

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 สารกำจัดศัตรูพืช

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อกระบวนการการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้ได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชเป็นสาร อินทรีย์สังเคราะห์ แบ่งได้ 4 ชนิด⁶ ดังนี้

1) กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ สารเคมีในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีพิษต่อแมลงทุกชนิด และสลายตัวช้า ทำให้พบตกค้างในห่วงโซ่อาหารและสิ่งแวดล้อมได้นาน บางชนิดตกค้างนานหลายสิบปี ปัจจุบันประเทศส่วนใหญ่ทั่วโลกไม่อนุญาตให้ใช้สารเคมีในกลุ่มนี้ หรือมีการควบคุมการใช้ ไม่อนุญาตให้ใช้อย่างเสรี เพราะผลกระทบต่อด้านสุขภาพและสิ่งแวดล้อม สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่ ดีดีที (DDT), ดีลดริน (Dieldrin), ออลดริน (Aldrin), ท็อกซาฟีน (Toxaphene), คลอเดน (Chlordane), ลินเดน (Lindane), เอนดริน (Endrin) และเฮปตาคลอ (Heptachlor) เป็นต้น

2) กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) เป็นกลุ่มที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ สารเคมีในกลุ่มนี้จะมีพิษรุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่น โดยเป็นพิษทั้งกับแมลงและสัตว์อื่นๆ ทุกชนิด สารในกลุ่มนี้จะย่อยสลายได้เร็วหลังการใช้จึงใช้ได้ดีในพืชผัก ได้แก่ มาลาไธออน (Malathion), ไดอาซีนอน (Diazinon), เฟนิโตรไธออน (Fenitrothion), ไดคลอวอส (Dichlorvos หรือ DDVP) และพิริมีฟอสเมทิล (Pirimi phos methyl) เป็นต้น

3) กลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) ซึ่งมีคาร์บาริลเป็นองค์ประกอบสำคัญ เป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลื้อยคลานน้อยกว่าพวกออร์กาโนฟอสเฟต แต่เมื่อได้รับในปริมาณมากสามารถทำให้เกิดพิษได้ สารเคมีที่รู้จักและใช้กันมาก คือ คาร์บาริล (Carbaryl ที่มีชื่อการค้า Savin), คาร์โบฟูแรน (Carbofuran), โพรพ็อกเซอร์ (Propoxur), เมทโฮมิล (Methomyl), เบนไดโอคาร์บ (Bendiocarb) และเมทิโอคาร์บ (Methiocarb) เป็นต้น

4) กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอย (Synthetic pyrethroid) เป็นสารเคมีกลุ่มที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีความสัมพันธ์ตามโครงสร้างของไพรีทริน (Pyrethrin) ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่สกัดได้จากพืชไพรีทรัม (Pyrethrum) สารเคมีในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อแมลงสูง มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลื้อยคลานต่ำ และไม่ทำให้เกิดปัญหาพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อเสียคือ คือ มีพิษสูงมากต่อสัตว์น้ำ เช่น ปลา และสัตว์ที่ไม่มีการดูดซับที่อาศัยอยู่ในน้ำ และสารเคมีกลุ่มนี้มีราคาแพงจึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่ เดลตาเมธริน (Deltamethrin), ไบโอเรสมเอธริน (Bioresmethrin), เพอร์เมธริน (Permethrin) และเรสมเอธริน (Resmethrin) เป็นต้น

งานวิจัยนี้ศึกษาการพัฒนาการคาร์โบฟูแรนไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของคาร์โบฟูแรนในตัวอย่าง การตรวจวัดจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้งานนอกสถานที่ได้ ไบโอเซนเซอร์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทำการศึกษาสำหรับการตรวจวัดสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.1.2 ไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารชีวภาพที่สามารถตรวจวัดสารได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีข้อดี คือ ใช้งานง่าย ความไวในการตรวจวัดสูง ลดเวลาในการเตรียมสาร ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น สะดวกต่อการตรวจวัดสารนอกสถานที่ และมีต้นทุนการผลิตต่ำ⁵ โดยทั่วไปแล้วไบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วยอุปกรณ์สำคัญ 2 ส่วน⁷ คือ สารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณ

สารชีวภาพ (Biological substance) เป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เอนไซม์ เอนติเจน แอนติบอดี กรดนิวคลีอิก ดีเอ็นเอ เป็นต้น

ตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) เป็นอุปกรณ์สำหรับแปลงสัญญาณเฉพาะต่างๆ เช่น อิเล็กตรอน แสง สี เป็นสัญญาณไฟฟ้าเพื่อเป็นดัชนีระบุถึงปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวอย่างตัวแปลงสัญญาณ เช่น ขั้วไฟฟ้า เซมิคอนดักเตอร์ โฟโตดีเทคเตอร์ เป็นต้น

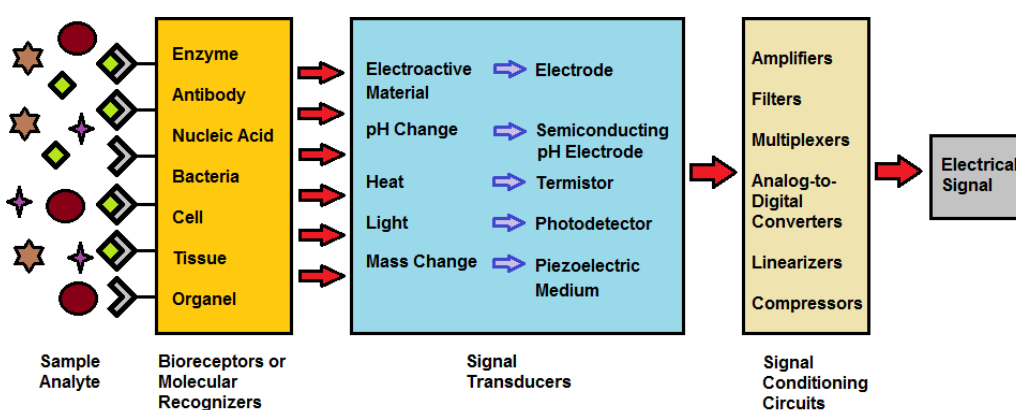
หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์

หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การตรึงสารชีวภาพเข้ากับตัวแปลงสัญญาณเพื่อสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องการ

ขั้นตอนที่ 2 นำไบโอเซนเซอร์ที่ได้มาทำการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในขั้นตอนนี้สารที่ต้องการวิเคราะห์จะจับกับไบโอเซนเซอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะเจาะจงตรงส่วนของสารชีวภาพ ที่ตรึงบนตัวไบโอเซนเซอร์ เรียกขั้นตอนนี้ว่า กลไกการจดจำทางชีวภาพ (Biological recognition mechanism) จากการเข้าจับกันทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะ (Indicated signal) ซึ่งอาจเป็นอิเล็กตรอน แสง และอื่นๆเข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ

ขั้นตอนที่ 3 ตัวแปลงสัญญาณรับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้า ผ่านเครื่องอ่านสัญญาณออกมา ทำให้เราสามารถอ่านค่าได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า เทคนิคของการรับและแปลงสัญญาณทางกายภาพ (Physical transduction technique) และเมื่ออ่านค่าได้ก็ทำให้ทราบว่าสารที่วิเคราะห์นั้นเป็นสารใด ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ไดอะแกรมของไบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วยสารชีวภาพ และตัวแปลงสัญญาณที่ทำหน้าที่รับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้า⁸

จากหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์จึงนำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยงานวิจัยนี้ใช้เอนไซม์เป็นสารชีวภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้ได้ผลิตภัณฑ์ หรือให้สัญญาณเฉพาะที่ติดตามได้ โดยจะขอกล่าวรายละเอียดของเอนไซม์ ดังนี้

2.1.3 เอนไซม์

เอนไซม์ (Enzyme)⁹ คือ กลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่เป็นตัวช่วยและเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่จำเพาะ โดยการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาชีวเคมีที่แน่นอนภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์เป็นหลายล้านเท่าด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาหรือสารตั้งต้นที่เรียกว่า ซับสเตรต (Substrate) สามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์นั้นจะไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น และสามารถเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา โดยการลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้

กลไกการทำงานของเอนไซม์

เมื่อเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น ทำให้สารตั้งต้นเกิดการสลายหรือสร้างพันธะแล้วเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้เอนไซม์กลับคืนมา ดังสมการที่ 2.1



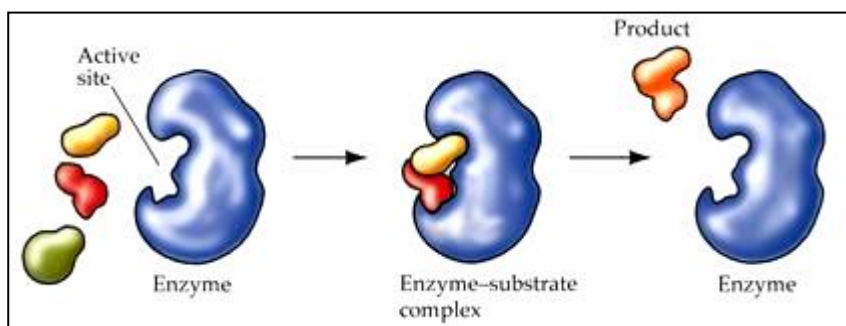
เมื่อ E คือ ตัวเร่งปฏิกิริยา (เอนไซม์)

S คือ สารตั้งต้น (ซับสเตรต)

ES คือ สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เนื่องจากเอนไซม์มีส่วนที่เป็นบริเวณเร่ง (Active site) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่จะให้ซับสเตรตเข้ามาจับกับเอนไซม์ได้ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งก่อนและหลังจากจับกับซับสเตรต และสามารถเข้ากันได้พอดีเหมือนกับลูกกุญแจและแม่กุญแจ ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์ ตามทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจ¹⁰

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์ ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ¹¹ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของซับสเตรต เมื่อเอนไซม์คงที่ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจะทำให้อัตราเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น จนถึงจุดๆ หนึ่งแล้วคงที่ และความเข้มข้นของซับสเตรตเข้มข้นเกินไป จะทำให้เอนไซม์หยุดการทำงานได้

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ ซับสเตรตประมาณหนึ่งๆ นั้น ต้องใช้เอนไซม์ประมาณพอเหมาะ ถ้าเอนไซม์มากหรือน้อยไปก็จะทำงานได้ผลไม่เต็มที่

