

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

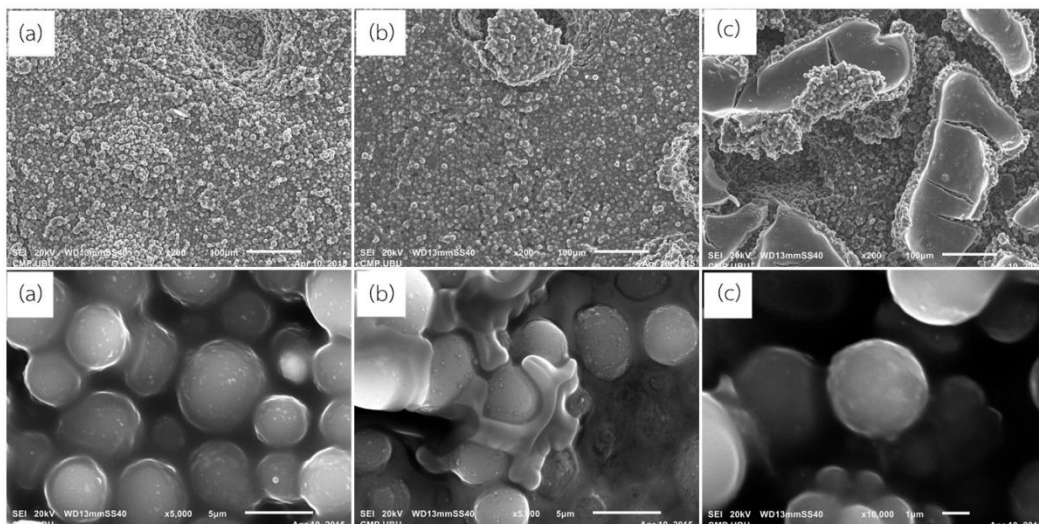
งานวิจัยนี้ปรับปรุงขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดคาร์โบฟูแรนโดยการตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวินเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัด ป้องกันการหลุดของเอนไซม์ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้า การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนอาศัยหลักการของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเร่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตให้ผลิตภัณฑ์ฟีนอลและกรดฟอสฟอริก ให้ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟีนอลจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นเบนโซควิโนน โปรตอน และอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนเป็นสัญญาณเฉพาะที่เครื่องแปลงสัญญาณสามารถรับและแปลงสัญญาณนี้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้

นอกจากนี้งานวิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ทางอ้อมของไบโอเซนเซอร์ คือคาร์โบฟูแรนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต โดยคาร์โบฟูแรนสร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเซอรีนในโครงสร้างของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพไปหรือถูกยับยั้งทำให้ผลิตฟีนอลได้ลดลง ค่าสัญญาณกระแสที่ได้จึงลดลงตามลำดับ สัญญาณที่ลดลงแปรผันตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของคาร์โบฟูแรน

ดังนั้น งานวิจัยเริ่มต้นจากการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสเพื่อพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาเอกลักษณ์ของผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและยืนยันการผลิตสารตัวกลางทางไฟฟ้าคือฟีนอลที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี หลังจากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ระยะเวลาในการเชื่อมโยงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ ปริมาณโบวินเซรัมอัลบูมิน ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม สภาวะ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ และปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์และประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาถึงช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ความไวในการตรวจวัด ขีดจำกัดในการตรวจพบและตรวจวัด ความเที่ยงของการวิเคราะห์ จากนั้นประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ โดยวิเคราะห์คาร์โบฟูแรนในข้าวหอมมะลิที่สุ่มเก็บมาจากพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

#### 4.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส ผู้วิจัยได้พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการศึกษารายละเอียดลักษณะพื้นผิว ดังรูปที่ 4.1

