

บทที่ 2

วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 Potentiostat (Autolab รุ่น PGSTATE10, Ecochemie, Netherlands) ทำหน้าที่ป้อนศักย์ไฟฟ้าและแสดงผลสัญญาณไฟฟ้าด้วยโปรแกรมควบคุม GPES (General purpose electrochemical system version 4.4)

2.1.2 ขั้วไฟฟ้าที่ใช้

- ขั้วไฟฟ้าใช้งาน(working electrode) ใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลส
- ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) ใช้ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์(Ag/AgCl, 3M KCl) (Metrohm, switzerland)
- ขั้วไฟฟ้าช่วย (auxiliary electrode) ใช้ขั้วไฟฟ้าแพลตทินัม (Metrohm, switzerland)

2.1.3 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 100, 250, 400 และ 500 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25.00, 100.00, 250.00 และ 500.00 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (MERCK, Germany) ขนาด 10.00 – 100.00, 100.00 – 1000.00 ไมโครลิตร
- ปิเปตแบบสเกลขนาด 10.00 และ 25.00 มิลลิลิตร

2.1.4 เครื่องอัลตราโซนิก (Transsonic digitals, รุ่น Z659460, Bandelin SONOREX[®], Singapore)

2.1.5 เครื่องวัดพีเอช (รุ่น pH 700 with Epoxy Electrode ยี่ห้อ Eutech, Singapore)

2.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (Hettich, Germany)

2.2 สารเคมี

2.2.1 Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$, 329.25 g/mol) Ajax Finechem, New Zealand

2.2.2 Sodium hydroxide (NaOH, 40.00 g/mol), Ajax Finechem, New Zealand

2.2.3 Potassium chloride (KCl, 74.55 g/mol), Ajax chemicals, Australia

2.2.4 capsaicin ($C_{18}H_{27}NO_3$, 305.41 g/mol) Sigma-Aldrich, USA

2.2.5 Phosphoric acid (H_3PO_4 , 85% w/w), Merck Millipore, Germany

2.2.6 Acetic acid, Glacial (CH_3COOH , 99.7% w/w), J.T.baker, Thailand

- 2.2.7 Conc. Sulfuric acid (H_2SO_4 , 95.0 – 98.0% w/w), J.T.baker, Thailand
- 2.2.8 Boric acid (H_3BO_3 , 61.81 g/mol), Ajax chemicals, Australia
- 2.2.9 Absolute Ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), Merck Millipore, Germany
- 2.2.10 Methanol (CH_3OH , 32.04 g/mol), RCL Labscan, Thailand
- 2.2.11 Sodium borohydride (NaBH_4 , 37.83 g/mol), Sigma-Aldrich, USA
- 2.2.12 Gold (III) Chloride hydrate (HAuCl_4 , 339.79 g/mol), Sigma-Aldrich, USA
- 2.2.13 Trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 258.06 g/mol), VWR International, UK
- 2.2.14 Graphite powder, Sigma-Aldrich, USA
- 2.2.15 Mineral oil, Sigma-Aldrich, USA

2.3 การเตรียมสารเคมี

2.3.1 สารละลายไตรโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.38 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยชั่ง ไตรโซเดียมซัลเฟต 0.0490 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500.00 มิลลิลิตร

2.3.2 Gold (III) Chloride hydrate ความเข้มข้น 0.30 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Gold (III) Chloride hydrate 0.0510 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500.00 มิลลิลิตร

2.3.3 สารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ความเข้มข้น 125 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยชั่งโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 2.3643 กรัม ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500.00 มิลลิลิตร

2.3.4 สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์ในโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.10 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 1.8638 กรัม ละลายในน้ำกลั่นโดยละลายในปิកเกอร์ ก่อน จากนั้นชั่งโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ 0.4116 กรัม แล้วเทสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไฮยาไนด์ ลงไปในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ที่เตรียมไว้ จากนั้นคนให้เข้ากัน ปรับปริมาตร 250.00 มิลลิลิตร

