บทที่ 2
แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

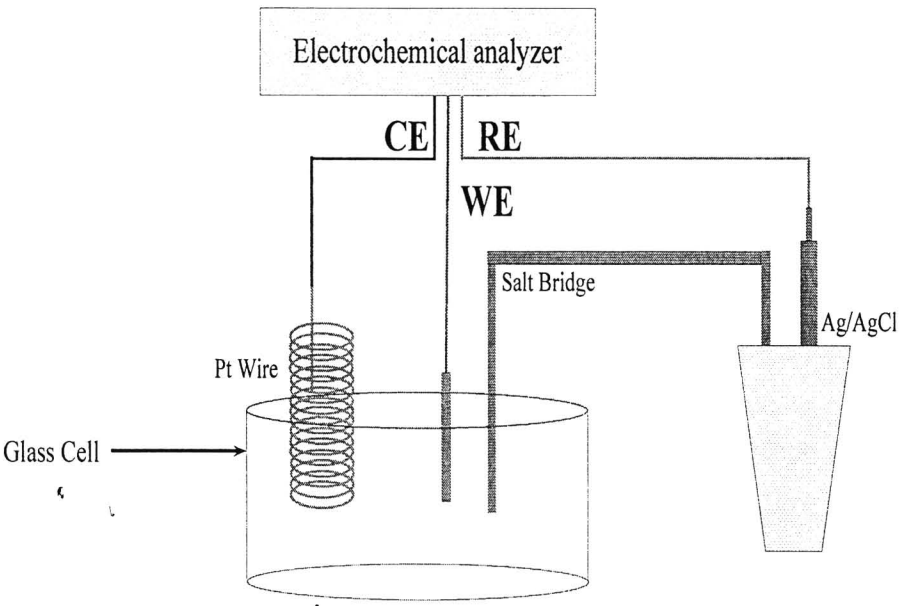
2.1 แนวคิดทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย

2.1.1 เทคนิคโวลแทมเมทรี

โวลแทมเมทรี เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า ที่ข้อมูลของการวิเคราะห์ได้จากความสัมพันธ์ของการเกิดกระแส กับการให้พลังงานศักย์แก่วงจร ภายใต้สภาวะการทดลองที่เกิดกระบวนการน้อนฟาราเดอิก หรือเกิดโพลาไรเซชันขึ้นที่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน การเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างจำเป็นต้องอาศัยพลังงานศักย์จากภายนอก วิธีการวิเคราะห์โวลแทมเมทรี มีบทบาทสำคัญมากสำหรับการศึกษากระบวนการเกิดออกซเดชัน หรือรีดักชันของสารในตัวกลางต่างๆ รวมทั้งกระบวนการดูดซับสาร และกลไกการส่งผ่านอิเล็คตรอนที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ทำให้วิเคราะห์ไอออนต่างๆ ได้ทั้งสารละลายอนินทรีย์ และสารละลายอินทรีย์

การวิเคราะห์ด้วยหลักการโวลแทมเมทรี ไม่ว่าเทคนิควิธีการวิเคราะห์แบบใด ย่อมประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนของเซลล์เคมีไฟฟ้า และส่วนของเครื่องมือในการควบคุมสัญญาณไฟฟ้า เซลล์เคมีไฟฟ้าในการทำโวลแทมเมทรี มักเรียกเป็น เซลล์โวลแทมเมทรีเพราะมีความแตกต่างไปจากเซลล์เคมีไฟฟ้าธรรมดาอยู่บ้าง ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป สำหรับเครื่องมือในการควบคุมสัญญาณไฟฟ้า มักประกอบไปด้วยอุปกรณ์ในการควบคุมศักย์ที่ให้แก่ขั้วไฟฟ้า เรียกโพเทนชิออสแตท (potentiostat) และอุปกรณ์ในการอ่านค่ากระแสของวงจร อาจเรียกส่วนของการควบคุมสัญญาณไฟฟ้านี้ว่า โวลแทมเมตริก อะนาไลเซอร์ (voltammetric analyzer) ในเครื่องมือของการทำโวลแทมเมทรีที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่างๆ ยังมักประกอบด้วยอุปกรณ์บันทึกแปลผลข้อมูล

