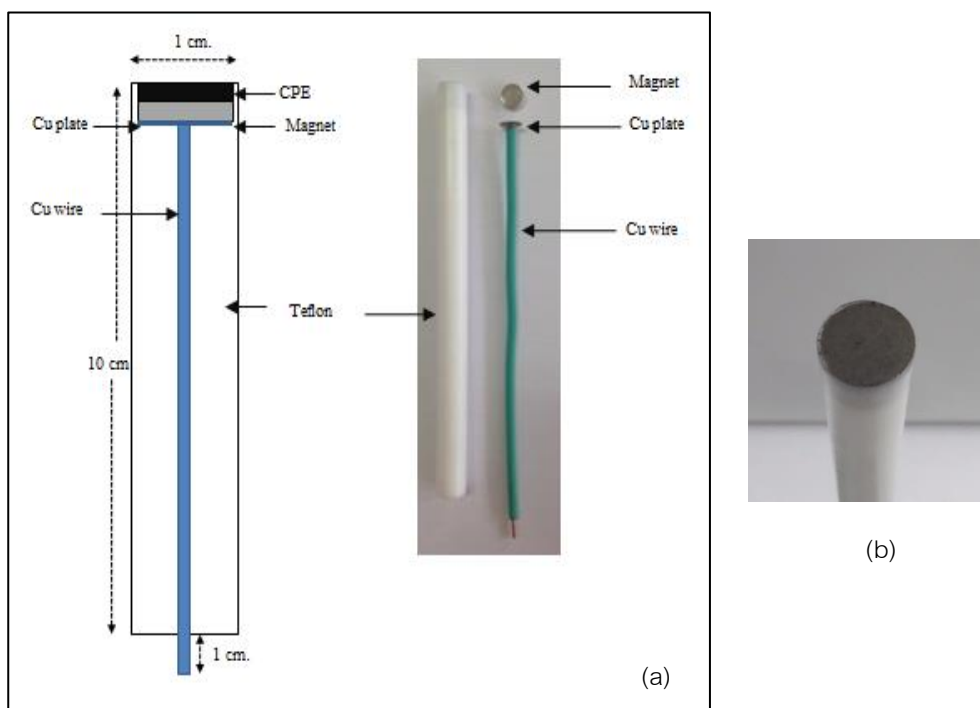
2.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพส

2.3.1 เตรียมคาร์บอนเพส

1. ชั่งผงคาร์บอน ปริมาณ 0.7xxx กรัม
2. เติมน้ำมันแร่ ปริมาณ 0.3xxx กรัม ผสมให้เข้ากัน
3. กวนจนเป็นเนื้อเดียวกันและเป็นเพส (Paste)
4. เก็บเพสในโถดูดความชื้น

2.3.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งาน

1. ออกแบบแท่งเทพลอนให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 11.5 เซนติเมตร
2. คว้านแท่งเทพลอนข้างในออกให้เป็นรูเพื่อใส่สายไฟเข้าไป โดยส่วนปลายด้านหนึ่งของแท่งเทพลอนจะคว้านออกให้ใหญ่พอที่จะใส่แม่เหล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร
3. ตัดสายไฟยาว 10 เซนติเมตร เอาฉนวนของสายไฟด้านปลายด้านหนึ่งออกประมาณ 1 เซนติเมตร ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งเชื่อมติดเข้ากับแผ่นทองแดง
4. สวมสายไฟ (เตรียมจากข้อ 3) เข้าไปในแท่งเทพลอน แล้ววางแม่เหล็กทับลงบนแผ่นเทพลอน ดังรูปที่ 2.1 (a)
5. อัดคาร์บอนเพสที่เตรียมได้ (จากข้อ 2.3.1) ลงในผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้ให้เต็มและแน่น จากนั้นขัดผิวหน้าคาร์บอนเพสให้เรียบและสม่ำเสมอด้วยแผ่นเทพลอน ดังรูปที่ 2.1 (b)



รูปที่ 2.1 (a) แท่งเทพลอนสำหรับสร้างขั้วไฟฟ้า และ (b) การอัดคาร์บอนเพสลงบนขั้วไฟฟ้า

2.3.3 เตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

1. ปิเปตสารละลาย 4.28 ยูนิต เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (การเตรียม 2.1.10) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิด
2. ปิเปตสารละลายอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (การเตรียม 2.2.5) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลาย ข้อ 1 ผสม
3. ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ครบ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที
4. เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน

2.3.4 ตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนผิวหน้าคาร์บอนเพส

จุ่มผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่เตรียม (การเตรียม 2.3.2) ลงในสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (การเตรียม 2.3.3) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำขั้วไฟฟ้าออกจากสารละลาย ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและรอการใช้งานต่อไป

2.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

2.4.1 ขั้วไฟฟ้าใช้งานพิมพ์สกรีนคาร์บอน

นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen-printed carbon electrode) ที่ทำการซิลเวอร์คอนดักทีฟเพ้นท์ (Silver conductive paint) ที่ปลายของขั้วไฟฟ้าเพื่อเชื่อมต่อการนำไฟฟ้า ดังรูปที่ 2.2 (a) และเชื่อมต่อเข้ากับชุดเซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 2.2 (b)

2.4.2 เตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

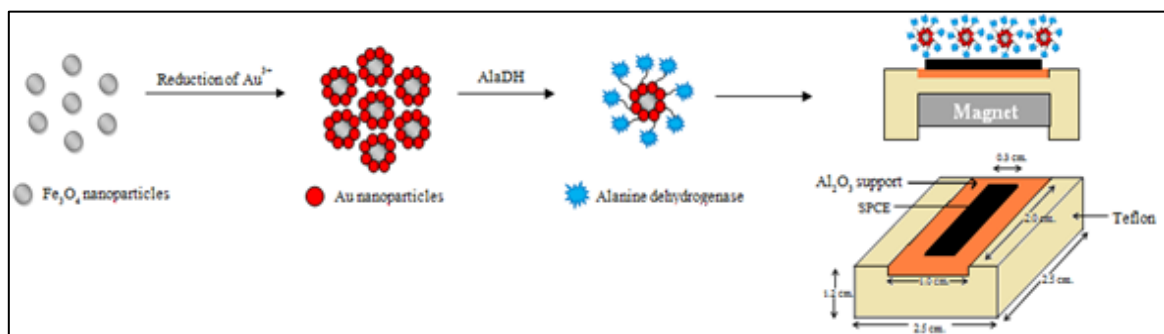
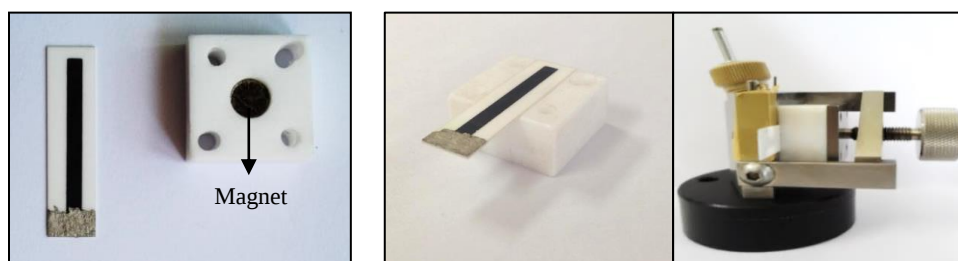
1. ปิเปตสารละลาย 4.28 ยูนิต เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (การเตรียม 2.1.10) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิด
2. ปิเปตสารละลายอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (การเตรียม 2.2.5) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลาย ข้อ 1
3. ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ครบ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที
4. เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน

2.4.3 เตรียมสารละลายผสมของโคแฟกเตอร์และสารตั้งต้น (Mixture solution of NADPH and pyruvate)

1. ปิเปตสารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ NADPH (การเตรียม 2.1.6) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิด
2. ปิเปตสารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ ไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลาย 2.5 เปอร์เซ็นต์ กลูตาไรลดีไฮด์ (การเตรียม 2.1.11) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ แนฟฟิออน (การเตรียม 2.1.12) ลงไปในสารละลาย ข้อ 1
3. ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ครบ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที
4. เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน

2.4.4 ตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ โคแฟกเตอร์ และสารตั้งต้น บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (จากข้อ 2.4.1) ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (วิธีการเตรียม 2.4.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และโคแฟกเตอร์กับสารตั้งต้น (วิธีการเตรียม 2.4.3) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและรอการใช้งานต่อไป ดังรูปที่ 2.2 (c)



รูปที่ 2.2 (a) ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (b) การเชื่อมต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนกับชุดเซลล์ไฟฟ้า และ (c) การตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ลงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 ศึกษาการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

2.5.1.1 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี

1. เลือกสแกนที่ความยาวคลื่น 300 - 800 นาโนเมตร (สแกน 3 รอบ)
2. ใส่น้ำปราศจากไอออนในเซลล์ 2 อัน โดยเซลล์อันที่ 1 ใช้เป็นเซลล์อ้างอิง และเซลล์อันที่ 2 ใช้เป็นสารละลายแบลนด์
3. สแกนสัญญาณการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลนด์
4. เปลี่ยนเอาเซลล์แบลนด์ออก ใส่เซลล์ที่ใส่สารแขวนลอยแมกนีไทต์ (การเตรียม 2.2.2) สารละลายทอง (การเตรียม 2.2.3) และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (การเตรียม 2.2.5) สแกนสัญญาณการดูดกลืนแสง ตามลำดับ บันทึกผลการทดลอง
5. ผลการทดลอง 3.1.1

2.5.1.2 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์

1. แยกตะกอนของสารแขวนลอยแมกนีไทต์ (การเตรียม 2.2.2) ใส่กระเจกนาฬิกา แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 °C
2. แยกตะกอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (การเตรียม 2.2.5) ใส่กระเจกนาฬิกา แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 °C
3. วัดการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ของอนุภาคแมกนีไทต์ที่เตรียมจากข้อที่ 1 และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่เตรียมจากข้อที่ 2 ตามลำดับ นำไปวางในที่ใส่ตัวอย่างของเครื่อง XRD ที่ใช้ $\text{Cu}_{K\alpha-1,2}$ ความยาวคลื่นเท่ากับ 1.54 Å เป็นแหล่งกำเนิดแสง โดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 35 มิลลิแอมแปร์ และความต่างศักย์เท่ากับ 40 กิโลโวลต์ ทำการสแกนในช่วง 2θ ตั้งแต่ 20-80° แล้วบันทึกผลการทดลอง
4. ผลการทดลอง 3.1.2

2.5.1.3 ศึกษาขนาดรูปร่างของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

1. ปิเปตสารแขวนลอยแมกนีไทต์ (การเตรียม 2.2.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน
2. ปิเปตอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (การเตรียม 2.2.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3. ปิเปตสารที่เตรียมจากข้อ 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นตาข่ายทองแดง (Copper grid) ที่เคลือบด้วยคาร์บอน ขนาด 200 เมช (Mesh) รอให้แห้ง
4. ตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ด้วยกำลังขยาย 50 เท่า แล้วบันทึกผลการทดลอง
5. ทำซ้ำข้อ 3-4 โดยเปลี่ยนเป็นสารที่เตรียมจากข้อ 2
6. ผลการทดลอง 3.1.3

2.5.1.4 ศึกษาประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าต่างๆ ดังนี้
 - ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ไม่มีการปรับปรุง
 - ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาค Fe_3O_4
 - ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$
2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี
3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลาย และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
4. ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.7 ถึง +1.0 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 0.05 โวลต์ต่อวินาที
5. ทำซ้ำข้อ 4 โดยใช้สารละลาย NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ (เตรียมจาก 2.1.6)
6. ทำซ้ำโดยเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าทำงานตามข้อ 1 จนครบทุกขั้วไฟฟ้า
7. ผลการทดลอง 3.1.4

2.5.1.5 ศึกษากระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$
2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี
3. ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (การเตรียม 2.1.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายและจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

4. ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.6 ถึง +1.0 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกนจาก 0.01 ถึง 0.175 โวลต์ต่อวินาที แล้วบันทึกผลการทดลอง
5. ผลการทดลอง 3.1.5

2.5.2 ศึกษาการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

2.5.2.1 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี

1. แยกตะกอนของสารแขวนลอยแมกนีไทต์ (การเตรียม 2.2.2) ใส่กระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ $110\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. แยกตะกอนของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (การเตรียม 2.2.5) ใส่กระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ $110\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. ผสมอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (การเตรียม 2.2.5) เข้ากับสารละลายเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส (การเตรียม 2.1.10) แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกตะกอนออกใส่กระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ $110\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. นำตะกอนที่ได้จากข้อที่ 1 ผสมเข้ากับ KBr บดให้ละเอียดและผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นอัดเป็นแผ่น
5. ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น $500\text{ ถึง }4000\text{ cm}^{-1}$ แล้วบันทึกผลการทดลอง
6. ทำซ้ำข้อ 4-5 โดยเปลี่ยนเป็นสารที่เตรียมจากข้อ 2 และ 3
7. ผลการทดลอง 3.2.1

2.5.2.2 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส เกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์สแกนอิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าต่างๆ ดังนี้
 - ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพลสที่ไม่มีการปรับปรุง
 - ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพลสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$
 - ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพลสที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$
2. ฉีดยาพื้นผิวหน้าคาร์บอนเพลสทุกสถานะที่เตรียมจากข้อ 1 ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกลาด ด้วยกำลังขยาย 200 และ 3,000 เท่า ตามลำดับ แล้วบันทึกผลการทดลอง

3. ผลการทดลอง 3.2.2

2.5.2.3 ศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าต่างๆ ดังนี้

- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ไม่มีการปรับปรุง
- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$
- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส
- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะ

ลานีนดีไฮโดรจีเนส

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ดังรูปที่ 2.3

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

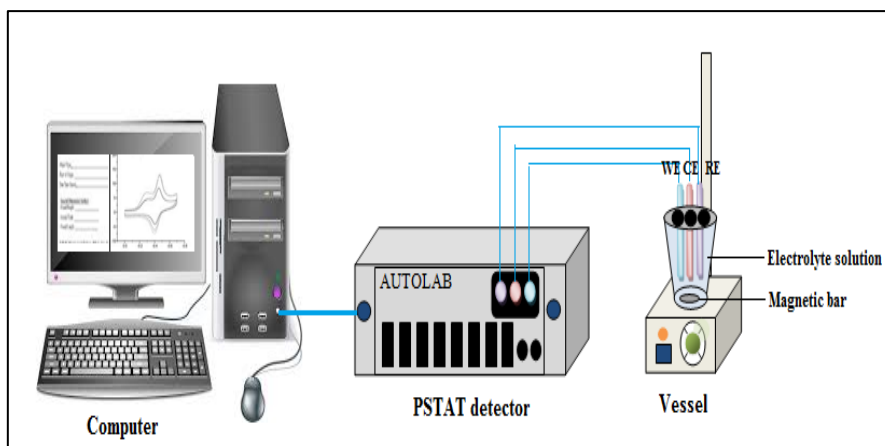
4. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสาร

5. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 แล้วกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสาร

6. ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.7 ถึง +1.0 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 0.05 โวลต์ต่อวินาที

7. ทำซ้ำโดยเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าทำงานตามข้อ 1 จนครบทุกขั้วไฟฟ้า

8. ผลการทดลอง 3.2.3



รูปที่ 2.3 ระบบการวิเคราะห์ทางเคมีวิเคราะห์ไฟฟ้า

2.5.2.4 ศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าต่างๆ ดังนี้

- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์ที่ไม่มีการปรับปรุง
- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์ที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$
- ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์ที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

4. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที

5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่

6. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง

7. ทำซ้ำโดยเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าทำงานตามข้อ 1 จนครบทุกขั้วไฟฟ้า

8. ผลการทดลอง 3.2.4

2.5.3 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ

2.5.3.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (การเตรียม 2.3.4) โดยตรึงเอนไซม์เป็นเวลา 5, 10, 20, 30 และ 40 นาที
2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอม เพอโรเมทรี ศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
4. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
6. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง
7. ผลการทดลอง 3.3.1

2.5.3.2 ศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส และอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ จำนวน 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} และ 5×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ
2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอม เพอโรเมทรี ศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
4. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่

6. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง

7. ผลการทดลอง 3.3.2

2.5.3.3 ศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ จำนวน 0.003 มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี ศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

4. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราความเร็ว 100 รอบต่อนาที

5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่

6. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง

7. ผลการทดลอง 3.3.3

2.5.3.4 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ จำนวน 0.003 มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี ศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

4. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราความรอบ 100 รอบต่อนาที

5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.4 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสไฟฟ้าหลังจนวนที่

6. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง

7. ทำซ้ำข้อที่ 1-4 โดยศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.5, +0.6 และ +0.7 ตามลำดับ

8. ผลการทดลอง 3.3.4

2.5.3.5 ศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือหนพอดเฟสบัฟเฟอร์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2

2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราความรอบ 100 รอบต่อนาที

4. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสไฟฟ้าหลังจนวนที่

5. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง

6. ทำซ้ำข้อที่ 1-6 โดยเปลี่ยนเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ

7. ผลการทดลอง 3.3.5

2.5.3.6 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2 ศึกษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวน

สารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที

4. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
5. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง
6. ทำซ้ำข้อที่ 1-6 โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ
7. ผลการทดลอง 3.3.6

2.5.3.7 ศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพริเวตที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2
2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และสารละลายไพริเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
4. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
5. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง
6. ทำซ้ำข้อที่ 1-6 โดยปิเปตสารละลายไพริเวต ปริมาตร 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในเซลล์ข้อ 3
7. ผลการทดลอง 3.3.7

2.5.3.8 ศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2
2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร และสารละลายไพริเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
4. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
5. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5

มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง

6. ทำซ้ำข้อที่ 1-6 โดยปิเปตสารละลาย NADPH ปริมาตร 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในเซลล์ข้อ 3

7. ผลการทดลอง 3.3.8

2.5.4 ศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ

2.5.4.1 ศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2
2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร และสารละลายไพโรเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
4. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
5. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก จากนั้นปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทุกๆ 100 วินาที จนกระทั่งได้สัญญาณคงที่ บันทึกผลการทดลอง
6. ผลการทดลอง 3.4.1

2.5.4.2 ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด

1. การทดลองตามวิธีการ 2.5.4.1 ข้อ 1-5
2. คำนวณหาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดจาก 3SD/slope
3. ผลการทดลอง 3.4.2

2.5.4.3 ศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด

1. การทดลองตามวิธีการ 2.5.4.1 ข้อ 1-5
2. คำนวณหาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดจาก 10SD/slope
3. ผลการทดลอง 3.4.3

2.5.4.4 ศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า จัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า และทำการทดลองตามวิธีการ 2.5.4.1 ข้อ 1-4
2. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง
3. ทำซ้ำข้อ 1-2 แล้วคำนวณหาความแม่นยำของการตรวจวัด
4. ผลการทดลอง 3.4.4

2.5.4.5 ศึกษาความแม่นยำของขั้วไฟฟ้า

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าจำนวน 3 ขั้ว จัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า และทำการทดลองตามวิธีการ 2.5.4.1 ข้อ 1-4
2. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ (การเตรียม 2.1.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง
3. ทำซ้ำข้อ 1-2 โดยศึกษาขั้วไฟฟ้าอีก 2 ขั้ว แล้วคำนวณหาความแม่นยำของขั้วไฟฟ้า
4. ผลการทดลอง 3.4.5

2.5.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวัดในระบบการไหลอัตโนมัติ

2.5.5.1 ศึกษาชนิดของขั้วไฟฟ้าทำงานต่อการให้สัญญาณการวิเคราะห์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าต่างๆ ดังนี้
 - ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่มีการปรับปรุง
 - ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาค $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส
 - ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาค $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส และสารตั้งต้นไพรูเวต
 - ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาค $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สารตั้งต้นไพรูเวต และโคแฟกเตอร์ NADPH
 - ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาค $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สารตั้งต้นไพรูเวต โคแฟกเตอร์ NADPH และกลูตาไรลดีไฮด์
 - ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาค $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สารตั้งต้นไพรูเวต โคแฟกเตอร์ NADPH กลูตาไรลดีไฮด์ และแนฟฟิออน
2. ประกอบอิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าสามขั้ว ได้แก่ ขั้ว

ไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ซึ่งจะมีแม่เหล็กภายนอกประกบ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และ ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม ต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลอัตโนมัติ ที่มีเพอร์ิสแตติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย ดังรูปที่ 2.4

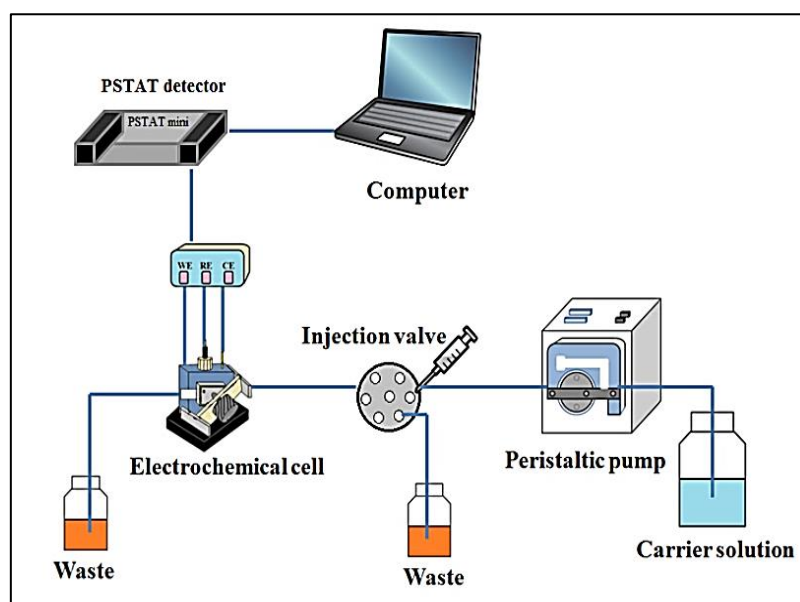
3. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

4. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหล

ด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

5. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียม 2.1.9) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

6. ผลการทดลอง 3.5.1



รูปที่ 2.4 ระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ

2.5.5.2 ศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้

งาน

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส สารตั้งต้นไพรวูเวต โคแฟกเตอร์ NADPH และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 0.5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} และ 2×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (การเตรียม 2.4.4)

2. ประกอบอิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าสามขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ซึ่งจะมีแม่เหล็กภายนอกประกบ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และ ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม ต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลอัตโนมัติ ที่มีเพอร์ิสแตติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย

3. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

4. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหลด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
5. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
6. ผลการทดลอง 3.5.2

2.5.5.3 ศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้

งาน

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ จำนวน 10×10^{-5} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร สารตั้งต้นไพรูเวต โคแฟกเตอร์ NADPH และ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตรตามลำดับ (การเตรียม 2.4.4)
2. ประกอบอิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าสามขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ซึ่งจะมีแม่เหล็กภายนอกประกบ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และ ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม ต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลอัตโนมัติที่มีเพอร์ิสแตติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย
3. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี
4. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหลด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
5. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
6. ผลการทดลอง 3.5.3

2.5.5.4 ศึกษาปริมาณของสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ จำนวน 10×10^{-5} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร โคแฟกเตอร์ NADPH และสารตั้งต้นไพรูเวต ปริมาณ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (การเตรียม 2.4.4)
2. ประกอบอิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าสามขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ซึ่งจะมีแม่เหล็กภายนอกประกบ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และ ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม ต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลอัตโนมัติที่มีเพอร์ิสแตติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย
3. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

4. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหลด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
5. นีตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
6. ผลการทดลอง 3.5.4

2.5.5.5 ศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ จำนวน 10×10^{-5} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร สารตั้งต้นไพรูเวต ปริมาณ 0.4 มิลลิโมลาร์ และโคแฟกเตอร์ NADPH ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (การเตรียม 2.4.4)
2. ประกอบอิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าสามขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ซึ่งจะมีแม่เหล็กภายนอกประกบ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม ต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลอัตโนมัติที่มีเพอร์ิสแตร์ติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย
3. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี
4. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหลด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
5. นีตสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
6. ผลการทดลอง 3.5.5

2.5.5.6 ศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ จำนวน 10×10^{-5} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร สารตั้งต้นไพรูเวต ปริมาณ 0.4 มิลลิโมลาร์ และโคแฟกเตอร์ NADPH ปริมาณ 0.8 มิลลิโมลาร์ (การเตรียม 2.4.4)
2. ประกอบอิเล็กโตรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าสามขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ซึ่งจะมีแม่เหล็กภายนอกประกบ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม ต่อเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลอัตโนมัติที่มีเพอร์ิสแตร์ติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย
3. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี
4. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหล

ด้วยอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

5. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

6. ทำซ้ำข้อ 1-5 โดยเปลี่ยนอัตราการไหลเป็น 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

7. ผลการทดลอง 3.5.6

2.5.5.7 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.5.6 ข้อ 1-2

2. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.2 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

3. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหล

ด้วยอัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

4. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

5. ทำซ้ำข้อ 1-4 โดยเปลี่ยนศักย์กระตุ้นเป็น +0.3, +0.4, +0.5, +0.6, +0.7 และ +0.8 โวลต์ ตามลำดับ

6. ผลการทดลอง 3.5.7

2.5.5.8 ศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.5.6 ข้อ 1-2

2. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.7 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

3. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหล

ด้วยอัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

4. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

5. ทำซ้ำข้อ 1-4 โดยเปลี่ยนเป็นสารละลายตัวพา pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ

6. ผลการทดลอง 3.5.8

2.5.5.9 ศึกษาปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.5.6 ข้อ 1-2

2. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.7 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี

3. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหล

ด้วยอัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

4. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
5. ทำซ้ำข้อ 1-4 โดยเปลี่ยนปริมาตรการฉีดสารเป็น 50, 100, 250 และ 500 ตามลำดับ
6. ผลการทดลอง 3.5.9

2.5.6 ศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

2.5.6.1 ศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.5.6 ข้อ 1-2
2. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.7 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี
3. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหล

ด้วยอัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

4. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 และ 0.60 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

5. ผลการทดลอง 3.6.1

2.5.6.2 ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด

1. การทดลองตามวิธีการ 2.5.6.1 ข้อ 1-4
2. คำนวณหาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดจาก 3SD/slope

3. ผลการทดลอง 3.6.2

2.5.6.3 ศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่ำสุด

1. การทดลองตามวิธีการ 2.5.6.1 ข้อ 1-4
2. คำนวณหาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดจาก 10SD/slope

3. ผลการทดลอง 3.6.3

2.5.6.4 ศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า จัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า และทำการทดลองตามวิธีการ 2.5.6.1 ข้อ 1-3

2. นีตสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
3. ทำซ้ำข้อ 1-2 แล้วคำนวณหาความแม่นยำของการตรวจวัด
4. ผลการทดลอง 3.6.4

2.5.6.5 ศึกษาความแม่นยำของขั้วไฟฟ้า

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าจำนวน 3 ขั้ว จัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า และทำการทดลองตามวิธีการ 2.5.6.1 ข้อ 1-3

2. นีตสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสดั้วพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
3. ทำซ้ำข้อ 1-2 โดยศึกษาขั้วไฟฟ้าอีก 2 ขั้ว แล้วคำนวณหาความแม่นยำของขั้วไฟฟ้า
4. ผลการทดลอง 3.6.5

2.5.7 ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชั้น

2.5.7.1 ศึกษาตัวรบกวนการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2
2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
3. ปิเปตสารละลาย NADPH เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (การเตรียม 2.1.6) ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร และสารละลายไพรูเวต เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (การเตรียม 2.1.7) ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 2 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
4. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
5. ปิเปตสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับกรดฟอร์มิก (การเตรียม 2.1.18) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก บันทึกผลการทดลอง
6. ทำซ้ำการทดลองที่ 1-5 จำนวน 2 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง
7. ทำซ้ำการทดลองที่ 1-6 โดยเปลี่ยนเป็นปิเปตสารละลายผสมของแอมโมเนียมไอออนกับกรดอะซิติก (การเตรียม 2.1.19) สารผสมกับคอปเปอร์ (การเตรียม 2.1.20) และสารผสมกับแมกนีเซียม (การเตรียม 2.1.21) ตามลำดับ
8. ผลการทดลอง 3.7.1

2.5.7.2 ศึกษาปัจจัยการเจือจางตัวอย่าง (Dilution factor)

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2
2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 2 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
4. ปิเปตน้ำยาสด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3
5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสไฟฟ้าหลังจนวนครั้งที่
6. ปิเปตน้ำยาสด ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก จากนั้นปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ทุกๆ 100 วินาที จนกระทั่งได้สัญญาณคงที่ บันทึกผลการทดลอง
7. ทำซ้ำการทดลองที่ 1-6 โดยเปลี่ยนเป็นปิเปตน้ำยาสด ปริมาตร 0.20, 0.13, 0.10 และ 0.08 มิลลิลิตร ตามลำดับ
8. ผลการทดลอง 3.7.2

2.5.7.3 ศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ โดยใช้วิธี

เติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (Standard addition method)

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.3.4 ข้อ 1-2
2. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น
3. ปิเปตสารละลาย NADPH (การเตรียม 2.1.6) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร และสารละลายไพรูเวต (การเตรียม 2.1.7) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 2 จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 100 รอบต่อนาที
4. ปิเปตน้ำยาสด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 3
5. เริ่มให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สังเกตสัญญาณกระแสไฟฟ้าหลังจนวนครั้งที่
6. ปิเปตน้ำยาสด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ข้อ 4 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก จากนั้นปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ทุกๆ 100 วินาที จนกระทั่งได้สัญญาณคงที่ บันทึกผลการทดลอง
7. ทำซ้ำการทดลองที่ 1-6 จำนวน 2 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง
8. ผลการทดลอง 3.7.3

2.5.7.4 ศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (Standard addition method)

1. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมไอออน 25 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 4 ใบ ด้วยปริมาตร 0, 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิลิตร ตามลำดับ
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำยางข้นลงในขวดข้อ 1 ขวดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0
3. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์ทางไฟฟ้า ดังการทดลอง 2.5.5.6 ข้อ 1-2
4. ให้ศักย์กระตุ้นที่ +0.7 โวลต์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี
5. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสารละลายตัวพาในระบบการไหลด้วยอัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที
6. ฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ ขวดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง
7. ทำซ้ำการทดลองที่ 1-6 โดยฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออนขวดที่ 2-4 เข้าไปในระบบ
8. ผลการทดลอง 3.7.4

2.5.7.5 ศึกษาด้วยเทคนิคการไทเทรต (Titration method)

1. ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.05xx กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และหยดเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ จำนวน 3 หยด
2. เติมสารละลาย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (การเตรียม 2.1.13) ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ไทเทรตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ข้อ 1) กับกรดไฮโดรคลอริก (ข้อ 2) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีโอรส บันทึกผลการทดลอง
4. ตวงน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ Stabilizer solution (การเตรียม 2.1.14) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
5. ชั่งน้ำยางข้นประมาณ 5-10 กรัมลงในบีกเกอร์ข้อ 4 และหยดเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ จำนวน 10 หยด
6. ไทเทรตน้ำยาง (ข้อ 5) กับกรดไฮโดรคลอริก (ข้อ 2) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีโอรส บันทึกผลการทดลอง
7. คำนวณหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้น
8. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนกับไบโอเซนเซอร์ แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 3.7.5

2.5.7.6 ศึกษาด้วยเทคนิคการวัดสี (Spectrophotometric method)

1. ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (การเตรียม 2.1.15) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ด้วยปริมาตร 0, 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.100 มิลลิลิตร ตามลำดับ
2. ปิเปตสารละลายน้ำยารุ่น (การเตรียม 2.1.16) ลงในขวดข้อ 1 ขวดละ 0.05 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายเนสเลอร์ (การเตรียม 2.1.17) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรข้อ 2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร
4. ปลอ่ยให้สารละลายทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ 10 นาที แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องวัดสี (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง
5. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนกับไปโอเซนเซอร์ แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 3.7.5

2.5.7.7 ศึกษาด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion selective electrode)

ส่งตัวอย่างน้ำยารุ่นไปตรวจวัดที่กลุ่มอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนกับไปโอเซนเซอร์ แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 3.7.5

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ยังเพิ่มประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์โดยปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โดยใช้ Fe_3O_4 เป็นแกน (Core) และทองเป็นเชลล์ (Shell) เนื่องจาก Fe_3O_4 มีสมบัติความเป็นแม่เหล็ก ช่วยในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสให้ติดอยู่บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า และทองอนุภาคนาโนสามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่ไทออล (Thiol) และหมู่เอมีน (Amine) ในโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้ทองเปรียบเสมือนเป็นสะพานเชื่อมในการนำส่งอิเล็กตรอนโดยตรง ส่งผลให้ไบโอเซนเซอร์มีสภาพไวสูงขึ้น โดยในงานวิจัยตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส วิเคราะห์แอมโมเนียมไอออนในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ และศึกษาการวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ โดยเปลี่ยนจากการใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเป็นขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีนคาร์บอน โดยไบโอเซนเซอร์นี้ทำการตรวจวัดสัญญาณกระแสด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี ซึ่งกระแสที่เกิดขึ้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมิเนชัน (Reductive amination) ของไพรูเวตได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะลานีน ในสภาวะที่มี NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจะใช้แอมโมเนียมไอออนเพื่อให้ไพรูเวตเกิดปฏิกิริยาอะมิเนชันได้อย่างจำเพาะเจาะจง และ NADPH จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น NADP^+ และได้รับ 2 อิเล็กตรอน ทำให้เกิดการไหลของอิเล็กตรอนและวัดสัญญาณกระแสสัมพันธ์กับปริมาณแอมโมเนียมไอออน

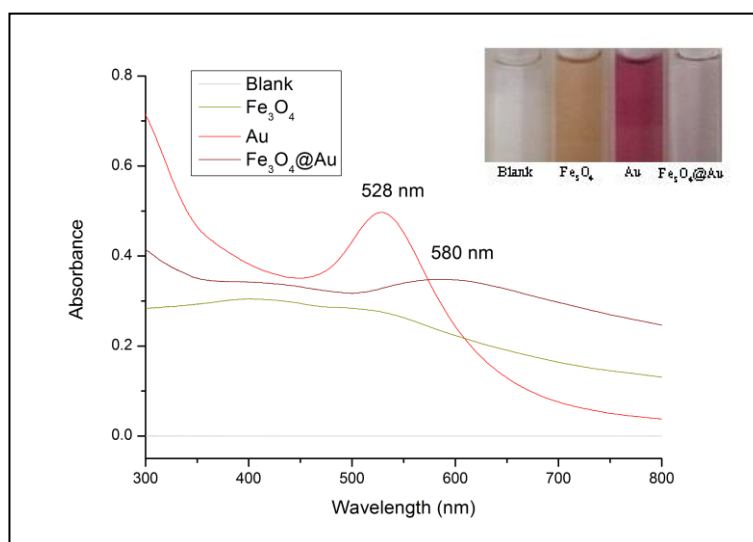
ดังนั้นงานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางรูปร่างและขนาดของอนุภาค เอกลักษณ์การนำส่งอิเล็กตรอน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ และประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน ตรวจวิเคราะห์ในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ

3.1 ผลการศึกษาการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งอิเล็กตรอน และเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสและขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน จึงทำการศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี และเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ ในขณะเดียวกันศึกษาเอกลักษณ์ทางขนาดและรูปร่างของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ยิ่งไปกว่านั้นศึกษาเอกลักษณ์การนำส่งอิเล็กตรอนและกระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี รายละเอียดของผลการทดลอง ดังนี้

3.1.1 ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี

ศึกษาขนาดของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโกปี โดยเปรียบเทียบผลของสเปกตรการดูดกลืนแสงของ Fe_3O_4 ทองอนุภาคนาโน และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (วิธีการทดลอง 2.5.1.1) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1



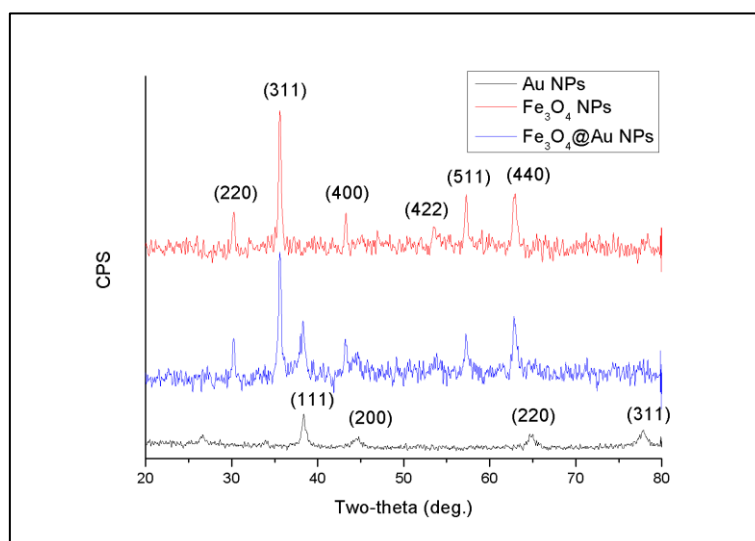
รูปที่ 3.1 สเปกตรายูวี-วิสิเบิล ของสารละลายแบงค์ (เส้นกราฟสีเทา) Fe_3O_4 (เส้นกราฟน้ำตาล) ทองอนุภาคนาโน (เส้นกราฟสีแดง) และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (เส้นกราฟสีม่วง) สแกนในช่วงความยาวคลื่น 300-800 นาโนเมตร

จากผลการทดลองพบว่า ทองอนุภาคนาโน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร ในขณะที่ Fe_3O_4 ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 580 นาโนเมตร พบว่าอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ แสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นสูงกว่าทองอนุภาคนาโน เนื่องจากเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ตำแหน่งความยาวคลื่นสูงขึ้น (Red shift) ไปประมาณ 50 นาโนเมตร เป็นผลจากปรากฏการณ์เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance) ของทอง ซึ่งเป็นการสั่นของอิเล็กตรอนบริเวณรอยต่อของโลหะกับสารไดอิเล็กทริก (Dielectric) เมื่อทองมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นจะทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สูงขึ้น และถ้าทองมีขนาดอนุภาคที่เล็กลงจะทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำลง (Blue shift) ดังนั้นตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดจึงสัมพันธ์กับขนาดของอนุภาค และสามารถอธิบายแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของขนาดอนุภาคได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Qiu J. D. และคณะ [45] และงานวิจัยของคุณ Irudayaraj J. และคณะ [46] ได้สังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ พบว่าอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นสูงกว่าทองอนุภาคนาโน

เพื่อเป็นการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่สังเคราะห์ได้ ผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.1.2 ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์

ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ โดยเปรียบเทียบผลของสเปกตรากการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (XRD) ของ Fe_3O_4 ทองอนุภาคนาโน และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (วิธีการทดลอง 2.5.1.2) ผลการทดลองดังรูปที่ 3.2



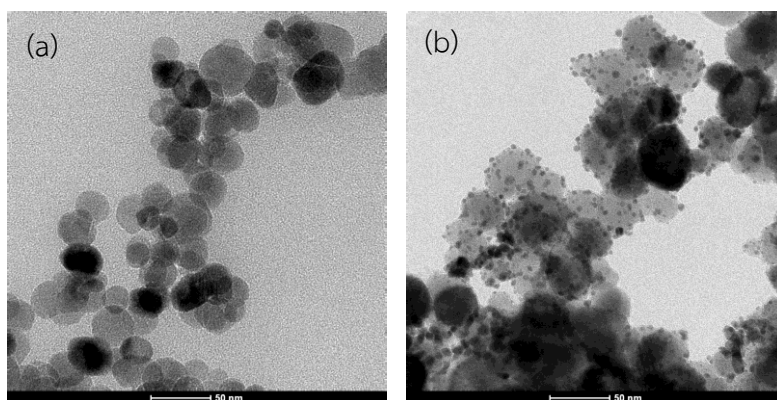
รูปที่ 3.2 สเปกตรากการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (XRD) ของทองอนุภาคนาโน (เส้นกราฟสีดำ) อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และ Fe_3O_4 (เส้นกราฟสีแดง)

จากผลการทดลองพบว่า ทองอนุภาคนาโนมีพีคการเลี้ยวเบนที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 38.2, 44.4, 64.6 และ 77.5 บ่งชี้ว่าเป็นแผนการเลี้ยวเบน (111), (200), (220) และ (311) ตามลำดับ ของทองอนุภาคนาโนในโครงสร้างผลึกที่เป็นแบบคิวบิก (Cubic phase) อนุภาค Fe_3O_4 มีพีคการเลี้ยวเบนที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 30.08, 35.38, 43.08, 53.48, 56.98 และ 62.58 เป็นแผนการเลี้ยวเบนของ Fe_3O_4 คือ (220), (311), (400), (422), (511) และ (440) ตามลำดับ พีคการเลี้ยวเบนทั้งหมดสอดคล้องกับ JPCD ของ Fe_3O_4 (JPCD 89-3854) ซึ่งเป็นรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของ Fe_3O_4 ที่มีลักษณะโครงสร้างผลึกเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ (Face centered cubic, FCC) อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ พบพีคการเลี้ยวเบนของทั้ง Fe_3O_4 และทองอนุภาคนาโน บ่งชี้ว่าทองอนุภาคเกาะติดอยู่บนพื้นผิวของอนุภาค Fe_3O_4 ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xie H.Y. และคณะ [49] ได้สังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Fe_3O_4 ทองอนุภาคนาโน และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ พบรูปแบบการเลี้ยวเบนของ Fe_3O_4 ทั้งหมด 6 พีค บ่งชี้ว่ามีลักษณะโครงสร้างผลึกแบบ FCC และเมื่อเกาะติดทองลงบนผิวของอนุภาค Fe_3O_4 พบพีคการเลี้ยวเบนเพิ่มที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 38.18 และ 44.28 ซึ่งเป็นรูปแบบการเลี้ยวเบนของทองอนุภาคนาโน

เพื่อเป็นการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่สังเคราะห์ได้ว่ามีทองเกาะติดอยู่บนพื้นผิวของอนุภาค Fe_3O_4 ผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.1.3 ผลการศึกษาขนาดรูปร่างของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เพื่อศึกษาขนาดและรูปร่างของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งเป็นเทคนิคการวัดพื้นผิวและศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาค (วิธีการทดลอง 2.5.1.3) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3



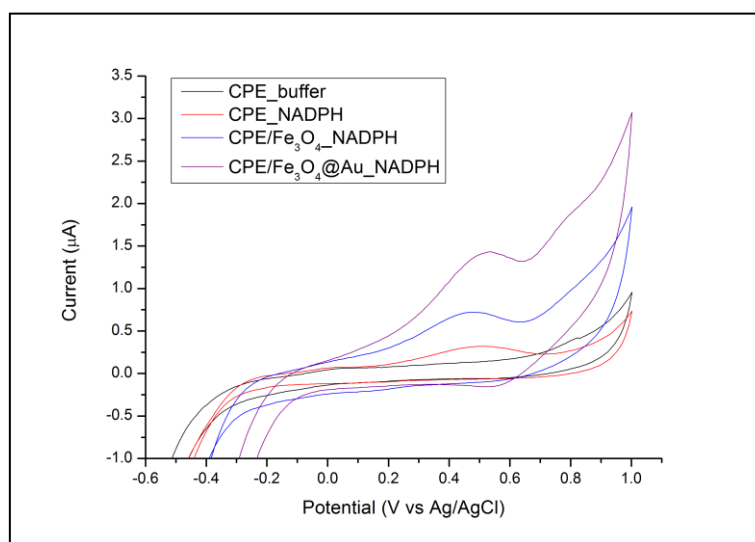
รูปที่ 3.3 รูปร่างและขนาดของอนุภาค (a) Fe_3O_4 และ (b) อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ผลการศึกษาพบว่า Fe_3O_4 มีรูปร่างเป็นทรงกลมซ้อนทับกัน ขนาดของอนุภาคประมาณ 20 นาโนเมตร ดังรูปที่ 3.3 (a) เมื่อทองอนุภาคนาโนเกาะติดบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 จะเห็นว่ามีจุดเล็ก ๆ ลักษณะคล้ายเมล็ดเกาะตามผิวของ Fe_3O_4 ซึ่งเกิดจากการรีดักชันด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ของ Au^{3+} กลายเป็นทองอนุภาคนาโนบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 ส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังรูปที่ 3.3 (b) ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xu J. J. และคณะ [50] ได้ศึกษาการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าขนาดอนุภาคของ Fe_3O_4 เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อถูกเคลือบผิวด้วยทองอนุภาคนาโน อีกทั้งการกระจายตัวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ดีกว่าของ Fe_3O_4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีทองเคลือบที่ผิวของ Fe_3O_4 จะทำให้มีความเสถียรและการกระจายตัวเพิ่มมากขึ้น

เพื่อยืนยันความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ผู้วิจัยได้ทำการประเมินความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.1.4 ผลการศึกษาการประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

เพื่อยืนยันความสามารถในการช่วยนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ จึงทำการศึกษาการทำงานของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าแบบต่างๆ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (วิธีการทดลอง 2.5.1.4) ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพส ศึกษาสัญญาณกระแสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เส้นกราฟสีดำ) เปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (เส้นกราฟสีแดง) ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วย Fe_3O_4 (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ศึกษาสัญญาณกระแสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ สแกนศักย์ไฟฟ้า -0.7 ถึง +1.0 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราการสแกน 0.05 โวลต์ต่อวินาที

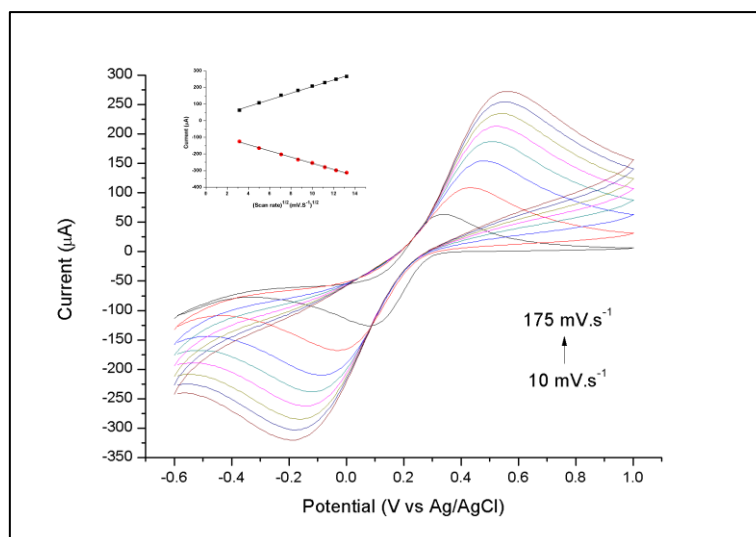
จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นขั้วไฟฟ้าใช้งานพบว่าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสตอบสนองต่อการตรวจวัดการเกิดออกซิเดชันของ NADPH ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ เมื่อปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วยอนุภาค Fe_3O_4 พบว่าขั้วไฟฟ้าสามารถตอบสนองต่อการเกิดออกซิเดชันของ NADPH และให้สัญญาณกระแสสูงขึ้น เนื่องจาก Fe_3O_4 สามารถช่วยเร่งการนำส่งอิเล็กตรอนได้ และสำหรับขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ให้สัญญาณการตอบสนองต่อการเกิดออกซิเดชันของ NADPH สูงที่สุด เนื่องจากในพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้ามี Fe_3O_4 ที่ช่วยนำส่งอิเล็กตรอน และทองอนุภาคนาโน มีสภาพการนำไฟฟ้าที่สูง ช่วยเร่งการนำส่งอิเล็กตรอน และมีพื้นที่ผิวมากทำให้เกิดปฏิกิริยาได้มาก ส่งผลให้ความไวในการตรวจวัดดีขึ้น ผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการวิจารณ์ของ He J. และคณะ [65] พบว่าเมื่อทำการปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยสารแม่เหล็กอนุภาคนาโน (Fe_3O_4 nanoparticles) สัญญาณการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เป็นผลมาจาก

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางไฟฟ้าของ Fe_3O_4 แสดงให้เห็นว่า Fe_3O_4 มีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ยอดเยี่ยม

ผู้วิจัยเลือกศึกษาชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษากระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.1.5 ผลการศึกษากระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

เพื่อตรวจสอบกระบวนการนำส่งอิเล็กตรอนของชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ผู้วิจัยศึกษาผลของอัตราการสแกนที่มีต่อการทำงานของชีวไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (วิธีการทดลอง 2.5.1.5) ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์ที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ศึกษาสัญญาณกระแสในสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ สแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.6 ถึง +1.0 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ที่อัตราการสแกนจาก 10 ถึง 175 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นชีวไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพสต์ที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ พบว่าสัญญาณกระแสที่ได้จากการตรวจวัดของชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อรากที่ 2 ของอัตราการสแกนเพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าชีวไฟฟ้าที่ถูกพัฒนาขึ้นเป็นแบบผันกลับได้และถูกควบคุมด้วยกระบวนการเคลื่อนที่โดยมวล (Mass transfer) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gu H. Y. และคณะ [55] สังเคราะห์

อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ใช้ปรับปรุงไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hb) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์ที่ถูกปรับปรุงด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ตรวจวัดโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)³ เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ศึกษาที่อัตราการสแกนจาก 20-400 มิลลิโวลต์ต่อวินาที พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อเพิ่มอัตราการสแกน

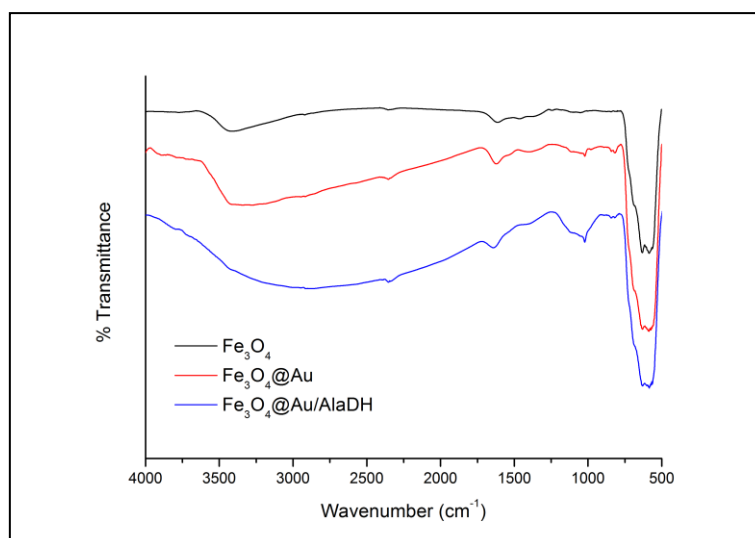
ผู้วิจัยสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ในขณะเดียวกันศึกษาความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีและเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี รายละเอียดของผลการทดลอง ดังนี้

3.2 ผลการศึกษาการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสและขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน เพื่อเป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ จึงทำการศึกษาเอกลักษณ์ของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.2.1 ศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี

เพื่อยืนยันว่าเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี โดยเปรียบเทียบผลของสเปกตรารการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ Fe_3O_4 อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (วิธีการทดลอง 2.5.2.1) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.6



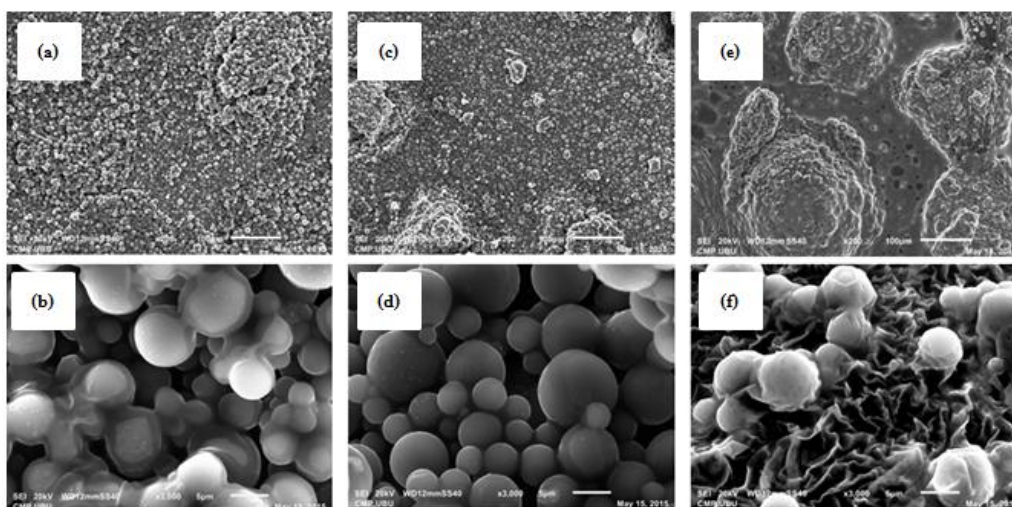
รูปที่ 3.6 สเปกตรากการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (FT-IR spectra) ของ Fe_3O_4 (เส้นกราฟสีดำ) อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (เส้นกราฟสีแดง) และอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (เส้นกราฟสีน้ำเงิน)

จากผลการทดลองพบว่า Fe_3O_4 มีพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 580 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดหด (Stretching) ของพันธะ Fe-O ของ Fe_3O_4 และพีการดูดกลืนที่ $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการสั่นแบบยืดหดของพันธะ O-H ซึ่งเป็นการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวของอนุภาค เนื่องจากในขั้นตอนการสังเคราะห์ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ส่งผลให้น้ำถูกดูดซับบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 และเมื่ออนุภาค Fe_3O_4 ถูกเคลือบด้วยทองอนุภาคนาโน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด เนื่องจากทองอนุภาคนาโนไม่ดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรด และหลังจากตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสลงบนพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ พบพีการสั่นที่ 1100 cm^{-1} เป็นผลมาจากการสั่นแบบยืดหดของพันธะ C-N ของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ ได้แก่ โฮโมซิสเทอีน (Homocysteine) เมไทโอนีน (Methionine) เป็นต้น ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bordbar A. K. และคณะ [51] สังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4/APTES$ โดยมีแมกนีไทต์ เป็นคอร์ (Core) ใช้อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (Aminopropyltriethoxysilane, APTES) ทำหน้าที่เป็นเชลล์ (Shell) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี พบพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของ Fe_3O_4 ที่ 576 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีการสั่นแบบยืดหด (Stretching) ของพันธะ Fe-O และพีการดูดกลืนที่ $3300\text{--}3450\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีการสั่นแบบยืดหดของ -OH และเมื่ออนุภาค Fe_3O_4 ถูกเคลือบด้วย APTES พบพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1109 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีการสั่นแบบยืดหดของ C-N

เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของชีวไฟฟ้าหลังจากทำการปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.2.2 ผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเปรียบเทียบกับพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ไม่ได้ทำการปรับปรุง และพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงเฉพาะอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (วิธีการทดลอง 2.5.2.2) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.7



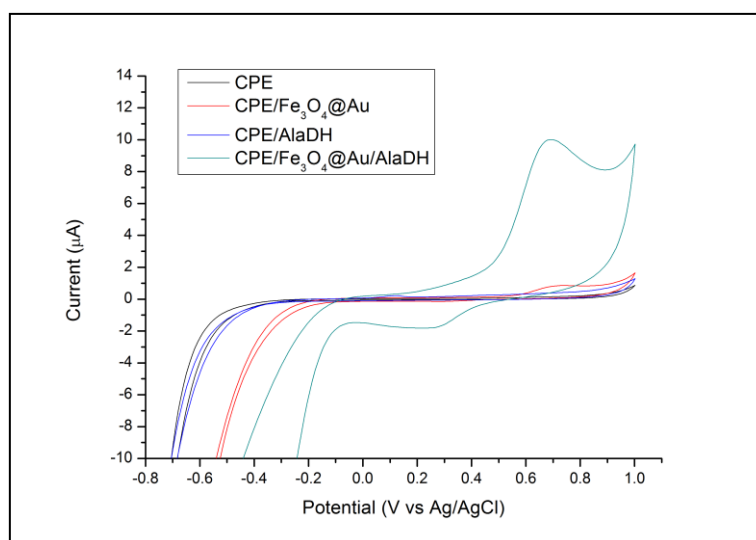
รูปที่ 3.7 ลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (a) กำลังขยาย 200 เท่า (b) กำลังขยาย 3000 เท่า ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (c) กำลังขยาย 200 เท่า (d) กำลังขยาย 3000 เท่า และขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (e) กำลังขยาย 200 เท่า (f) กำลังขยาย 3000 เท่า

จากผลการศึกษาพบว่า อนุภาคของคาร์บอนกระจายและเชื่อมซ้อนกันบนพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ไม่ได้ทำการปรับปรุง และมีชั้นของน้ำมันเคลือบอยู่ที่ผิวของอนุภาคคาร์บอนอย่างชัดเจน เนื่องจากคาร์บอนเพสเตรียมจากการนำผงคาร์บอนผสมกับน้ำมันแร่ (Mineral oil) เพื่อทำให้กลายเป็นเพส เมื่อทำการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ พบว่าอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ไปยึดเกาะอยู่บนผิวของอนุภาคคาร์บอน ส่งผลให้ชั้นน้ำมันเคลือบอยู่ที่ผิวของอนุภาคคาร์บอนหายไป และยังไปกว่านั้น เมื่อตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจะเห็นชั้นของโปรตีนปกคลุมที่ผิวหน้าของคาร์บอนเพส ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pundir C.S. และคณะ [66] ปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทองด้วย Fe_3O_4 มัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (MWCNT) และเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AChE) ทำการศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าปกคลุมไปด้วยชั้นโปรตีนของเอนไซม์

เพื่อยืนยันความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส และยืนยันความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ผู้วิจัยศึกษาความไวในการวิเคราะห์ของชีวไฟฟ้าที่ถูกปรับปรุง ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.2.3 ผลการศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส เกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

เพื่อยืนยันความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส และความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสัญญาณกระแสของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสแบบต่างๆ ได้แก่ (1) ชีวไฟฟ้าที่ไม่ได้ปรับปรุง (2) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (3) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส และ (4) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส วิเคราะห์สัญญาณกระแสตามปริมาณของแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีไพรูเวตเป็นสารตั้งต้น และ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ศึกษาด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (วิธีการทดลอง 2.5.2.3) ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 3.8



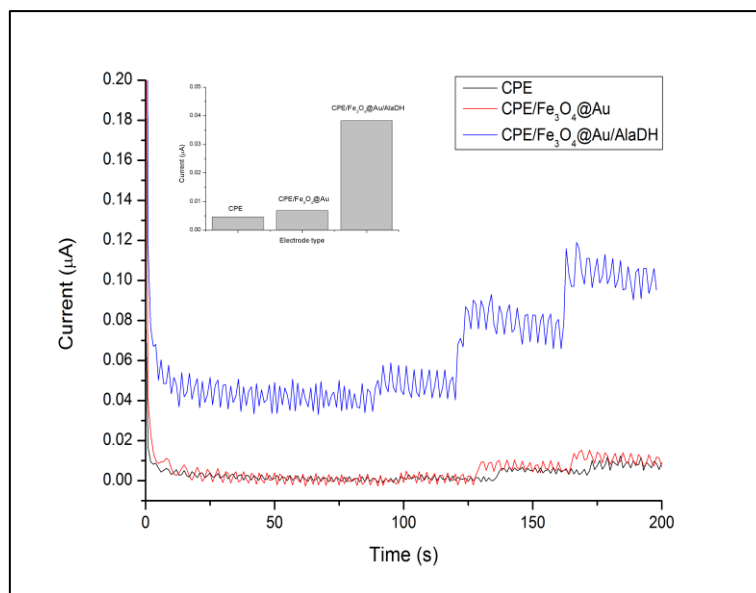
รูปที่ 3.8 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้าของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพส (เส้นกราฟสีดำ) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (เส้นกราฟสีแดง) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส (เส้นกราฟสีเขียว) ศึกษาสัญญาณกระแสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน สแกนศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง +1.0 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราการสแกน 0.05 โวลต์ต่อวินาที

จากผลการทดลอง พบว่าชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ให้สัญญาณกระแสสูงที่สุด เนื่องจากชีวไฟฟ้านี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมิเนชัน (Reductive amination) ของไพรูเวตได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะลานีน ในสภาวะที่มี NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ โดยในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจะใช้แอมโมเนียมไอออนเพื่อให้ไพรูเวตเกิดปฏิกิริยาอะมิเนชันได้อย่างจำเพาะเจาะจง และ NADPH จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น NADP^+ และได้รับ 2 อิเล็กตรอน ทำให้สามารถตรวจวัดจำนวนอิเล็กตรอนจากการเกิดปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้ชีวไฟฟ้านี้ยังถูกปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ซึ่ง Fe_3O_4 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าของชีวไฟฟ้าและยังสามารถช่วยเร่งการนำส่งอิเล็กตรอน และทองอนุภาคนาโนที่เคลือบอยู่บนผิวของ Fe_3O_4 สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่ไทออล (Thiol) หรือหมู่เอมีน (Amine) ภายในโครงสร้างของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ทำให้ทองอนุภาคนาโนเปรียบเสมือนเป็นสะพานเชื่อมในการขนส่งอิเล็กตรอนได้โดยตรง ทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนรวดเร็วขึ้น มีส่วนช่วยทำให้ไบโอเซนเซอร์มีสภาพไวสูงขึ้น ผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการวิจารณ์ของ Li J. และคณะ [67] ได้อธิบายการเกิดพันธะระหว่างทองอนุภาคนาโนกับหมู่เอมีนหรือหมู่ไทออลในโครงสร้างของเอนไซม์ ดังนั้นการปรับปรุงชีวไฟฟ้าด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ช่วยเพิ่มการนำส่งอิเล็กตรอนตามคุณสมบัติของทองอนุภาคนาโน

นอกจากนี้ผู้วิจัยยืนยันความสามารถการตอบสนองต่อสัญญาณกระแสของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี เพื่อนำไปสู่การสร้างไบโอเซนเซอร์ต่อไป รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.2.4 ผลการศึกษาประเมินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี

เพื่อยืนยันความสามารถการตอบสนองต่อสัญญาณกระแสของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสัญญาณกระแสของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสแบบต่างๆ ได้แก่ (1) ชีวไฟฟ้าที่ไม่ได้ปรับปรุง (2) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และ (3) ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส วิเคราะห์สัญญาณกระแสตามปริมาณของแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีไพรูเวตเป็นสารตั้งต้น และ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี (วิธีการทดลอง 2.5.2.4) ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลาของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (เส้นกราฟสีดำ) ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ (เส้นกราฟสีแดง) และขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงทั้งอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส (เส้นกราฟน้ำเงิน) ศึกษาสัญญาณกระแสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโพรวเตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

จากผลการทดลอง พบว่าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ให้สัญญาณกระแสสูงที่สุด เนื่องจากขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ใช้นี้อาศัยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส และความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ดังที่ได้อธิบายมาแล้วข้างต้น (ผลการทดลอง 3.2.3)

จากผลการศึกษา ผู้วิจัยเลือกขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ เพื่อหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมเบื้องต้นของไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

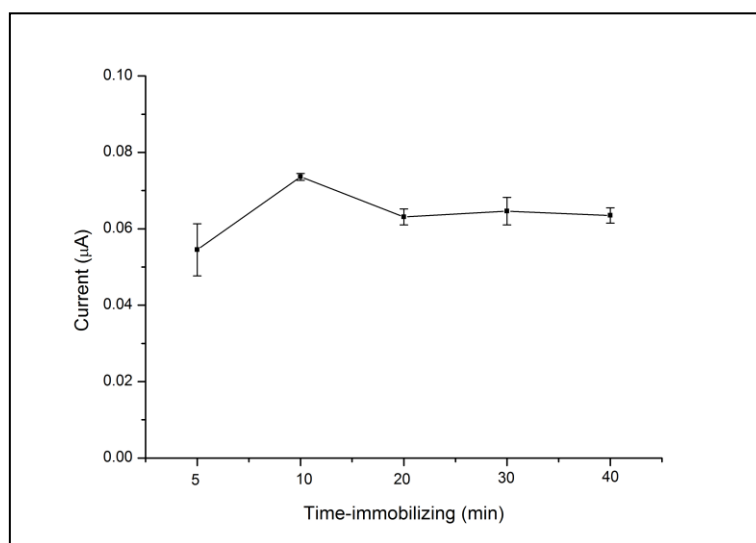
3.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ

เพื่อให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพการทำงานสูง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส จึงเป็นตัวแปรที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน ผู้วิจัยศึกษาตัวแปรต่างๆ ดังนี้ ศึกษาเวลาในการตรึงเอนไซม์ ศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และปริมาณเอนไซม์บนผิวหน้า

ชีวไฟฟ้า ศึกษาสภาวะศักย์กระตุ้น ศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตและปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ตามลำดับ

3.3.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าชีวไฟฟ้า

ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าของชีวไฟฟ้าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องศึกษา เพื่อให้ได้ไบโอเซนเซอร์ที่สามารถสร้างและตรวจวัดได้ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากที่สุด ผู้วิจัยศึกษาระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนผิวหน้าชีวไฟฟ้า 5, 10, 20, 30 และ 40 นาที ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.10 (วิธีการทดลอง 2.5.3.1)



รูปที่ 3.10 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนผิวหน้าของชีวไฟฟ้า ตั้งแต่ 5 ถึง 40 นาที ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมไอออน ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

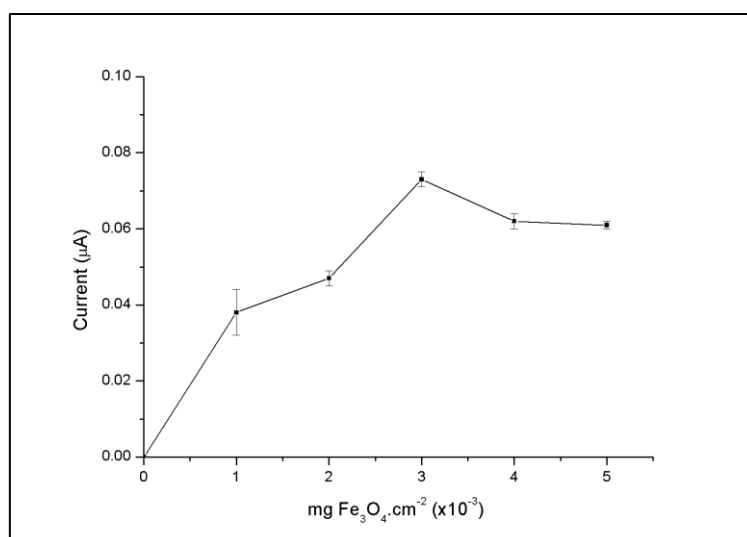
จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนผิวหน้าของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพส พบว่าเวลาในการตรึงเอนไซม์ที่ 10 นาที ให้สัญญาณกระแสสูงและเป็นเวลาที่เหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากถ้าใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์น้อยเกินไปจะทำให้เอนไซม์ยึดเกาะบนผิวหน้าชีวไฟฟ้าได้ไม่ดี ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนในการตรวจวัดสูง ในขณะที่เมื่อใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์มากเกินไปจะทำให้มีเอนไซม์และอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ มายึดเกาะบนผิวหน้าชีวไฟฟ้ามาก ส่งผลให้เกิดชั้นที่หนาของเอนไซม์และอนุภาคบนพื้นผิวของชีวไฟฟ้า ทำให้กีดกันการขนส่งอิเล็กตรอนจากสารละลายมายังผิวหน้าชีวไฟฟ้า ผลการศึกษาสอดคล้องกับการวิจารณ์ของ Noronha S.B. และคณะ [68] ทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงบนชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนเพื่อสร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์ พบว่าเมื่อใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์มาก ไม่ส่งผลให้สัญญาณการตอบสนองของ

ไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยเลือกระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่เหมาะสมคือ 10 นาที เพื่อให้ได้ไบโอเซนเซอร์ที่สามารถสร้างได้ง่าย รวดเร็ว และให้ประสิทธิภาพที่สูง

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.3.2 ผลการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน

อนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ช่วยในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าให้มีอายุการทำงานนานขึ้น และยังช่วยเพิ่มความไวของไบโอเซนเซอร์ ดังนั้นจำนวนของอนุภาคคอร์เซลล์จึงมีความสำคัญต่อความไวของการวิเคราะห์และอายุการใช้งาน ผู้วิจัยศึกษาจำนวนของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ตั้งแต่ 1×10^{-3} ถึง 5×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร ผลการทดลองรูปที่ 3.11 (วิธีการทดลอง 2.5.3.2)



รูปที่ 3.11 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ศึกษาจำนวนอนุภาคตั้งแต่ 1×10^{-3} ถึง 5×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อลิตร และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

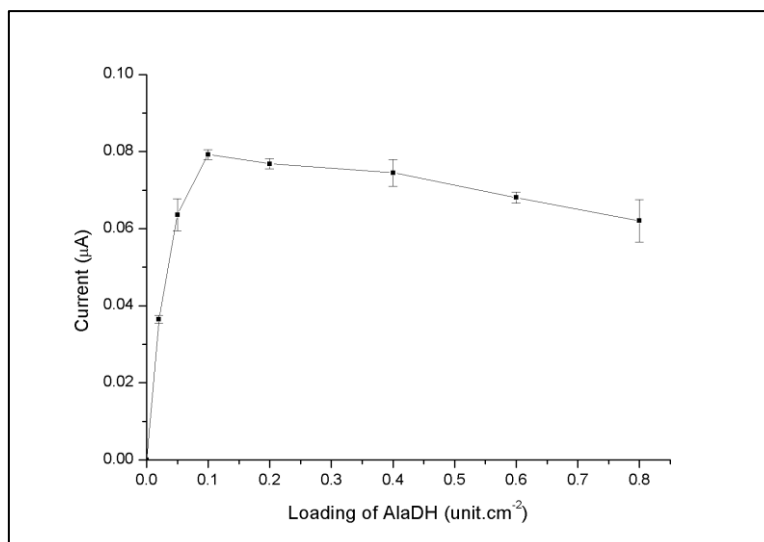
จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส พบว่าสัญญาณการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มปริมาณของอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ และการตอบสนองสูงที่สุดเมื่อปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร เนื่องจาก Fe_3O_4 สามารถช่วยเร่ง

การนำส่งอิเล็กตรอน และทองอนุภาคนาโนที่เคลือบอยู่บนผิวของ Fe_3O_4 สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่ไทออล (Thiol) หรือหมู่เอมีน (Amine) ภายในโครงสร้างของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ทำให้ทองอนุภาคนาโนเปรียบเสมือนเป็นสะพานเชื่อมในการขนส่งอิเล็กตรอนได้โดยตรง ทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนรวดเร็วขึ้น ส่งผลให้ชีวไฟฟ้ามีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่เมื่อใช้อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลงและเริ่มคงที่ เนื่องจากปริมาณที่มากเกินไปทำให้เกิดชั้นของอนุภาคบนพื้นผิวของชีวไฟฟ้ามีความหนามากขึ้น และอาจเกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการตรึงเอนไซม์ไม่ดี สัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้จึงลดลง ดังนั้นผู้วิจัยเลือกปรับปรุงชีวไฟฟ้าใช้งานด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร ผลการศึกษาสอดคล้องกับการวิจารณ์ของ Chen G. และคณะ [69] สร้างเซนเซอร์ตรวจวัดทางไฟฟ้าโดยปรับปรุงผิวหน้าชีวไฟฟ้าด้วยคอมโพสิตของคาร์บอนนาโนทิวกับแม่เหล็กอนุภาคนาโน (Carbon nanotube/nano- Fe_3O_4 composite) พบว่าสัญญาณการวิเคราะห์ลดลงเมื่อมีปริมาณสารคอมโพสิตบนผิวหน้าชีวไฟฟ้ามากเกินไป เนื่องจากสารคอมโพสิตส่วนเกินรบกวนการแพร่ของสารที่ต้องการวิเคราะห์บนผิวหน้าของเซนเซอร์

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมบนผิวหน้าของชีวไฟฟ้า รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.3.3 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าชีวไฟฟ้าใช้งาน

จากการศึกษาการทำงานของไบโอเซนเซอร์ เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่ตรึงบนผิวหน้าชีวไฟฟ้ามีผลต่อความไวในการวิเคราะห์ ดังนั้นปริมาณของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ผู้วิจัยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่ใช้ในการตรึงบนผิวหน้าชีวไฟฟ้า ตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.8 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ผลการทดลองดังรูปที่ 3.12 (วิธีการทดลอง 2.5.3.3)



รูปที่ 3.12 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ศึกษาปริมาณตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.8 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อลิตร และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

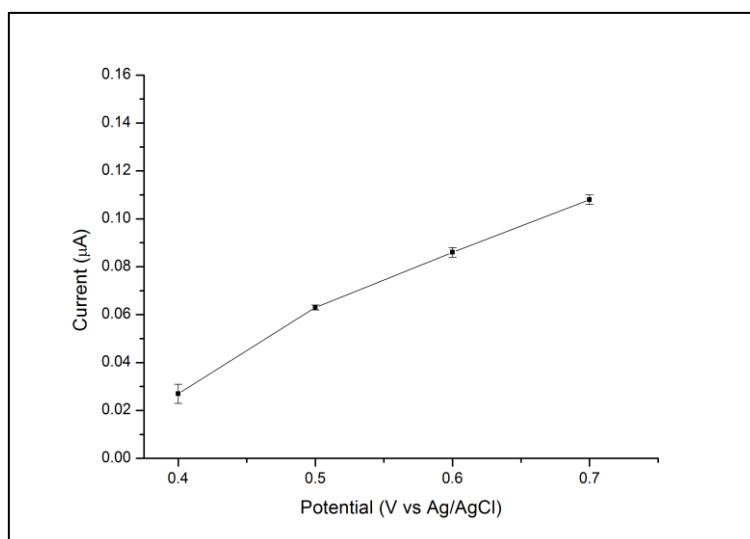
จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้าใช้งาน พบว่าการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสัญญาณกระแสที่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนอิเล็กตรอน และจำนวนอิเล็กตรอนนั้นได้มาจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นเมื่อมีปริมาณของเอนไซม์น้อย ความสามารถในการตอบสนองต่อการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนจึงมีน้อยด้วย จนถึงปริมาณเอนไซม์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ให้สัญญาณการตอบสนองสูงสุด ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าสูงขึ้น พบว่าสัญญาณการตอบสนองลดต่ำลง เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้การแพร่เกิดการจำกัด ส่งผลให้สัญญาณกระแสที่ได้ลดลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกปริมาณเอนไซม์ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ในการตรึงบนขั้วไฟฟ้าใช้งาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Apetrei C. [70] และคณะ ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยตรึงเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ลงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน พบว่าสัญญาณการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ลดลง เมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้การแพร่ของสารตัวกลาง NADH ถูกจำกัด

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาสถานะศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.3.4 ผลการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้ามีความสำคัญต่อความไวในการวิเคราะห์และหลักเลียงสัญญาณรบกวนจากสารรบกวน ผู้วิจัยศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นขั้วไฟฟ้าเพื่อให้เกิดการรับส่ง

อิเล็กตรอนที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.13 (วิธีการทดลอง 2.5.3.4)



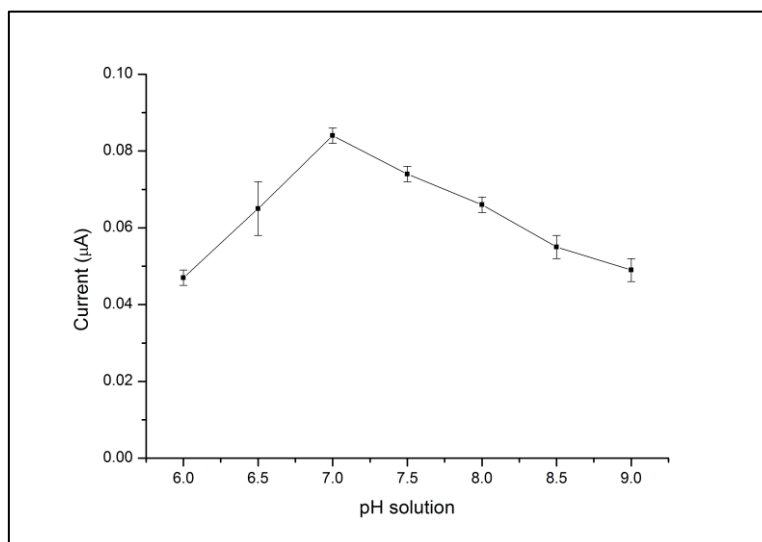
รูปที่ 3.13 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์กระตุ้นชั่วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นตั้งแต่ +0.4 ถึง +0.7 โวลต์ เทียบกับชั่วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมไอออน

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นชั่วไฟฟ้าใช้งานที่ถูกปรับปรุง พบว่าสัญญาณการตอบสนองเพิ่มขึ้นเมื่อศักย์กระตุ้นเพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ +0.6 โวลต์ เทียบกับชั่วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ เป็นศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tan L.L. และคณะ [22] ได้พัฒนาแอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน โดยตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสในเมทาคริลิกเมมเบรน (Methacrylic membrane) บนชั่วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน พบว่าการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้นเมื่อศักย์กระตุ้นเพิ่มขึ้น และสามารถทำงานได้ดีที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับชั่วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เกือหนุนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.3.5 ผลการศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สภาพความเป็นกรด-เบสของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนผิวหน้าของไบโอเซนเซอร์ เพื่อให้ได้สัญญาณการตอบสนองที่ดี ทำการศึกษาสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ตั้งแต่ 6.0 ถึง 9.0 ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.14 (วิธีการทดลอง 2.5.3.5)



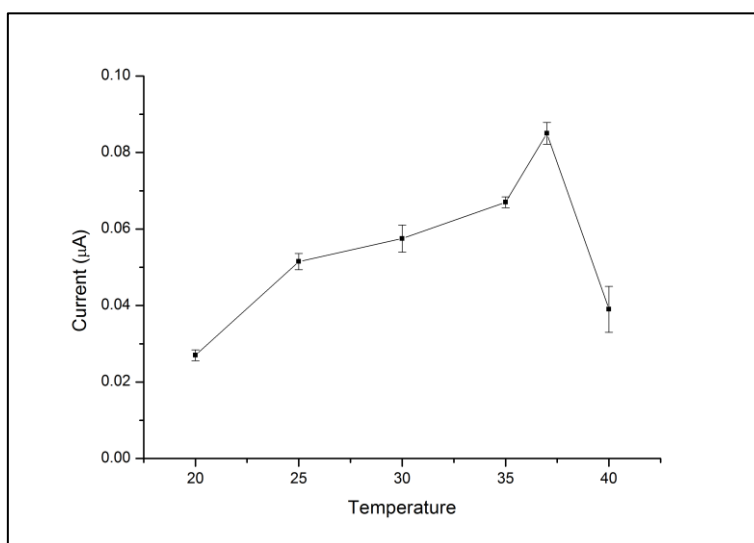
รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเป็นกรด-เบสของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ถึง 9.0 ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมไอออน

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเป็นกรด-เบสของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นตามสภาพกรด-เบสของสารละลายตัวพาดังแต่ 6.0 ถึง 7.0 หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้ลดลง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบสของสารละลาย ซึ่งเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง และการทำงานของเอนไซม์จะเสื่อมสภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดหรือเบสมากเกินไป ทำให้การเร่งปฏิกิริยาเกิดได้น้อย ดังนั้นผู้วิจัยเลือกสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tan L.L. และคณะ [22] ได้พัฒนาแอมโมเนียมไบโอเซนเซอร์โดยใช้เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเป็นสารชีวภาพ พบว่าเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.0

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.3.6 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งสามารถคงสภาพทางานได้ดีในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น แต่ในขณะเดียวกันจะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงศึกษาอุณหภูมิตั้งแต่ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.15 (วิธีการทดลอง 2.5.3.6)



รูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและอุณหภูมิในการวิเคราะห์ โดยใช้ชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีไพรูเวตและ NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ศึกษาอุณหภูมิในการวิเคราะห์ตั้งแต่ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส

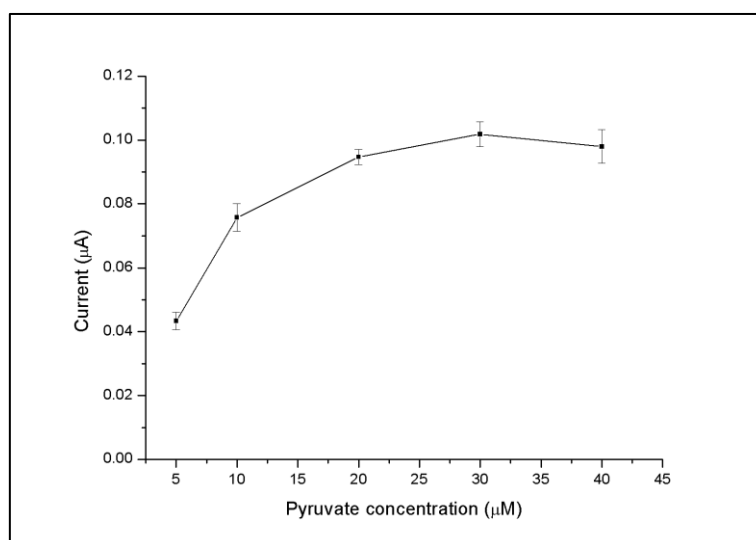
จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์พบว่าที่อุณหภูมิต่ำเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้น้อย แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นสัญญาณการตอบสนองมีค่าสูงขึ้นจากอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส และสัญญาณกระแสลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปส่งผลให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จากการศึกษาอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ให้สัญญาณการวิเคราะห์สูงที่สุด เนื่องจากเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส แต่ผู้วิจัยเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมใช้ในการวิเคราะห์ คือ อุณหภูมิห้องควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้สัญญาณกระแสที่ยอมรับได้และสะดวกต่อการวิเคราะห์

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Toppare L. และคณะ [71] พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการตรวจวัด พบว่าสัญญาณการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และทำงานได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 35 ถึง 60 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตและปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส อาศัยการทำงานร่วมกันของสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.3.7 ผลการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม

การตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องใช้สารตั้งต้นไพรูเวตในการเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นปริมาณของสารตั้งต้นไพรูเวตจึงมีผลต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณของไพรูเวตตั้งแต่ 5 ถึง 40 ไมโครโมลต่อลิตร ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.16 (วิธีการทดลอง 2.5.3.7)



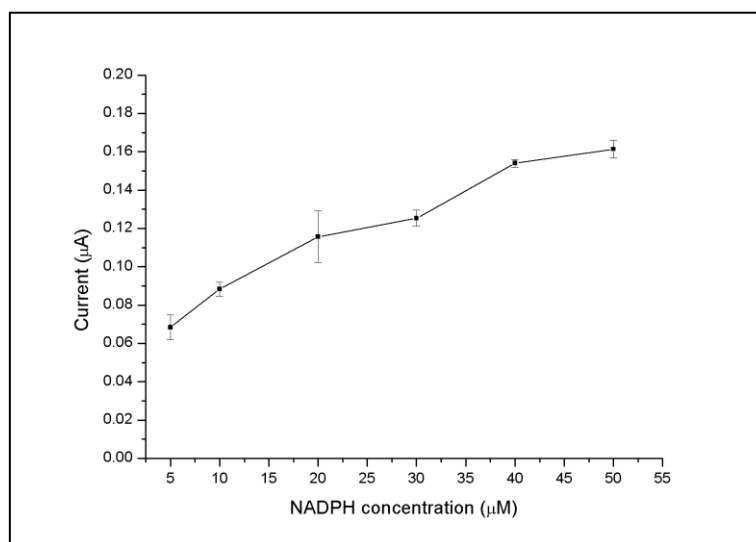
รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพรูเวต โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี NADPH เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพรูเวตตั้งแต่ 5 ถึง 40 ไมโครโมลาร์

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพรูเวต พบว่าสัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณของสารตั้งต้นไพรูเวตเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นที่ 30 ไมโครโม

ลาร์ หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้เริ่มคงที่ เนื่องจากเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมิเนชันของไพรูเวต โดยใช้แอมโมเนียมไอออนเพื่อให้ไพรูเวตเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นเมื่อมีปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตมาก ส่งผลให้เอนไซม์ใช้แอมโมเนียมไอออนมากเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยา สัญญาณกระแสที่ได้จึงสูงตามปริมาณของสารตั้งต้นและแอมโมเนียมที่ถูกใช้ในการเกิดปฏิกิริยา แต่เมื่อใช้ปริมาณสารตั้งต้นมากเกินไป ทำให้ปริมาณสารตั้งต้นพอดีกับปริมาณของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ไม่มีบริเวณเร่งเหลือว่างอยู่ สัญญาณกระแสที่ได้จึงคงที่ ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee Y. H. และคณะ [56] และ Tan L.L. และคณะ [22] พบว่าสัญญาณการตอบสนองต่อการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารตั้งต้นไพรูเวตที่เพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตมากเกินไป ดังนั้นผู้วิจัยเลือกใช้สารตั้งต้นไพรูเวตที่ 30 ไมโครโมลาร์ ในการทดลองต่อไป

3.3.8 ผลการศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม

การตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องใช้โคแฟกเตอร์ NADPH เพื่อทำให้การเร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมิเนชันของไพรูเวตเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และยังทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าในการตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณของโคแฟกเตอร์ NADPH ตั้งแต่ 5 ถึง 50 ไมโครโมลต่อลิตร ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.17 (วิธีการทดลอง 2.5.3.8)



รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ NADPH โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้ งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 หน่วยต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีสารตั้งต้นไพรูเวต เข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ศึกษาความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ NADPH ตั้งแต่ 5 ถึง 50 ไมโครโมลาร์

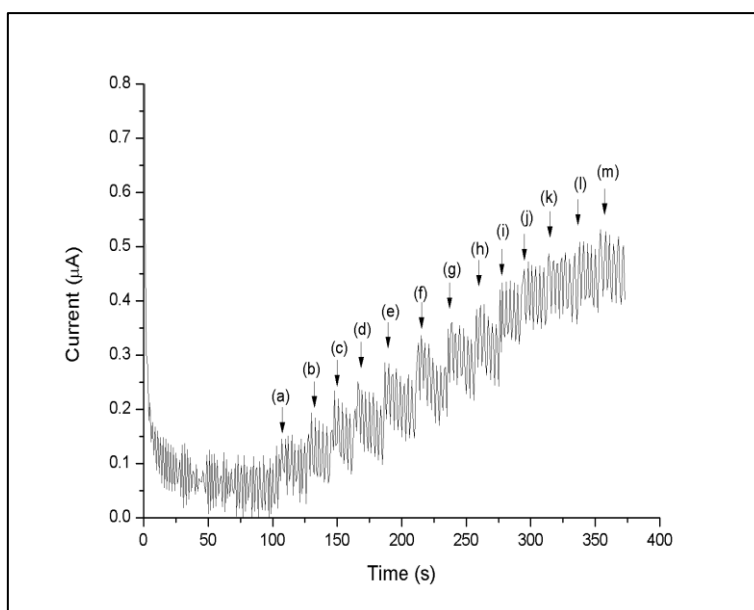
จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารโคแฟกเตอร์ NADPH พบว่าสัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณของโคแฟกเตอร์ NADPH เพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นที่ 40 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้เริ่มคงที่ เนื่องจากปริมาณของโคแฟกเตอร์ NADPH สัมพันธ์กับความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เพราะการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องใช้โคแฟกเตอร์ NADPH เพื่อให้การเร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมีนของไพรูเวตเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และยังทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าในการตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน ดังนั้นเมื่อมีปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH มาก สัญญาณการตอบสนองต่อแอมโมเนียมไอออนจึงมากด้วย ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kwan R.C.H. และคณะ [72] พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดหาปริมาณอะลานีน โดยใช้เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเป็นสารชีวภาพ ตรวจวัดโดยอาศัยการทำงานร่วมกับโคแฟกเตอร์ NAD^+ พบว่าสัญญาณการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์เพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์มากเกินไป ดังนั้นผู้วิจัยเลือกใช้โคแฟกเตอร์ NADPH ที่ 40 ไมโครโมลาร์ ในการทดลองต่อไป

3.4 ผลการศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ

เพื่อประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไอออนในระบบการตรวจวัดแบบปกติ จึงได้ทำการศึกษหาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน ชีตความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด ชีตความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ความแม่นยำของการวิเคราะห์ และความแม่นยำของไบโอเซนเซอร์ เป็นต้น แสดงผลดังนี้

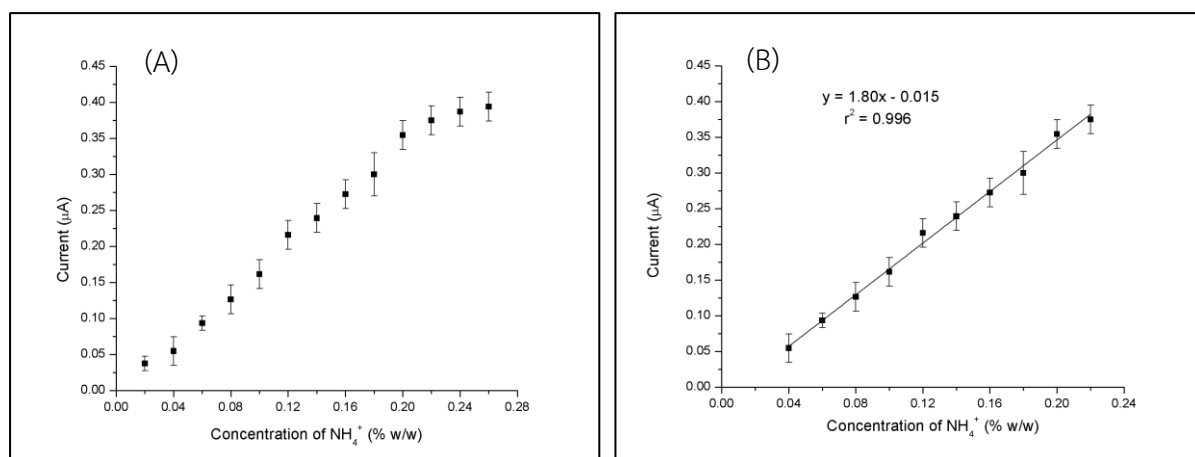
3.4.1 ผลการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์

ความสามารถในการทำงานของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.18 (วิธีการทดลอง 2.5.4.1)



รูปที่ 3.18 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับเวลาของสารละลายแอมโมเนียมไอออน โดยใช้ไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีสารตั้งต้นไพรูเวต เข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ โคแฟกเตอร์ NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น (a) 0.02 (b) 0.04 (c) 0.0 (d) 0.08 (e) 0.10 (f) 0.12 (g) 0.14 (h) 0.16 (i) 0.18 (j) 0.20 (k) 0.22 (l) 0.24 และ (m) 0.26 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ของสัญญาณกระแสตามปริมาณแอมโมเนียม ที่ความเข้มข้น 0.02 ถึง 0.26 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นมีลักษณะเป็นขั้นบันได จนถึงระดับความเข้มข้นที่ 0.26 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน สัญญาณกระแสจะเริ่มคงที่ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับความเข้มข้น ได้ช่วงไดนามิกส์ ดังรูปที่ 3.19 (A) และเลือกช่วงความเป็นเส้นตรงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในช่วงความเข้มข้น 0.04 ถึง 0.22 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.996 และความไวในการวิเคราะห์ 3.6 μA per $\%.\text{cm}^2$ ดังรูปที่ 3.19 (B)



รูปที่ 3.19 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสแอมโวนิกกับปริมาณของแอมโมเนียมไอออน (A) ช่วงไดนามิกส์ที่ความเข้มข้น 0.02 ถึง 0.26 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมไอออน และ (B) ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.04 ถึง 0.22 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมไอออน ตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และตรึงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส

หลังจากศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนแล้ว ผู้วิจัยได้ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.4.2 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด

ทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (การทดลอง 2.5.4.2) พิจารณาขีดความสามารถต่ำสุดจาก 3SD./slope คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสการวิเคราะห์กับสภาพไวในการวิเคราะห์หมีค่าเป็น 3 เท่า จากผลการศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน

3.4.3 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด

ทดสอบขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (การทดลอง 2.5.4.3) พิจารณาขีดความสามารถต่ำสุดจาก 10SD./slope คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสการวิเคราะห์กับสภาพไวในการวิเคราะห์หมีค่าเป็น 10 เท่า จากผลการศึกษาขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนมีค่าเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน

นอกจากศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดของไบโอเซนเซอร์แล้ว ผู้วิจัยได้ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์และของไบโอเซนเซอร์ รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.4.4 ผลการศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้งของการทดลอง ผลการศึกษาดังตารางที่ 3.1 (การทดลอง 2.5.4.4) พบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ 3.1 เปอร์เซ็นต์เพียงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

ตารางที่ 3.1 สัญญาณกระแสเฉลี่ยของแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ครั้งที่	กระแสเฉลี่ย (μA)
1	0.166
2	0.168
3	0.176
Mean	0.170
SD (n=3)	0.005
%RSD	3.1

3.4.5 ผลการศึกษาความแม่นยำของชีวไฟฟ้า

ความแม่นยำของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ชั่ว ผลการศึกษาดังตารางที่ 3.2 (การทดลอง 2.5.4.5) พบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ 4.1 เปอร์เซ็นต์เพียงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

ตารางที่ 3.2 สัญญาณกระแสเฉลี่ยของแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชีวไฟฟ้า	กระแสเฉลี่ย (μA)
1	0.152
2	0.156
3	0.144
Mean	0.151
SD (n=3)	0.006
%RSD	4.1

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไอออนในระบบการตรวจวัดแบบการไหลอัตโนมัติ เพื่อทำให้การ

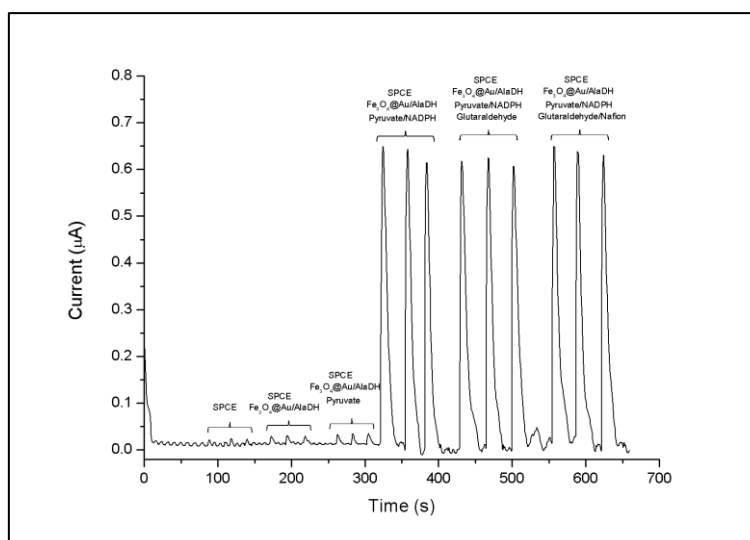
วิเคราะห์รวดเร็วขึ้น มีความแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังลดปัญหาการใช้สารเคมีที่ราคาแพง ลดต้นทุนการวิเคราะห์ และลดปริมาณของเสียที่จะเกิดพิษจากการใช้สารเคมี

3.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

เพื่อให้ได้ข้อไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพการทำงานสูงสำหรับตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ ผู้วิจัยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของข้อไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส โดยศึกษาตัวแปรต่างๆ ดังนี้ ศึกษาชนิดของข้อไฟฟ้าทำงาน ศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวต และปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH บนผิวหน้าข้อไฟฟ้า ศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพา ศึกษาสภาวะศักย์กระตุ้น ศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสของตัวพา และศึกษาปริมาตรการฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออน ตามลำดับ

3.5.1 ผลการศึกษาชนิดของข้อไฟฟ้าทำงานต่อการให้สัญญาณการวิเคราะห์

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของข้อไฟฟ้าใช้งาน ศึกษาสัญญาณกระแสสัมพันธ์ตามปริมาณแอมโมเนียมไอออน โดยศึกษาข้อไฟฟ้าแบบต่างๆ ดังนี้ (1) ข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่มีการปรับปรุง (2) ข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (3) ข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ถูกปรับปรุงและมีสารตั้งต้นไพรูเวตบนผิวหน้าข้อไฟฟ้า (4) ข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ถูกปรับปรุงและมีสารตั้งต้นไพรูเวตกับสารโคแฟกเตอร์ NADPH บนผิวหน้าข้อไฟฟ้า (5) ข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ถูกปรับปรุง มีสารตั้งต้นไพรูเวตกับสารโคแฟกเตอร์ NADPH ซึ่งถูกเชื่อมไขว้ด้วยสารกลูตาไรลดีไฮด์บนผิวหน้าข้อไฟฟ้า และ (6) ข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ถูกปรับปรุง มีสารตั้งต้นไพรูเวตกับสารโคแฟกเตอร์ NADPH ซึ่งถูกเชื่อมไขว้ด้วยสารกลูตาไรลดีไฮด์และถูกคลุมด้วยแนฟฟิออบบนผิวหน้าข้อไฟฟ้า วิเคราะห์สัญญาณกระแสตามปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาด้วยระบบการไหลอัตโนมัติ ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.20 (การทดลอง 2.5.5.1)



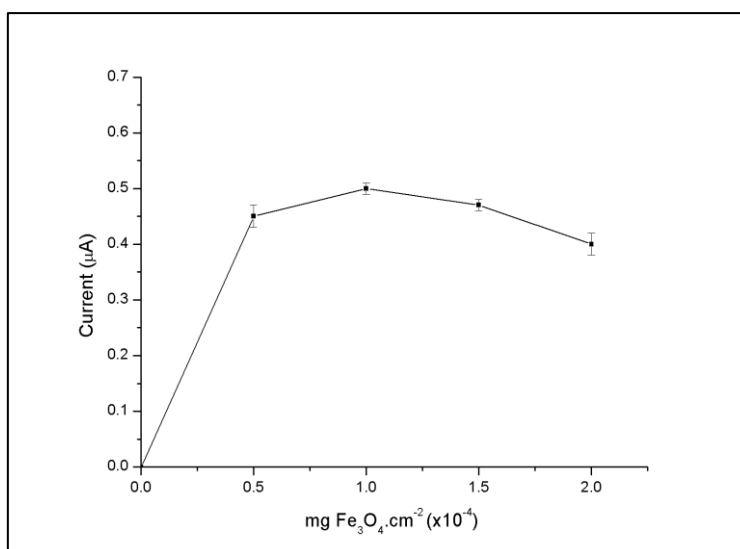
รูปที่ 3.20 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและชนิดของชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็น กระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที และสารละลายแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและชนิดของชีวไฟฟ้าใช้งานที่มีการปรับปรุงแบบต่างๆ พบว่าชีวไฟฟ้าสามารถตอบสนองต่อการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนได้ดีเมื่อปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ในสภาวะที่มีสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH เนื่องจากการตรวจวัดหาปริมาณแอมโมเนียมไอออน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องอาศัยสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH ในการเร่งการตรวจวัด ดังนั้นถ้าขาดสารตัวใดตัวหนึ่งจะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณการตอบสนองของแอมโมเนียมไอออนหรือตรวจวัดได้สัญญาณน้อยมาก ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจว่าสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH ถูกตรึงบนผิวหน้าชีวไฟฟ้า ผู้วิจัยใช้กลูตารัลดีไฮด์เพื่อเชื่อมโยงสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ เนื่องจากกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่อยู่ในโมเลกุล ซึ่งสามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่เอมีนของโปรตีนหรือพอลิเมอร์ได้ และยังใช้แนฟฟิออนเพื่อคลุมผิวหน้าชีวไฟฟ้าป้องกันไม่ให้สารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์หลุดออกออกจากชีวไฟฟ้าในระหว่างการใช้งาน

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าของชีวไฟฟ้า รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.2 ผลการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่เหมาะสมบนผิวหน้าชีวไฟฟ้าใช้งาน

ผู้วิจัยศึกษาจำนวนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าชีวไฟฟ้า ตั้งแต่ 0.5×10^{-4} ถึง 2×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร ผลการทดลองรูปที่ 3.21 (วิธีการทดลอง 2.5.5.2)



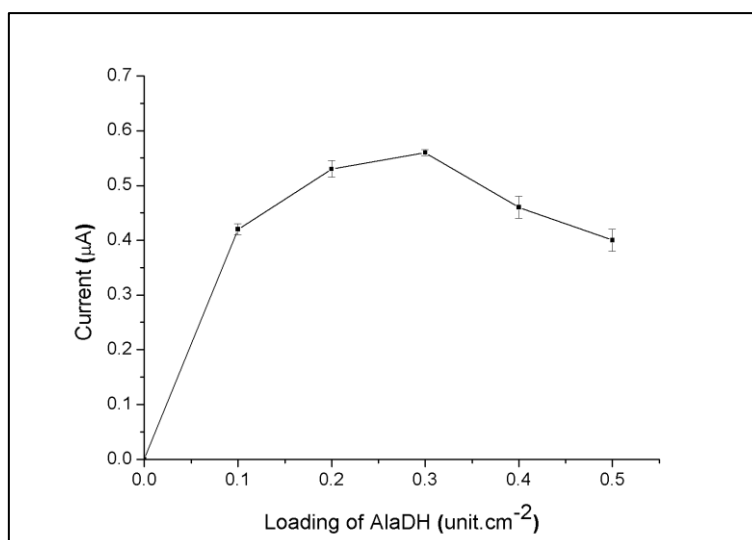
รูปที่ 3.21 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ศึกษาจำนวนอนุภาคตั้งแต่ 0.5×10^{-4} ถึง 2×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร ที่มีโพรวูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.2 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน พบว่าสัญญาณการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au เพิ่มขึ้นจนถึง 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร เมื่อใช้อนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลง ดังนั้นผู้วิจัยเลือกปรับปรุงขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพส ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ (ผลการทดลอง 3.3.2)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.3 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน

ผู้วิจัยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่ใช้ในการตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.5 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ผลการทดลองดังรูปที่ 3.22 (วิธีการทดลอง 2.5.5.3)



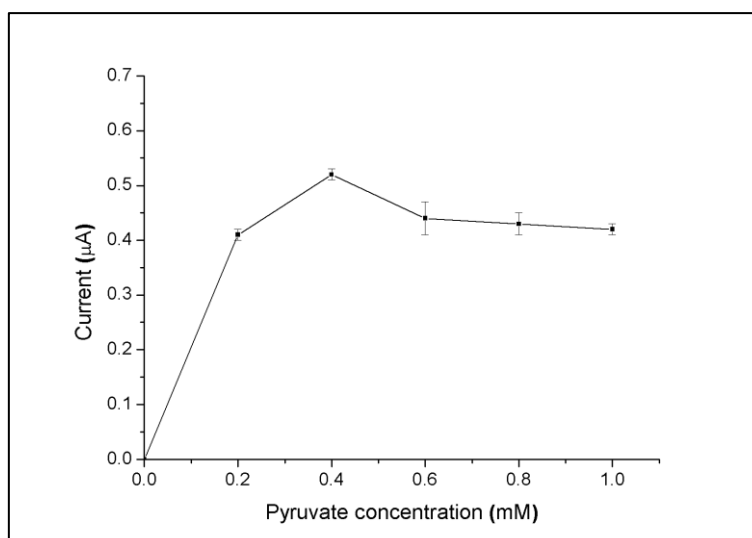
รูปที่ 3.22 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ศึกษาปริมาณตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.5 หน่วยต่อตารางเซนติเมตร มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.2 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้าใช้งาน พบว่าการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสัญญาณกระแสที่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนอิเล็กตรอน และจำนวนอิเล็กตรอนนั้นได้มาจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จนถึงปริมาณเอนไซม์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า 0.3 หน่วยต่อตารางเซนติเมตร ให้สัญญาณการตอบสนองสูงสุดในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าสูงขึ้น พบว่าสัญญาณการตอบสนองลดต่ำลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกปริมาณเอนไซม์ 0.3 หน่วยต่อตารางเซนติเมตร ในการตรึงบนขั้วไฟฟ้าใช้งาน ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใช้งาน คาร์บอนเพส ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ (ผลการทดลอง 3.3.3)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตและปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส อาศัยการทำงานร่วมกันของสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.4 ผลการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตที่เหมาะสม

การตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องใช้สารตั้งต้นไพรูเวตในการเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณของไพรูเวตตั้งแต่ 0.2 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.23 (วิธีการทดลอง 2.5.5.4)

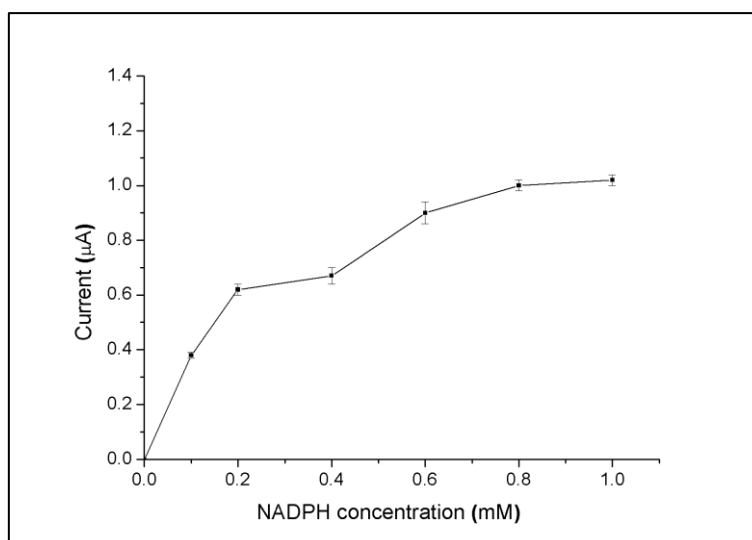


รูปที่ 3.23 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพรูเวต โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มี NADPH ปริมาณ 0.2 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่ออนาที ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพรูเวตตั้งแต่ 0.2 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพรูเวต พบว่าสัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณของสารตั้งต้นไพรูเวตเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นที่ 0.4 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้ลดลงและเริ่มคงที่ เนื่องจากไพรูเวตถูกตรึงอยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดชั้นที่หนาของสารตั้งต้น ส่งผลให้การแพร่ของสารละลายมายังผิวหน้าขั้วไฟฟ้าถูกจำกัด ดังนั้นผู้วิจัยเลือกใช้สารตั้งต้นไพรูเวตที่ 0.4 มิลลิโมลาร์ ในการทดลองต่อไป

3.5.5 ผลการศึกษาปริมาณโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสม

การตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องใช้โคแฟกเตอร์ NADPH เพื่อให้การเร่งปฏิกิริยารีดักทีฟอะมิเนชันของไพรูเวตเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และยังทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าในการตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณของโคแฟกเตอร์ NADPH ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.24 (วิธีการทดลอง 2.5.5.5)



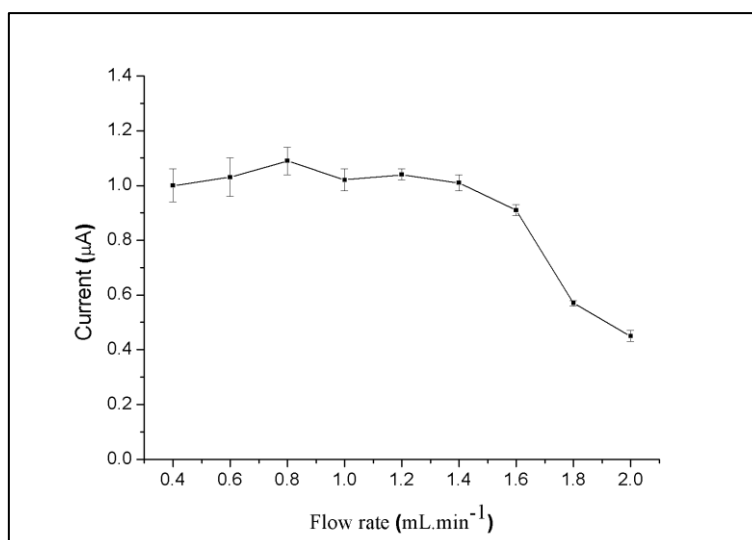
รูปที่ 3.24 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ NADPH โดยใช้ไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวต ปริมาณ 0.4 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ศึกษาความเข้มข้นของ NADPH ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารโคแฟกเตอร์ NADPH พบว่าสัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณของโคแฟกเตอร์ NADPH เพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นที่ 0.8 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้เริ่มคงที่ ดังนั้นผู้วิจัยเลือกใช้โคแฟกเตอร์ NADPH ที่ 0.8 มิลลิโมลาร์ ในการทดลองต่อไป ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณของโคแฟกเตอร์ NADPH ที่เหมาะสมโดยไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพสที่ถูกปรับปรุง ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ (ผลการทดลอง 3.3.8)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสมต่อการทำการของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.6 ผลการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม

อัตราการไหลที่ต่างกันจะทำให้ค่าสัญญาณกระแสของการตรวจวัดปริมาณของแอมโมเนียมไอออนแตกต่างกัน และรูปร่างของสัญญาณแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพา เพื่อหาอัตราการไหลที่เหมาะสม ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.25 (การทดลอง 2.5.5.6)



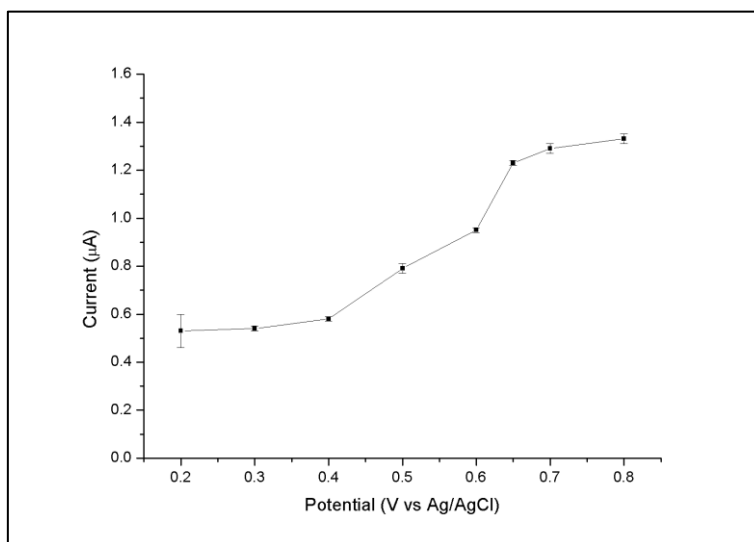
รูปที่ 3.25 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา โดยใช้ไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล ศึกษาอัตราการไหล 0.4 ถึง 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ศักย์กระตุ้นที่ +0.60 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา พบว่าที่อัตราการไหลต่ำ ค่าสัญญาณกระแสที่ได้สูง แต่สัญญาณพีกมีลักษณะที่กว้าง (Broad peak) และสัญญาณพื้นหลังไม่เท่ากัน เป็นผลจากการเร่งปฏิกิริยาของแอมโมเนียมไอออนเกิดช้า แต่เมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้น สัญญาณพีกที่ได้มีลักษณะแหลม (Shape peak) แต่ค่าของสัญญาณกระแสลดลง เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาของแอมโมเนียมไอออนเกิดเร็วเกินไป นอกจากนี้ที่อัตราการไหลสูงๆ ส่งผลต่อการเสียดที่เอนไซม์ สารตั้งต้น และโคแฟกเตอร์ หลุดออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าและสิ้นเปลืองปริมาณสารละลายตัวพา ดังนั้นเพื่อให้ได้สัญญาณที่เป็นพีกแหลมและให้ค่ากระแสที่สูง ผู้วิจัยเลือกอัตราการไหลที่ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอัตราการไหลที่เหมาะสม ที่อัตราการไหลนี้ยังให้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Jakmunee J. และคณะ [73] ได้ปรับปรุงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนโดยใช้โลหะอนุภาคนาโนและคาร์บอนนาโนทิวป์ ใช้สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระบบการไหลอัตโนมัติ พบว่าขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงมีความไวหรือสัญญาณกระแสสูงสุด เมื่อใช้อัตราการไหล 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาสถานะศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.7 ผลการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้ามีความสำคัญต่อความไวในการวิเคราะห์และหลีกเลี่ยงสัญญาณรบกวนจากสารรบกวน ผู้วิจัยศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นชีวไฟฟ้าเพื่อให้เกิดการรับส่งอิเล็กตรอนที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.26 (วิธีการทดลอง 2.5.5.7)



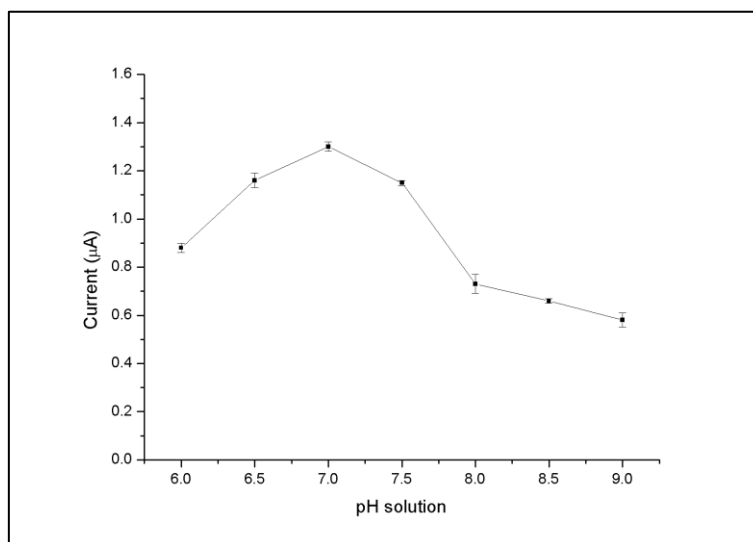
รูปที่ 3.26 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์กระตุ้นชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.2 ถึง +0.60 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นชีวไฟฟ้าใช้งานที่ถูกรับปรุง พบว่าสัญญาณการตอบสนองเพิ่มขึ้นเมื่อศักย์กระตุ้นเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่ศักย์ +0.65 โวลต์ ดังนั้นผู้วิจัยเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ +0.7 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า โดยชีวไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพสที่ถูกรับปรุง ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ (ผลการทดลอง 3.3.4)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของตัวพา รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.8 ผลการศึกษาศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา

สภาพความเป็นกรด-เบสของสารละลายตัวพามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนผิวหน้าของไบโอเซนเซอร์ เพื่อให้ได้สัญญาณการตอบสนองที่ดี ทำการศึกษาสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ตั้งแต่ 6.0 ถึง 9.0 ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.27 (วิธีการทดลอง 2.5.5.8)



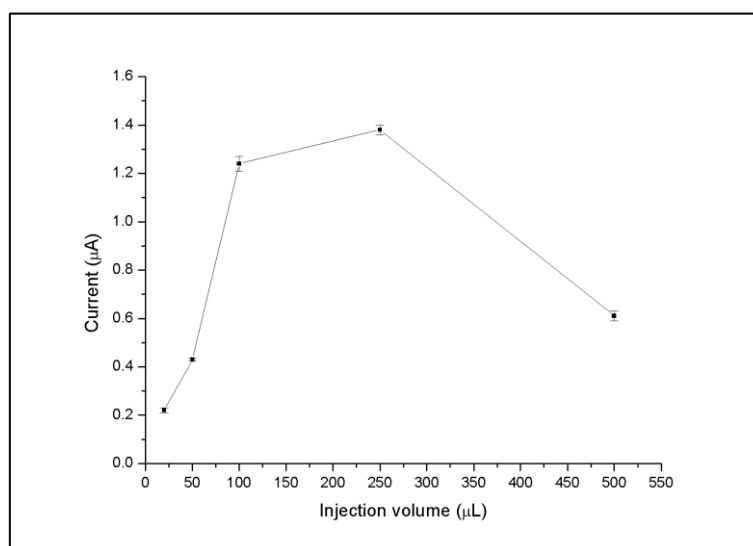
รูปที่ 3.27 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเป็นกรด-เบสของสารละลายตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้ไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 ถึง 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ถึง 9.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศักยภาพกระตุ้นที่ +0.70 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเป็นกรด-เบสของสารละลายตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นตามสภาพกรด-เบสของสารละลายตัวพาดังแต่ 6.0 ถึง 7.0 หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้ลดลง เนื่องจากเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง ดังนั้นผู้วิจัยเลือกสารละลายตัวพาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือหนูนพ็อตเฟสบัฟเฟอร์ โดยไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเพสที่ถูกปรับปรุง ตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ (ผลการทดลอง 3.3.5)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาปริมาณการฉีดสารละลายแอมโมเนียมไอออนเข้าสู่ระบบการตรวจวัดแบบการไหลอัตโนมัติที่เหมาะสม รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.5.9 ผลการศึกษาปริมาณการฉีดยาตัวอย่างที่เหมาะสม

ปริมาณของส่วนที่ใช้ในการฉีดยาละลายตัวอย่างเข้าสู่กระแสตัวพาเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ต้องศึกษา เพื่อให้ได้ไบโอเซนเซอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนสูงที่สุด ทำการศึกษาปริมาณในการฉีดยาละลาย 20 ถึง 500 ไมโครลิตร ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.28 (วิธีการทดลอง 2.5.5.9)



รูปที่ 3.28 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและปริมาณการฉีดยาตัวอย่าง โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.70 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 20 ถึง 500 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและปริมาณการฉีดยาละลายตัวอย่าง พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของแอมโมเนียมไอออนเพิ่มขึ้นจนถึง 250 ไมโครลิตร หลังจากนั้นสัญญาณกระแสที่ได้ลดลง เนื่องจากเกิดการอิ่มตัวระหว่างเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสกับแอมโมเนียมไอออน ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้ไพรูเวตเกิดปฏิกิริยาต่อได้ นอกจากนี้เมื่อใช้ปริมาณการฉีดยามาก สัญญาณพิกที่ได้มีลักษณะกว้าง ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกปริมาตรที่ 100 ไมโครลิตร สำหรับฉีดยาละลายแอมโมเนียมไอออนและตัวอย่างเข้าสู่ระบบการตรวจวัดแบบการไหลอัตโนมัติ ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jakmunee J. และคณะ [73] ได้ปรับปรุงขั้วไฟฟ้าฟิมพ์สกรีนคาร์บอนโดยใช้โลหะอนุภาคนาโนและคาร์บอนนาโนทิวป์ ใช้สำหรับตรวจวัดหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระบบการไหลอัตโนมัติ พบว่าความไวของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาตรของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้น

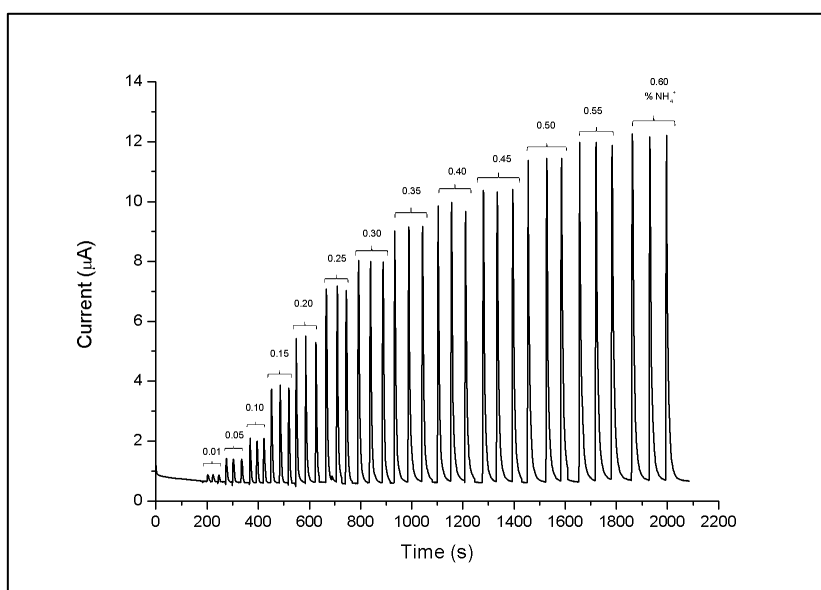
จนถึง 100 ไมโครลิตร และความไวของชีวไฟฟ้าลดลงเมื่อใช้ปริมาตรไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่า 100 ไมโครลิตร

3.6 ผลการศึกษาประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

เพื่อประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไอออนในระบบการตรวจวัดแบบการไหลอัตโนมัติ จึงได้ทำการศึกษหาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน ขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด ขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ความแม่นยำของการวิเคราะห์ และความแม่นยำของไบโอเซนเซอร์ เป็นต้น แสดงผลดังนี้

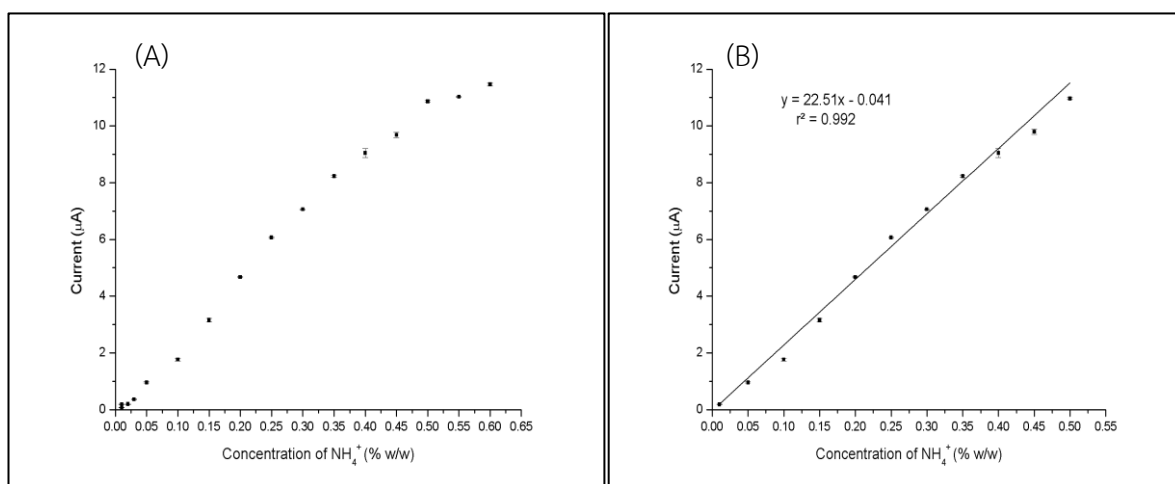
3.6.1 ผลการศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์

ความสามารถในการทำงานของชีวไฟฟ้าฟิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส เพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.29 (วิธีการทดลอง 2.5.6.1)



รูปที่ 3.29 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับเวลาของสารละลายแอมโมเนียมไอออน โดยใช้ชีวไฟฟ้าใช้ งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.70 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และ สารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ของสัญญาณกระแสตามปริมาณแอมโมเนียมไอออน ที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.60 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน พบว่าสัญญาณกระแสเพิ่มขึ้นมีลักษณะเป็นพิกจนถึงระดับความเข้มข้นที่ 0.50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน หลังจากนั้นสัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นแตกต่างกันเล็กน้อยถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับความเข้มข้น ได้ช่วงไดนามิกส์ ดังรูปที่ 3.30 (A) และเลือกช่วงความเป็นเส้นตรงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.992 และความไวในการวิเคราะห์ เท่ากับ $35.7 \mu\text{A per \% cm}^2$ ดังรูปที่ 3.30 (B)



รูปที่ 3.30 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสแอนดิกกับปริมาณของแอมโมเนียมไอออน (A) ช่วงไดนามิกส์ที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.60 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน และ (B) ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส

หลังจากศึกษาช่วงการตอบสนองเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนแล้ว ผู้วิจัยได้ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดและขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.6.2 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด

ทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจวัดแอมโมเนียมที่ไอออนความเข้มข้นต่ำสุดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (การทดลอง 2.5.6.2) พิจารณาขีดความสามารถต่ำสุดจาก $3\text{SD}/\text{slope}$ คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสการวิเคราะห์กับสภาพในการวิเคราะห์หาค่าเป็น 3 เท่า จากผลการศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 0.001 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมไอออน

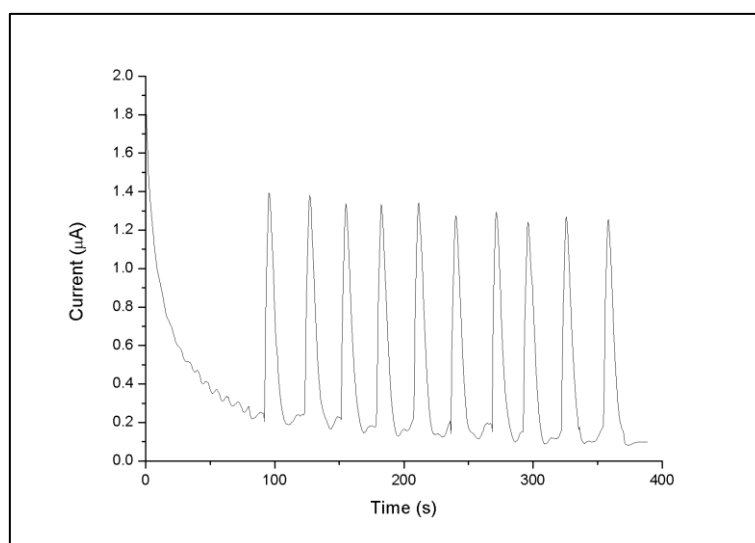
3.6.3 ผลการศึกษาขีดความสามารถในการหาปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุด

ทดสอบขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (การทดลอง 2.5.6.3) พิจารณาขีดความสามารถต่ำสุดจาก $10SD./slope$ คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสการวิเคราะห์กับสภาพไฟในการวิเคราะห์หาค่าเป็น 10 เท่า จากผลการศึกษาขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนมีค่าเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน

นอกจากศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวัดและวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดของไบโอเซนเซอร์แล้ว ผู้วิจัยได้ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์และของไบโอเซนเซอร์รายละเอียดในหัวข้อถัดไป

3.6.4 ผลการศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

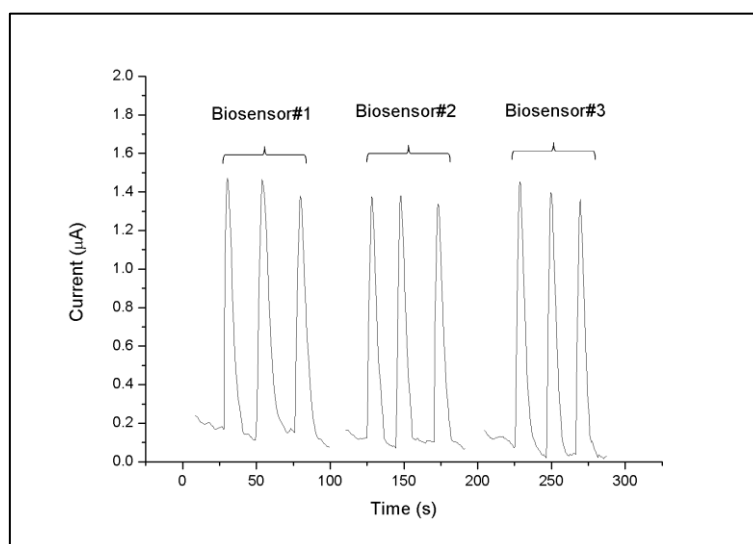
ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการไหลอัตโนมัติ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 ครั้งของการทดลอง ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.31 (การทดลอง 2.5.6.4) พบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ 2.6 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์



