

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาและทดลองที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยมีการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิเคราะห์ สารเคมี และวิธีการทดลอง ดังนี้

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ประกอบ และวัสดุเครื่องแก้ว งานวิจัยนี้ได้มีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ อุปกรณ์ประกอบ และวัสดุเครื่องแก้ว ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ประกอบที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	เครื่องมือ	บริษัท (รุ่น)
1.	AUTOLAB (Potentiostat)	Methrohm (PG12)
2.	Counter electrode : Pt	CH-Instrument
3.	Hot plate	VELP SCIENTIFICA
4.	Magnetic stirrer	Methrohm
5.	pH meter	EUTECH INSTRUMENTS pH501
6.	Reference electrode : Ag/AgCl	CH-Instrument
7.	Vertex	Labnet
8.	Homogenizer	IKA (RW20)
9.	Rotary evaporator	BUCHI

3.1.2 วัสดุเครื่องแก้ว

วัสดุเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและสังเคราะห์สาร ดังตารางที่ 3.2 และวัสดุสำหรับประกอบขั้วไฟฟ้าเพื่อเตรียมเป็นไบโอเซนเซอร์ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 วัสดุเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและสังเคราะห์สาร

ลำดับที่	วัสดุเครื่องแก้ว	ขนาด
1.	ปิกเกอร์ (Beaker)	50 100 และ 1000 mL
2.	ขวดปริมาตร (Volumetric flask)	5 10 20 25 50 100 250 และ 500 mL
3.	ช้อนตักสาร (Spatula)	-
4.	ขวดน้ำปราศจากไอออน (Bottles deionized water)	-
5.	แท่งแม่เหล็กคนสาร (Magnetic bar)	1 cm
6.	ไมโครปิเปต (Micropipette)	10-100 μ L และ 100-1000 μ L
7.	ขวดเก็บสารสีชา (Bottle ember)	50 และ 100 mL
8.	ขวดเก็บสาร (Bottle clear)	500 mL
9.	กระบอกตวงสาร (Cylinder)	25 และ 100 mL
10.	แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)	-
11.	ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)	250 mL
12.	กระจกนาฬิกา (Watch glass)	-
13.	ปิเปต (Pipette)	5 10 และ 20 mL
14.	กรวยแยก (Separatory funnel)	250 mL
15.	ขวดก้นกลม (Round bottom flask)	250 mL

3.2 สารเคมี งานวิจัยนี้ใช้สารเคมี มีเกรดความบริสุทธิ์และสั่งซื้อมาจากหลายบริษัท ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	รายการ	ระดับความบริสุทธิ์	บริษัทที่ผลิต
1.	น้ำมันแร่ (Mineral oil)	AR grade	Acros
2.	อะซิโตนไตริล (Acetonitrile)	AR grade	Analar
3.	เฮกเซน (Hexane)	AR grade	Analar
4.	ฟีนอล (Phenol)	ACS-For analysis	CARLO ERBA
5.	กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)	37.0 %	CARLO ERBA
6.	โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Monosodium dihydrogen phosphate)	AR grade	CARLO ERBA
7.	คาร์โบฟูแรน (Carbofuran)	99.0 %	Chem service

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ลำดับที่	รายการ	ระดับความบริสุทธิ์	บริษัทที่ผลิต
8.	โบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)	98.0 %	Merck
9.	ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต (Disodium phenyl phosphate)	AR grade	Sigma Aldrich
10.	เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Enzyme alkaline phosphatase)	AR grade	Sigma Aldrich
11.	กลีเซอรอล (Glycerol)	AR grade	Sigma Aldrich
12.	กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	25.0 %	Sigma Aldrich
13.	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate)	99.0%	Sigma Aldrich
14.	ผงคาร์บอน (Carbon nanopowder)	99.9 %	Sigma Aldrich

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

3.3.1 เตรียมสารละลาย โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M NaH_2PO_4) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

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

3.3.2 เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M Na_2HPO_4) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 6.70xx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ตัดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.3 เตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือหนุนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 (Phosphate buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสม 0.1 โมลาร์ สารละลายโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (การเตรียม 3.3.1) กับ 0.1 โมลาร์ สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น ปริมาตร 85 มิลลิลิตร (การเตรียม 3.3.2) จากนั้นตรวจสอบ pH ของสารละลายด้วยเครื่องวัด pH เมื่อได้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.8 เก็บสารละลายที่ได้ในขวดเก็บสาร ตัดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม รอการใช้งานต่อไป