3. ความเป็นกรด-เบส ของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในหลายด้าน ตามปกติเอนไซม์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อ pH สูงหรือต่ำกว่า pH ที่เหมาะสม โดย pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 6-8 การที่ pH สูงมากหรือต่ำมาก จะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ

4. อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่งเอนไซม์ทั้งทางบวกและทางลบ ถึงแม้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลเร่งปฏิกิริยา แต่ในขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิก็จะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเปลี่ยนสภาพเดิมของมันได้ง่าย อุณหภูมิที่พอเหมาะเท่านั้นจึงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี

5. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถวัดได้จากอัตราการหายไปของสารเริ่มต้นหรือวัดจากการปรากฏขึ้นของผลิตภัณฑ์ หรือทำทั้ง 2 วิธีพร้อมกัน แต่ไม่ว่าจะวัดโดยวิธีใด จะพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ช้าลงนี้ เพราะเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังเกิดเพราะมีการลดลงของสารเริ่มต้น และผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นหนึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ โมเลกุลของผลิตภัณฑ์จะรวมกับเอนไซม์แทนสารเริ่มต้นทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

6. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Inhibitors) มีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สารเหล่านี้อาจเป็นสารอนินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรืออาจเป็นสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) หรือโปรตีน เป็นต้น

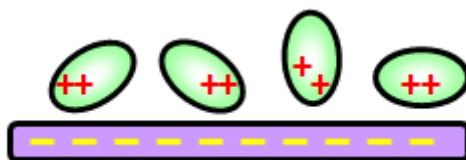
นอกจากนี้การสร้างไบโอเซนเซอร์ การยัดติดเอนไซม์บนผิวหน้าของตัวแปลงสัญญาณมีความสำคัญมาก ดังนั้นจำเป็นต้องเข้าใจระบบการตรึงเอนไซม์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

วิธีการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ หมายถึง การจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ด้วยวิธีทางกายภาพหรือจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ให้อยู่ในช่องว่างที่กำหนด โดยตรึงเอนไซม์กับตัวยึดเกาะที่ไม่ละลายที่หลากหลายโดยเอนไซม์นั้นยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการตรึงเอนไซม์มีวิธีพื้นฐานอยู่ 5 วิธี¹²

1. การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption method)

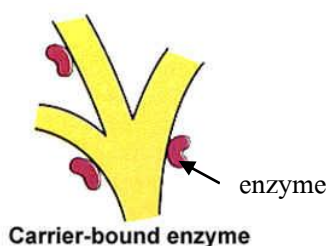
อาศัยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน คือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander waals forces) ระหว่างเอนไซม์กับตัวดูดซับใช้ตรึงเอนไซม์ ซึ่งเป็นข้อดีเพราะสามารถฟื้นฟูสภาพของตัวดูดซับได้ง่าย ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ¹²

2. การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง (Connection method)

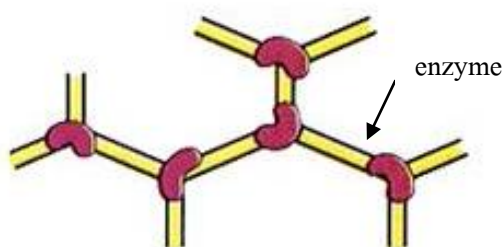
วัตถุหรือสารที่เป็นตัวกลางหรือตัวพุง (Carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำโดยการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุงด้วยการตรึงแบบกายภาพหรือด้วยพันธะเคมีที่เรียกว่าพันธะไอออนิกหรือเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งจะไม่ทำให้โครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์เสียไปแต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดติดกับสารตัวกลาง¹²

3. การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (Cross linking method)

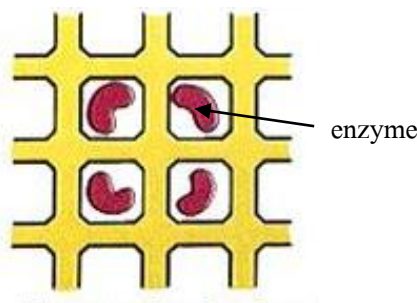
การตรึงเอนไซม์วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุงแต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้มีความสามารถละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวางจะเกิด ปฏิกริยารุนแรง มีผลทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้¹²

4. การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด (Entrapment method)

โมเลกุลของเอนไซม์อยู่อย่างอิสระในสารละลายแต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่โดยโครงสร้างที่เป็นจุดแลตติซ (Lattice) ของเจล (Gel) โดยต้องควบคุมความพรุนของเจลแลตติซ (Gel lattice) ให้มีความเหมาะสมในการป้องกันการรั่วของเอนไซม์ออกมา และภายในเจลนั้นต้องมีที่ว่างพอให้มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระของซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.6



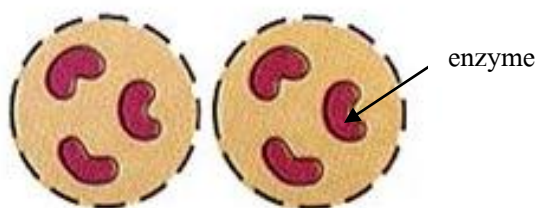
รูปที่ 2.6 การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด¹²

5. การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (Entrapping method)

การตรึงเอนไซม์โดยที่เอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้มและเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพอง หรือ จับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

5.1 เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ ภายในช่องตาข่ายของสารโพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ก็ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้ จะต้องเลือกชนิดของสารโพลิเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลิเมอร์จะมีปฏิกิริยารุนแรง จนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายได้

5.2 เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารโพลิเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ ลักษณะการห่อหุ้ม ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ในแคปซูล¹²

นอกจากการตรึงเอนไซม์มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาและความคงอยู่แล้ว ยังพบว่าการเสื่อมสภาพและการถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การเสื่อมสภาพของเอนไซม์

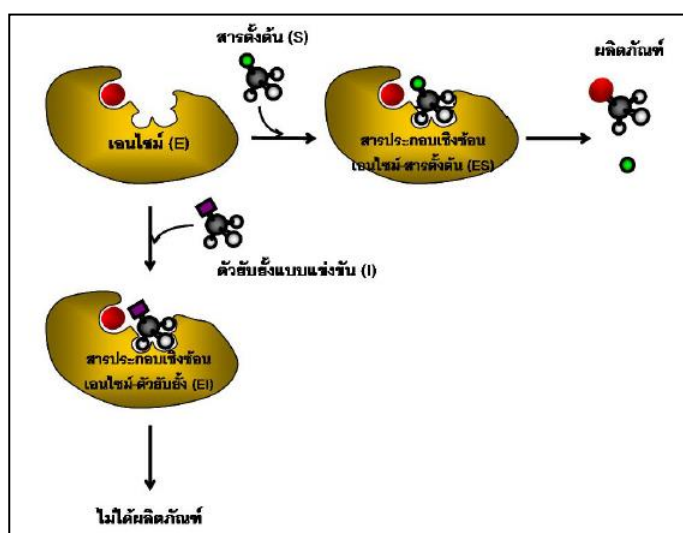
เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป จนสารเริ่มต้นไม่สามารถรวมกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง (Active site) จะทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างทำให้เกิดการหมดสภาพของเอนไซม์ มีหลายกรณีที่เมื่อเอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพไปแล้ว ไม่สามารถกลับคืนมาสู่สภาพที่ทำงานได้อีก เช่น กรณีที่ได้รับอุณหภูมิสูงทั้งนี้เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการสร้างพันธะชนิดโควาเลนต์ระหว่างลูกโซ่ โพลีเปปไทด์ (Polypeptide chain) หรือในลูกโซ่โพลีเปปไทด์เดียวกัน และพันธะเหล่านี้จะมีความคงตัวมากจนทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพได้¹³

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาตัวยับยั้งของเอนไซม์¹⁴ ทำให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีต่าง ๆ ต่อเซลล์และร่างกาย และยังเป็นเครื่องมือที่ดีในการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ในรายละเอียดการยับยั้งแบ่งออกได้ตามบริเวณที่เข้าจับของสารตั้งต้นบนเอนไซม์ ได้เป็น 2 แบบ คือ จับบริเวณเดียวกับสารตั้งต้น เรียกว่า การยับยั้งแบบแข่งขัน และจับกันคนละบริเวณกับสารตั้งต้น เรียกว่า การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ซึ่งการยับยั้งแบบไม่แข่งขันสามารถเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์ หรือกระทบต่อจลนศาสตร์ของเอนไซม์

1. การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition)

การยับยั้งแบบนี้ ตัวยับยั้ง (Inhibitor) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของสารตั้งต้น จึงสามารถเข้าจับกับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบแข่งขันนี้สามารถผันกลับได้ (Reversible) เพราะตัวยับยั้งและสารตั้งต้น พยายามแข่งขันแย่งกันเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่า ก็จะเข้าจับได้ดีกว่า การยับยั้งแบบนี้ เป็นการยับยั้งแบบย้อนกลับได้ โดยการกำจัดตัวยับยั้งออกไปจากสารละลาย หรือโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น สารตั้งต้นที่มีจำนวนความเข้มข้นสูงกว่าจะเข้าแย่งจับที่บริเวณเร่ง ทำให้ตัวยับยั้งหลุดออกไปจากบริเวณเร่ง ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) ตัวยับยั้งเข้าแย่งจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์¹⁴

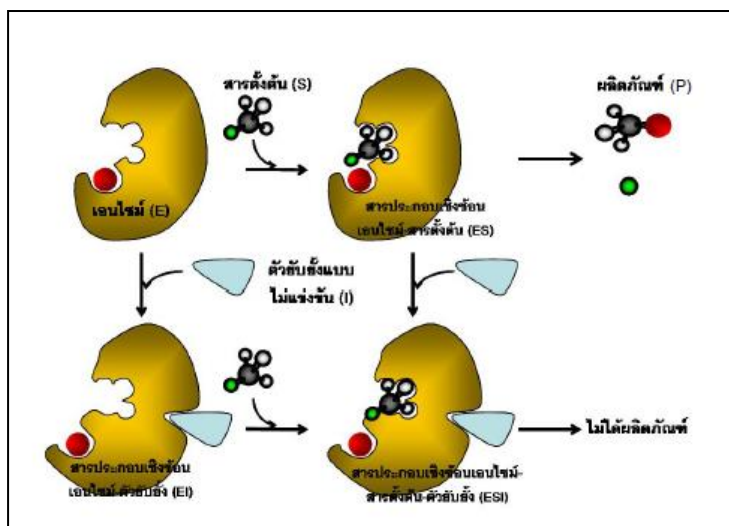
2. การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Noncompetitive และ uncompetitive inhibition)