2.3.5 สารละลายมาตรฐานแคปไซซินความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์

เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานแคปไซซิน 0.0161 กรัม ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

2.3.6 สารละลาย Britton Robinson buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ชั่งกรดบอริก 1.546 กรัม ละลายในน้ำกลั่นโดยละลายในบีกเกอร์ก่อน จากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก 1.70 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 1.43 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500.00 มิลลิลิตร ปรับพีเอชที่ต้องการด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

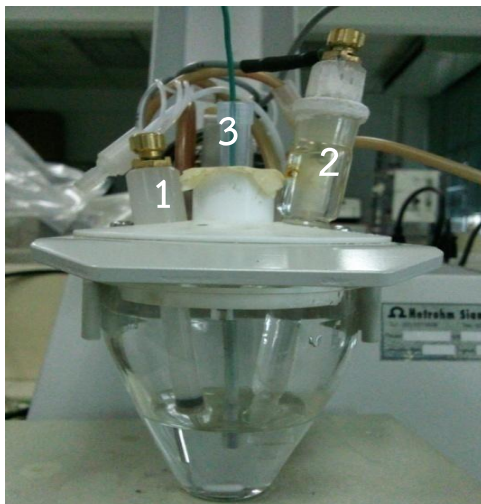
เติมสารละลายไตรโซเดียมซิเตรดความเข้มข้น 0.38 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500.00 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วสะอาด จากนั้นเติมสารละลาย Gold (III) Chloride hydrate ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 153 ไมโครลิตร ตามด้วยเติมสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ความเข้มข้น 125 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1200 ไมโครลิตร คนผสมเข้าด้วยกันอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ไปตรวจสอบสมบัติทางเคมีด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer สมบัติทางกายภาพด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscope (TEM) และวัดขนาดของอนุภาคนาโนทองด้วยเครื่อง Dynamic light scattering (DLS)

2.4.2 การประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลส

ผสมผงแกรไฟต์ 0.50 กรัม และ mineral oil 0.20 มิลลิลิตรให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบรรจุในหลอดพลาสติกที่มีลวดทองแดงเป็นตัวนำไฟฟ้า ส่วนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทองเตรียมโดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลสมาหยดด้วยอนุภาคนาโนทองแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทอง

2.4.3 การจัดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์

ในการศึกษาขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทองในระบบแบบแบบพหุชั้น จะทำการศึกษาโดยเทคนิคโวลแทมเมตรีแบบรอบ โดยทำการจัดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์ที่เป็นระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า คือ ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าแพลตตินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และ ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพลสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทองเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ดังรูปที่ 2.2 ซึ่งขั้วไฟฟ้าทั้งสามจะจุ่มอยู่ในสารละลายตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 2.1 และมีสายไฟเชื่อมต่อระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสามกับ Stand for voltammetric model 663 VA ที่ต่ออยู่กับ potentiostat/Galvanostat model 10 และควบคุมการทำงานของเครื่องมือด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลที่มีโปรแกรมควบคุม GPES (General Purpos Electrochemical System Version 4.4)



รูปที่ 2.1 ขั้วไฟฟ้าที่นำมาใช้ในการศึกษา

โดย 1. ขั้วไฟฟ้าช่วย

2. ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

3. ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแก้ด้วยอนุภาคนาโนทอง

2.4.4 การศึกษาการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแก้ด้วยอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมโมแกรม

1) การศึกษาการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ไอโอดีนาต 5×10^{-3} โมลาร์ในโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.10 โมลาร์

ปีเปตสารละลายสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ไอโอดีนาต 5×10^{-3} โมลาร์ในโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.4 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรมที่ได้เปรียบเทียบกับระหว่างขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพสและขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแก้ด้วยอนุภาคนาโนทอง

2) การศึกษาการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้าในสารละลายแคปไซซิน

ปีเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 100 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้ว ให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรมที่ได้เปรียบเทียบกับระหว่างขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพสและขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแก้ด้วยอนุภาคนาโนทอง