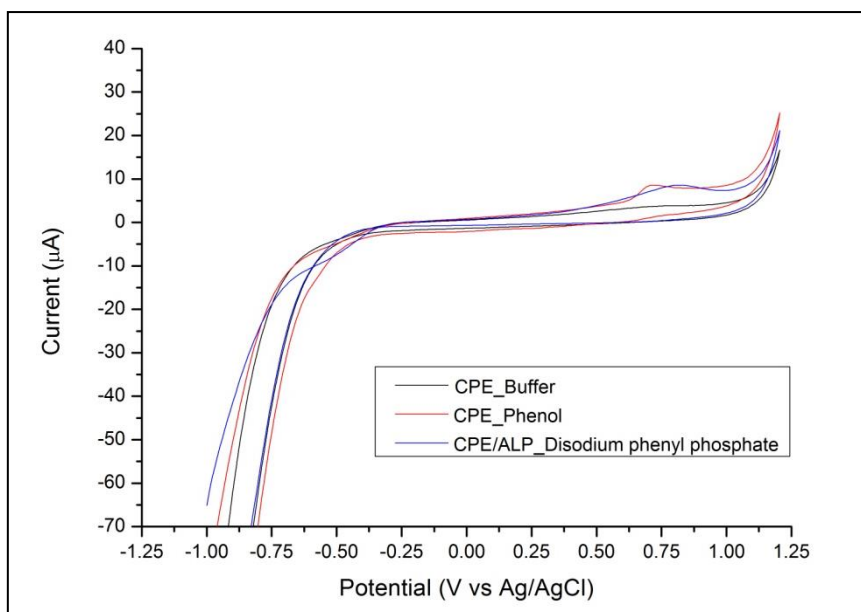


**รูปที่ 4.1** รูปร่างลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้า: (a) คาร์บอนเฟส, (b) คาร์บอนเฟสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ (c) คาร์บอนเฟสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวินเซรัมอัลบูมิน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคของคาร์บอนมีรูปร่างเป็นทรงกลมและซ้อนกันอยู่ ดังรูปที่ 4.1(a) เมื่อตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสลงบนคาร์บอนเฟสจะเห็นว่า มีสารเกาะอยู่กับคาร์บอนเฟส ซึ่งเกิดจากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไปเกาะอยู่บนพื้นผิวของคาร์บอนเฟส ดังรูปที่ 4.1(b) และเมื่อตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวินเซรัมอัลบูมินลงบนคาร์บอนเฟสจะเห็นว่า มีสารเกาะตัวกันบนผิวหน้าคาร์บอนเฟสซึ่งเกิดจากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวินเซรัมอัลบูมินเกิดการสร้างพันธะกันส่งผลให้กลุ่มก้อนโปรตีนนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้น

#### 4.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของขั้วไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

การทดลองนี้ยืนยันการทำงานของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเฟสที่ปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้า โดยการตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวินเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์เพื่อพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์ โดยศึกษาสัญญาณการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าต่อฟีนอลซึ่งเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของไดไฮเดียมฟีนิลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเฟสที่มีการตรึงและไม่ตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ดังรูปที่ 4.2



**รูปที่ 4.2** ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส สัญญาณกระแสของสารละลายบัฟเฟอร์ (เส้นกราฟสีดำ) สารละลาย 42 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟีนอล (เส้นกราฟสีแดง) และสารละลาย 6200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดโซเดียมฟีนอลฟอสเฟต (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) ที่ศักย์กระตุ้น -1.0 ถึง +1.2 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราสแกน 0.1 โวลต์ต่อวินาที

ผลการทดลองพบว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นตอบสนองต่อฟีนอล ให้สัญญาณกระแสแอนดิก (เส้นกราฟสีแดง) ที่ศักย์ +0.75 โวลต์<sup>26</sup> ที่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณกระแสของแบลนค์ (เส้นกราฟสีดำ) และเมื่อศึกษาขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าให้สัญญาณกระแสทางแอนดิกที่ศักย์ +0.60 ถึง +0.80 โวลต์ ซึ่งมีศักย์ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันกับศักย์ของฟีนอล แสดงว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถเร่งปฏิกิริยาของไดโซเดียมฟีนอลฟอสเฟตเกิดผลิตภัณฑ์เป็นฟีนอล ซึ่งเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าได้

จากการศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรนด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

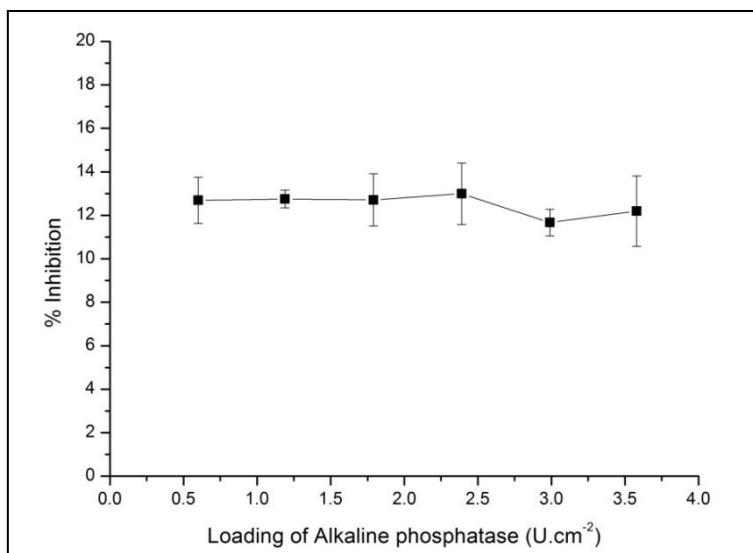
#### 4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์