รูปที่ 3.31 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับเวลาของสารละลายแอมโมเนียมไอออน โดยใช้ชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $Fe_3O_4@Au$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.70 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.6.5 ผลการศึกษาความแม่นยำของชีวไฟฟ้า

ความแม่นยำของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในระบบการไหลอัตโนมัติ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์จำนวน 3 ครั้ง ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.32 (การทดลอง 2.5.6.5) พบว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ 3.0 เปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์



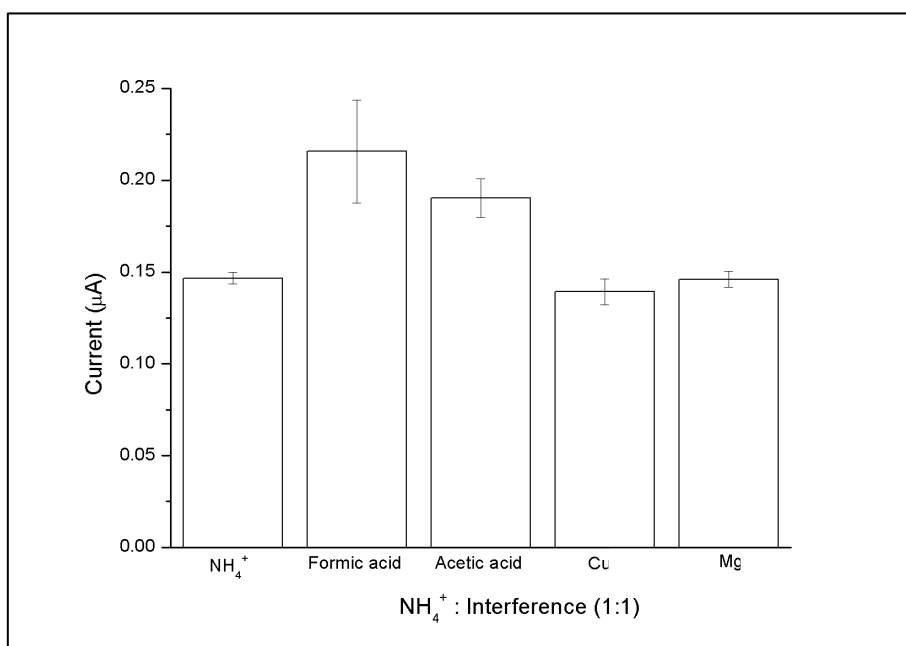
รูปที่ 3.32 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับเวลาของสารละลายแอมโมเนียมไอออน โดยใช้ชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 หน่วยต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.70 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.7 ผลการศึกษาวិเคราะห์หาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชัน

ก่อนประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชัน ผู้วิจัยได้ศึกษาตัวรบกวนการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน และผลการเจือจางตัวอย่างต่อความถูกต้องในการวิเคราะห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชันด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ ด้วยวิธีเดิมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต (Titration method) เทคนิคการวัดสี (Spectrophotometric method) และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ชีวไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion selective electrode)

3.7.1 ผลการศึกษาตัวรบกวนการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน

การวิเคราะห์ปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอาจมีสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้าเดียวกันกับ NADPH ที่เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าสำหรับตรวจวัด ดังนั้นเพื่อให้ได้ค่าสัญญาณการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ถูกต้องที่สุด จึงจำเป็นต้องศึกษาตัวรบกวน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก คอปเปอร์ และแมกนีเซียม เป็นต้น ตัวรบกวนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาดังนั้นผู้วิจัยศึกษาสัญญาณกระแสของแอมโมเนียมไอออนที่ถูกผสมกับตัวรบกวน ในอัตราส่วน 1:1 หน่วยความเข้มข้นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.33 (การทดลอง 2.5.7.1)

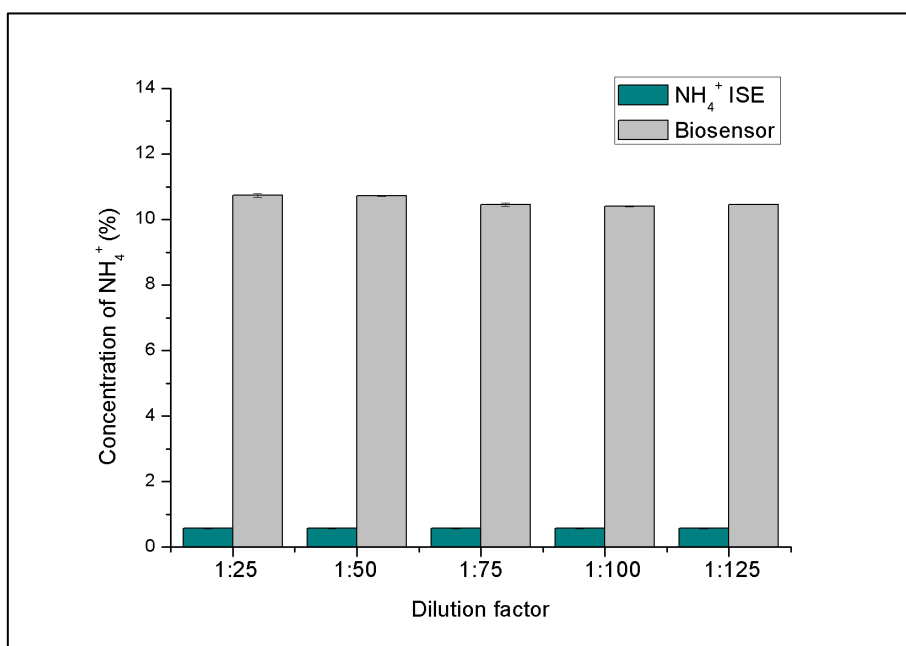


รูปที่ 3.33 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและอัตราส่วนของแอมโมเนียมไอออนต่อตัวรบกวน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก คอปเปอร์ และแมกนีเซียม ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีสารตั้งต้นไพรูเวตเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ โคแฟกเตอร์ NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและอัตราส่วนของปริมาณแอมโมเนียมไอออนต่อตัวรบกวน 1:1 ซึ่งสารรบกวนที่ศึกษา ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก คอปเปอร์ และแมกนีเซียม พบว่ากรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก ให้สัญญาณกระแสรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ดังนั้นเพื่อลดผลของตัวรบกวนเหล่านี้ ผู้วิจัยศึกษาปัจจัยการเจือจางตัวอย่าง (Dilution factor) ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยารุ่น รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

3.7.2 ผลการศึกษาปัจจัยการเจือจางตัวอย่าง

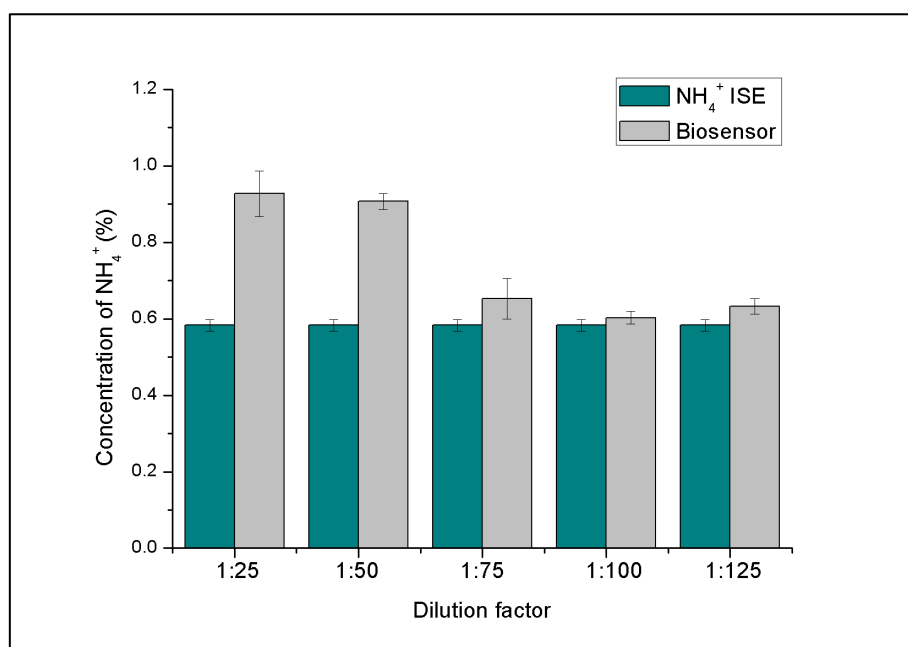
เนื่องจากในน้ำยามีกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติกเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นได้ ดังนั้นเพื่อลดปริมาณการรบกวนของตัวรบกวนเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องเจือจางตัวอย่างน้ำยาก่อนทำการวิเคราะห์ ผู้วิจัยศึกษาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยากันที่ถูกเจือจาง 25 ถึง 125 เท่า ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับค่าจริงของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยากัน ที่ตรวจวัดได้จากเทคนิคมาตรฐาน คือ เทคนิคโพเทนชิโอเมตรี ด้วยข้อไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.34 (การทดลอง 2.5.7.2)



รูปที่ 3.34 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนและปัจจัยการเจือจางตั้งแต่ 25 ถึง 125 เท่า โดยใช้ข้อไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับข้อไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีสารตั้งต้นไพรูเวตเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ โคแฟกเตอร์ NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับค่าจริงที่ตรวจวัดได้จากเทคนิคมาตรฐาน คือ เทคนิคโพเทนชิโอเมตรี ด้วยข้อไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน

จากผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนและปัจจัยการเจือจาง พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยากันที่ถูกเจือจาง ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าสูงและต่างจากค่าจริงที่ถูกตรวจวัดด้วยเทคนิคมาตรฐานอย่างมาก เนื่องจากได้รับสัญญาณรบกวนจากตัวรบกวนที่มีในน้ำยากัน คือ กรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ มีทั้งน้ำตาล โปรตีน ฟอสโฟไลปิด และสารอื่นๆ ซึ่งสามารถรบกวนการวิเคราะห์ได้ ส่วนประกอบเหล่านี้มีปริมาณไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น พันธุ์ยาง อายุต้นยาง ระบบและวิธีการกรีด ฤดูกาล

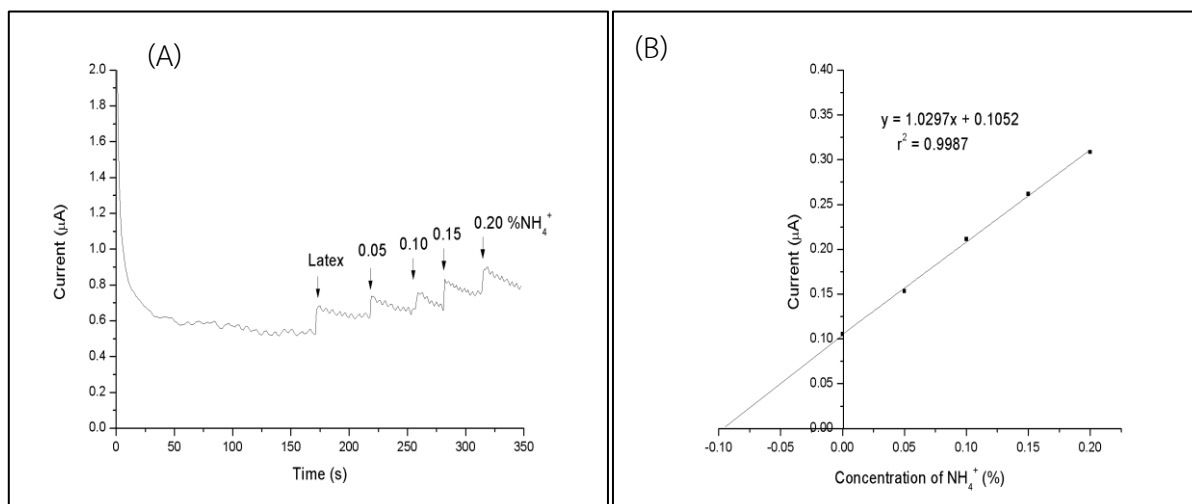
เป็นต้น ดังนั้นเพื่อการจัดผลของสัญญาณรบกวนจากส่วนประกอบเหล่านั้น ผู้วิจัยประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดน้ำยางสด (ไม่มีแอมโมเนียมไอออน) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบ (Blank) นำมาหักลบกับผลจากการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้น (น้ำยางที่เติมแอมโมเนีย) พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้นที่ถูกเจือจางมากกว่า 100 เท่า ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลที่สอดคล้องกับค่าจริงที่ได้รับจากเทคนิคมาตรฐาน ดังรูปที่ 3.35 อย่างไรก็ตามการเจือจางตัวอย่างมากเกินไปจะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนได้ เนื่องจากขีดจำกัดในการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์ ดังนั้นผู้วิจัยประเมินความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้นที่ถูกเจือจาง 100 เท่า ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ



รูปที่ 3.35 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนและปัจจัยการเจือจางตั้งแต่ 25 ถึง 125 เท่า โดยใช้ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีสารตั้งต้นไพรูเวตเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ โคแฟกเตอร์ NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับค่าจริงที่ตรวจวัดได้จากเทคนิคมาตรฐาน คือ เทคนิคโพเทนชิโอเมตรี ด้วยชีวไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน (*หมายเหตุ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนที่ถูกตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ถูกหักลบกับสัญญาณจากองค์ประกอบรบกวนในน้ำยาง)

3.7.3 ผลการศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (Standard addition method)

เพื่อยืนยันปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชันและลดผลของตัวรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม จึงศึกษาด้วยวิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (Standard addition method) โดยเติมสารละลายตัวอย่างน้ำยางชันเจือจาง 100 เท่า ปริมาตรเท่ากันลงไปในสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.2 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.36 (การทดลอง 2.5.7.3)



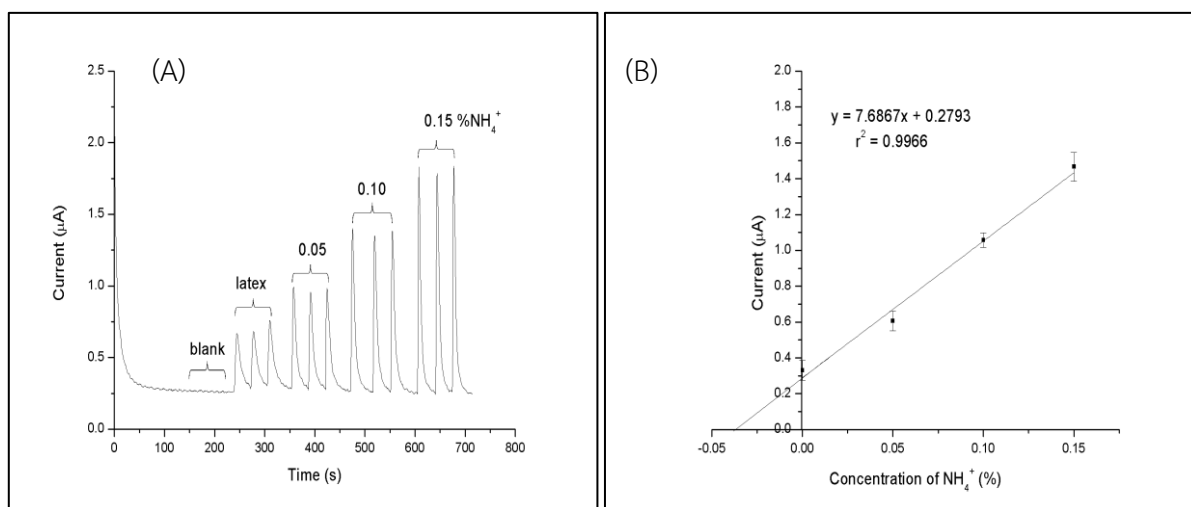
รูปที่ 3.36 (A) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา และ (B) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมไอออนช่วง 0 ถึง 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ชีวไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ จำนวน 3×10^{-3} มิลลิกรัมแมกนีไทต์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศึกษาที่ศักย์กระตุ้น +0.6 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มีสารตั้งต้นไพรูเวตเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ โคแฟกเตอร์ NADPH เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยางชันจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากบริษัทเคมีคอลแอนด์แมททีเรียลส์ จำกัด พบว่าปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชันเฉลี่ยหลังจากหักลบสัญญาณจากองค์ประกอบรบกวนพบปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ 0.61 ± 0.02 , 0.62 ± 0.01 และ 0.58 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ

3.7.4 ผลการศึกษาด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ โดยใช้วิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (Standard addition method)

เพื่อยืนยันปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชันและลดผลของตัวรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม จึงศึกษาด้วยวิธีเติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (Standard addition method)

โดยเติมสารละลายตัวอย่างน้ำยางชันปริมาณเท่ากันลงในสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.15 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาดังรูปที่ 3.37 (การทดลอง 2.5.7.4)



รูปที่ 3.37 (A) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา และ (B) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมไอออนช่วง 0 ถึง 0.15 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ จำนวน 1×10^{-4} มิลลิกรัมแมกนีไทด์ต่อตารางเซนติเมตร และเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ปริมาณ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ที่มีไพรูเวตและ NADPH ปริมาณ 0.4 ถึง 0.8 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศักยภาพกระตุ้นที่ +0.70 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยางชันจำนวน 3 ตัวอย่าง ซื้อมาจากบริษัทเคมีคอลแอนด์แมททีเรียลส์ จำกัด พบว่าปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชันเฉลี่ยหลังจากหักลบสัญญาณจากองค์ประกอบรบกวนพบปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ 0.63 ± 0.03 , 0.61 ± 0.02 และ 0.59 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ

3.7.5 ผลการเปรียบเทียบการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและแบบการไหลอัตโนมัติ เทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคการไทเทรต เทคนิคการวัดสี และเทคนิคโฟเทนซิอเมทรี ด้วยขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน ด้วยสถิติ t-test

ทำการประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชันจำนวน 3 ตัวอย่าง ซื้อมาจากบริษัทเคมีคอลแอนด์แมททีเรียลส์ จำกัด โดยทำการวิเคราะห์ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและแบบการไหลอัตโนมัติ และเทคนิคมาตรฐานคือเทคนิคการไทเทรต (การทดลอง 3.5.7.5) เทคนิคการวัดสี (การทดลอง 3.5.7.6) และเทคนิคโฟเทนซิอเมทรี ด้วยขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน (การทดลอง 3.5.7.7) ผลการทดลองดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้น ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและแบบการไหลอัตโนมัติ และเทคนิคมาตรฐาน คือเทคนิคการไทเทรต เทคนิคการวัดสี และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี ด้วยขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน

ตัวอย่าง	ปริมาณแอมโมเนียมไอออน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)				
	ไบโอเซนเซอร์ (Batch analysis)*	ไบโอเซนเซอร์ (Flow analysis)*	เทคนิคการ ไทเทรต	เทคนิคการ วัดสี	เทคนิคโพเทน ชิโอเมทรี
น้ำยางข้น #1	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.64 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.57 ± 0.01
น้ำยางข้น #2	0.62 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.57 ± 0.03
น้ำยางข้น #3	0.58 ± 0.05	0.59 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.60 ± 0.01

* หมายถึง ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนที่ถูกตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ถูกหักลบกับสัญญาณจากองค์ประกอบรบกวนในน้ำยาง

ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติค่า t พบว่า ไบโอเซนเซอร์พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและแบบการไหลอัตโนมัติ ให้ค่าการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันกับเทคนิคการไทเทรต เทคนิคการวัดสี และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน ส่งไปตรวจวัดที่กลุ่มอุตสาหกรรมยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดย $t_{\text{tabulated}}$ มีค่าเท่ากับ 4.3 ที่ degree of freedom =2 และ $t_{\text{calculated}}$ อยู่ในช่วง 0.0-2.9 ซึ่งค่า $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า $t_{\text{tabulated}}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น สามารถยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงสรุปว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและแบบการไหลอัตโนมัติสามารถตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางข้นได้จริง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียในไอออน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ยังเพิ่มประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์โดยปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ โดยใช้ Fe_3O_4 เป็นแกน (Core) และทองเป็นเชลล์ (Shell) เนื่องจาก Fe_3O_4 มีสมบัติความเป็นแม่เหล็ก ช่วยในการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสให้ติดอยู่บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า และทองอนุภาคนาโนสามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่ไทออล (Thiol) และหมู่เอมีน (Amine) ในโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้ทองเปรียบเสมือนเป็นสะพานเชื่อมในการนำส่งอิเล็กตรอนโดยตรง ส่งผลให้ไบโอเซนเซอร์มีสภาพไวสูงขึ้น โดยในงานวิจัยตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส วิเคราะห์แอมโมเนียในกระบวนการวิเคราะห์แบบปกติ และศึกษาการวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ โดยเปลี่ยนจากการใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเป็นขั้วไฟฟ้าแบบฟิล์มสกรีนคาร์บอน

การออกแบบขั้วไฟฟ้าเพื่อเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์แอมโมเนียในไอออนนั้น สามารถเตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสและขั้วไฟฟ้าฟิล์มสกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ตรึงด้วยเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส จึงได้สังเคราะห์และศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ จากนั้นประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์และวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียในตัวอย่างน้ำยางชันด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและการไหลอัตโนมัติ เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคมาตรฐาน ได้แก่ เทคนิคการไทเทรต (Titration method) เทคนิคการวัดสี (Spectrophotometric method) และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียในไอออน ผลการทดลองพบว่า

(1) อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งความยาวคลื่นสูงกว่าทองอนุภาคนาโนที่ 580 นาโนเมตร พบพิกการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของทั้ง Fe_3O_4 และทองอนุภาคนาโน บ่งชี้ว่าทองเกาะติดบนพื้นผิวของ Fe_3O_4 หลังจากตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส พบพิกการสั่นแบบยืดหดของพันธะ C-N ของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ ลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม การกระจายตัวสม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 50 นาโนเมตร เมื่อทำการตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส พบว่าพื้นผิวของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ถูกปกคลุมด้วยกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์ ผลการประเมินการนำส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ พบว่าขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงให้สัญญาณการตอบสนองต่อสารตัวกลางทางไฟฟ้าในโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ได้ดีที่ศักย์ช่วง +0.4 ถึง +0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และให้กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเป็นแบบการเคลื่อนที่โดยมวล

(2) สภาวะที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์ต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในไอออน ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติ คือ เวลาในการตรึงเอนไซม์ 10 นาที ปริมาณอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้าคือ 3×10^{-3} มิลลิกรัม Fe_3O_4 ต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณเอนไซม์อะลานีนดี

ไฮโดรจีนเนส 0.1 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ศักย์กระตุ้นการทำงานของขั้วไฟฟ้า 0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สภาพความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน 25 องศาเซลเซียส ปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH คือ 0.03 และ 0.04 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

(3) สภาพที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์ต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี ตรวจวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ คือ ปริมาณอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้าคือ 1×10^{-4} มิลลิกรัม Fe_3O_4 ต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณเอนไซม์ 0.3 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณสารตั้งต้นไพรูเวตและโคแฟกเตอร์ NADPH คือ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นการทำงานของขั้วไฟฟ้า 0.7 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สภาพความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 และปริมาตรในการฉีดสาร 100 ไมโครลิตร

(4) ประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ผลการศึกษาดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ตรวจวิเคราะห์ในระบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ

ประสิทธิภาพการทำงาน	ไบโอเซนเซอร์ (ระบบปกติ)	ไบโอเซนเซอร์ (ระบบการไหล)
ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ ($\% \text{NH}_4^+$)	0.04–0.22	0.01–0.50
ความไวของการวิเคราะห์ ($\mu\text{A per } \% \cdot \text{cm}^2$)	3.6	35.7
ขีดความสามารถในการตรวจวัด ($\% \text{NH}_4^+$)	0.01	0.001
ขีดความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณ ($\% \text{NH}_4^+$)	0.05	0.01
ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ ($\% \text{RSD}$)	3.1 (n=3)	2.6 (n=10)
ความแม่นยำของไบโอเซนเซอร์ ($\% \text{RSD}$)	4.1 (n=3)	3.0 (n=3)

(5) ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ สามารถตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชันที่ถูกเจือจาง 100 เท่าได้ ด้วยวิธีเดิมสามารถฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

(6) ประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการวิเคราะห์แบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ สำหรับตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยางชัน เทียบกับเทคนิคมาตรฐาน คือ เทคนิคการไทเทรต เทคนิคการวัดสี และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงแอมโมเนียมไอออน ด้วยสถิติ t-test พบว่าค่าที่ได้จากไบโอเซนเซอร์และเทคนิคมาตรฐานให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารอ้างอิง

- [1] บุญธรรม นิธิอุทัย; พรพรรณ นิธิอุทัย; ปรีชา ป้องภัย, เทคโนโลยีน้ำยางชั้น ห่องปฏิบัติการเทคโนโลยีการยาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี หน้า 2-39.
- [2] <http://www.rubberthai.com/book/file/98.pdf>
- [3] http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water05.html
- [4] <http://www.kmutt.ac.th/ev/inimage/analysisN.pdf>
- [5] <http://www.biomed.in.th/biosensor/>
- [6] <http://www.vcharkarn.com/varticle/38381>
- [7] <http://www.intechopen.com/books/advances-in-graphene-science/synthesis-and-biomedical-applications-of-graphene-present-and-future-trends>
- [8] Buerk, D.G., Biosensor: theory and applications, Lancaster, Basel: Technomic Pub., 1993, 39-61.
- [9] <https://prezi.com/qk5lhsvmg7ru/enzyme-catalysis-lab/>
- [10] <http://www.student.chula.ac.th/~53373322/cell%20%20type.htm>
- [11] https://en.wikipedia.org/wiki/Fragment_antigen-binding
- [12] ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, เอนไซม์เทคโนโลยี (Enzyme technology) สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2556 หน้า 4-21.
- [13] <https://riasparklebiochemistry.wordpress.com/2013/03/31/reflection-14lock-key-vs-induced-fit-hypothesis/>
- [14] https://en.wikipedia.org/wiki/Active_site
- [15] <http://frynn.com%E0%B8%A1%E0%B9%8C/>
- [16] จิตติมา เจริญพานิช, เอนไซม์วิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์ 2553 หน้า 6-18.
- [17] Gallagher, D.T.; Monbouquette, H.G.; Schroder, I.; Robinson, H.; Holden, M.J.; Smith, N.N., *J. Mol. Biol.* 2004, 342, 119-130.
- [18] <http://www.google.com/patents/EP0365158A1?cl=en>
- [19] <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4162/immobilized-enzyme>
- [20] <http://www.mindat.org/min-2538.html>
- [21] <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>
- [22] Tan, L.L.; Musa, A.; Lee, Y.H., *Journal of Sensors* 2011, Article ID 980709, 10 pages.
- [23] http://www.gwent.org/gem_data_sheets/biosensor_products/active_electrodes/ae2071122d6.pdf
- [24] http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_paste_electrode