การยับยั้งแบบไม่แข่งขันนี้ ตัวยับยั้งจะไม่เข้าแข่งขันจับกับบริเวณเร่งโดยตรง แต่จะยับยั้งโดยการเข้ารบกวนการเกิดสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น การยับยั้งแบบไม่แข่งขันนี้ผันกลับได้ โดยการกำจัดตัวยับยั้งออกไปจากสารละลาย แต่จะไม่ย้อนกลับหากเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น เพราะว่าตัวยับยั้งและสารตั้งต้น มีได้จับในบริเวณเดียวกัน การยับยั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

2.1 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition type 1)

เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับที่ที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง โดยเข้าจับได้ทั้งกับสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น และเอนไซม์อิสระ หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งว่า ตัวยับยั้งแบบนี้ เข้าจับกับเอนไซม์

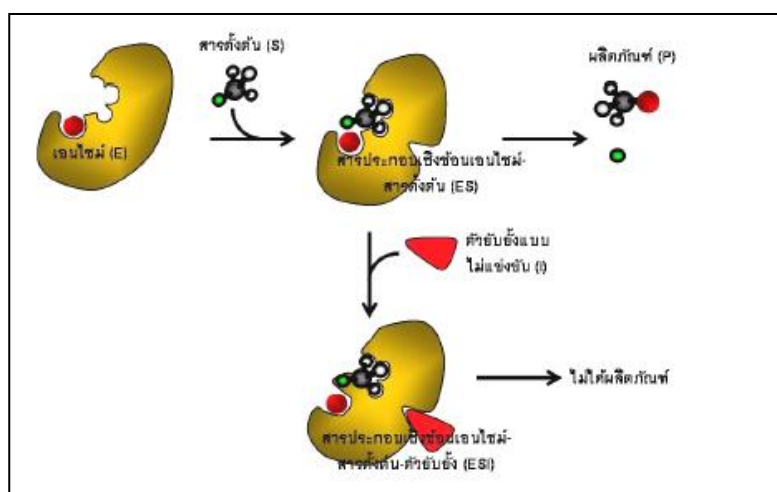
ได้ โดยไม่สนใจว่ามีสารตั้งต้นจับอยู่กับเอนไซม์หรือไม่ พบว่า ตัวยับยั้งแบบนี้ไม่รบกวนการจับของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้หมู่เร่งปฏิกิริยาไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยลง หรือเปลี่ยนไม่ได้เลย ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition)¹⁴

2.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition type 2)

เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับเฉพาะกับสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น แต่ไม่จับกับเอนไซม์อิสระ ผลของการจับของตัวยับยั้งทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปไป ดังรูปที่ 2.10 ทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ลดลงหรือหมดไป อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปวิเคราะห์ตามสมการของไมเคิลิส-เมนเทน¹⁵ และเขียนกราฟตามสมการลายวีฟเวอร์เบอร์ก¹⁵ พบว่า ทั้งค่าคงที่ของไมเคิลิส (K_m) และค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) กลับลดลง



รูปที่ 2.10 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition)¹⁴

3. ตัวยับยั้งเอนไซม์แบบไม่ผันกลับ (Irreversible inhibitor)

การยับยั้งแบบแข่งขัน หรือไม่แข่งขัน สามารถผันกลับได้ เมื่อกำจัดเอาตัวยับยั้งออกไป อย่างไรก็ตาม มีตัวยับยั้งบางตัวเข้าจับกับเอนไซม์ด้วยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างตัวยับยั้งกับหมู่ข้าง (Side chain) ของกรดอะมิโนของเอนไซม์หรือโคเอนไซม์ ทำให้ย้อนกลับไม่ได้ (Irreversible)

ประเภทของเอนไซม์

เอนไซม์สามารถจำแนกได้หลายวิธีแต่วิธีที่เป็นที่ยอมรับและใช้อย่างกว้างขวาง คือการจำแนกชนิดตามข้อตกลงของเอนไซม์ (Commission on enzymes, E.C.) ซึ่งจำแนกของเอนไซม์ไว้ 6 ประเภท¹⁶ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ประเภทของเอนไซม์

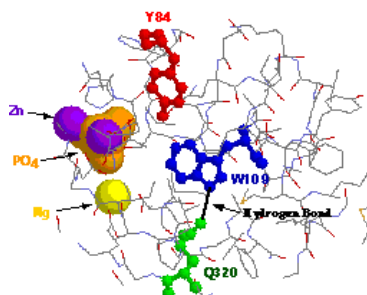
ประเภทของเอนไซม์	ลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาเคมี
1. ออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductase)	เร่งปฏิกิริยาที่มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนระหว่างซับสเตรต
2. ทรานส์เฟอเรส (Transferase)	เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมหรือ กลุ่มอะตอมจากตัวให้ (Donor) ไปยังตัวรับ (Acceptor)
3. ไฮโดรเลส (Hydrolase)	เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเคมีในสารประกอบด้วยน้ำ
4. ไลเอส (Lyases)	เร่งปฏิกิริยาการแยกโปรตอน (H^+) ของสารตั้งต้น ทำให้เกิดพันธะคู่ในผลิตภัณฑ์
5. ไอโซเมอเรส (Isomerases)	เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างจากไอโซเมอร์หนึ่งไปเป็นอีกไอโซเมอร์หนึ่ง
6. ไลเกส (Lygases)	เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์หรือการสร้างพันธะชนิดต่างๆ ระหว่างโมเลกุล 2 โมเลกุล ด้วยการสลายพันธะไพโรฟอสเฟตในเอทีพี (ATP)

เอนไซม์มีหลายประเภท ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาไปโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดคาร์โบฟูแรนโดยอาศัยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (เอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไดไฮเดรียมฟีนิลฟอสเฟต จึงขอกล่าวถึงคุณลักษณะของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในหัวข้อต่อไป

2.1.4 เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

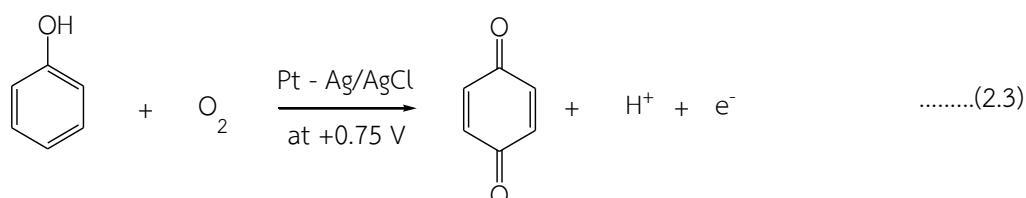
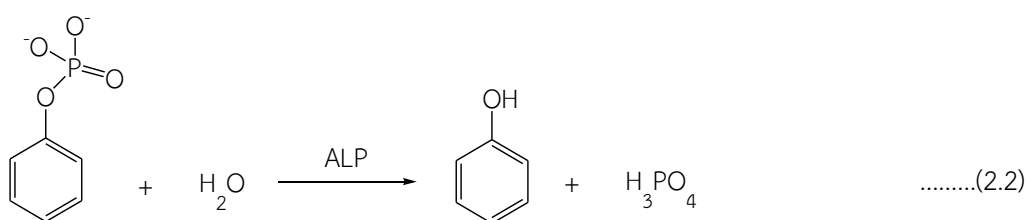
เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส¹⁷ (Alkaline phosphatase, ALP) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ตามเนื้อเยื่อตามร่างกายมนุษย์ โดยส่วนใหญ่จะพบตรงบริเวณกระดูก ตับ ไต และลำไส้เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโมเลกุล 2 ชนิด คือ Zn และ Mg ซึ่งไอออนนี้จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกันระหว่าง glutamine 320 และ tryptophan 109 ดังรูปที่ 2.11 และเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเฟตจากโมเลกุลของสารหลายชนิด เช่น โปรตีน อัลคาลอยด์ และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น โดยเรียกกระบวนการดึงหมู่ฟอสเฟตนี้ว่า ดีฟอสโฟรีเลชัน (Dephosphorylation) สภาพความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่เหมาะสมที่สุดของการทำงานของเอนไซม์นี้ คือ 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคต่างๆ ซึ่งจะสัมพันธ์กับอวัยวะดังกล่าว โดยระดับปกติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะ

อยู่ที่อัตรา 25-100 IU/L หากความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่า 300 IU/L จะบ่งชี้การเกิดโรคที่ร้ายแรงได้ เช่น โรคตับ มะเร็งตับ ตับอักเสบ โรคกระดูก และมะเร็งไต เป็นต้น

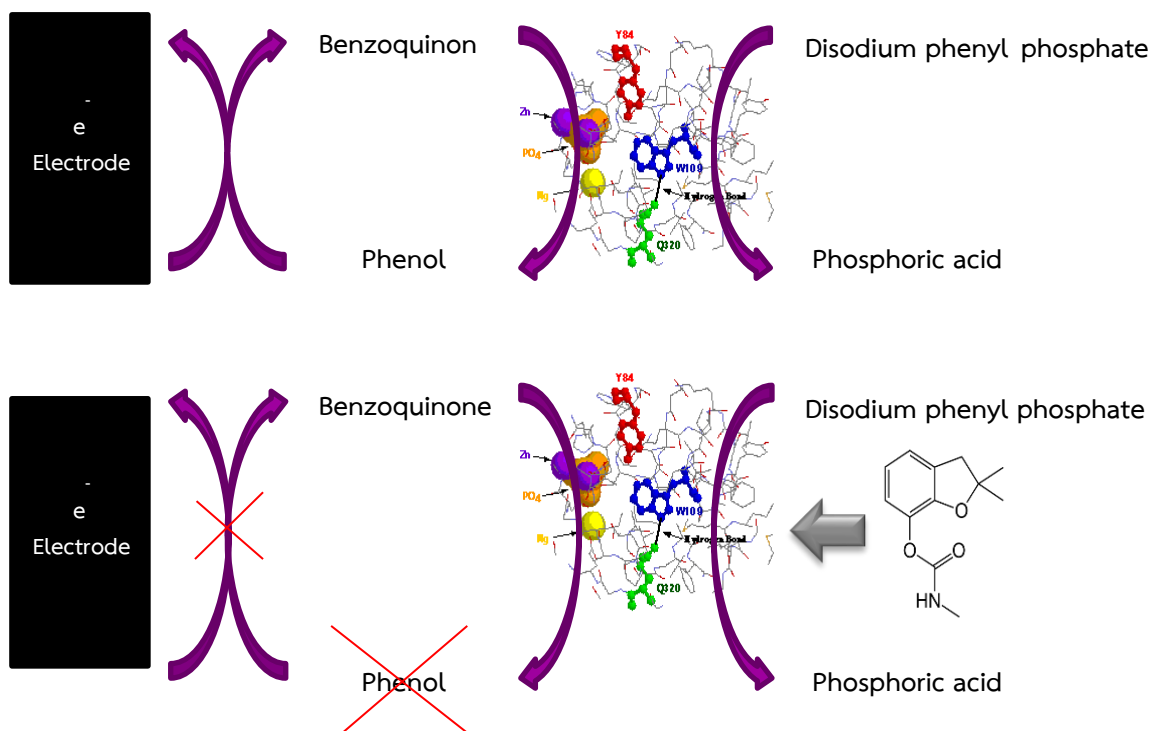


รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส¹⁸

งานวิจัยนี้อาศัยการเร่งปฏิกิริยาดีฟอสโฟริเลชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เกิดผลิตภัณฑ์เป็นฟีนอลและกรดฟอสฟอริก ดังสมการที่ 2.2 ซึ่งฟีนอลที่เกิดขึ้นเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า เมื่อได้รับศักย์กระตุ้น ที่ +0.75 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้ผลิตภัณฑ์เป็นเบนโซควิโนน (Benzoquinone) โปรตอนและอิเล็กตรอน ดังสมการที่ 2.3³⁰