เพื่อให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นคาร์โบฟูแรนไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ระยะเวลาการเชื่อมโยงระหว่างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับลูตารัลดีไฮด์ ปริมาณโบวีนเซิร์มอัลบูมิน ปริมาณไดโซเดียมฟีนอลฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ สภาวะ pH ของสารละลาย ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นและอุณหภูมิ ผลการศึกษา ดังนี้

##### 4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

การทำงานของคาร์โบฟูแรนไบโอเซนเซอร์อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน โดยคาร์โบฟูแรนสร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเซอรีนใน

โครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพไปหรือถูกยับยั้ง การศึกษาปริมาณเอนไซม์จึงมีความสำคัญ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เหมาะสมที่ตรึงบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ศึกษาปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 0.6 ถึง 3.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.3



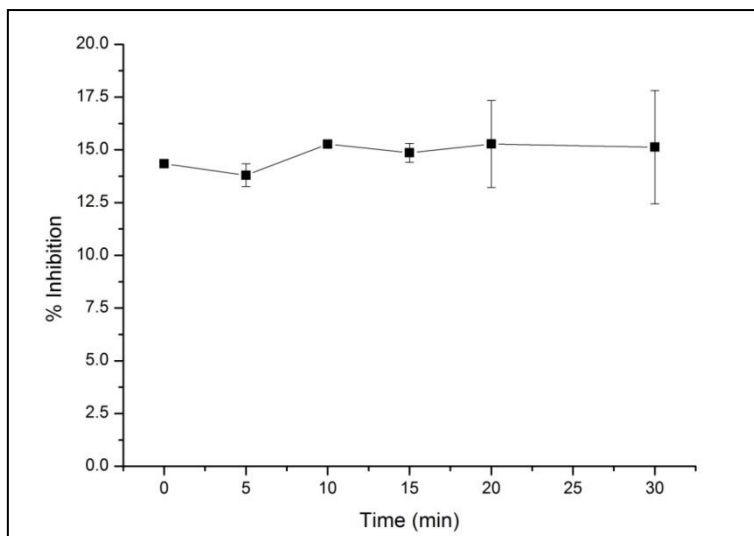
**รูปที่ 4.3** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ถูกตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 5 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้น การยับยั้งด้วยคาร์โบฟูแรน ไม่มีผลต่อร้อยละของการยับยั้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกปริมาณเอนไซม์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร (120 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดและมีค่าความแปรปรวนของข้อมูลต่ำ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระยะเวลาของการเชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

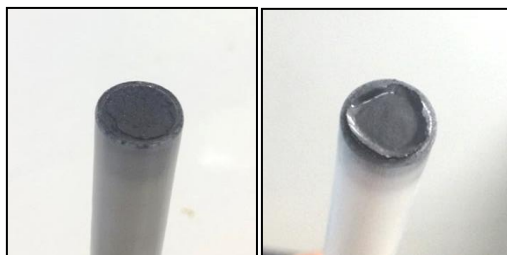
#### 4.3.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์

กลูตารัลดีไฮด์มีคุณสมบัติเกิดเป็นโครงร่างตาข่ายได้โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ของหมู่อะมิโนของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ เพิ่มการยึดติดของเอนไซม์บนผิวหน้า เพิ่มความเสถียรในการทำงานของไบโอเซนเซอร์ การเชื่อมไขว้กลูตารัลดีไฮด์ต้องใช้เวลาที่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาเวลาที่กลูตารัลดีไฮด์เชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 30 นาที ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.4



**รูปที่ 4.4** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและระยะเวลาในการเชื่อมไขว้กลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาพบว่าที่เวลาเริ่มต้นของการเชื่อมไขว้กลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ให้ผลร้อยละของการยับยั้งด้วยคาร์โบฟูแรนเท่ากับ 12.70 คาร์โบฟูแรนสามารถเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้โดยตรงโดยไม่ผ่านชั้นของกลูตารัลดีไฮด์ส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งมีค่าสูงและความแปรปรวนของข้อมูลต่ำ แต่พบว่าความเสถียรของการคงอยู่ของเอนไซม์ต่ำ ในขณะที่เมื่อเวลาการเชื่อมไขว้กลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มมากขึ้น ชั้นของกลูตารัลดีไฮด์จะหนาขึ้นทำให้คาร์โบฟูแรนเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ช้าลงเนื่องจากต้องผ่านชั้นของกลูตารัลดีไฮด์ นอกจากนี้กลูตารัลดีไฮด์มีการรวมตัวเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานๆส่งผลให้สารหลุดออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ดังรูปที่ 4.5 ค่าการวิเคราะห์จึงมีความแปรปรวนสูงมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกระยะเวลาในการเชื่อมไขว้กลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ 10 นาที เป็นสถานะที่เหมาะสม ซึ่งมีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ E. Akyilmaz และคณะ<sup>31</sup> ใช้กลูตารัลดีไฮด์ เข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 30 นาที