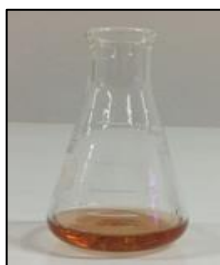
- [25] <http://www.als-japan.com/1368.html>
- [26] <http://www.technologystudent.com/designpro/prtpro4.htm>
- [27] http://www.dropsens.com/en/accesories_pag.html
- [28] <https://en.wikipedia.org/wiki/Amperometry>
- [29] <http://www.lmsmagazine.co.za/restoring-mother-earth-autolab-potentiostat/>
- [30] <http://www.ist.cmu.ac.th/riseat/nl/2003/08/01.php>
- [31] www2.chemistry.gatech.edu/class/analyt/fia.pdf
- [32] Ruzicka, J.; Hansen, E.H., *Anal. Chim. Acta.* 1975, 78, 145-157.
- [33] Parikh, A.; Patel, K.; Patel, C., *J. Chem. Pharm. Res.* 2010, 2, 118-125.
- [34] <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/08/05/manifolds-for-flow-injection-analysis/>
- [35] <http://urrjaa.blogspot.com/2013/08/cyclic-voltammetry-urrjaa-p0110-2013.html>
- [36] <http://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching-notes/linear-sweep-and-cyclic-voltammetry-the-principles>
- [37] http://faculty.uml.edu/david_ryan/84.514/ElectrochemLecture8-2005.pdf
- [38] <http://glasswarechemical.com/scientific-instrument/A3-uv-vis-spectrophotometer/>
- [39] http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2552/aphys0852pp_ch2.pdf
- [40] http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/ir-265.pdf
- [41] <http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/x-ray-analysis-instrument-menu/item/87>
- [42] <http://www.nano.kmitl.ac.th/index.php/tool/218-scanning-eletron-microscopysem-.html>
- [43] <http://www.atom.rmutphysics.com/charud/scibook/nanotech/Page/Unit4-5.html>
- [44] วราภรณ์ ขจรไชยกูล, ยางธรรมชาติ : การผลิตและการใช้งาน (Natural Rubber : Production and Applications), กรุงเทพมหานคร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 2549 หน้า 37-43.
- [45] Qiu, J.D.; Xiong, M.; Liang, R.P.; Peng, H.P.; Liu, F., *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2649-2653.
- [46] Kouassi, G.K.; Irudayaraj, J., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3234-3241.
- [47] Cui, Y.; Wang, Y.; Hui, W.; Zhang, Z.; Xin, X.; Chen, C., *Biomed. Microdevices* 2005, 2, 153-156.
- [48] Wang, L.; Luo, J.; Fan, Q.; Suzuki, M.; Suzuki, I.S.; Engelhard, M.H.; Lin, Y.; Kim, N.; Wang, J.Q.; Zhong, C. J., *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 21593-21601.
- [49] Xie, H.Y.; Zhen, R.; Wang, B.; Feng, Y.J.; Chen, P.; Hao, J., *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, 4825-4830.
- [50] Zhang, H.; Zhong, X.; Xu, J.J.; Chen, H. Y., *Langmuir* 2008, 24, 13748-13752.

- [51] Bordbar, A.K.; Rastegari, A.A.; Amiri, R.; Ranjbakhsh, E.; Abbasi, M.; Khosropour, A.R., *Biotechnology Research International* 2014, Article ID 705068, 6 pages.
- [52] Chauhan, N.; Pundir, C.S., *Anal. Chim. Acta* 2011, 701, 66–74.
- [53] Du, D.; Tao, Y.; Zhang, W.; Liu, D.; Li, H., *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 4231–4235.
- [54] Zhai, Y.; Zhai, J.; Wang, Y.; Guo, S.; Ren, W.; Dong, S., *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 7009–7014.
- [55] Liu, Y.; Han, T.; Chen, C.; Bao, N.; Yu, C.M.; Gu, H.Y., *Electrochim. Acta* 2011, 56, 3238–3247.
- [56] Tan, L.L.; Musa, A.; Lee, Y.H., *Sensor* 2011, 9344-9360.
- [57] Bertocchi, P.; Compagnone, D., *Biosens. Bioelectron.* 1996, 11, 1-10.
- [58] Kwan, R.C.H.; Hon, P.Y.T.; Renneberg, R., *Sens. Actuators B* 2005, 107, 616–622.
- [59] Azmi, N.E.; Ahmad, M.; Abdullah, J.; Sidek, H.; Heng, L.Y.; Karupiah, N., *Anal. Biochem.* 2009, 388, 28–32.
- [60] Choodum, A.; Boonsamran, P.; Daeid, N.N.; Wongniramaikul, W., *Science and Justice* 2015, 9.
- [61] Lopez, A.C.; Ymbern, O.; Puyol, M.; Casalta, J. M.; Chamarro, J.A., *Anal. Chim. Acta* 2015, 874, 26–32.
- [62] Ling, T.L.; Ahmad, M.; Heng, L.Y., *Sens. Actuators, B* 2012, 173, 614– 619.
- [63] Jin, S.; Lee, J.S.; Kang, Y.; Heo, M.; Shin, J.H.; Cha, J.S.; Nam, H.; Lee, J.Y.; Helal, A.; Kim, H. S.; Jeong, I.; Shim, J. H., *Sens. Actuators, B* 2015, 207, 1026–1034.
- [64] Azmi, N.E.; Abdullah, J.; Ahmad, M.; Sidek, H.; Heng, L.Y.; Rahman, S.A., *American Journal of Analytical Chemistry* 2012, 3, 364-370.
- [65] Zhu, J.; He, J.; Du, X.; Lu, R.; Huang, L.; Ge, X., *Appl. Surf. Sci.* 2011, 257, 9056-9062.
- [66] Chauhan, N.; Pundir, C.S. *Anal. Chim. Acta* 2011, 701, 66-74.
- [67] Li, D.; He, Q.; Cui, Y.; Duan, L.; Li, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 335, 488-493.
- [68] Khan, A.Y.; Noronha, S.B.; Bandyopadhyaya, R., *Biochem. Eng. J.* 2014, 91, 78-85.
- [69] Qu, S.; Wang, J.; Kong, J.; Yang, P.; Chen, G., *Talanta* 2007, 71, 1096-1102.
- [70] Apetrei, I.M.; Apetrei, C., *J. Food Eng.* 2015, 149, 1-8.
- [71] Turkarslan, O.; Kayahan, S. K.; Toppare, L., *Sens. Actuators, B* 2009, 136, 484-488.
- [72] Kwan, R. C. H.; Hon, P. Y. T.; Renneberg, R., *Anal. Chim. Acta* 2004, 523, 81-88.
- [73] Reanpang, P.; Themsirimongkon, S.; Saipanya, S.; Chailapakul, O.; Jakmunee, J., *Talanta* 2015, 144, 868-874.

ภาคผนวก

รูปภาพวิธีการทดลอง

ภาพที่ 1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$



(1) สารแขวนลอยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$



(2) สารละลายเอนไซม์เกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

ภาพที่ 2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส



(1) ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส



(2) ตรึงเอนไซม์เกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

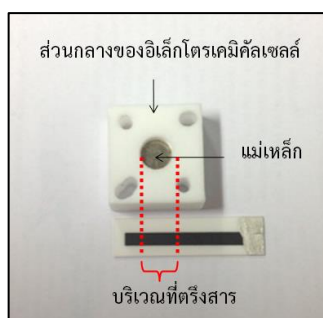
ภาพที่ 3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน



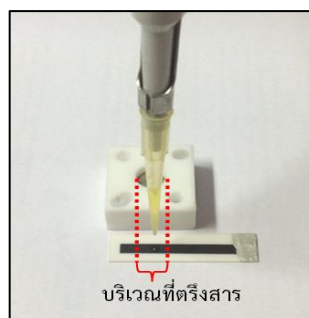
(1) ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน



(2) ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ทากาวซิลเวอร์
คอนดักทีฟเพ้นท์

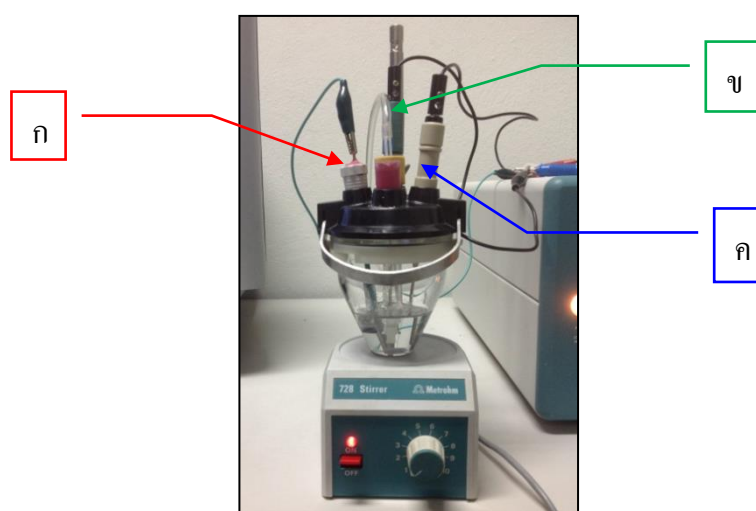


(3) บริเวณที่ตรึงสาร

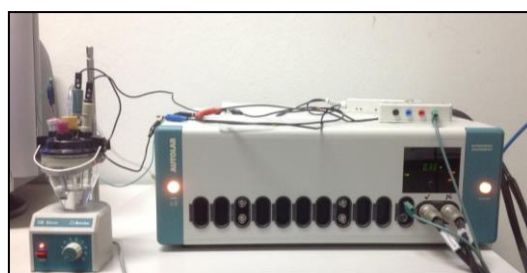


(4) ตรึงสารบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

ภาพที่ 4 การเตรียมระบบการวิเคราะห์แบบปกติ

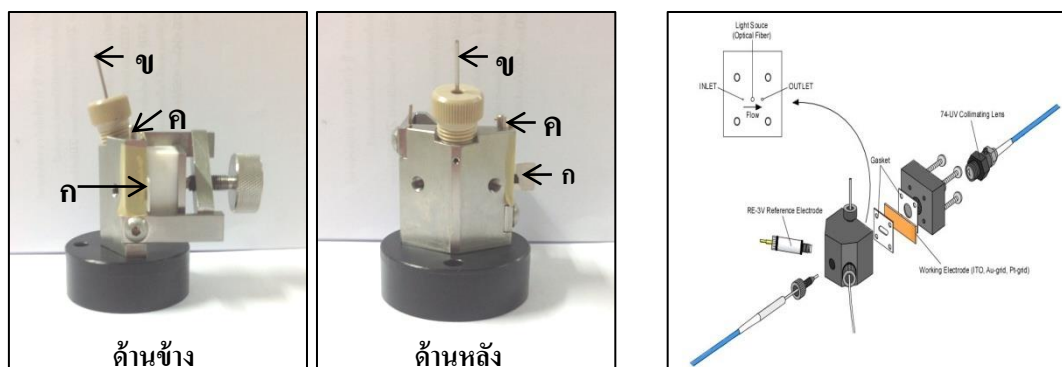


(1) การประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้า (ก) ขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนเฟสที่ถูกรับปรุง (ข) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (ค) ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม



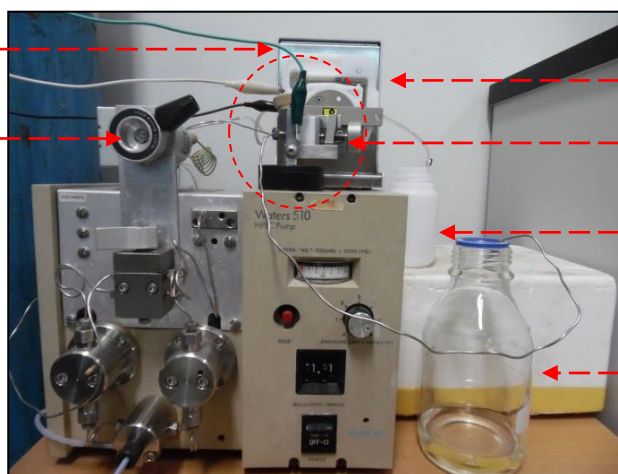
(2) การต่อเซลล์ขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ไฟฟ้า

ภาพที่ 5 การเตรียมระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ

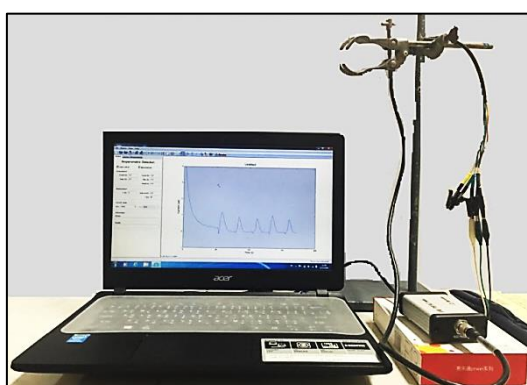


(1) การประกอบอิเล็กโทรเคมีเซลล์ (ก) ขั้วไฟฟ้าใช้งานพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ถูกปรับปรุง (ข) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และ (ค) ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม

เชื่อมต่อกับตัว
ตรวจวัด
ที่ฉีดสารตัวอย่าง
(Injection valve)



(2) ระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ



(3) เชื่อมต่อระบบการไหลอัตโนมัติเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ไฟฟ้าและคอมพิวเตอร์

ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำอย่างเข้มข้นระหว่างไบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐาน

เทคนิค	ไบโอเซนเซอร์	โพเทนชิโอเมทรี	ไทเทรต	วัดสี
ข้อดี	- ตรวจวัดง่ายและรวดเร็ว - ความไวสูง - ประยุกต์ให้เป็นอุปกรณ์ขนาดเล็กที่สามารถพกพาไปใช้ในภาคสนามได้ - ตรวจวัดสารได้หลากหลาย โดยเปลี่ยนชนิดของชั้นตรวจวัดให้จำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ - ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง - ราคาไม่แพง ประมาณ 500 บาท ต่อชิ้น สามารถตรวจวัดอย่างน้อย 5 ครั้ง	- จำเพาะเจาะจงสูง ไม่มีปัญหาการรบกวนจากตัวรบกวน - ความถูกต้องสูง - ตรวจวัดง่ายและรวดเร็ว - อุปกรณ์มีขนาดเล็ก สามารถพกพาไปตรวจวัดที่ภาคสนามได้ - ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง - ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.03-1400 มิลลิกรัมต่อลิตร - ชีตความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร	- ตรวจวัดง่ายและรวดเร็ว - อุปกรณ์หาได้ทั่วไปตามท้องปฏิบัติการ - สารเคมีราคาไม่แพง	- ความถูกต้องสูง - ความไวและจำเพาะเจาะจงสูง - ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.05-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร - ชีตความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร
ข้อด้อย	- มีปัญหาจากตัวรบกวน - ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.1-5.0 กรัมต่อลิตร - ชีตความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด 0.1 กรัมต่อลิตร	- อุปกรณ์ราคาแพง (ประมาณ 20,000 - 30,000 บาท) และต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ - ขั้วไฟฟ้าจำเพาะเจาะจงต่อไอออนชนิดเดียว	- ความถูกต้องต่ำ เนื่องจากการตรวจวัดขึ้นกับการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย - วิเคราะห์ปริมาณได้ยาก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำอย่างไม่ชัดเจน ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัด - ใช้สารเคมีปริมาณมาก - ชีตความสามารถในการตรวจวัดสูงในระดับเปอร์เซ็นต์	- ต้องเตรียมตัวอย่างให้เป็นสารละลายใสไม่มีอนุภาคแขวนลอย - การตรวจวัดใช้เวลานาน - เครื่องมือราคาแพง - ใช้สารเคมีเป็นพิษ คือสารประกอบของปรอท (HgI_2) - ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์

บทความเผยแพร่

1. เข้าร่วมงานประชุมเชิงวิชาการ PACCON 2016
2. เข้าร่วมงานประชุมเชิงวิชาการ Seoul International Conference on Engineering and Applied Science ที่ประเทศเกาหลี
3. ตีพิมพ์ผลงานวิจัยวารสาร Talanta
4. ยื่นขออนุสิทธิบัตร
5. ร่างเอกสาร การตีพิมพ์ผลงานวิจัย (อยู่ในระหว่างรอการยืนยันยอมรับผลงาน)



CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

Presented to

Preeyanut Butmee

with abstract titled

**A biosensor based on alanine dehydrogenase immobilized
on Fe₃O₄@Au nanoparticles for the determination
of ammonium ion in concentrated latex samples
using flow-injection amperometric system**

Presented during

PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE

PACCON 2016

**'THAILAND: ONE HUNDRED YEARS OF
ADVANCEMENT IN CHEMISTRY'**

**February 9 - 11, 2016
Bangkok, Thailand**

Associate Professor Dr. Vudhichai Parasuk
Chairman, Department of Chemistry
Faculty of Science, Chulalongkorn University

Associate Professor Dr. Surin Laosooksathit
President, the Chemical Society of Thailand



A Biosensor Based on Alanine Dehydrogenase Immobilized on Fe₃O₄@Au Nanoparticles for the Determination of Ammonium Ion in Concentrated Latex Samples using Flow-injection Amperometric System



Preeyanut Butmee¹, Sarawut Prasertsri¹, Saichol Pimpongkol², Kurt Kalcher³ and Anchalee Samphao^{1,*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, UbonRatchathani University, UbonRatchathani, 34190 Thailand

²Department of Physics, Faculty of Science, UbonRatchathani University, UbonRatchathani, 34190 Thailand

³Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, Karl-Franzens University, A-8010 Graz, Austria

*e-mail: anchalees@yahoo.com

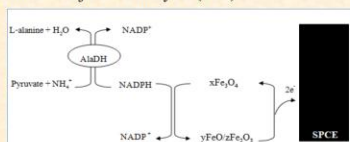


Introduction

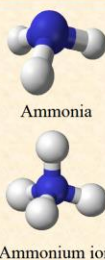
Ammonia is necessary in the latex industrial quality control.

- Use as a preservative substance
- Adding during the process to enhance the preservation of latex
- Determination in form of ammonium ion (NH₄⁺)

In this research, the NH₄⁺ biosensor was developed by alanine dehydrogenase (AlaDH) chemisorbed on the surface of magnetic core shell (Fe₃O₄@Au NPs) and attached them on a screen-printed carbon electrode (SPCE) by an extra pillar magnet for the determination of NH₄⁺ in concentrated latex samples based on flow injection analysis (FIA).



Reaction mechanism of NH₄⁺ determination based on AlaDH/Fe₃O₄@Au/SPCE

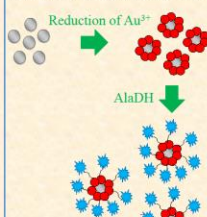


The optimum conditions of the NH₄⁺ biosensor based on FIA system

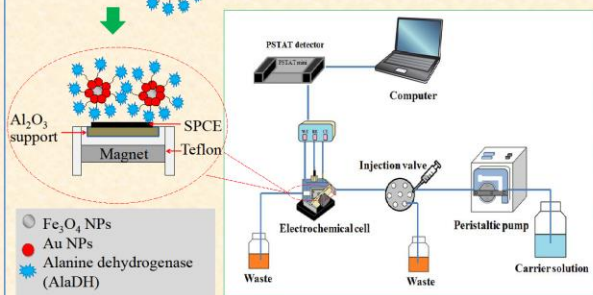
Conditions	Optimal value
Loading of core-shell	0.0001 mg Fe ₃ O ₄ .cm ⁻²
Loading of enzyme	0.6 unit.cm ⁻²
Potential applied	0.7 V versus Ag/AgCl
pH solution	7.0
Substrate concentration	0.6 mmol.L ⁻¹ .cm ⁻²
Cofactor concentration	1.2 mmol.L ⁻¹ .cm ⁻²
Flow rate	1.2 mL.min ⁻¹
Injection loop	100 µL

Experimental

AlaDH/Fe₃O₄@Au/SPCE preparation



The response of the biosensor to NH₄⁺ was based on the electrocatalytic properties of Fe₃O₄ to oxidize β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), which was used as a cofactor of the enzymatic reaction. The current signal was occurred and measured which is proportional to the amount of NH₄⁺ consumed during the catalytic reaction of the AlaDH enzyme with pyruvate.



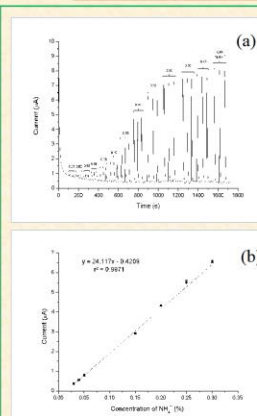
Schematic of AlaDH/Fe₃O₄@Au/SPCE preparation and flow injection system for NH₄⁺ determination

Results and discussion

An attention was paid to characterize Fe₃O₄@Au.

- The maximum absorption spectrum were observed at 580 nm.
- The average diameter were about 20-30 nm.

The AlaDH/Fe₃O₄@Au/SPCE was optimized the experimental conditions and evaluated the analytical performance and then applied to the determination of NH₄⁺ in the concentrated latex samples.



Analytical performance

The AlaDH/Fe₃O₄@Au/SPCE was experimentally evaluated and the results showed as follow:

Linear range	0.03-0.30%
Sensitivity	36.6 µA per %.cm ²
LOD	0.01%
LOQ	0.02%
Repeatability	2.3%RSD (n=10)
Reproducibility	4.3%RSD (n=3)

The NH₄⁺ determination was studied under the optimum conditions; FIA diagram (a) and linear response range (b).

Determination of NH₄⁺ in concentrated latex

- The proposed biosensor was applied to determine NH₄⁺ in the concentrated latex samples.
- Nessler spectrophotometric method was used as a comparison method.
- The two methods were in good agreement at 95% confidence level.

Samples	Biosensor (%w/w)	Nessler method (%w/w)
Concentrated Latex #1	0.72 ± 0.03	0.64 ± 0.09
Concentrated Latex #2	0.79 ± 0.04	0.78 ± 0.02
Concentrated Latex #3	0.80 ± 0.07	0.67 ± 0.11

Conclusions

- The biosensor modified with AlaDH and core shell Fe₃O₄@Au could be applied to determine ammonium ion in concentrated latex samples.
- The analytical results from the proposed biosensor and a reference method are no significant statistical difference by t-test at a confidence interval for 95%.
- This biosensor could be promising applied to determine ammonium ion in real samples with high sensitivity and accuracy.

Acknowledgment

The authors would like to thank Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, and the Thailand Research Fund (RDG5750100) for all supports.

References

- [1] Ling, T.L., Ahmad, M., and Heng, L.Y., *Sensors*, 2011, 11, 9344-9360.
- [2] Bertocchi, P., Compagnone, D., and Palleschi, G., *Biosens. Bioelectron.*, 1996, 11, 1-10.
- [3] Liu, R., Sun, B., Liu, D., and Sun, A., *Talanta*, 1996, 43, 1049-1054.

Development of biosensors for the determination of ammonium ion in concentrated latex samples



Preeyanut Butmee¹, Sarawut Prasertsri¹, Saichol Pimmongkol², Kurt Kalcher³ and Anchalee Samphao^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190 Thailand

²Department of Physics, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190 Thailand

³Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, Karl-Franzens University, A-8010 Graz, Austria

*e-mail: anchalees@yahoo.com

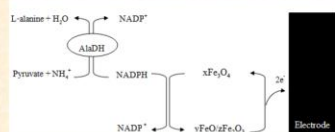


Introduction

Ammonia is necessary in the latex industrial quality control.

- Use as a preservative substance
- Adding during the process to enhance the preservation of latex
- Determination in form of ammonium ion (NH_4^+)

In this research, the NH_4^+ biosensor was developed by alanine dehydrogenase (AlaDH) chemisorbed on the surface of magnetic core shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ NPs) and attached them on a carbon paste electrode (CPE) and screen-printed carbon electrode (SPCE) by an extra pillar magnet for the determination of NH_4^+ in concentrated latex samples based on batch and flow injection analysis (FIA) system, respectively.