เซลล์โวลแทมเมทรี มักใช้เรียกเซลล์เคมีไฟฟ้าในกลุ่มการวิเคราะห์โวลแทมเมทรี ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า และสารละลายอิเล็คโทรไลต์ ขั้วไฟฟ้ามักประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าใช้งาน และขั้วไฟฟ้าช่วย หรือ ขั้วไฟฟ้าร่วม จุ่มอยู่ในสารละลายที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสารอิเล็คโตรไลต์ที่ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา มักเรียกสารอิเล็คโทรไลต์ช่วย หรือเกื้อหนุน (supporting electrolyte) โดยสารอิเล็คโทรไลต์มักใช้ในปริมาณที่มากเกินพอ ดังรูปที่ 2.1

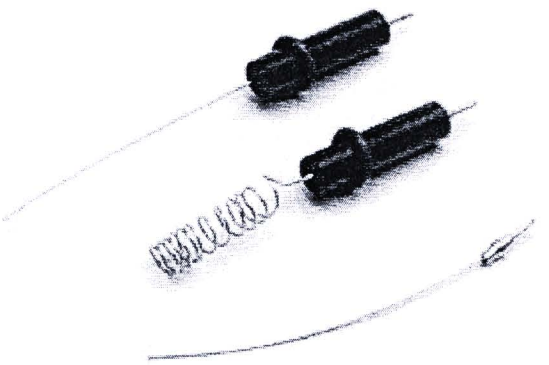


รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของเซลล์โวลแทมเมทรี

ขั้วไฟฟ้าของเซลล์เคมีไฟฟ้า ประกอบไปด้วย

1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ต้องมีค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ตลอดการทดลอง และควบคุมค่าศักย์ของขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วย แม้ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล จะเคยถูกจัดเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่ใช้ได้ทั่วไป แต่ด้วยเหตุผลด้านความเป็นพิษและผลต่อมลพิษของปรอท ทำให้ขั้วซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ เป็นที่ยอมรับในการเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแทน

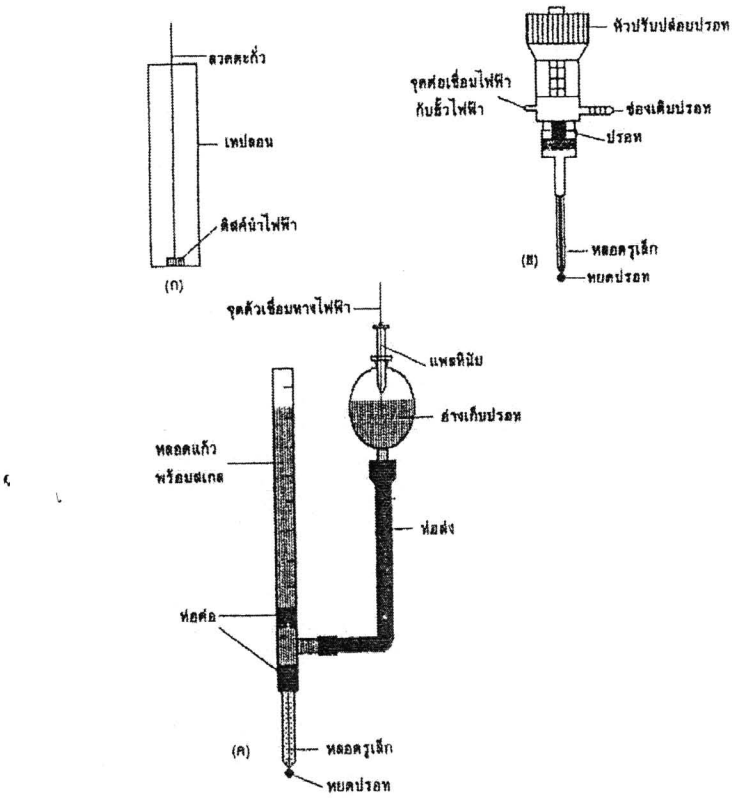
2) ขั้วไฟฟ้าร่วม หรือขั้วไฟฟ้าช่วย จัดเป็นขั้วไฟฟ้าขั้วที่สามของวงจรโวลแทมเมทรีที่มีคุณลักษณะเฉพาะ คือ ทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี เป็นขั้วที่รับพลังงานไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ส่งต่อผ่านสารละลายไปยังขั้วไฟฟ้าใช้งาน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างที่ขั้วไฟฟ้าจุ่มอยู่โดยขั้วไฟฟ้าร่วมนี้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้น ในขณะเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างระหว่างการวิเคราะห์ ขั้วไฟฟ้ามักมีพื้นที่ผิวมากๆ เพื่อให้การนำไฟฟ้าเป็นไปได้ดี ลดการเกิดศักย์จากโอห์ม (E = iR) ของวงจร ขดลวดแพลทินัมหรือแผ่นแพลทินัม หรืออ่างปรอท มักใช้เป็นขั้วไฟฟ้าร่วมได้