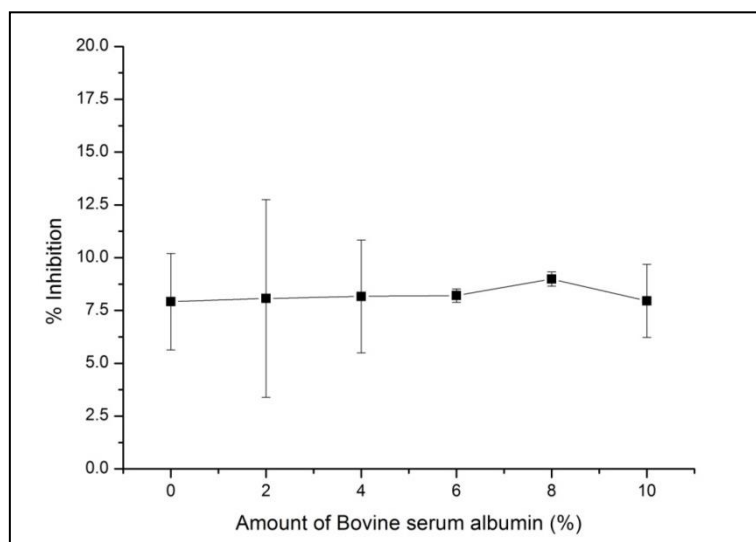
**รูปที่ 4.5** ภาพผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเชื่อมไขว้ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ก่อนการใช้งาน เวลาในการเชื่อมไขว้ 10 นาที (ซ้าย) และเวลาในการเชื่อมไขว้ 30 นาที (ขวา)

โบวินเซรัมอัลบูมินเป็นอีกหนึ่งตัวแปรที่มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

#### 4.3.3 ผลการศึกษาปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน

โบวีนเซรัมอัลบูมินเป็นโปรตีนที่นิยมใช้ในทางชีวเคมี เพราะมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ ป้องกันการรวมตัวกันของเอนไซม์ ช่วยให้เอนไซม์มีการกระจายตัวที่ดีขึ้น และช่วยป้องกันการยิดเกาะของเอนไซม์กับบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมินที่เหมาะสมต่อการปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ศึกษาปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 0 ถึง 10 โดยมวลต่อปริมาตร ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.6

จากการศึกษาพบว่าปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลต่อร้อยละของการยับยั้ง แต่เมื่อมีปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินในปริมาณน้อยค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์มีค่าสูงมากเนื่องจากเอนไซม์มีการรวมตัวกันส่งผลให้บริเวณเร่งมีปริมาณลดลง คาร์โบฟูแรนเข้าไปสร้างอันตรกิริยาได้น้อยลงทำให้ร้อยละของการยับยั้งมีความแปรปรวนสูง งานวิจัยนี้เลือกปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินที่ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตรใกล้เคียงกับผลงานวิจัยของ S. B. Adeloju และคณะ<sup>32</sup> ที่ใช้ปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 6.8 โดยมวลต่อปริมาตร



**รูปที่ 4.6** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมต่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร

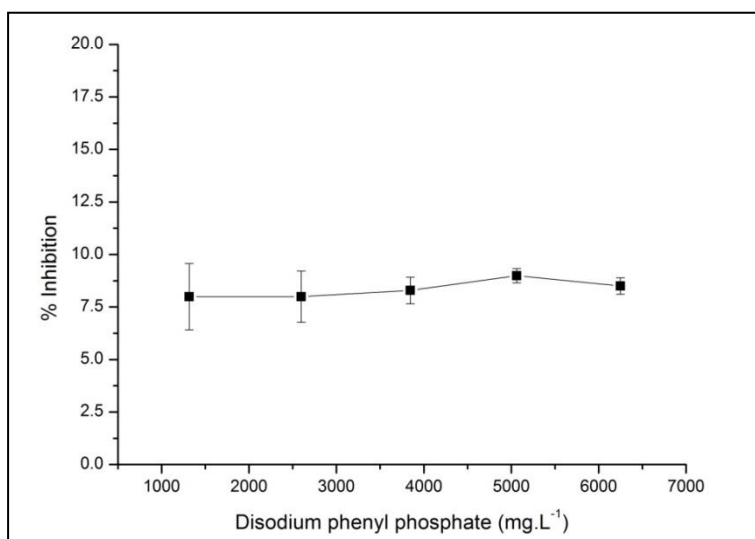
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของขั้วไฟฟ้า หลังจากนั้นจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ได้แก่ ปริมาณไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต สภาวะ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ศักย์กระตุ้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม ผลการทดลองดังหัวข้อถัดไป