การเร่งปฏิกิริยาดีฟอสโฟริเลชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ฟีนอลซึ่งเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า เมื่อให้ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมฟีนอลสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอิเล็กตรอนซึ่งเป็นสัญญาณทางไฟฟ้ามีผลให้สามารถตรวจวัดปริมาณฟีนอลได้ โดยกระแสที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอล และปริมาณสารตั้งต้นตามหลักของปริมาณสารสัมพันธ์ ซึ่งอธิบายได้ด้วยแผนภาพ ดังรูปที่ 2.12



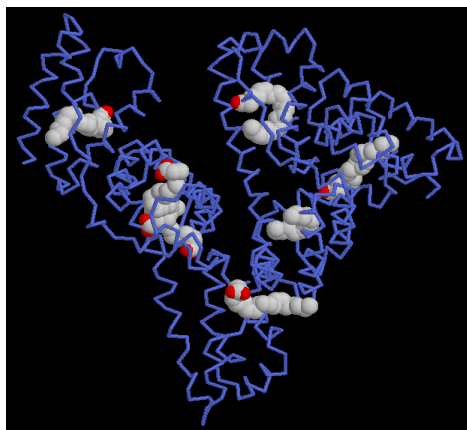
รูปที่ 2.12 หลักการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า (บน) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยคาร์โบฟูแรนทำให้ฟีนอลมีปริมาณลดลง (ล่าง)

จากหลักการการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จึงนำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน ซึ่งอาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสถูกยับยั้งการทำงานด้วยคาร์โบฟูแรน ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาดีฟอสโฟริเลชันของไดไฮดรอกซีฟีนิลฟอสเฟตลดลงปริมาณฟีนอลจึงลดลงทำให้สัญญาณกระแสลดลงตามลำดับ ดังนั้นอาศัยหลักการนี้วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบฟูแรนได้ การยับยั้งปฏิกิริยาดีฟอสโฟริเลชันของไดไฮดรอกซีฟีนิลฟอสเฟตด้วยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เกิดขึ้นจากอันตรกิริยาระหว่างคาร์โบฟูแรนกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ในโครงสร้างของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จึงส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพไป หรือ เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงาน

ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดคาร์โบฟูแรน ทำการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์ด้วยวิธีการตรึงทางเคมีแบบเชื่อมโยงโดยใช้โบวีนเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอล และสารละลายกลูตาไรลไฮด ในการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์เข้าด้วยกันเพื่อช่วยเก็บเอนไซม์ไว้ที่ผิวหน้าอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะขอกกล่าวถึงคุณสมบัติของสารดังกล่าวในหัวข้อต่อไป

2.1.5 โบวีนเซรัมอัลบูมิน

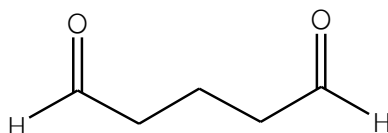
โบวีนเซรัมอัลบูมิน¹⁷ (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนที่นิยมใช้ในทางชีวเคมีเนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ช่วยป้องกันการยึดเกาะของเอนไซม์กับบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ ช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ และป้องกันการเกาะตัวกันของเอนไซม์ ซึ่งโบวีนเซรัมอัลบูมินนี้ จะช่วยให้เอนไซม์มีการกระจายตัวที่ดีขึ้น โครงสร้างของโบวีนเซรัมอัลบูมินจะเป็นสายโปรตีนที่มี arachidonic acid แทรกอยู่ 7 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของโพลินิเชรัลมิน¹⁹

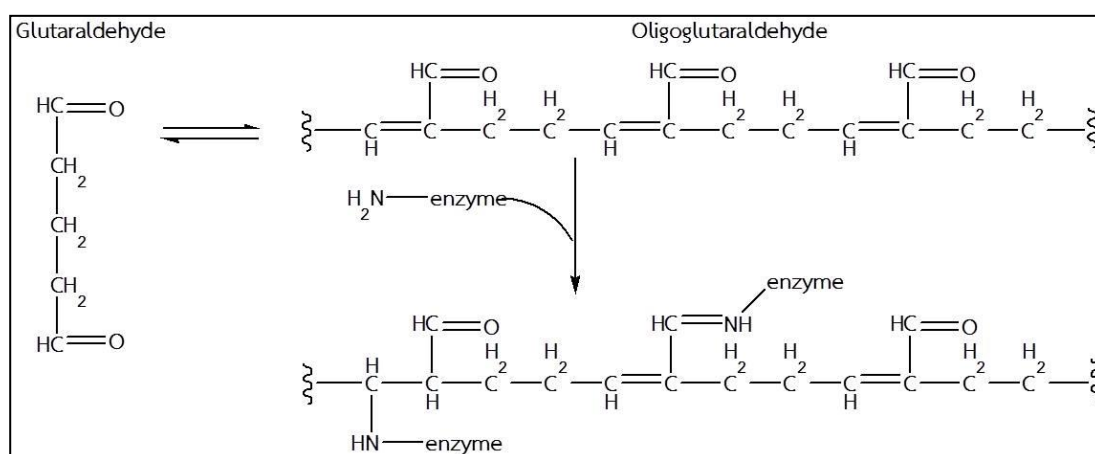
2.1.6 กลูตารัลดีไฮด์

กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) มีสูตรเคมี คือ $C_5H_8O_2$ เป็นอนุพันธ์หนึ่งของฟอร์มัลดีไฮด์ โครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 2.14 เป็นสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี มีกลิ่นฉุนรุนแรง นิยมใช้ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทางการแพทย์และทันตกรรม ใช้บำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรม และใช้เป็นสารกันบูด



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์

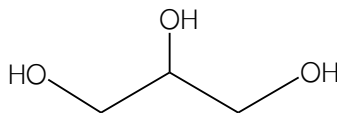
นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเกิดเป็นโครงร่างตาข่ายได้ โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ของหมู่อะมิโนในเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ เกิดโครงร่างตาข่ายขนาดใหญ่ขึ้นมา ดังรูปที่ 2.15 ดังนั้นจึงนำกลูตารัลดีไฮด์มาใช้เพื่อเป็นสารเชื่อมไขว้ในการตรึงเอนไซม์เพิ่มการยึดติดของเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าส่งผลให้ไบโอเซนเซอร์มีอายุการใช้งานที่ยาวนานยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.15 การเชื่อมขวางของกลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์²⁰

2.1.7 กลีเซอรอล

กลีเซอรอล²¹ (Glycerol) มีสูตรเคมี คือ $C_3H_8O_3$ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลิออล (Polyol) เป็นสารที่เป็นของเหลว หนืดใส ไม่มีสี ในโมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ ดังรูปที่ 2.16 จึงทำให้ละลายในน้ำได้ดี มีสมบัติในการรวมตัวกับน้ำได้ดี (Hydroscopic) นิยมนำมาใช้เป็นตัวเชื่อมประสาน ช่วยให้เอนไซม์ผสมเข้ากับสารอื่นได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของกลีเซอรอล

2.1.8 คาร์บอนเพส

คาร์บอนเพส¹² (Carbon paste) นิยมใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เนื่องจากมีช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กว้าง กระแสพื้นหลังต่ำ (Background current) ราคาถูก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารหลายชนิด ง่ายต่อการผสมกับสารหลายชนิดที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า องค์ประกอบที่สำคัญของคาร์บอนเพส มีดังนี้

1. ผงคาร์บอน (Carbon powder) ดังรูปที่ 2.17 เป็นองค์ประกอบหลักของคาร์บอนเพสที่ใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

- 1.1 มีความบริสุทธิ์สูง
- 1.2 อนุภาคมีการกระจายตัวที่ดี
- 1.3 มีแรงดูดซับน้อย

2. ตัวเชื่อมประสาน (Binder) ได้แก่ สารจำพวกน้ำมัน (Oil) ทำหน้าที่เป็นตัวประสานให้ผงคาร์บอนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และทำหน้าที่ร่วมกับผงคาร์บอนเพื่อให้เกิดเป็นคาร์บอนเพส ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

- 2.1 มีความเหนียวและไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น
- 2.2 มีความหนืดสูง
- 2.3 ละลายในน้ำได้น้อย
- 2.4 ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

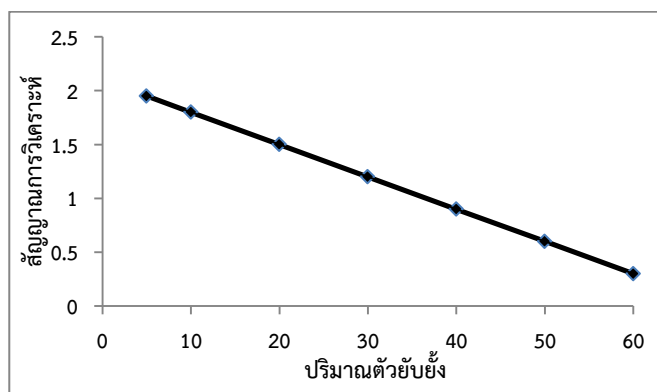


รูปที่ 2.17 ผงคาร์บอน²²

การวิเคราะห์คาร์โบฟูแรนจะอาศัยหลักการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทางอ้อม ดังรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม ในหัวข้อถัดไป