รูปที่ 2.2 ลักษณะของขั้วไฟฟ้าช่วย (แพลตินัม) แบบต่างๆ

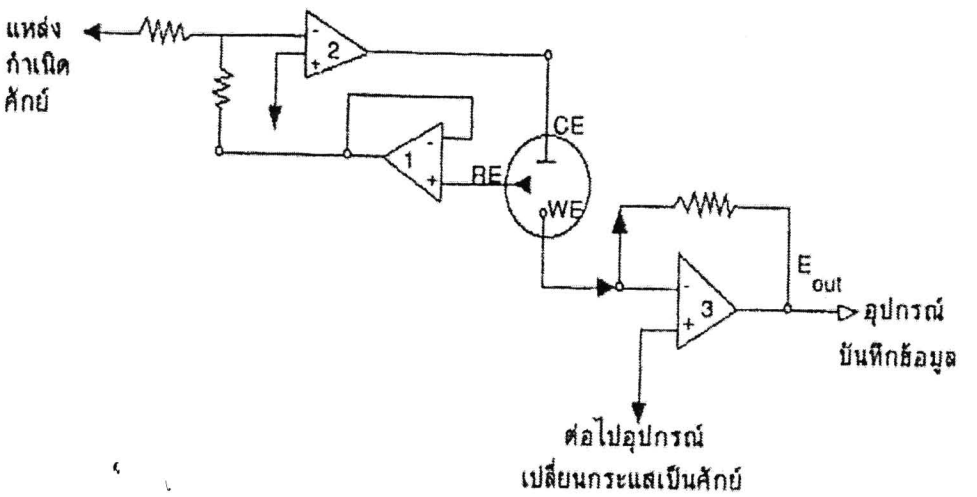
ที่มา http://nkw.ac.th

3) ขั้วไฟฟ้าใช้งาน จะต้องมีขนาดของขั้วไฟฟ้าที่เล็ก ทั้งนี้เพื่อให้พื้นผิวของขั้วไฟฟ้ามีการสัมผัสกับสารตัวอย่างมีน้อย เกิดสภาวะของโพลาไรเซชันตลอดการวิเคราะห์ มักเป็นโลหะเฉื่อย เช่น แพลทินัม หรือทอง ไพโรไลต์กราไฟต์ หรือกลาสสิคาร์บอน และปรอท รูปแบบของขั้วไฟฟ้าที่ผลิตออกสู่ท้องตลาดมีได้แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของขั้วไฟฟ้านั้นเพื่อให้เหมาะสมแก่การวิเคราะห์ทั่วไป หรือการนำไปประยุกต์ใช้ กับการวิเคราะห์อื่นได้แก่ ขั้วไฟฟ้าที่ส่วนประกอบอัดเป็นแผ่นเล็กๆ เรียก ดิสค์อิเล็คโทรด (Disk electrode) ขั้วไฟฟ้าปรอทแขวนตัว (HMDE) และขั้วไฟฟ้าหยดปรอท (DME) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ก) 2.3 (ข) และ 2.3 (ค) ตามลำดับ



รูปที่ 2.3 ขั้วไฟฟ้าแบบต่างๆ (ก) ดิสค์อิเล็คโทรด (ข) ขั้วไฟฟ้าหยดปรอทแขวนลอย (HMDE) (ค) ขั้วไฟฟ้าหยดปรอท (DME)
ที่มา: เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2549