#### 4.3.4 ผลการศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต

ความเข้มข้นของสับสเตรตมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์ปริมาณคงที่ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรตจะทำให้อัตราเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดๆหนึ่งแล้วจะคงที่ และความเข้มข้นของสับสเตรตมากเกินไปจะทำให้เอนไซม์หยุดการทำงานได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาปริมาณไดโซเดียมฟีนิล

ฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ โดยศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 1300 ถึง 6200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.7

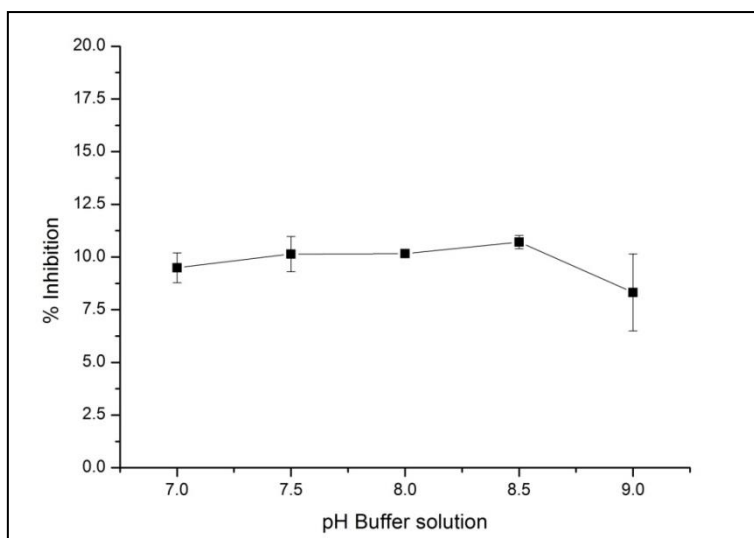
เมื่อกำหนดปริมาณเอนไซม์คงที่ บริเวณเร่งของเอนไซม์จะมีปริมาณจำกัด ปริมาณไดโซเดียม ฟีนิลฟอสเฟตมากขึ้นทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีจำนวนมากขึ้น งานวิจัยนี้ให้ร้อยละการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตที่มากขึ้น แต่พบว่าร้อยละการยับยั้งไม่ได้มีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นสภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากมีค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์ต่ำ



**รูปที่ 4.7** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0

#### 4.3.5 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สภาวะความเป็นกรดเบสของสารละลายบัฟเฟอร์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ การทำงานของเอนไซม์จะลดลง เมื่อ pH สูงหรือต่ำมากเกินไป ส่งผลให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้

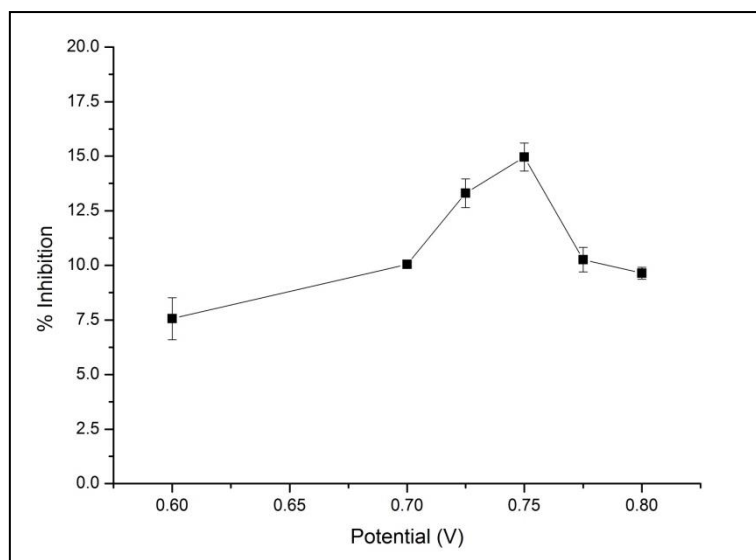


**รูปที่ 4.8** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมต่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัล ดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และ สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษา pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ที่ pH 7 ถึง 9 ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.8 จากผลการศึกษา พบว่าร้อยละการยับยั้งมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงสภาวะที่ pH 8.5 และหลังจากนั้นจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม คือ pH 8.0 เป็น สภาวะที่เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วยคาร์โบฟูแรนได้ดีที่สุด และมีความเที่ยงมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ คุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่อ้างอิงจากบริษัท sigma Aldrich<sup>36</sup> ที่ระบุว่าเอนไซม์นี้สามารถ ทำงานได้ดีที่ pH 8