3.3.4 เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (10 %w/v $C_6H_5PO_4Na_2$) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตไดไฮเดรต ($C_6H_5PO_4Na_2 \cdot 2H_2O$) 2.330x กรัม ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และปรับปริมาตรจนครบ 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสารติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ($100 \text{ mg.L}^{-1} C_{12}H_{15}NO_3$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งคาร์โบฟูแรน ($C_{12}H_{15}NO_3$) 0.005x กรัม ละลายด้วยอะซิโตนไทรล์ 226 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บสารละลายในขวดเก็บสารติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.6 เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ($2.5 \%v/v OHC(CH_2)_3CHO$) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปต 25 % โดยปริมาตร กลูตารัลดีไฮด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสารติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.7 เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 KU.mL^{-1}

ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 (การเตรียม 3.3.3) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงในเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (P6772-2KU) ซึ่งมีลักษณะเป็นผง หลังจากนั้น ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 KU.mL^{-1} ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.8 เตรียมสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ชั่งโบวินเซรัมอัลบูมิน 0.04xx กรัม ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 (การเตรียม 3.3.3) ปริมาตร 420 ไมโครลิตร ลงในขวดเตรียมสารขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 KU.mL^{-1} (การเตรียม 3.3.7) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 30 นาที ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม และเก็บไว้ในตู้เย็น

3.3.9 เตรียมสารละลายฟีนอล เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (1000 mg.L^{-1}) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ชั่งฟีนอล (Phenol) 0.025x กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสารติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.10 เตรียมสารเฮกเซนที่อิมัลส์ด้วยสารอะซิโตนไตรล์

นำสารอะซิโตนไตรล์ใส่ในกรวยแยกและค่อยเติมสารเฮกเซนลงในสารอะซิโตนไตรล์ เขย่าจนเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน นำชั้นสารอะซิโตนไตรล์มาใช้ในการสกัดสาร

3.3.11 เตรียมสารอะซิโตนไตรล์ที่อิมัลส์ด้วยสารเฮกเซน

นำสารเฮกเซนใส่ในกรวยแยกและค่อยเติมสารอะซิโตนไตรล์ลงในสารเฮกเซน เขย่าจนเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน นำชั้นเฮกเซนมาใช้ในการสกัดสารต่อไป

3.4 การสกัดคาร์โบฟูแรนจากข้าวหอมมะลิ³⁷

1. ชั่งตัวอย่างข้าวหอมมะลิ 20.xx กรัม
2. เติมเฮกเซนที่อิมัลส์ด้วยสารละลายอะซิโตนไตรล์ปริมาตร 80 มิลลิลิตร (การเตรียม 3.3.10)
3. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่องผสมสารความเร็วสูง (Homoginizer) ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที นาน 5 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
4. เก็บสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ใส่ในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะซิโตนไตรล์ที่อิมัลส์ด้วยเฮกเซน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดสารด้วยกรวยแยกนาน 15 นาที ปล่อยให้สารละลายแยกชั้น เก็บสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของสารละลายอะซิโตนไตรล์กรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (สกัด 2 ครั้ง) (การเตรียม 3.3.11)
5. นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยหมด
6. ละลายสารที่เหลืออยู่ด้วยสารละลายอะซิโตนไตรล์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตร

3.5 การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งาน

3.5.1 การเตรียมคาร์บอนเพส

1. ชั่งผงคาร์บอน ปริมาณ 0.70xx กรัม
2. เติมน้ำมันแร่ ปริมาณ 0.30xx กรัม ผสมให้เข้ากัน กวนจนเป็นเนื้อเดียวกันจนเพส
3. เก็บเพสในโถดูดความชื้น

3.5.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส

1. ตัดสายไฟยาว 12 เซนติเมตร เอาฉนวนของสายไฟด้านปลายทั้งสองด้านออก 1.0 เซนติเมตร ขัดสารที่เคลือบผิวทองแดงออกด้วยกระดาษทรายละเอียดและบัดกรีติดกับแผ่นทองแดงเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร
2. ตัดแท่งเทฟลอนยาว 11.5 เซนติเมตร เจาะรูกลวงภายในเพื่อให้สวมสายไฟได้ และคว้านส่วนบนให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ลึก 0.5 เซนติเมตร
3. สวมสายไฟ (เตรียมจากข้อ 1) เข้าในแท่งเทฟลอนในส่วนบนและอัดกาวโพลีเมอร์บริเวณด้านล่างของแท่งเทฟลอนเพื่อยึดลวดทองแดงกับแท่งเทฟลอนให้แน่น รอกาวแห้ง

4. อัดคาร์บอนเพสที่เตรียมได้ (จากข้อ 3.5.1) ลงในผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้ให้เต็มและแน่นแล้ว จากนั้นใช้แผ่นเทฟลอนขัดผิวหน้าคาร์บอนเพสให้เรียบและสม่ำเสมอ (ภาคผนวก หมวด ก-1 รูปที่ ก-1.1 ถึง ก-1.4)

3.6 การเตรียมไบโอเซนเซอร์

ตรึงสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าคาร์บอนเพส

1. ปิเปตสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (การเตรียม 3.3.8) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าคาร์บอนเพส และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2. คว่ำขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก บรรจุสาร 5 มิลลิลิตร ละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที (ภาคผนวก หมวด ก-1 รูปที่ ก-1.5 ถึง ก-1.6)

3. เมื่อครบกำหนดเวลา นำขั้วไฟฟ้าออกจากขวดของสารละลาย และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ไบโอเซนเซอร์ที่ต้องการ

3.7 วิธีการทดลอง

3.7.1 พิสูจน์เอกลักษณ์ทางไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (ภาพการประกอบขั้วไฟฟ้าและเครื่องมือ ที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-2.1 และ ก-2.2) เลือกโปรแกรมเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายและจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

4. ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -1.0 โวลต์ ถึง +1.2 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 0.1 โวลต์ต่อวินาที บันทึกผลการทดลอง

5. ทำซ้ำ ข้อ 4 โดยใช้สารละลายฟีนอล เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (การเตรียม 3.3.9) บันทึกผลการทดลอง

6. ทำการศึกษาด้วยวิธีการเดิม ตั้งแต่ ข้อ 2-5 ด้วยขั้วไฟฟ้าตรึงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

7. ผลการทดลอง 4.2

3.7.2 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

3.7.2.1 ศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 0.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (ภาพการประกอบขั้วไฟฟ้าและเครื่องมือ ที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-2.1 และ ก-2.2) กำหนดศักย์กระตุ้นที่ +0.75 โวลต์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่บรรจุสารละลาย

4. จุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์ข้อ 3 ที่วางบนเครื่องมือกวนสารและทำการไล่ออกซิเจนออกจากสารละลายบัฟเฟอร์โดยการแทนที่ด้วยแก๊สอาร์กอน เป็นเวลา 5 นาที

5. กวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 200 รอบต่อนาทีจากนั้นเริ่มให้ศักย์กระตุ้น สังเกตสัญญาณกระแสไฟฟ้าหลังจนกระทั่ง

6. ปิเปตสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียม 3.3.4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไปในเซลล์ข้อ 3 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก สังเกตสัญญาณกระแสจนกระทั่ง

7. ปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

8. ปิเปตสารละลายคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเตรียม 3.3.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จนกระทั่งสัญญาณกระแสคงที่ บันทึกผลการทดลอง

9. ทำซ้ำข้อที่ 1-8 โดยเปลี่ยนสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เป็น 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 และ 3.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

10. ผลการทดลอง 4.3.1 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.1

3.7.2.2 ศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมโยงเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร

2. นำขั้วไฟฟ้าที่มีเอนไซม์ไปวิเคราะห์ (ไม่มีการเชื่อมโยงเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์)

3. ศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมโยงเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ โดยนำขั้วไฟฟ้าที่มีเอนไซม์ ไปแช่ในไอของกลูตารัลดีไฮด์ (ดังรูปที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-1.6) เป็นเวลา 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.2 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.2

3.7.2.3 ศึกษาปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร และระยะเวลาในการเชื่อมโยงเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที

2. ศึกษาปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน เข้มข้นร้อยละ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.3 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.3

3.7.2.4 ศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมโยงเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที และปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร

2. ศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้น 1300, 2600, 3800, 5000

และ 6250 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.4 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.4

3.7.2.5 ศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิต์ต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมขั้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร และปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ศึกษาสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.5 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.5

3.7.2.6 ศึกษาศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิต์ต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมขั้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0

2. ศึกษาศักย์กระตุ้น ที่ +0.600 +0.700, +0.725, +0.750, +0.775 และ +0.800 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.6 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.6

3.7.2.7 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

1. เตรียมขั้วไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิต์ต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมขั้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และศักย์กระตุ้น +0.750 โวลต์

2. ศึกษาอุณหภูมิที่ 20, 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.7 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.7

3.7.3 ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์

3.7.3.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ด้วยไบโอเซนเซอร์

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (การเตรียม 3.5)

2. ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม: ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (ภาพการประกอบขั้วไฟฟ้าและเครื่องมือ ที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-2.1 และ ก-2.2) กำหนดศักย์กระตุ้นที่ +0.75 โวลต์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี

3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่

บรรจุสารละลาย

4. จุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์ข้อ 3 ที่วางบนเครื่องมือกวนสาร และทำการไล่ออกซิเจนในสารละลายบัฟเฟอร์โดยการแทนที่ด้วยแก๊สอาร์กอน เป็นเวลา 5 นาที
5. กวนสารละลายด้วยเครื่องมือกวนสารที่อัตราการหมุน 200 รอบต่อนาทีจากนั้นเริ่มให้ศักย์กระตุ้น สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่
6. ปิเปตสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียม 3.3.4) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรลงไปในเซลล์ข้อ 3 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก สังเกตสัญญาณกระแสคงที่
7. ปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก
8. ปิเปตสารละลายคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเตรียม 3.3.5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในเซลล์ ทำการวัดสัญญาณกระแสฟาราเดอิก จากนั้นปิเปตสารละลายคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปทุกๆ 100 วินาที บันทึกผลการทดลอง
9. ผลการทดลอง 4.4.1 และภาคผนวก ข หมวด ข-2.1

3.7.3.2 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

1. ทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1
2. คำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบต่ำสุดจาก 3SD/Slope
3. ผลการทดลอง 4.4.2 และภาคผนวก ข หมวด ข-2.2

3.7.3.3 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ

1. ทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1
2. คำนวณหาขีดความสามารถในการตรวจวัดปริมาณต่ำสุดจาก 10SD/Slope
3. ผลการทดลอง 4.4.3 และภาคผนวก ข หมวด ข-2.3

3.7.3.4 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์

3.7.3.4.1 ความเที่ยงของขั้วไฟฟ้า

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (การเตรียม 3.5) จำนวน 3 ขั้ว
2. การทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1 ข้อ 2-8
3. ทำซ้ำกับขั้วไฟฟ้าอีก 2 ขั้ว
4. คำนวณหาความเที่ยงของขั้วไฟฟ้า
5. ผลการทดลอง 4.4.4.1

3.7.3.4.2 ความเที่ยงของการตรวจวัด

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (การเตรียม 3.5)
2. ทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1 ข้อ 2-7
3. ปิเปตสารละลายคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเตรียม 3.3.5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก จากนั้นปิเปตสารละลายคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป บันทึกกระแส และทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง

4. คำนวณหาความเที่ยงของการตรวจวัด

5. ผลการทดลอง 4.4.4.2

3.7.4 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ

3.7.4.1 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยไบโอเซนเซอร์

1. สุ่มเก็บตัวอย่างข้าวหอมมะลิ จากตลาดพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี
จำนวน 13 ตัวอย่าง

2. สกัดตัวอย่าง ดังวิธีการ 3.4

3. เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟูแรน ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟูแรน ด้วยวิธีเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

สารละลาย	ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร			
	1	2	3	4
สารละลาย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร คาร์โบฟูแรน (มิลลิลิตร)	0.00	0.05	0.10	0.15
สารสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	0.10	0.10	0.10	0.10
ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ครบ 5 มิลลิลิตร			

4. เตรียมขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส (การเตรียม 3.5)

5. การทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1 ข้อ 2-7

6. ปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก จนกระทั่งได้สัญญาณคงที่ บันทึกผลการทดลอง

7. ผลการทดลอง 4.5 และภาคผนวก ข หมวด ข-2.4

3.7.4.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. ทดลองตามวิธีการ 3.7.4.1 ข้อ 1-3

2. ส่งตัวอย่างไปตรวจวัดที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ. 4 จังหวัดอุบลราชธานี

3. ผลการทดลอง 4.5 และภาคผนวก ข หมวด ข-3.1