โวลแทมเมตริก อะนาไลเซอร์ เป็นส่วนประกอบของเครื่องมือวิเคราะห์ทางโวลแทมเมทรี ที่ต่อเข้ากับเซลล์โวลแทมเมทรี เดิมที่มีเพียงการทำโพลาโรกราฟีเครื่องมือนี้ถูกเรียกว่าโพลาโรกราฟ ซึ่งอาจเขียนแทนเป็นวงจรไฟฟ้าง่ายๆ ที่มีการควบคุมศักย์ไฟฟ้าด้วยการปรับเลื่อนเข็มไปบนลวดความต้านทานของวงจรที่มีขั้วไฟฟ้า 2 หรือ 3 ขั้ว ต่อเชื่อมอยู่ ปัจจุบันโวลแทมเมทริกอะนาไลเซอร์ มีวิวัฒนาการแตกต่างจากเดิมมากเช่นเดียวกับเครื่องโพเทนชิออมิเตอร์ เพียงแต่ในวงจรการทำโวลแทมเมทรีต้องใช้ Op amp ถึงสามวงจรต่อเชื่อมกัน และใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ดังวงจรในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ผังแสดงวงจรโวลแทมเมทริกอะนาไลเซอร์ 1, 2, 3 แทน Op-amp
ที่มา: เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2549

การทำงานของผังวงจร Op amp อธิบายได้ดังนี้ เมื่อมีการให้พลังงานไฟฟ้าในรูปของศักย์แก่วงจร ศักย์ถูกส่งไปยัง Op amp (1) ซึ่งควบคุมศักย์ของขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE) มิให้เกิดการไหลของกระแสผ่านส่วนนี้ ผลลัพธ์ คือ Op amp (1) ถูกส่งไปยัง Op amp (2) เพื่อให้ครบวงจรไฟฟ้า โดยที่ Op amp (2) มีกระแสไหลระหว่างขั้วไฟฟ้าช่วย (CE) กับขั้วไฟฟ้าใช้งาน (WE) ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีของสารที่ต้องการวิเคราะห์ขึ้นที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ขณะเดียวกันส่วนของ Op amp (2) ก็ช่วยรักษาระดับความต่างศักย์ระหว่าง RE และ WE กระแสที่เกิดขึ้นจากการดำเนินไปของปฏิกิริยาของสารที่ต้องการวิเคราะห์ถูกส่งไปยัง Op amp (3) ซึ่งต่อกับเครื่องบันทึกผลในการบันทึก หรือสร้างกราฟของค่าศักย์ที่ให้กับวงจร กับกระแสที่เปลี่ยนแปลงไป

2.1.2 ความสำคัญของคอเลสเตอรอล

1) คอเลสเตอรอล (Cholesterol)

คอเลสเตอรอลเป็นทั้งสารสเตอรอยด์ (steroid) ลิพิด (lipid) และแอลกอฮอล์ พบในผนังเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ คอเลสเตอรอลส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกาย จะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไขสันหลัง (spinal cord) สมอง และผนังหลอดเลือดแดง (atheroma) คอเลสเตอรอลมีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

ร่างกายใช้คอเลสเตอรอลเป็นสารเบื้องต้นในการสร้างฮอร์โมนเพศทุกชนิด สร้างน้ำดี สร้างสารสเตอรอลที่อยู่ใต้ผิวหนังให้เป็นเป็นวิตามินดีเมื่อโดนแสงแดด คอเลสเตอรอลจะพบมากในไข่แดง เครื่องในสัตว์ และอาหารทะเลค่อนข้างสูง ร่างกายสามารถสังเคราะห์เองได้แต่ไม่เพียงพอกับความต้องการ การรับประทานกรดไขมันที่จำเป็นโดยเฉพาะกรดไลโนเลอิกในปริมาณที่พอเพียงและเลี่ยงอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง บวกกับการออกกำลังกาย จะช่วยลดความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดอุดตัน สาเหตุของการเกิดโรคหัวใจและอัมพาต