#### 4.3.6 ผลการศึกษาศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม

ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมเพื่อให้สารตัวกลางทางไฟฟ้าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันได้มี ผลต่อความไวในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.6 ถึง +0.8 โวลต์เพื่อใช้กระตุ้นฟินอลให้ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.9



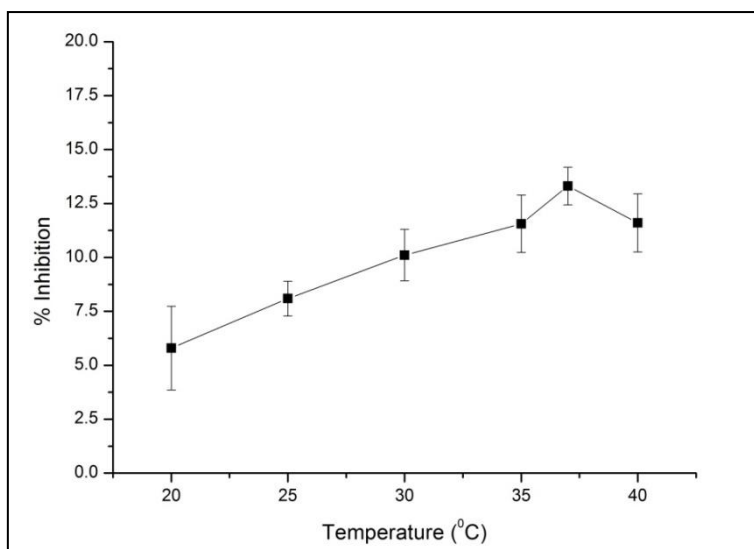
**รูปที่ 4.9** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 หน่วยต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษา พบว่าร้อยละการยับยั้งจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อศักย์กระตุ้นเพิ่มขึ้นจนถึงศักย์กระตุ้นที่ +0.750 โวลต์ และร้อยละการยับยั้งจะลดลงเมื่อศักย์กระตุ้นมากกว่า +0.775 โวลต์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า คือ +0.750 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ เนื่องจากมีค่าร้อยละการยับยั้งที่สูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ A. Samphao และคณะ<sup>26</sup> ให้ผลการทดลองในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเชื่อมไขว้ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เกิดกระแสแอมแปร์สูงสุดที่ศักย์ไฟฟ้า +0.750 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์

#### 4.3.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งสามารถคงสภาพทำงานได้ดีในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้นแต่ในขณะเดียวกันจะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงศึกษาอุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.10

จากผลการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิต่ำเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาน้อย แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นร้อยละการยับยั้งมีค่าสูงขึ้นจากอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส และร้อยละการยับยั้งจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เกิดจากเอนไซม์เสื่อมสภาพไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสให้ร้อยละการยับยั้งสูงสุด ซึ่งเป็นสภาวะที่เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสทำงานได้ดี แต่ผู้วิจัยเลือกอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่อุณหภูมิห้องควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีร้อยละการยับยั้งที่ยอมรับได้และสะดวกต่อการวิเคราะห์



**รูปที่ 4.10** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิ ตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมโยงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

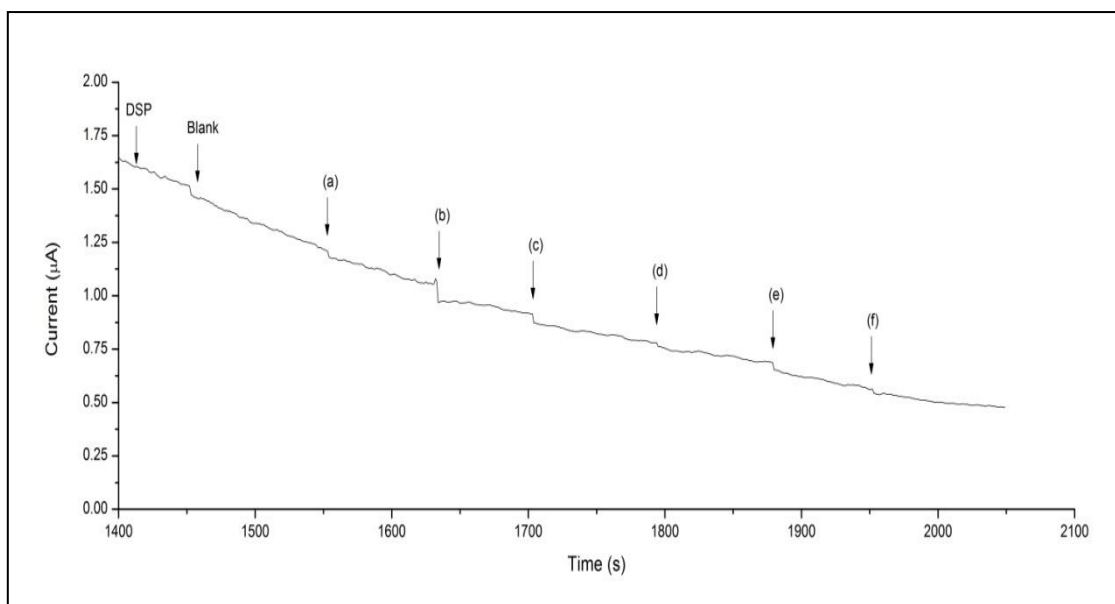
เมื่อทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จากนั้นจำเป็นต้องประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