Reaction mechanism of NH_4^+ determination based on electrode modified with AlaDH and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ NPs



Ammonia



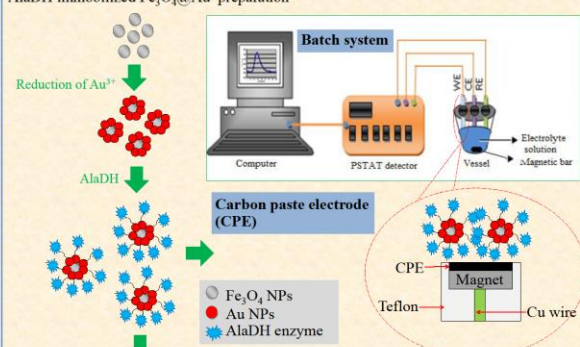
Ammonium ion

The optimum conditions of the NH_4^+ biosensor based on batch and FIA system

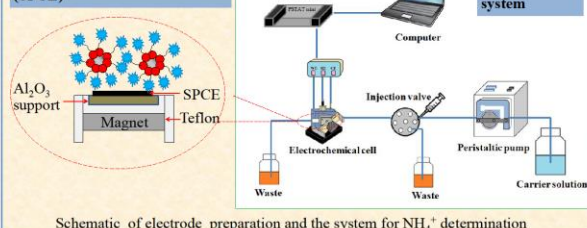
Conditions	Optimal value	
	Batch system	FIA system
Loading of core-shell	0.003 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cm}^2$	0.0001 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cm}^2$
Loading of enzyme	0.3 unit. cm^2	0.6 unit. cm^2
Potential applied	0.6 V versus Ag/AgCl	0.7 V versus Ag/AgCl
pH solution	7.0	7.0
Substrate concentration	20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0.6 mmol. $\text{L}^{-1}.\text{cm}^2$
Cofactor concentration	30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1.2 mmol. $\text{L}^{-1}.\text{cm}^2$
Temperature	25°C	25°C
Flow rate	-	1.2 mL. min^{-1}
Injection loop	-	100 μL

Experimental

AlaDH immobilized $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ preparation



Screen-printed carbon electrode (SPCE)



Schematic of electrode preparation and the system for NH_4^+ determination

Results and discussion

An attention was paid to characterize $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$.

- The maximum absorption spectrum were observed at 580 nm.
- The average diameter were about 20-30 nm.

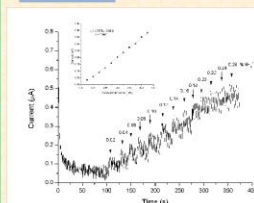
The modified electrodes was optimized the experimental conditions and evaluated the analytical performance and then applied to the determination of NH_4^+ in the concentrated latex samples.

References

- [1] Ling, T.L., Ahmad, M., and Heng, L.Y., *Sensors*, 2011, 11, 9344-9360.
- [2] Bertocchi, P., Compagnone, D., and Palleschi, G., *Biosens. Bioelectron.*, 1996, 11, 1-10.
- [3] Liu, R., Sun, B., Liu, D., and Sun, A., *Talanta*, 1996, 43, 1049-1054.

Analytical performance

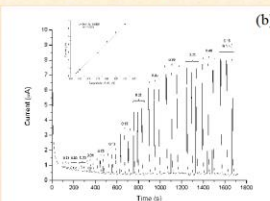
Batch system



Linear range	0.02-0.22%
Sensitivity	3.6 μA per %. cm^2
LOD	0.01%
LOQ	0.03%
Repeatability	4.7%RSD (n=3)
Reproducibility	3.6%RSD (n=3)
Sample throughput	72 samples per hour

Flow injection system

Linear range	0.03-0.30%
Sensitivity	36.6 μA per %. cm^2
LOD	0.01%
LOQ	0.02%
Repeatability	2.3%RSD (n=10)
Reproducibility	4.3%RSD (n=3)
Sample throughput	130 samples per hour



The amperometric response of the biosensor for the NH_4^+ determination studied under the optimum conditions: (a) the biosensor based on batch system (b) the biosensor based on FIA system

Determination of NH_4^+ in concentrated latex

- The proposed biosensor was applied to determine NH_4^+ in the concentrated latex samples.
- Nessler spectrophotometric method was used as a comparison method.
- The two methods were in good agreement at 95% confidence level.

Samples	Biosensor (%w/w)		Nessler method (%w/w)
	Batch system	FIA system	
Concentrated latex #1	0.68 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.09
Concentrated latex #2	0.71 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.02
Concentrated latex #3	0.71 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.11

Conclusions

- The biosensor modified with AlaDH and core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ could be applied to determine ammonium ion in concentrated latex samples.
- The analytical results from the proposed biosensor and a reference method are no significant statistical difference by t-test at a confidence interval for 95%.
- This biosensor could be promising applied to determine ammonium ion in real samples with high sensitivity and accuracy.

Acknowledgment

The authors would like to thank Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, and the Thailand Research Fund (RDG5750100) for all supports.



Paper-FIA.pdf

Talanta 142 (2015) 35–42



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Flow-injection amperometric determination of glucose using a biosensor based on immobilization of glucose oxidase onto Au seeds decorated on core Fe_3O_4 nanoparticles



Anchalee Samphao^{a,b,*}, Preeyanut Butmee^a, Juthamas Jitcharoen^a, Ľubomír Švorc^c, Georg Raber^d, Kurt Kalcher^d

^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, UbonRatchathani University, UbonRatchathani 34190, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, UbonRatchathani University, UbonRatchathani 34190, Thailand

^c Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, Bratislava SK-812 37, Slovak Republic

^d Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, Karl-Franzens University, A-8010 Graz, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2014

Received in revised form

27 January 2015

Accepted 28 January 2015

Available online 27 March 2015

Keywords:

Core-shell magnetite gold nanoparticles

Screen-printed electrode

Amperometric biosensor

Glucose

Flow-injection analysis

ABSTRACT

An amperometric biosensor based on chemisorption of glucose oxidase (GOx) on Au seeds decorated on magnetic core Fe_3O_4 nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) and their immobilization on screen-printed carbon electrode bulk-modified with manganese oxide (SPCE(MnO₂)) was designed for the determination of glucose. The $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{GOx}$ modified SPCE(MnO₂) was used in a flow-injection analysis (FIA) arrangement. The experimental conditions were investigated in amperometric mode with the following optimized parameters: flow rate 1.7 mL min⁻¹, applied potential +0.38 V, phosphate buffer solution (PBS; 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0) as carrier and 3.89 unit mm⁻² enzyme glucose oxidase loading on the active surface of the SPCE. The designed biosensor in FIA arrangement yielded a linear dynamic range for glucose from 0.2 to 9.0 mmol L⁻¹ with a sensitivity of 2.52 $\mu\text{A mm}^{-1} \text{cm}^{-2}$, a detection limit of 0.1 mmol L⁻¹ and a quantification limit of 0.3 mmol L⁻¹. Moreover, a good repeatability of 2.8% (number of measurements $n=10$) and a sufficient reproducibility of 4.0% (number of sensors $n=3$) were achieved. It was found that the studied system $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ facilitated not only a simpler enzyme immobilization but also provided wider linear range. The practical application of the proposed biosensor for FIA quantification of glucose was tested in glucose syrup samples, honeys and energy drinks with the results in good accordance with those obtained by an optical glucose meter and with the contents declared by the producers.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The development of biosensors has attracted much attention due to their possible applications in the fields of clinical monitoring and diagnosis as well as in industrial quality and process control [1–3]. Very widespread are amperometric enzyme biosensors which are often based on the oxidation of the target analyte with an appropriate oxidase, where the formation of hydrogen peroxide is monitored (first generation oxidase biosensors) [4–6]. Glucose oxidase represents one of the most exploited enzymes of the oxidase group [7]. The fabrication of glucose biosensors was achieved with immobilization of the enzyme by different methods such as physical

adsorption [8,9], microencapsulation [10,11], entrapment [12,13], cross-linking [14,15], or covalent bonding [16,17]. However, some of these sensors show only fair sensitivity and stability or have the disadvantage that the immobilization procedures are long and require many steps.

Food production and quality control requires fast and easy-to-manage sensing of certain food components in order to guarantee proper processing. The quicker the analysis can be performed, the better the production process can be altered or adapted. Facile analysis and quick handling can be simply achieved by magnetic nanoparticles.

Nanoparticles of noble metals have attracted much attention recently, particularly because of their high surface area combined with improvements of the electron transfer. Thus, very often catalytic or even synergistic effects with other modifiers can be observed with corresponding electrochemical sensors.

* Corresponding author at: Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, UbonRatchathani University, UbonRatchathani 34190, Thailand. Tel.: +66 85 055 1717; fax: +66 45 288 400.
E-mail address: scanchsa@mail2ubu.ac.th (A. Samphao).

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาศาสตร์เคมีที่เกี่ยวข้องกับไบโอเซนเซอร์

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

แอมโมเนียเป็นสารเคมีที่มีการใช้งานอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมย้อมผ้า ยา เส้นใยสังเคราะห์ พลาสติก ปุ๋ย วัตถุระเบิด อุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง โรงกลั่นน้ำมัน และไอคริม เป็นต้น แอมโมเนียถือว่าเป็นสารพิษสารหนึ่ง ซึ่งมีโทษกับทั้งคนและสัตว์ หากปล่อยแหล่งน้ำจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำสูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ลดลง ทำให้สัตว์น้ำตายอย่างเฉียบพลัน หากมีการปนเปื้อนในอากาศ จะเปลี่ยนเป็นสารประกอบกลุ่มไนโตรเจน (NOx) และละอองไออนแอมโมเนียมีฤทธิ์กัดกร่อนโลหะได้ และทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังที่สัมผัส หากสูดดมมากจะออกฤทธิ์กระตุ้นหัวใจ เสี่ยงต่อหัวใจวายได้ง่าย ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณของแอมโมเนียที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำและอากาศจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ การวิเคราะห์แอมโมเนียในปัจจุบันตรวจวัดในรูปของแอมโมเนียมไอออน วิเคราะห์ด้วยขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจงแอมโมเนียมไอออน (Amonium ion selective electrode) แต่อุปกรณ์ดังกล่าวมีข้อด้อยคือ ราคาแพงอยู่ที่ประมาณ 60,000 ถึง 100,000 บาท และต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงทำให้เกิดความพยายามที่จะสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่สามารถเตรียมและใช้งานได้ง่าย และมีราคาไม่แพง

อุปกรณ์ตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนที่พัฒนาขึ้น เรียกว่าไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างจำเพาะเจาะจงเช่นเดียวกับขั้วไฟฟ้าแบบเจาะจงไอออน (Ion selective electrode) ไบโอเซนเซอร์ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพ (Biological substance) และตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์คือแอมโมเนียมไอออนทำปฏิกิริยากับสารชีวภาพที่ตรึงบนผิวหน้าของตัวแปลงสัญญาณ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ถูกแปรเป็นสัญญาณที่ตัวแปลงสัญญาณ แปลงสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นสัญญาณที่อ่านค่าออกมาได้ สัญญาณวิเคราะห์ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอมโมเนียมไอออน และถูกนำไปดำเนินการต่อเพื่อแสดงผลออกมา โดยส่วนของสารชีวภาพใช้เอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส (Alanine dehydrogenase) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอมโมเนียมไอออน และส่วนของตัวแปลงสัญญาณใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (Carbon paste electrode) เนื่องจากสามารถเตรียมง่ายเพียงแค่นำผงคาร์บอน (Carbon powder) ผสมเข้ากับน้ำมันแร่ (Mineral oil) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังได้ปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสด้วยอนุภาคคอร์เชลล์แมกเนติก-ทอง (Core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ nanopaticels) เพื่อช่วยในการตรึงเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ให้อยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า อีกทั้งอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ยังสามารถช่วยเพิ่มความไวของขั้วไฟฟ้าได้อีกด้วย

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

ไบโอเซนเซอร์มีลักษณะเป็นอุปกรณ์ที่ประดิษฐ์ขึ้นเพื่อใช้ติดตามหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออน โดยใช้สารชีวภาพคือเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอมโมเนียมไอออน ซึ่งถูกเกาะติดกับอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เมื่อเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไอออน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและได้รับสัญญาณเฉพาะ ในที่นี้คืออิเล็กตรอน ต่อมาตัวแปลงสัญญาณคือขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส ทำหน้าที่แปลงสัญญาณเฉพาะให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าที่สามารถอ่านค่าออกมา โดยสัญญาณไฟฟ้าที่ได้แปรตามปริมาณของแอมโมเนียมไอออน การประดิษฐ์นี้มีความมุ่งหมายเพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดที่จำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน มีขนาดเล็ก พกพาสะดวก สามารถเตรียมและใช้งานได้ง่าย ตลอดจนมีราคาถูก

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงถึงอุปกรณ์ตรวจวัดไบโอเซนเซอร์ ตามการประดิษฐ์นี้

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ไบโอเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ประกอบไปด้วยสองส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณ ในการประดิษฐ์นี้ใช้เอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเป็นสารชีวภาพ ซึ่งถูกเกาะติดกับอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเป็นตัวแปลงสัญญาณ ดำเนินการประดิษฐ์โดยขั้นตอนแรกเตรียมส่วนของตัวแปลงสัญญาณ โดยออกแบบแท่งเทฟลอน (Teflon rod) (1) ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร ยาวขนาด 10 เซนติเมตร เจาะรูข้างในตรงกลางเล็กน้อยประมาณ 4 มิลลิเมตร เพื่อใส่ลวดสายไฟทองแดง (2) โดยลวดสายไฟทองแดง (2) ที่นำมาใช้ยาวขนาด 11 เซนติเมตร ตัดเอาฉนวนด้านปลายออกด้านหนึ่งประมาณ 5 มิลลิเมตร ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งเชื่อมติดเข้ากับแผ่นทองแดงขนาดยาวๆ (3) จากนั้นใส่ลวดสายไฟทองแดง (2) เข้าไปในแท่งเทฟลอน (1) และนำแม่เหล็กถาวร (Permanent neodymium magnet) (4) ทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ลึก 3 มิลลิเมตร ใส่เข้าไปในแท่งเทฟลอน (1) โดยวางทับลงบนแผ่นทองแดง (3) จากนั้นเตรียมคาร์บอนเพส (5) โดยผสมผงคาร์บอน (Carbon powder) กับน้ำมันแร่ (Mineral oil) ให้มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อน้ำมันคือ 7:3 ผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวและเกิดเป็นเพส แล้วอัดลงบนแม่เหล็กถาวร (4) ให้เต็มผิวหน้าขั้วไฟฟ้า และใช้แผ่นเทฟลอนขัดผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสให้เรียบและสม่ำเสมอ

เตรียมส่วนของสารชีวภาพ โดยทำการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ที่มีอัตราส่วนโมลของ $\text{Fe}_3\text{O}_4: Au$ คือ 1:0.8 ดังนี้ ปิเปตน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ปริมาตร 22 มิลลิลิตร และสารแขวนลอย Fe_3O_4 เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic sonicator) เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายทอง (HAuCl_4) เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ภายใต้สภาวะที่อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 5 นาที และรีดิวซ์ด้วยสารละลาย

โซเดียมโบโรไฮไดร (NaBH₄) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 10 นาที

ตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au และผิวหน้าขั้วไฟฟ้า โดยปิเปตสารแขวนลอยอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายมาตรฐานเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (AlaDH) 4.25 ยูนิต ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิด (Safe lock tube) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจะถูกเกาะติดบนผิวของอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au ด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างทองกับหมู่ไทโธลในโครงสร้างของเอนไซม์ จากนั้นจุ่มผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่เตรียมลงในสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ Fe₃O₄@Au สามารถเกาะติดที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยแรงทางแม่เหล็ก ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานของระบบการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

วิธีการใช้งานไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างน้ำยากัน โดยประกอบขั้วไฟฟ้าใช้งานดังกล่าวข้างต้น ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl reference electrode) และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม (Pt electrode) เข้ากับเซลล์ไฟฟ้าของเครื่องวิเคราะห์ไฟฟ้า (Vessel) ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในสถานะที่มีโพรวเตเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ และนิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ในรูปออกซิไดซ์ (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADPH) เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ (Cofactor) สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไอออน ตามลำดับ และเชื่อมต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสามเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat detector) และคอมพิวเตอร์เพื่อประเมินผล

วิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้เปิดเผยไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

บทสรุปการประดิษฐ์

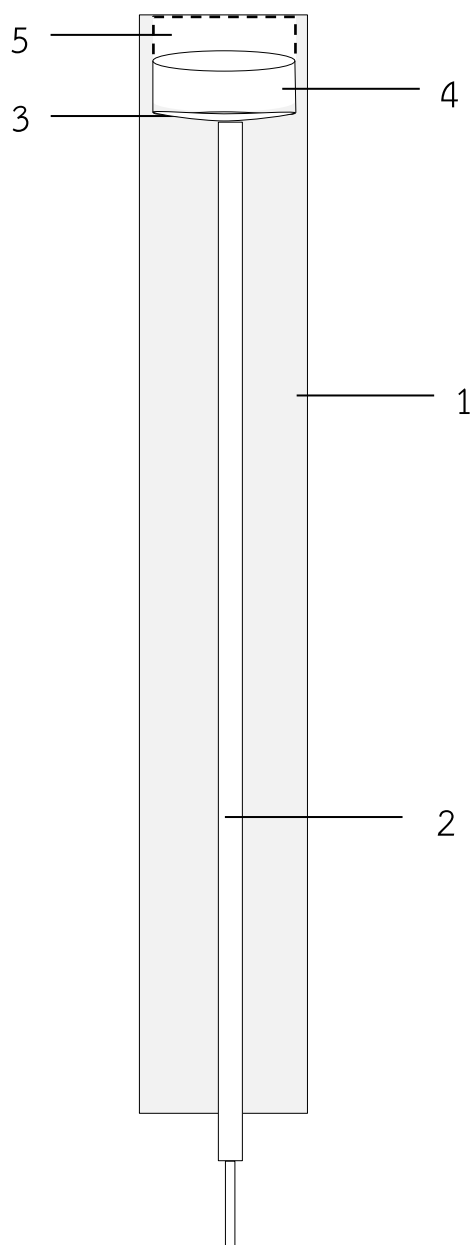
ไบโอเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสำหรับหาปริมาณของแอมโมเนียมไอออนในตัวอย่าง ประกอบไปด้วยสองส่วนคือ ส่วนของสารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณ โดยใช้สารชีวภาพคือเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสถูกเกาะติดกับอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ เพื่อเพิ่มความไวของไบโอเซนเซอร์และช่วยตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสให้อยู่บนผิวหน้าของตัวแปลงสัญญาณ และส่วนของตัวแปลงสัญญาณคือ ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเตรียมจากแท่งเทฟลอน (1) ภายในประกอบด้วยลวดสายไฟทองแดง (2) ทำหน้าที่นำส่งอิเล็กตรอน และแม่เหล็กถาวร (4) ทำหน้าที่ดึงดูดเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ให้ยึดติดบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

ข้อถกเถียง

1. ไบโอะเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ประกอบไปด้วยสองส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณ มีลักษณะเฉพาะดังนี้

ส่วนของตัวแปลงสัญญาณคือขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส โดยออกแบบแท่งเทฟลอน (Teflon rod) (1) ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร ยาวขนาด 10 เซนติเมตร เจาะรูข้างในตรงกลางเล็กน้อยประมาณ 4 มิลลิเมตร เพื่อใส่ลวดสายไฟทองแดง (2) โดยลวดสายไฟทองแดง (2) ที่นำมาใช้ยาวขนาด 11 เซนติเมตร ตัดเอาฉนวนด้านปลายออกด้านหนึ่งประมาณ 5 มิลลิเมตร ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งเชื่อมติดเข้ากับแผ่นทองแดงขนาดยาวๆ (3) จากนั้นใส่ลวดสายไฟทองแดง (2) เข้าไปในแท่งเทฟลอน (1) และนำแม่เหล็กถาวร (Permanent neodymium magnet) (4) ทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ลึก 3 มิลลิเมตร ใส่เข้าไปในแท่งเทฟลอน (1) โดยวางทับลงบนแผ่นทองแดง (3) จากนั้นเตรียมคาร์บอนเพส (5) โดยผสมผงคาร์บอน (Carbon powder) กับน้ำมันแร่ (Mineral oil) ให้มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อน้ำมันคือ 7:3 ผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวและเกิดเป็นเพส แล้วอัดลงบนแม่เหล็กถาวร (4) ให้เต็มผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

ส่วนของสารชีวภาพคือเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส ซึ่งถูกเกาะติดกับอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ โดยทำการสังเคราะห์อนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ที่มีอัตราส่วนโมลของ $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Au}$ คือ 1:0.8 ดังนี้ ปิเปตน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) อนุหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ปริมาตร 22 มิลลิลิตร และสารแขวนลอย Fe_3O_4 เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic sonicator) เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายทอง (HAuCl_4) เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ภายใต้สภาวะที่อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 5 นาที และรีดิวซ์ด้วยสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้อนุภาคกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 10 นาที ตรึงเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสบนอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ และผิวหน้าขั้วไฟฟ้า โดยปิเปตสารแขวนลอยอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายมาตรฐานเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนส (AlaDH) 4.25 ยูนิต ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิด (Safe lock tube) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจุ่มผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่เตรียม ลงในสารละลายเอนไซม์อะลานีนดีไฮโดรจีเนสเกาะติดอนุภาคคอร์เซลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ สามารถเกาะติดที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยแรงทางแม่เหล็ก ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานของระบบการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า



รูปที่ 1



Manuscript-Monatshefte für chemie.pdf

MCCM_Template_Vers 4

May 2014

A biosensor for the determination of ammonium ion using flow injection amperometric system based on alanine dehydrogenase immobilized on Fe₃O₄@Au nanoparticles

Preeyanut Butmee¹ • Sarawut Prasertsri¹ • Saichol Pimmongkol² • Gamolwan Tumcharern³ • Albana Veseli⁴ • Eda Mehmeti⁵ • Kurt Kalcher⁵ • Anchalee Samphao^{1,6}

Received:/Accepted ...

Abstract An ammonium ion biosensor was constructed using a screen-printed carbon electrode (SPCE) based on alanine dehydrogenase (AlaDH) immobilized on core shell Fe₃O₄@Au nanoparticles which were attached to the electrode surface by an external magnet. The amperometric current response in a flow injection analysis (FIA) system depending on the oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) was proportional to the amount of ammonium ion consumed during the catalytic reaction of the AlaDH enzyme. The designed biosensor was evaluated with a linear response range from 5-255 mM with a sensitivity of 0.2 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, a detection limit of 2.5 mM and a quantification limit of 6.0 mM. Moreover, the repeatability (10 measurements) and the reproducibility (3 sensors) were estimated as 2.6 %RSD and 3.0 %RSD, respectively. The proposed biosensor was applied successfully to the determination of ammonium ion concentration in concentrated latex samples.

Keywords Biosensor • Ammonium ion • Core shell Fe₃O₄@Au nanoparticles • Alanine dehydrogenase • Screen-printed carbon electrode • Flow injection analysis

✉ Anchalee Samphao
anchalee.s@ubu.ac.th
anchalees@yahoo.com

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	เวลาที่วางแผน (เดือน)	เวลาดำเนินการ (เดือน)	ผลการดำเนินการ
1. เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือ		ได้อุปกรณ์พร้อมใช้งาน	1	1	เป็นไปตามแผน
2. การเตรียมแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์	สังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ด้วยเทคนิค UV-vis, XRD, TEM และ IR พิสูจน์เอกลักษณ์ชีวไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ และเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิค SEM, EIS, CV และ Chronoamperometry ศึกษาปริมาณคอร์เชลล์ $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ บนชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพส และชีวไฟฟ้าพิกสกรีนคาร์บอน 0.5×10^{-3} และ 0.2×10^{-3} มิลลิกรัม Fe_3O_4 ต่อผิวหน้าชีวไฟฟ้า ตามลำดับ ศึกษาปริมาณเอนไซม์อะลานินดีไฮโดรจีเนสบนชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพส และชีวไฟฟ้าพิกสกรีนคาร์บอน 0-0.8 และ 0-0.5 ยูนิตต่อผิวหน้าชีวไฟฟ้า ตามลำดับ	ได้สภาวะที่เตรียมแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์	2	2	เป็นไปตามแผน
3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ของแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์โดยใช้ชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพส	ศึกษาศักยภาพที่ 0.4-0.8 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl ศึกษาความเป็นกรดเบสของสารละลายที่เหมาะสม 6.0-9.0 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 20-40 องศาเซลเซียส ศึกษาปริมาณสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ 0-40 และ 0-50 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ	ได้สภาวะการวิเคราะห์	1	1	เป็นไปตามแผน
4. ดำเนินการติดตั้งระบบแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	ศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพา 0.4-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาศักยภาพที่ 0.2-0.8 โวลต์ เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl ศึกษาความเป็นกรดเบสของสารละลายที่เหมาะสม 6.0-9.0 ศึกษาปริมาตรการฉีดสารตัวอย่าง 20-500 ไมโครลิตร ศึกษาปริมาณสารตั้งต้นและโคแฟกเตอร์ 0-1.0 มิลลิโมลาร์	ได้ระบบการวิเคราะห์แบบการไหลอัตโนมัติ	1	1	เป็นไปตามแผน
5. ดำเนินการประเมินการทำงานของแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์	ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ความไวในการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน ขีดความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจพบและตรวจวัดแอมโมเนียมไอออน ความแม่นยำในการตรวจวัดและของชีวไฟฟ้า ตัวรบกวนการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออน	ได้ประเมินการทำงานของแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์	2	2	เป็นไปตามแผน
6. ดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชัน ด้วยแอมโมเนียมไอออนไบโอเซนเซอร์ในระบบปกติและระบบการไหลอัตโนมัติ		ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนในน้ำยางชัน	2	6	ไม่เป็นไปตามแผน
7. รวบรวม และวิเคราะห์ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์		ข้อมูลผลการวิเคราะห์แอมโมเนียมไอออนทั้งหมด	1	1	เป็นไปตามแผน
8. วิเคราะห์ วิจารณ์ และสรุปผลการดำเนินการวิจัย		ได้ข้อสรุปงานวิจัย	1	1	เป็นไปตามแผน
9. จัดทำรูปเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์		รูปเล่มงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	0.5	0.5	เป็นไปตามแผน
10. ยื่นเสนอขอจดอนุสิทธิบัตรหรือสิทธิบัตร		อนุสิทธิบัตรหรือสิทธิบัตร	0.5	0.5	เป็นไปตามแผน