2.1.9 วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม

วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม (Indirect method) เป็นวิธีการวิเคราะห์โดยการติดตามสัญญาณที่ลดลงสัมพันธ์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analyte) เมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณน้อยค่าสัญญาณกระแสที่ได้จะมีค่ามาก ในทางตรงข้ามเมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณมากค่าสัญญาณกระแสที่ได้จะมีค่าน้อย แสดงความสัมพันธ์ของสัญญาณกระแสกับปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 กราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณการวิเคราะห์กับปริมาณตัวยับยั้ง¹⁷

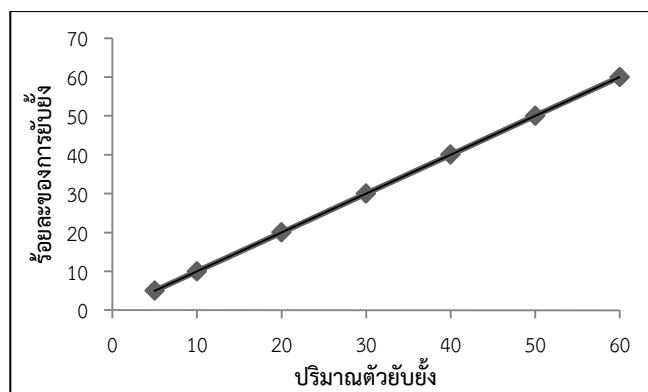
นำผลของสัญญาณที่ได้มาทำเป็นกราฟมาตรฐานเทียบ ในกรณีการวิเคราะห์ด้วยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารที่ต้องการวิเคราะห์ (ตัวยับยั้ง) ใช้ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง ดังสมการที่ 2.4

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{I_0 - I}{I_0} \right] \times 100 \quad \text{.....(2.4)}$$

เมื่อ I_0 คือ กระแสที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของซับสเตรตด้วยเอนไซม์ (μA)
 I คือ กระแสที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง (μA)

% Inhibition คือ ร้อยละของการยับยั้ง

สามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง ดังรูปที่ 2.19



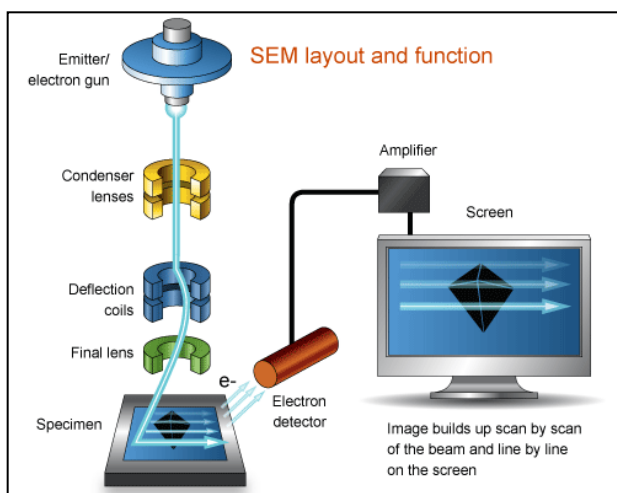
รูปที่ 2.19 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง

งานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงข้อไฟฟ้าคาร์บอนเพสเพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน และประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ คือ เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี และเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี แต่ละเทคนิคมีหลักการ ดังนี้

2.1.10 เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เทคนิคนี้²³ อาศัยการโฟกัสลำอิเล็กตรอนกราดลงบนผิวชิ้นงานสัญญาณที่เกิดขึ้นจากอันตรกิริยาระหว่างอิเล็กตรอนที่ตกกระทบกับผิวชิ้นงานจะถูกถ่ายทอดผ่าน ระบบตรวจวัดและอิเล็กตรอนิกส์ปรากฏบนจอภาพคล้ายกับภาพที่เห็นทางจอโทรทัศน์ สัญญาณที่ใช้ในการสร้างภาพมีหลายชนิด เช่น อิเล็กตรอนทุติยภูมิ, อิเล็กตรอนกระเจิงกลับ หรือรังสีเอกซ์ เป็นต้น แสดงองค์ประกอบของเครื่องมือ ดังรูปที่ 2.20 เทคนิคนี้สามารถใช้ศึกษา สัณฐานวิทยาของชิ้นงาน สภาพผิวของชิ้นงาน จุดบกพร่องบริเวณใกล้ผิวชิ้นงาน โดยมีหลักการทำงาน ดังนี้

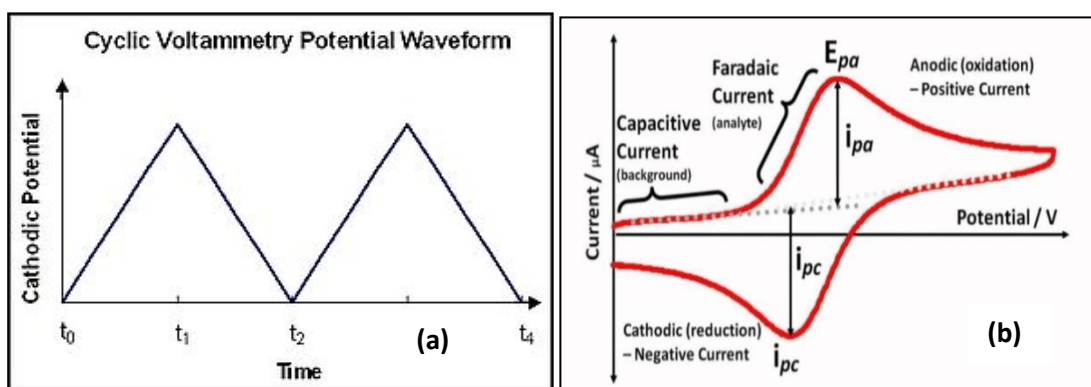
1. Electron gun ทำหน้าที่ผลิตกลุ่มอิเล็กตรอน
2. กลุ่มอิเล็กตรอนผ่าน condenser lenses กลายเป็นลำอิเล็กตรอน
3. ลำอิเล็กตรอนจะผ่าน objective lenses
4. ลำอิเล็กตรอนตกกราดลงบนผิวของชิ้นงาน เกิด secondary electron
5. สัญญาณจาก secondary electron ถูกแปลงไปเป็นสัญญาณปรากฏภาพบนจอร์ับภาพ (CRT)



รูปที่ 2.20 องค์ประกอบของเครื่องจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด²⁴

2.1.11 เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

ไซคลิกโวลแทมเมทรี¹² (Cyclic voltammetry) หรือโวลแทมเมทรีแบบรอบเป็นวิธีการสแกนศักย์ไฟฟ้าเชิงเส้นตรงแบบคลื่นรูปสามเหลี่ยม ดังรูปที่ 2.21 (a) ระบบประกอบไปด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) และขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode) ขั้วไฟฟ้าทั้งสามขั้วจุ่มอยู่ในสารละลายที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสารอิเล็กโทรไลต์ที่ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ใช้ในปริมาณที่มากเกินไป การสแกนศักย์ของเทคนิคนี้ คือให้ศักย์กับระบบที่ใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานแบบหนึ่งขนาดเล็กรวมในสารละลายที่ไม่มีการคนหรือการกวน ซึ่งสัญญาณกระตุ้นแบบสามเหลี่ยมนี้เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าสองค่า ค่าแรกเป็นการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าแบบเส้นตรงไปจนถึงจุดสูงสุด แล้วลดลงแบบเส้นตรงโดยมีความชันเท่ากับความชันในช่วงแรก

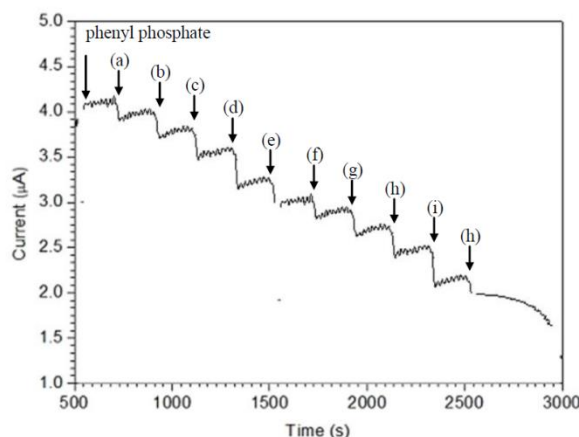


รูปที่ 2.21 รูปคลื่นของการสแกนศักย์ในเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี²⁵ (a) และสัญญาณกระแสสัมพันธ์กับศักย์ที่ขั้วไฟฟ้าของไซคลิกโวลแทมโมแกรม (b)

โวลแทมเมทรีแบบรอบเป็นการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นกับศักย์ไฟฟ้า การตอบสนองที่อยู่ในรูปของการสแกนไปข้างหน้าและย้อนกลับ และการสแกนศักย์จากลบไปบวก ดังรูปที่ 2.21 (b) เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร ซึ่งสามารถศึกษาได้จากเอกลักษณ์ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันที่ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นศักย์เฉพาะของสารนั้นๆ

2.1.12 เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี

เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี (Chronoamperometry) เป็นเทคนิคที่ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าช่วย เป็นเทคนิคที่ศึกษาปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิสของสารที่สนใจภายใต้สภาวะที่มีการคนสารละลาย ทำให้มีการขนส่งสารละลายใหม่ๆ ไปยังผิวหน้าขั้วไฟฟ้าโดยวิธีกายภาพ เพื่อให้เกิดกระบวนการรีดอกซ์อย่างต่อเนื่อง โดยขั้นตอนการแพร่จะถูกจำกัดโดยชั้นแคบๆ หลักการทำงาน คือ ให้ศักย์ที่คงที่ระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า และวัดสัญญาณกระแสที่ค่าความเข้มข้นต่างๆของสารตัวอย่าง ทำให้เทคนิคนี้มีข้อดี คือ มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง เนื่องจากการขนส่งมวลสารภายใต้สภาวะไฮโดรไดนามิกดีมากขึ้น ทำให้สถานะคงตัวค่อนข้างเร็วและวัดสัญญาณกระแสได้แม่นยำสูง กระแสไฟฟ้าที่ได้จะขึ้นกับปริมาณสารที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าตามเวลา โดยกระแสจะเกิดที่บริเวณชั้นกระแสการแพร่ (Diffusion current) ดังรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับเวลา ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี²⁶

งานวิจัยนี้พัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในข้าวหอมมะลิ รายละเอียดคร่าวๆของข้าวหอมมะลิ ดังหัวข้อต่อไป