2.4.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

2.4.7.1 การศึกษาพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ปีเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 25 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรม แล้วเปลี่ยนสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer เป็นพีเอช 1, 4, 7, 9 และ 12

2.4.7.2 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการสะสมแคปไซซินบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า

ปีเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 25 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรม แล้วเปลี่ยนเวลาในการสะสมเป็น 0, 20, 40, 60, 80, 160, 180 และ 240 วินาที

2.4.8 การศึกษาความไววิเคราะห์ของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแปสที่ปรับปรด้วยอนุภาคนาโนทอง

ปีเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 2.5 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรม และวัดกระแสแอโนดิกที่ได้ แล้วทำการทดลองเช่นเดิมแต่ใส่สารละลายแคปไซซินให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 ไมโครโมลาร์

2.4.9 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแปสที่ปรับปรด้วยอนุภาคนาโนทอง

ปีเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 5 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์

เทียบกับข้าวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึก โวลแทมโมแกรม และวัดกระแสแอโนดิกที่ได้ แล้วทำการทดลองเช่นเดิมแต่ใส่สารละลายแคปไซซินให้มีความเข้มข้น 10, 20, 25 และ 30 ไมโครโมลาร์ สร้างกราฟหาช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรง limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) ของสารมาตรฐานระหว่างค่ากระแสที่ได้กับความเข้มข้นของแคปไซซิน

2.4.10 การศึกษาความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ข้าวไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทอง

2.4.10.1 การศึกษาความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ข้าวไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทองแบบ Repeatability

ปิเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 25 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับข้าวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึก โวลแทมโมแกรม และวัดกระแสแอโนดิกที่ได้ ทำซ้ำอีก 6 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.4.10.2 การศึกษาความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ข้าวไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทองแบบ Reproducibility

เตรียมข้าวไฟฟ้าข้าวไฟฟ้าคาร์บอนแพสที่ปรับแปรด้วยอนุภาคนาโนทอง 7 ขั้ว ปิเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายแคปไซซิน 25 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลายแล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับข้าวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึก โวลแทมโมแกรม และวัดกระแสแอโนดิกที่ได้ ทำซ้ำอีก 6 ครั้งโดยเปลี่ยนข้าวไฟฟ้าใหม่ทุกครั้ง หาค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.4.11 การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

บดพริกให้ละเอียดจากนั้นชั่งตัวอย่างมา 0.5 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25.00 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานแคปไซซินลงไป ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเอทานอล นำไปโซนิเคต 10 นาที

และคนโดยใช้ magnetic stirrer 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนสารละลายไปใช้ในการวิเคราะห์แบบ standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินในตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วลงไป ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลาย แล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรม และวัดกระแสแอโนดิกที่ได้ ใส่สารละลายแคปไซซินความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ นำข้อมูลไปสร้างกราฟเพื่อหาปริมาณแคปไซซินในตัวอย่างและหา %Recovery

2.4.12 การวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินในตัวอย่าง

บดพริกให้ละเอียดจากนั้นชั่งตัวอย่างมา 0.5 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเอทานอล นำไปโซนิเคต 10 นาที และคนโดยใช้ magnetic stirrer 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนสารละลายไปใช้ในการวิเคราะห์แบบ standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินในตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายสารละลายสารละลาย Britton Robinson buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 1 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรลงในเซลล์ ใส่สารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วลงไป ใช้เวลาสะสม 120 วินาที โดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง เมื่อครบเวลาจึงหยุดการคนสารละลาย แล้วให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 ถึง 0.9 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราเร็วในการสแกน 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที บันทึกโวลแทมโมแกรม และวัดกระแสแอโนดิกที่ได้ ใส่สารละลายแคปไซซินความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ นำข้อมูลไปสร้างกราฟเพื่อหาปริมาณแคปไซซินในตัวอย่าง