#### 4.4 ผลการศึกษาประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์

เพื่อประเมินความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยชีวไฟฟ้าที่ทำการปรับปรุงขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นไบโอเซนเซอร์ จึงได้ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน ชีตจำกัดในการตรวจพบและตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรน ความเที่ยงของการวิเคราะห์ เป็นต้น

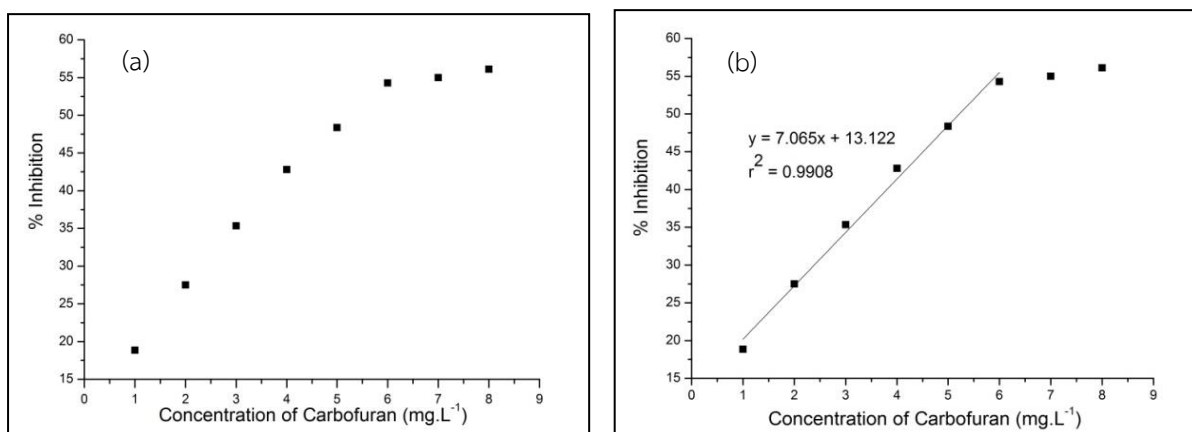
##### 4.4.1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน

ความสามารถในการทำงานของชีวไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบฟูแรน ผลการศึกษา ดังรูปที่ 4.11



**รูปที่ 4.11** ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลาของสารละลายคาร์โบฟูแรน โดยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมขั้วเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตาไรลไฮด 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมินร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร : ปริมาณคาร์โบฟูแรน (a) 1.0, (b) 2.0, (c) 3.0, (d) 4.0, (e) 5.0 และ (f) 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองพบว่าสัญญาณกระแสลดลงเป็นขั้นบันไดชัดเจนตามความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนได้ช่วงไดนามิกส์ ดังรูปที่ 4.12(a) และเลือกช่วงความเป็นเส้นตรงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.991 ดังรูปที่ 4.12(b)



**รูปที่ 4.12** ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน (a) ช่วงไดนามิกส์ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (b) ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

#### 4.4.2 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ทดสอบขีดจำกัดในการตรวจพบคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ พิจารณาขีดจำกัดในการตรวจพบจาก  $3SD/slope$  คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการยับยั้งกับสภาพไวในการวิเคราะห์มีค่าเป็น 3 เท่า จากผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบที่ความเข้มข้นต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.4.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ

ทดสอบขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณของคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ พิจารณาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณจาก  $10SD/slope$  คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการยับยั้งกับสภาพไวในการวิเคราะห์มีค่าเป็น 10 เท่า จากผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณที่ความเข้มข้นต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 3.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.4.4 ผลการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์

##### 4.4.4.1 ความเที่ยงของซ้ำไฟฟ้า

ทดสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ โดยเตรียมซ้ำไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จำนวน 3 ซ้ำ ทำการตรวจวัดสัญญาณของฟีนอลที่ลดลงที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน แล้วทำการหาค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งจากซ้ำไฟฟ้าทั้งสามซ้ำ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1 พบว่าให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 4.31 มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 5 จึงสามารถยอมรับความเที่ยงของซ้ำไฟฟ้าได้