2.1.13 ข้าวหอมมะลิ

ข้าวหอมมะลิ¹ (Thai Jasmine Rice) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ ว่า *Oryz Sativa* L. เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยจัดเป็นข้าวนาปี ปลูกได้ เพียงปีละ 1 ครั้ง ลักษณะข้าวเปลือกเรียวยาวเมื่อสีเป็น ข้าวสาร จะได้ ข้าวเมล็ดเรียวยาว ข้าวใสเป็นเงา แกร่ง มีท้อง ไข่น้อย มีกลิ่นหอมคล้าย ใบเตย เป็นพันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย ทั้งในประเทศและต่างประเทศและเป็นพันธุ์ข้าวที่สร้าง ชื่อเสียงให้ชาวไทยเป็นที่รู้จักทั่วโลก

แหล่งปลูกข้าวหอมมะลิที่สำคัญของไทย

ประเทศไทยถือเป็นแหล่งผลิตข้าวหอมมะลิที่มีคุณภาพดีที่สุดแห่งหนึ่ง โดยมีแหล่งเพาะปลูกสำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เขตทุ่งกุลาร้องไห้) และมีพื้นที่เพาะปลูกครอบคลุมกว่า 19 ล้านไร่ทั่วประเทศ โดยมีแหล่งผลิตสำคัญ คือ จังหวัดสุรินทร์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ นครราชสีมา อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด รongลงมา คือภาคเหนือ เนื่องจากสภาพดินฟ้าอากาศและพื้นที่เพาะปลูกของทั้งสองภาคคล้ายคลึงกัน เหมาะแก่การเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ กล่าวคือ สภาพพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ดอน ฝนจะเริ่มตกตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ชาวนาจะเริ่มหว่านไถ ในเดือนมิถุนายน และเพาะปลูกอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม เมื่อฝนเริ่มหมด ปลายเดือนตุลาคมจนถึงต้นเดือนพฤศจิกายนจึงเริ่มเก็บเกี่ยวช่วงเดือนพฤศจิกายนความชื้นจะน้อย เพราะเป็นช่วงที่ลมหนาวจากเมืองจีน เริ่มพัดเข้ามาในสองภาคนี้ ทำให้อากาศแห้งเหมาะในการเก็บเกี่ยว การตาก การนวด ก็ทำได้ง่าย เพราะน้ำค้างหมาดแล้ว ไม่มีฝน จึงทำให้ได้เมล็ดข้าวที่มีคุณภาพ

คุณสมบัติของข้าวหอมมะลิ

ข้าวหอมมะลิที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายคือพันธุ์ ข้าวดอกมะลิ 105 และ พันธุ์ กข. 15 ความหอมของข้าวหอมมะลิ เกิดจากสารระเหยชื่อ 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นสารที่ระเหยหายไปได้ การรักษาความหอมของข้าวหอมที่ดีต้องเริ่มตั้งแต่ การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาข้าวเปลือกการสีข้าว และการเก็บรักษาข้าวที่สีเรียบร้อยแล้วการจะรักษาความหอมของข้าวเอาไว้ ต้องพยายามหลีกเลี่ยงสภาวะ แดดร้อนที่ร้อน อบอ้าว และมีความชื้นสูง การตากแดดหรือใกล้สถานที่ร้อนจัดเป็นเวลานานๆ เป็น สิ่ง

ควรหลีกเลี่ยงอย่างยิ่งสภาวะที่เหมาะสมคือที่มีอากาศค่อนข้างเย็น มีการถ่ายเทของอากาศดี ความชื้นไม่สูง

ข้าวหอมใหม่ หมายถึงข้าวหอมที่เพิ่งเก็บเกี่ยวมาได้สักระยะหนึ่ง และมีการดูแลรักษาอย่างดี ก่อนที่จะนำมาบริโภค ข้าวหอมใหม่จะให้ความหอมขณะหุงต้ม ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากข้าวชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ข้าวหอมที่หุงแล้ว ยังมีลักษณะ นุ่มเหนียว มียาง เกาะตัวกันพอสมควรมีรสชาติอร่อย

ข้าวหอมที่เก็บไว้นานขึ้น (ข้าวเก่า) คือ ข้าวที่เก็บเกี่ยวมาแล้วเก็บไว้เป็นเวลานาน 5-6 เดือนขึ้นไป ความหอมจะเจือจางลง รวมทั้ง ความนุ่มเหนียวลดลงด้วย เมื่อนำข้าวหอมนี้มาหุงจะต้องใช้ปริมาณน้ำมากขึ้นกว่าข้าวใหม่ ถึงแม้ความหอมจะลดน้อยลงไปแต่ยังคงมี รสชาติอร่อยเหมือนเดิม ส่วนความนุ่มนวลนั้น แม้จะลดลงบ้างเมื่อเทียบกับข้าว-หอมใหม่ แต่ก็ไม่ร่วนแข็งกระด้างเหมือนข้าวชนิดอื่น ๆ

ดังนั้น ผู้วิจัยได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ปนเปื้อนในข้าวหอมมะลิ ที่สุ่มเก็บมาจากตลาดในท้องถิ่น ได้แก่ ตลาดวารินเจริญศรี ตลาดแม่กิมเต็งและตลาดวาริน อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ผู้วิจัยได้สร้างงานวิจัยนี้โดยทำการศึกษาค้นคว้างานวิจัยจากนักวิจัยหลายกลุ่มซึ่งได้รายงานไว้ในหัวข้อถัดไป

2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษา พัฒนา และปรับปรุงจากงานวิจัยหลายกลุ่ม ดังนี้

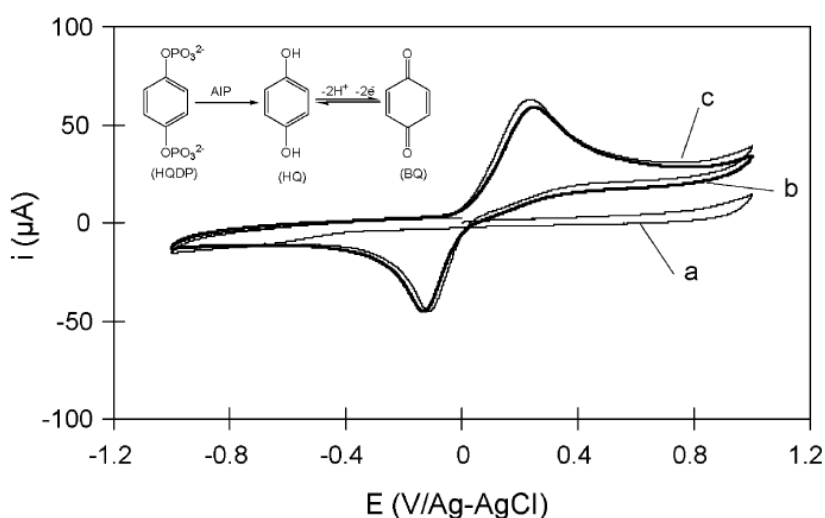
2.2.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไบโอเซนเซอร์

ในปี ค.ศ. 2004 F. Mazzei และคณะ²⁵ ศึกษากระบวนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase, ALP) ด้วยสารกำจัดศัตรูพืชมาลาไธออน (Malathion) และ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติกแอซิด (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) ซึ่งเป็นสารจำพวกออกาโนฟอสฟอรัสและออกาโนคลอรีน การเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาในสองส่วน คือ แอมเพอโรเมตริกอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไบโอเซนเซอร์ โดยใช้ 3-อินดอกซิลฟอสเฟต (3-Indoxyl phosphate) เป็นสารตั้งต้น และอีกส่วนคือระบบโวลแทมเมตริก โดยใช้ฟีนิลฟอสเฟต (Phenyl phosphate, PP) และ แอสคอร์เบต-2-ฟอสเฟต (Ascorbate-2-phosphate, A-2-P) เป็นสารตั้งต้น ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ สารละลายไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 8.0 ระยะเวลาในการบ่มสาร 30 ถึง 60 นาที และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์มาลาไธออน และ 2,4-D เท่ากับ 1.5 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.2 ถึง 45 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ชีตจำกัดในการตรวจพบของมาลาไธออน และ 2,4-D เท่ากับ 0.5 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2008 G. Valdés-Ramírez และคณะ²⁶ พัฒนาแอมเพอโรเมตริกอะซิetylโคลีนเอสเทอร์เรส (Acetylcholinesterase, AChE) ไบโอเซนเซอร์ สำหรับตรวจหาปริมาณ คาร์โบฟูแรน (Carbofuran), คาร์บาริล (Carbaryl), เมทิลพาราออกซอน (Methyl paraoxon) และไดคลอวอส (Dichlorvos) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีอะซิโตนไตรล์ 5% ศึกษาไบโอเซนเซอร์ที่ต่างกัน 3 ชั่วโมง ใช้เอนไซม์ต่างชนิด คือ เอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเทอร์เรส จากปลาไหลไฟฟ้า จากการดัดแปลงพันธุกรรม (B394) และจากแมลงวันทอง (Wild-type B1) และใช้โคบอลต์พธาลอไซยานิน (Cobalt(II)

phthalocyanine) เพื่อช่วยในการตรึงเอนไซม์โดยเกิดการเชื่อมพันธะกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ และนำไปทดสอบสารกำจัดศัตรูพืชทั้ง 4 ชนิด ผลการทดลองพบว่า ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรของการวิเคราะห์ การตรึงเอนไซม์มีความคงที่ สามารถเก็บไบโอเซนเซอร์ไว้ได้นาน ชีตจำกัดที่ตรวจวัดได้ด้วยเอนไซม์ B394 พบ ไดคลอวอส 9.6×10^{-11} โมลต่อลิตร เมทิลพาราออกซอน 2.7×10^{-9} โมลต่อลิตร เอนไซม์ B1 พบ คาร์โบฟูแรน 4.5×10^{-9} โมลต่อลิตร และทั้งเอนไซม์ B1 และเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า พบ คาร์บาริล 1.6×10^{-7} โมลต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชที่เติมลงในตัวอย่างผลไม้แอปเปิ้ลให้ผลการทดลองที่ดีสามารถใช้งานได้จริง