2) การจำแนกประเภทของคอเลสเตอรอล

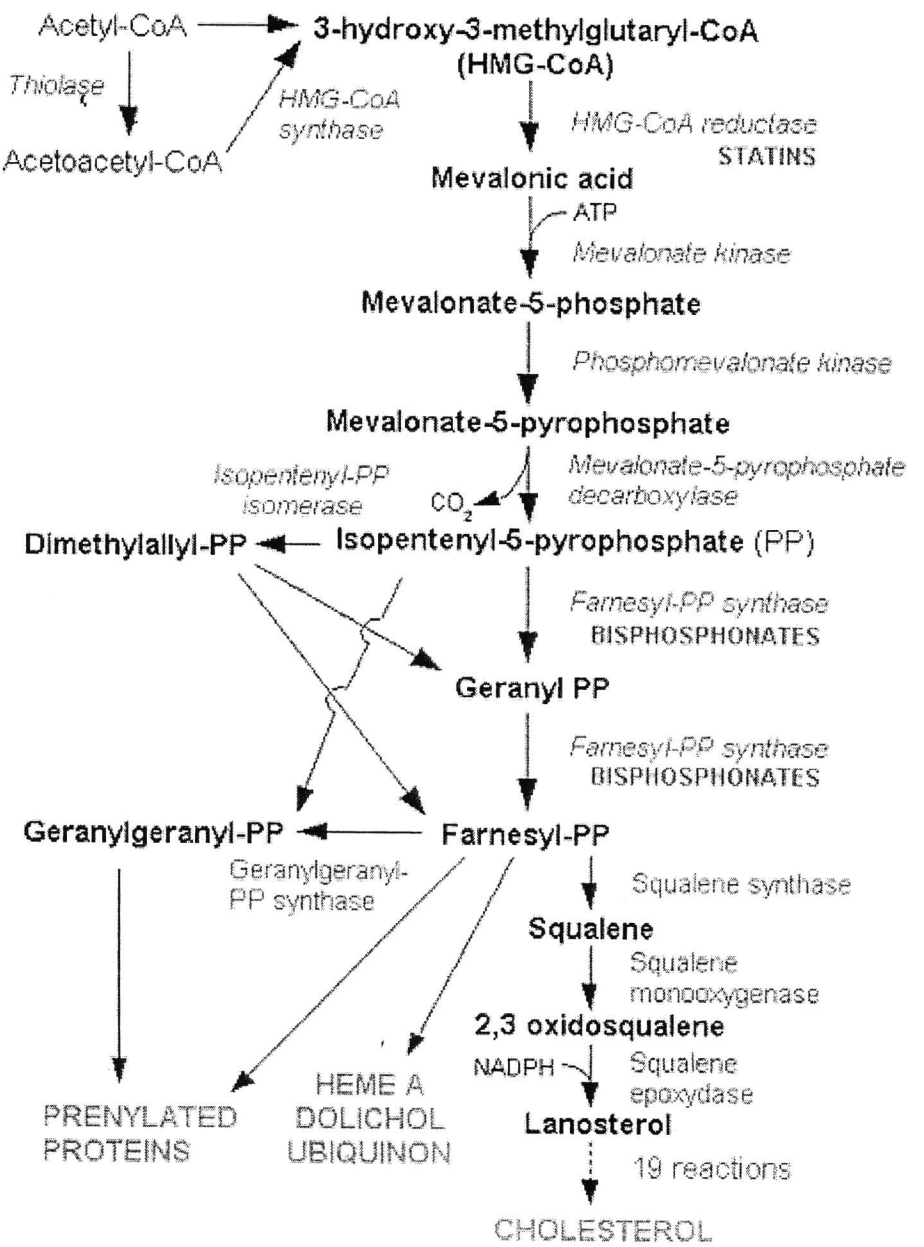
คอเลสเตอรอลเป็นกลุ่มไขมันที่เป็นสารไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่ละลายน้ำ คอเลสเตอรอลเป็นสิ่งจำเป็นต่อชีวิต เนื่องจากร่างกายต้องใช้เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของผนังเซลล์ และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮอร์โมน เช่น estrogen progesterone testosterone aldosterone และ cortisol นอกจากนั้นคอเลสเตอรอลยังใช้ในการสร้างวิตามินดี และน้ำดีสำหรับย่อยไขมันในอาหาร เป็นต้น ในระบบหมุนเวียนโลหิต คอเลสเตอรอลจะถูกหุ้มด้วยสาร lipoproteins ซึ่งจะทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลไปตามกระแสโลหิตเพื่อส่งไปยังเซลล์ต่างๆ เพื่อนำไปใช้งาน lipoproteins ที่หุ้มคอเลสเตอรอลมี 2 ชนิด คือ Low density lieoprotein (LDL) และ High density Lipoprotein (HDL)

Low density lieoprotein (LDL)จัดเป็นไขมันที่ทำให้เกิดการสะสมของไขมันในผนังของหลอดเลือดแดงทั้งร่างกาย เช่น สมอง (เกิดอัมพาต) หัวใจ (เกิดโรคหัวใจขาดเลือด) ไต (เกิดไตวาย) อวัยวะเพศ (หย่อนสมรรถภาพทางเพศ) เป็นต้น พบว่าความผิดปกติเหล่านี้สัมพันธ์กับระดับ Total cholesterol และ LDL-C อย่างมาก หากมีไขมันชนิดนี้ในเลือดสูงก็จะไปเกาะผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดพอกหนาขึ้นจนความยืดหยุ่นของหลอดเลือดเสียไปหลอดเลือดจะตีบแคบลงทำให้การไหลเวียนเลือดไม่สะดวกจึงเสี่ยงต่อการเกิดโรคเส้นเลือดตีบตันได้มาก ระดับปกติในเลือดไม่ควรเกิน 130 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

High density Lipoprotein (HDL) ตรงข้ามกับ LDL-C ไขมัน HDL-C ช่วยนำเอาไขมันที่สะสมอยู่ตามผนังหลอดเลือดออกมา แต่ทำงานช้ากว่า LDL-C เสมอ ระดับไขมัน HDL-C ต่ำจะเสี่ยงต่อโรคหัวใจขาดเลือด ในทางกลับกันหากยิ่งสูงยิ่งดีช่วยป้องกันโรคนี้ เราสามารถเพิ่ม HDL-C ให้สูงได้ด้วย การหยุดบุหรี่ ออกกำลังกายแบบแอโรบิคสม่ำเสมอ ดื่มแอลกอฮอล์จำนวนเล็กน้อย HDL-C นี้ ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมเช่นกัน ดังนั้นบางรายทำอย่างไร HDL-C ก็ไม่สูงขึ้น HDL มีหน้าที่นำคอเลสเตอรอลจากกระแสเลือดไปทำลายที่ตับ ดังนั้นถ้าระดับ HDL ในเลือดสูงจะทำให้อัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตีบน้อยลง ระดับปกติในเลือดผู้ชายมากกว่า 35 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผู้หญิงมากกว่า 45 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

3) การสังเคราะห์และนำเข้าสู่ร่างกาย

คอเลสเตอรอลมีสารตั้งต้นการสังเคราะห์มาจากอะซิทิล โคเอ (acetyl CoA) โดยผ่าน เอชเอ็มจี-โคเอ รีดักเทส พาทเวย์ (HMG-CoA reductase pathway) การผลิตคอเลสเตอรอลทั้งหมดในร่างกายประมาณ 20-25 % (ซึ่งผลิตได้วันละ 1 กรัม) เกิดขึ้นในตับ ส่วนอื่นของร่างกายที่ผลิตรองลงมาได้แก่ ลำไส้เล็ก (intestines) ต่อมหมวกไต (adrenal gland) อวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organ)



รูปที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลใน HMG-CoA reductase pathway

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:HMG-CoA_reductase_pathway.png

4) คุณสมบัติของคอเลสเตอรอล

คอเลสเตอรอลละลายในน้ำได้น้อยมาก เพราะโมเลกุลของมันมีส่วนที่เป็นไขมันอยู่มาก ดังนั้นการเคลื่อนย้ายในกระแสเลือดจึงต้องเกาะตัวไปกับไลโปโปรตีน (lipoprotein) ไลโปโปรตีนขนาดใหญ่ที่สุด ที่ทำหน้าที่ขนคอเลสเตอรอลและไขมันอื่นๆ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) จากลำไส้เล็กไปยังตับชื่อ ไคโลไมครอน (chylomicron) ในตับอนุภาค ไคโลไมครอนจะจับตัวกับ ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลแล้วเปลี่ยนเป็น ไลโปโปรตีน ความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein-LDL) แล้วจะเคลื่อนย้ายไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลไปยังเซลล์อื่นๆ ของร่างกาย ส่วนไลโปโปรตีน-ความหนาแน่นสูง (High density lipoprotein-HDL) จะทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลจากเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกายกลับมาที่ตับเพื่อกำจัด ในผู้ที่มีสุขภาพดีอนุภาคไลโปโปรตีน-ความหนาแน่นต่ำจะมีขนาดใหญ่และจำนวนน้อยในทางตรงกันข้าม ถ้าไลโปโปรตีน-ความหนาแน่นต่ำมีขนาดเล็กแต่จำนวนมาก พบว่ามันส่งเสริมให้เกิดโรคหลอดเลือดตีบ (atheroma) พบว่าถ้าร่างกายมีไลโปโปรตีน-ความหนาแน่นสูง ขนาดใหญ่จำนวนมากจะมีสุขภาพดี ในทางตรงกันข้ามถ้ามีไลโปโปรตีน-ความหนาแน่นสูงขนาดใหญ่จำนวนน้อยจะส่งเสริมให้เป็นโรคหลอดเลือดตีบง่ายขึ้น

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีกลุ่มของนักวิจัยหลายกลุ่มด้วยกันที่ได้ออกแบบคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์ขึ้นมาโดยใช้เทคนิคการตรวจวัดที่ต่างกันไป การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้านับได้ว่าเป็นแนวทางหนึ่ง ซึ่งจัดได้ว่าเป็นวิธีการที่ง่าย ให้ความไวที่สูง และประกอบกับราคาเครื่องมือที่มีราคาไม่แพงนัก สามารถพกพาออกภาคสนามได้ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้เลือกการตรวจวัดด้วยเคมีไฟฟ้า การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้ามีหลายเทคนิคด้วยกันที่นำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดคอเลสเตอรอล เช่น เทคนิคอิมพิแดนซ์ (electrochemical impedance) (Arya and et. al., 2007: 210) เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (cyclic voltammetry) (Zhou and et. al., 2006: 5227) เทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี (amperometry) (Yao and et. al., 1998: 67; Vidal and et. al., 2004: 88; Charpentier and et. al., 1995: 89; Nakaminami and et. al., 1999: 1068; และ Li and et. al., 2003: 1031) คณะผู้วิจัยได้เลือกเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรีเนื่องจากให้สัญญาณการตรวจวัดที่มีความไวสูง (high sensitivity) และใช้เวลาในการตรวจวัดน้อย

จากการสืบค้นขั้วไฟฟ้าที่ใช้สำหรับเป็นฐานตรึงเอนไซม์คอเลสเตอรอลออกซิเดสมีหลากหลายชนิดด้วยกัน เช่น platinum electrode (Vidal and et. al., 2002: 537; Ozer and et. al., 2007: 262; และ Devadoss and et.al., 2005: 7393) glassy carbon paste electrode (Nakaminami and

et. al., 1997: 2367) screen-printed rhodium-graphite electrode (Shumyantseva and et. al., 2005: 217) screen-printed gold electrode (Shen and Liu, 2007: 417) silicon substrate electrode (Song and et. al., 2006: 7197) indium tin oxide electrode (Arya and et. al., 2007: 210) และ gold electrode (Nakaminami and et. al., 1999: 1068; และ Aravamudhan and et. al., 2007: 2289) จากขั้วไฟฟ้าที่ได้กล่าวข้างต้นเป็นขั้วไฟฟ้าที่มีราคาแพงยกเว้นขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode) จัดได้ว่าเป็นขั้วไฟฟ้าที่มีราคาถูกที่สุดจากขั้วไฟฟ้าที่ได้กล่าวข้างต้น แต่ต้องมีเครื่องสำหรับการสร้างขั้วไฟฟ้า ซึ่งมีราคาสูงมากประมาณล้านกว่าบาท หรือสามารถสั่งซื้อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนนี้ได้จากต่างประเทศมีราคาประมาณ 20 บาทต่อขั้วไฟฟ้า (ยังไม่ได้รวมค่านำเข้าประเทศ) และเป็นขั้วไฟฟ้าที่ใช้แล้วทิ้งดังนั้นจึงจัดได้ว่ามีราคาแพงสำหรับคณะผู้วิจัย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์นำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานเพื่อลดต้นทุนในการซื้อขั้วไฟฟ้า จากการสืบค้นงานวิจัยทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์บนฐานของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนต้นทุนต่ำ โดยใช้เทคนิคแอมเปอร์โรเมทรีเป็นระบบการตรวจวัดสัญญาณ