ตารางที่ 4.1 ร้อยละการยับยั้งเฉลี่ยตามปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

| ไบโอเซนเซอร์ | ร้อยละการยับยั้ง (%) |
|--------------|----------------------|
| 1            | 15.10                |
| 2            | 15.53                |
| 3            | 14.26                |
| $\bar{X}$    | 14.96                |
| SD (n=3)     | 0.64                 |
| %RSD         | 4.31                 |

##### 4.4.4.2 ความเที่ยงของการตรวจวัด

ทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 4 ครั้งด้วยซ้ำไฟฟ้า 1 ซ้ำ ของไบโอเซนเซอร์ ตารางที่ 4.2 พบว่าไบโอเซนเซอร์ตอบสนองให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 2.80 มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 5 จึงสามารถยอมรับความเที่ยงของการวิเคราะห์ได้

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการยับยั้งเฉลี่ยตามปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

| จำนวนครั้ง | ร้อยละการยับยั้ง (%) |
|------------|----------------------|
| 1          | 4.21                 |
| 2          | 4.30                 |
| 3          | 4.14                 |
| 4          | 4.42                 |
| $\bar{X}$  | 4.27                 |
| SD (n=4)   | 0.12                 |
| %RSD       | 2.80                 |

#### 4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ

ทำการประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนผู้วิจัยวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิที่สุ่มเก็บจาก 13 แหล่ง คือ ตลาดวารินเจริญศรี ตลาดแม่กิมเต็ง ตลาดวาริน บ้านก่อ ตลาดห้วยขยุง ร้านชัยเจริญ ร้านเหรียญทอง ตลาดบึงหวาย บ้านศรีโคเหนือ บ้านทุ่งเกษม บ้านธาตุ บ้านบุงใหม่ บ้านศรีไคใต้ ในพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี โดยทำการสกัดคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิที่สุ่มเก็บมาจาก 13 แหล่ง (ข้าวหอมมะลิ # 1-3, 7-16) และเติมปริมาณคาร์โบฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวอย่างสารสกัดจาก 3 แหล่ง (ข้าวหอมมะลิ # 4-6) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในสารสกัดจากข้าวหอมมะลิด้วยไบโอเซนเซอร์และเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

จากข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิไม่สามารถตรวจวัดได้จากไบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีขีดจำกัดในการตรวจพบสูงถึง 1.12 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถระบุได้ว่ามีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจพบของทั้งสองวิธี ดังนั้นจึงทำการเติมสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในสารสกัดตัวอย่างข้าวหอมมะลิ 3 ตัวอย่างและทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยเทคนิคทั้งสอง ตรวจพบระดับปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ให้ผลการวิเคราะห์ในช่วง 1.43 - 1.57 มิลลิกรัมต่อลิตร เทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในช่วง 1.39 - 1.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนมาในช่วงร้อยละ 95.6 - 104.8 จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากทั้งสองเทคนิคด้วยสถิติค่า  $t$  พบว่า ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันกับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดย  $t_{\text{tabulated}}$  มีค่าเท่ากับ 4.3 ที่ degree of freedom = 2 และ  $t_{\text{calculated}}$  อยู่ในช่วง 0.26- 2.81 ซึ่งค่า  $t_{\text{calculated}}$  น้อยกว่า  $t_{\text{tabulated}}$  แสดงว่า ผลการวิเคราะห์ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงสรุปได้ว่าไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิได้จริง

**ตารางที่ 4.3** ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในข้าวหอมมะลิด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์และเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

| สารสกัดข้าวหอมมะลิ | ปริมาณคาร์โบฟูแรน (มิลลิกรัมต่อลิตร) |             |
|--------------------|--------------------------------------|-------------|
|                    | ไบโอเซนเซอร์                         | HPLC        |
| ข้าวหอมมะลิ # 1    | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 2    | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 3    | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 4    | 1.52 ± 0.08                          | 1.39 ± 0.01 |
| ข้าวหอมมะลิ # 5    | 1.43 ± 0.20                          | 1.40 ± 0.01 |
| ข้าวหอมมะลิ # 6    | 1.57 ± 0.31                          | 1.40 ± 0.02 |
| ข้าวหอมมะลิ # 7    | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 8    | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 9    | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 10   | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 11   | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 12   | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 13   | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 14   | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 15   | ND.                                  | ND.         |
| ข้าวหอมมะลิ # 16   | ND.                                  | ND.         |

ND. = non detection