ในปี ค.ศ. 2008 C. Mousty และคณะ²⁷ พัฒนาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไบโอเซนเซอร์โดยตรึงเอนไซม์แบบกายภาพ ใช้ไฮดรอกไซด์เมทริกซ์ที่มีชั้นไฮดรอกไซด์ 2 ชั้น (Different layered double hydroxides, LDH) ที่เกิดจาก $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ และ $\text{Mg}_2\text{Al-CO}_3$ ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเมมเบรน ALP/LDH หาภาวะของวิธีการตรึงเอนไซม์ การเข้าถึงได้ของสาร และผลของสารละลายบัฟเฟอร์ ผลการทดลองพบว่าวัสดุขนาดนาโน MgAl-LDH ช่วยเพิ่มความเสถียรในการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และใช้ 25 % กลูตาไรลดีไฮด์ที่อิมมูบิลในการเชื่อมโยงสารชีวโมเลกุลเข้าด้วยกันการทำงานร่วมกันของการตรึง LDH กับ สารตั้งต้นไฮโดรควิโนนไดฟอสเฟต (Hydroquinone diphosphate, HQDP) ให้การตอบสนองที่รวดเร็ว และมีศักย์กระตุ้นการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ALP/ MgAl-LDH ที่ 0.4 โวลต์ ดังรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.23 ปฏิกริยาของ HQDP และไซคลิกโวลแทมโมแกรม²⁷ ของ (a) 1 mM HQDP, (b) 1 mM HQDP+ ALP และ (c) 1 mM HQ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.5 อัตราการสแกน 50 mV.s^{-1}

ในปี ค.ศ. 2010 งานวิจัยระดับปริญญาตรีของ นีรนุช สุพร²⁸ พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยวิธีวิเคราะห์ทางอ้อม ตรึงและใช้ประโยชน์ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากการยับยั้งการทำงานด้วยคาร์โบฟูแรน โดยตรึงเอนไซม์แบบเคมีบนผิวหน้าของคาร์บอนเพส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ได้ผลการทดลอง ดังนี้ ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.75 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ pH

7.5 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 0.5 ถึง 3.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 4.0 ถึง 7.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ความไวของการตรวจวัด คือ -2.78 ร้อยละการยับยั้ง.ลิตรต่อไมโครกรัม ชัดจำกัดในการตรวจพบของคาร์โบฟูแรน 0.53 ไมโครกรัมต่อลิตร และชัดจำกัดที่ตรวจวัดปริมาณได้ ของคาร์โบฟูแรน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2010 E. Akyilmaz และคณะ²⁹ พัฒนาไบโอเซนเซอร์ตรวจวัดคาเฟอีน อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยการตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับสารเชื่อมโยงกลูตารัลดีไฮด์บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทองที่ปรับปรุงผิวหน้าขั้วด้วยชั้นของซิสเทอมีน (Cysteamine) ซึ่งคาเฟอีนจะไปยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขันใช้หลักการนี้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีน พบว่าสภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ 30 องศาเซลเซียส ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาเฟอีน 0.1 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ ชัดจำกัดในการตรวจพบ 0.08 ไมโครโมลาร์

ในปี ค.ศ. 2011 งานวิจัยระดับปริญญาตรีของยุวันดา วงษา¹⁷ พัฒนาไบโอเอนไซมาติกไบโอเซนเซอร์ตรึงด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรทและคาร์โบฟูแรน อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยโปรทสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และคาร์โบฟูแรนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส วิเคราะห์หาปริมาณโปรทและคาร์โบฟูแรนด้วยหลักการวิเคราะห์ทางอ้อม ประเมินการทำงานของไบโอเอนไซมาติกไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรทในน้ำตัวอย่างที่มีการเติมโปรท 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารตัวอย่างมาตรฐานที่มีการรับรองจากสถาบันวิจัยแห่งชาติประเทศแคนาดา (สารตัวอย่างปลาหมึก, DORM-2) ที่รับรองปริมาณโปรท 4.64 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการวิเคราะห์ตรวจพบปริมาณโปรทที่ 2.17 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.29 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างพริกขี้หนู และพริกขี้หนู จากตลาดสดท้องถิ่น อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี ผลการวิเคราะห์ตรวจพบปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ 5.55 ± 0.07 และ 5.52 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และประเมินการทำงานเทียบกับเทคนิคมาตรฐานอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมทรีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรท และเทคนิคมาตรฐานยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรเมทรีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน เมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสามารถนำไบโอเอนไซมาติกไบโอเซนเซอร์นี้ไปตรวจวัดในตัวอย่างจริงได้

ในปี ค.ศ. 2011 S. B. Adeloju และคณะ³⁰ ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้โบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) และกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, GLA) ในชั้นของการเชื่อมโยงตัวรับสารเพียวรีน นิวคลีโอไซด์ ฟอสฟอริเลส (Purine nucleoside phosphorylase, PNP) กับสารแซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase, XOD) เพื่อพัฒนาเป็นโพเทนชิโอเมตริกฟอสเฟตไบโอเซนเซอร์ ซึ่งจะแบ่งเป็นชั้นภายใน คือ ชั้นของ BSA-GLA และชั้นภายนอก คือ ชั้นของ BSA-GLA-PNP-XOD โดยการรวมกันของชั้น BSA-GLA จะช่วยเพิ่มการยึดเกาะของชั้น BSA-GLA-PNP-XOD ได้ดี ส่งผลให้เพิ่มความเสถียรให้แก่ฟอสเฟตไบโอเซนเซอร์ได้ดียิ่งขึ้น เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า การตรึงเอนไซม์ในชั้นนอกจะใช้ กลูตารัลดีไฮด์ ร้อยละ 4.5 โดยปริมาตร โบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 6.8 โดย

มวลต่อปริมาตร อัตราส่วนแซนทินออกซิเดสต่อเพียวรีน นิวคลีโอไซด์ ฟอสฟอรัส เท่ากับ 1:8 และระยะเวลาที่ฟิล์มแห้ง 30 นาที สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ฟอสเฟต 40 ถึง 120 ไมโครโมลต่อลิตร ชัดจำกัดในการตรวจพบของฟอสเฟต 20 ไมโครโมลต่อลิตร และไบโอเซนเซอร์มีความเสถียร 21 วัน

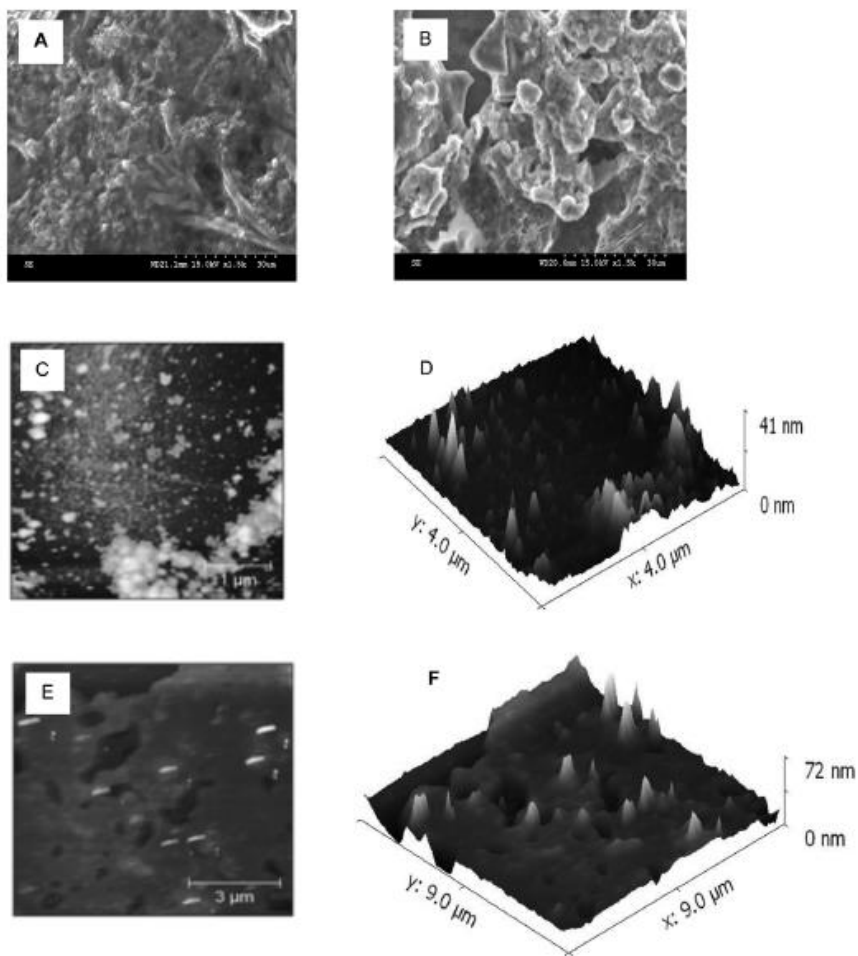
ในปี ค.ศ. 2012 X. Sun และคณะ² พัฒนาแอมเพอโรเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรน โดยการตรึงเยื่อหลายชั้นของทองคำขนาดนาโน (Gold nanocrystals, DpAu) และ 4,4'-ไธโอบิสเบนซีนไทออล (4,4'-Thiobisbenzenethiol, DMDPSE) ลงบนขั้วไฟฟ้าทองเพื่อสร้างแอมเพอโรเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์ วิเคราะห์พิษจังก์ชันเอกลักษณ์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry, CV) และเทคนิคการวัดความต้านทานเชิงซ้อนทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) ศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนระหว่างแอนติคาร์โบฟูแรน โมโนโคลนอล แอนติบอดี กับคาร์โบฟูแรน ด้วยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี (Differential pulse voltammetry, DPV) และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 0.1×10^6 ถึง 1.0×10^6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชัดจำกัดในการตรวจพบ 0.06 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อิมมูโนเซนเซอร์นี้มีช่วงการวิเคราะห์กว้าง แม่นยำ เสถียร จำเพาะเจาะจงกับสารและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อนำมาตรวจวัดในสารตัวอย่างผักกาดหอม กะหล่ำปลี พริกเขียว มะเขือเทศ กระเทียมจีน และสตรอเบอร์รี่ พบร้อยละการได้กลับคืน ร้อยละ 82.0 -109.2 แสดงให้เห็นว่าอิมมูโนเซนเซอร์นี้สามารถนำไปใช้งานได้จริงในการตรวจหาปริมาณคาร์โบฟูแรนในพืช ผัก ผลไม้

ในปี ค.ศ. 2013 A. Samphao และคณะ²⁶ พัฒนาแอมแปโรเมตริกไบโอเซนเซอร์เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยการวิเคราะห์ทางอ้อม อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยคาร์โบฟูแรนจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ตรึงอยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอน เพส เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ เทคนิคโคโนโอมเพอโรเมทรี ผลการทดลองสถานะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 8.5 พบช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 10 ถึง 97 ไมโครกรัมต่อลิตร ชัดจำกัดในการตรวจพบ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ ร้อยละ 2.3 ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ทดลอง 3 ครั้ง) และมีความเที่ยงของไบโอเซนเซอร์ ร้อยละ 3.4 (3 ขั้ว)

ในปี ค.ศ. 2013 Q. Zhou และคณะ³¹ พัฒนาแอมเพอโรเมตริกอะซิetylโคลีนเอสเตอเรส (AChE) ไบโอเซนเซอร์ โดยใช้อนุภาคทินไดออกไซด์ขนาดนาโน (SnO_2 NPs), คาร์บอกซิลิกกราฟีน (Carboxylic graphene, CGR) และ เนฟิออน (Nafion, NF) ปรับปรุงบนขั้วไฟฟ้าเกลสซีคาร์บอน (GCE) เพื่อทำการตรวจวัด เมทิลพาราไทออล (Methyl parathion) และ คาร์โบฟูแรน (Carbofuran) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เตรียมด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) เทคนิคเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction, XRD) และเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) และศึกษาผลของการทำงานของเอนไซม์โดยมีอะซิetylโคลีน คลอไรด์ (ATCI) เป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองสถานะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์คือ สารละลายอะซิetylโคลีน คลอไรด์ pH 7.4 สารละลายฟอสเฟต

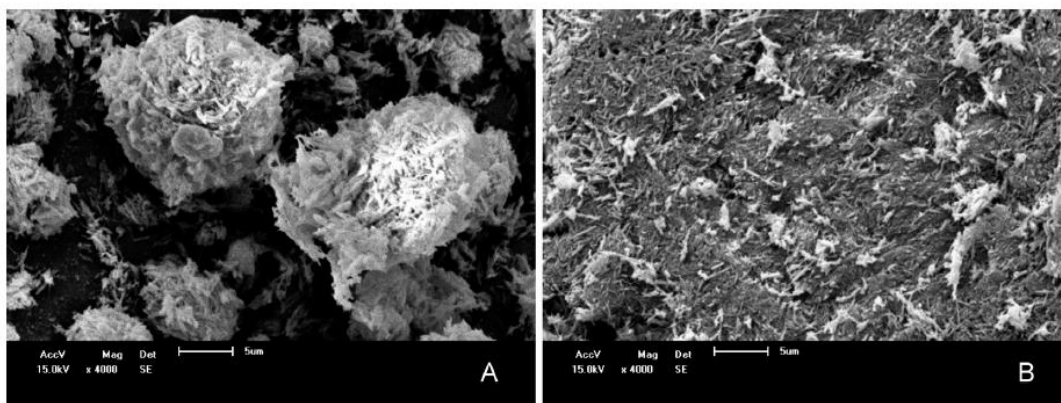
บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 7.4 และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์เมทิลพาราไทฮอล 10^{-13} ถึง 10^{-10} โมลต่อลิตร และ 10^{-10} ถึง 10^{-8} โมลต่อลิตร และช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 10^{-12} ถึง 10^{-10} โมลต่อลิตร และ 10^{-10} ถึง 10^{-8} โมลต่อลิตร ชัดจำกัดในการตรวจพบของ เมทิลพาราไทฮอล 5×10^{-14} โมลต่อลิตร และ คาร์โบฟูแรน 5×10^{-13} โมลต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2014 T. Jeyapragasam และคณะ⁵ พัฒนาสแควร์เวฟโวลแทมเมตริกไบโอเซนเซอร์ความไวสูงสำหรับตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรน โดยปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแกสซีคาร์บอนด้วยการตรึงเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) บนฟิล์มไฮดรอกไซด์-โคโตซานขนาดนาโน (AChE/Fe₃O₄-CH/GCE) พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เตรียมด้วยเทคนิคฟูเรียร์ ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) และวิเคราะห์การตรึงเอนไซม์บนฟิล์มด้วยเทคนิคความต้านทานเชิงซ้อนทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) เทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) และกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic force microscope, AFM) ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยคาร์โบฟูแรน โดยมีอะซีทิลไฮโดรโคลีน คลอไรด์ (ATCI) เป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ตรึงลงบนฟิล์มไฮดรอกไซด์-โคโตซานขนาดนาโนมีการปกคลุมบนผิวของแผ่นฟิล์มโดยสังเกตจากภาพของเทคนิค SEM และ AFM ดังรูปที่ 2.27 ผลการศึกษาจาก AFM ของ Fe₃O₄-CH (C) 2D, (D) 3D และ AChE/Fe₃O₄-CH (E) 2D, (F) 3D เมื่อนำไบโอเซนเซอร์มาวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ ความเข้มข้นของอะซีทิลไฮโดรโคลีน คลอไรด์ 1.0×10^{-3} โมลต่อลิตร ความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน 1.0×10^{-5} โมลต่อลิตร ระยะเวลาในการบ่มด้วยยับยั้งใช้เวลา 15 นาที ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 5.0×10^{-9} ถึง 9.0×10^{-8} โมลต่อลิตร ชัดจำกัดในการตรวจพบ 3.6×10^{-9} โมลต่อลิตร และนำไบโอเซนเซอร์ไปตรวจวัดหาปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างพบว่ามีย่อยละการได้กลับคืน ร้อยละ 96 ถึง 97 และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถนำไปใช้วัดปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างได้จริง



รูปที่ 2.24 ภาพถ่าย SEM ของ (A) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CH}$ และ (B) $\text{AChE/Fe}_3\text{O}_4\text{-CH}$ ⁵

ในปี ค.ศ. 2015 G. F. Grawe และคณะ³² พัฒนาไบโอเซนเซอร์ โดยการตรึง Isolated endophytic fungus *Eupenicillium shearii* FREI-39 esterase บน Halloysite nanotubes (HNTs) ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ และใช้ผงกราฟไฟต์ คาร์บอนนาโนทิวบ์ผนังหลายชั้น และมีเนอร์รอลอยสำหรับตรวจวัดหาปริมาณคาร์โบฟูแรน โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ผ่านวิธีสแควร์เวฟโวลแทมเมทรี (SWV) ผลการทดลองการดูดซับของเอนไซม์บน Halloysite nanotubes ดังรูปที่ 2.28 ภาพถ่าย SEM ของ HNTs และ endophytic extract ตรึงบน HNTs ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ ปริมาณเอนไซม์ 0.5 ยูนิต ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กับตัวยับยั้งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 นาที ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 5.0 ถึง 100.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดในการตรวจพบ 1.69 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดที่ตรวจวัดปริมาณได้ 5.13 ไมโครกรัมต่อลิตร และร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง ร้อยละ 103.8 ± 6.7 ถึงร้อยละ 106.7 ± 9.7 ความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ 20 สัปดาห์ เมื่อนำไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนานี้ไปตรวจวัดคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างน้ำเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ด้านสถิติค่าที (t-test)



รูปที่ 2.25 ภาพถ่าย SEM ของ (A) HNTs และ (B) endophytic extract ตรึงบน HNTs³²

2.2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสกัดคาร์โบฟูแรนจากสารตัวอย่าง

ในปี ค.ศ. 2005 J. F. Huertas-Pérez และคณะ³³ วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างผักกาดหอมด้วยเทคนิค Flow-injection chemiluminescence ทำการสกัดสารคาร์โบฟูแรนโดยชั่งตัวอย่างผักกาดหอมมา 20 กรัม หลังจากนั้นเติมคาร์โบฟูแรนที่ทราบความเข้มข้น (2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) 35 มิลลิลิตร และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต ($\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$) 30 กรัม แล้วนำสารที่ได้ไปกรองโดยใช้ตัวกรองสุญญากาศ (Vacuum) โดยใช้เอทิลอะซิเตทปริมาตร 15 มิลลิลิตร ล้างกระดาศกรองและขวดรูปชมพู่ หลังจากนั้นกำจัดตัวทำละลายโดยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ให้เหลือปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทิลอะซิเตทปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำสารที่ได้ไปผ่านตัวกรองอะลูมินา (Alumina cartridge, มีอะลูมินา 1.5 กรัม) ชะด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร และน้ำ 3 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen stream) จนกว่าแห้ง ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 0.06 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดในการตรวจพบ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2012 X. Sun และคณะ³⁴ พัฒนาแอมเพอโรเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนในกะหล่ำปลี โดยใช้อนุภาคทองขนาดนาโน (AuNPs) แมกเนติก (Fe_3O_4) ท่อคาร์บอนผนังหลายชั้น (FCNTs) และไคโตซาน (CS) ได้เป็นอนุภาค AuNPs/CS- Fe_3O_4 -FCNTs สร้างขึ้นเป็นแผ่นฟิล์มด้วยโบวินเซรัมอัลบูมิน (BSA) และปรับปรุงผิวหน้าด้วยไฟฟ้าแกสซีคาร์บอน สกัดสารคาร์โบฟูแรนจากกะหล่ำปลี โดยเริ่มต้นจากล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง แล้วพ่นคาร์โบฟูแรนความเข้มข้นต่างๆลงบนผิวตัวอย่าง ทิ้งไว้ 24 ชม. หลังจากนั้นเอาตัวอย่างมา 10 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 85 โดยปริมาตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยใช้ เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที แล้วเอาออกมาแยกสารปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็ว 6000 rpm และเก็บส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 1 ถึง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.1 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีขีดจำกัดในการตรวจพบ 0.032 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาในสารตัวอย่าง พบร้อยละการได้กลับคืนถึงร้อยละ 90.7 ถึง ร้อยละ 110.4 และพบว่าแอมเพอโรเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์นี้ มีความเที่ยงสูง ความไวในการตรวจวัดสูง และมีความเสถียรสามารถนำไปใช้วัดปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างจริงได้

ในปี ค.ศ. 2012 งานวิจัยระดับปริญญาโทของสุภาพร บังพรม³⁵ ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดแมลงคาร์โบฟูแรนด้วยเทคนิควัดสีในพริกชี้หนูสด 10 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจากพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ กับปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชันของสารคาร์โบฟูแรนกับสารพาราไนโตรอะนิลีน (*p*-nitroaniine, PNA) ภายใต้สภาวะเบส ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีไวน์แดงที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน คือ คาร์โบฟูแรน 3.12 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6.3 กรัมต่อลิตร สารละลายพาราไนโตรอะนิลีน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใน 25 มิลลิลิตร) สภาพความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 11.8 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 0.5 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดในการตรวจพบ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดที่ตรวจวัดปริมาณได้ 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารคาร์โบฟูแรนในพริกชี้หนูสด 10 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิควัดสีพบการปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 4.99 ถึง 10.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม