บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

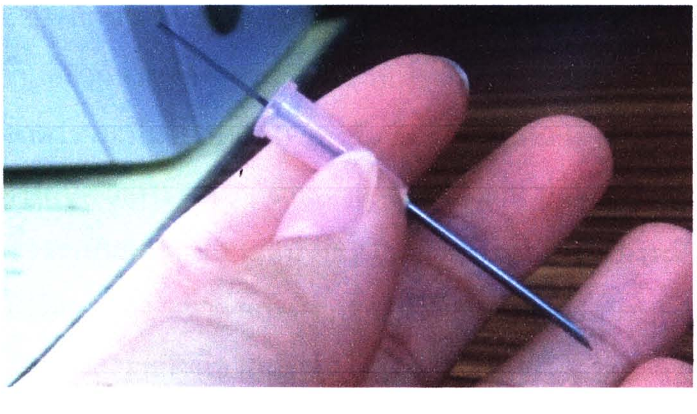
3.1.1 ศึกษาการเตรียมขั้วไฟฟ้า สำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

ในงานวิจัยได้เลือกจากการใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm เนื่องจากมีราคาถูกและสามารถหาได้ง่าย ดังนั้นจึงนำไส้ดินสอยี่ห้อต่างๆ 5 ยี่ห้อ มาทดสอบคือ Rotring Pilot ‘Faber-Castrll Staedtler และ QuanTum และในแต่ละยี่ห้อได้นำไส้ดินสอชนิด HB และ 2B มาทำการทดสอบ และต่อขั้วไฟฟ้าโดยผสมสารละลายกาว Epoxy A กับ B ในอัตราส่วน 1:1 นำไส้ดินสอใส่ลงใน micro-pipette tip ใส่สารผสม Epoxy ลงใน micro-pipette tip ที่มีไส้ดินสออยู่ และทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เพื่อให้สารผสมแข็งตัว จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้ (ดังรูปที่ 3.1) มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี โดยใช้เครื่อง Electrochemical Analyzer ด้วยขั้นตอนดังนี้

1) ใส่สารละลายผสมของ 10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 2 mL ที่ละลายในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในเซลล์

2) ต่อขั้วไฟฟ้าทำงาน (WE; ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอ) ขั้วไฟฟ้าช่วย (CE; ขั้วไฟฟ้าลวดแพลทินัม) และขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE; ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์) จุ่มลงในเซลล์

3) ทำการตั้งพารามิเตอร์เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีดังนี้ อัตราการสแกน 100 mV/s และช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่สแกนระหว่าง -0.2 ถึง 0.7 V



รูปที่ 3.1 ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอ

3.1.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

3.1.2.1 ศึกษา $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อ H_2O_2 โดยสังเกตจากสีสารละลายที่เปลี่ยนแปลงในขวด vial ทั้ง 5 ขวด จากการเติม 0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 1 mL (ความเข้มข้นในปริมาตรรวมเป็น 0.02 mM) และ horseradish peroxidase (HRP) เอนไซม์ 10 μL เท่ากันทั้ง 5 ขวด พร้อมทั้งเติม 1 M H_2O_2 และน้ำปราศจากไอออน (H_2O) ให้ปริมาตรต่างกันตามตารางที่ 3.1 และสังเกตการเปลี่ยนแปลงพร้อมถ่ายภาพเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสี

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรของสารละลายที่เติมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อ H_2O_2

สารที่เติม	Vial ขวดที่				
	1	2	3	4	5
1 M H_2O_2 (mL)	0 (0 mM)	1 (0.2 mM)	2 (0.4 mM)	3 (0.6 mM)	4 (0.8 mM)
H_2O (mL)	4	3	2	1	0

3.1.2.2 ศึกษา $K_3Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อ H_2O_2 โดยสังเกตจากสีที่เปลี่ยนแปลงในขวด vial ทั้ง 5 ขวด จากการเติม 0.1 M $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 1 mL (ความเข้มข้นในปริมาตรรวมเป็น 0.02 mM) และ HRP เอนไซม์ 10 μL เท่ากันทั้ง 5 ขวด พร้อมทั้งเติม 1 M H_2O_2 และน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรต่างกันตามตารางที่ 3.1 และสังเกตการเปลี่ยนแปลงพร้อมถ่ายภาพเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสี

3.1.2.3 ศึกษาก่อนและหลังการเติม HRP เอนไซม์ ที่มีผลต่อ $K_4Fe(CN)_6$ mediator โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.2.1 เริ่มจากการเติม 0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 1 mL (ความเข้มข้นในปริมาตรรวมเป็น 0.02 mM) เท่ากันทั้ง 5 ขวด เติม 1 M H_2O_2 และน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรต่างกันตามตารางที่ 3.1 และสังเกตการเปลี่ยนแปลงพร้อมถ่ายภาพเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสี ซึ่งจะเป็นผลของก่อนเติม HRP เอนไซม์ จากนั้นทำการเติม HRP เอนไซม์ปริมาตร 10 μL ลงไปในขวดทั้ง 5 ขวด และสังเกตการเปลี่ยนแปลงพร้อมทั้งถ่ายภาพเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสี ก่อนเติมและหลังเติม HRP เอนไซม์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246134
เลขเรียกหนังสือ

3.1.2.4 ศึกษา $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อคอเลสเตอรอล โดยเริ่มจากการเติม 0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 40 μL (ความเข้มข้นในปริมาตรรวมเป็น 0.01 mM) และ Cholesterol Oxidase (ChOx) เอนไซม์ ความเข้มข้น 3.1279 Unit ปริมาตร 10 μL เท่ากันทั้ง 5 ขวด จากนั้นเติม 10 mM คอเลสเตอรอล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ให้ได้ปริมาตรตามตารางที่ 3.2 จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงพร้อมถ่ายภาพ

ตารางที่ 3.2 ปริมาตรของสารที่เติมเพื่อทดสอบ $K_4Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อคอเลสเตอรอล

สารที่เติม	**Tube ที่**			
	1	**2**	**3**	**4**
10 mM คอเลสเตอรอล (μL)	0 (0.0 mM)	50 (1.67 mM)	100 (3.33 mM)	200 (6.67 mM)
10% Triton-X 100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 (μL)	250	200	150	50

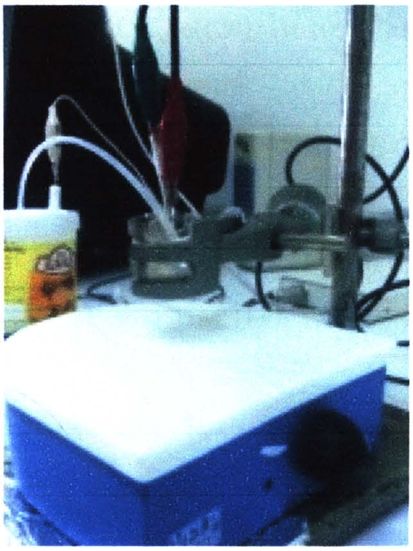
3.1.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอลด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

3.1.3.1 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของ $K_3Fe(CN)_6$ โดยตรวจวัดด้วย 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ใน 10% Triton-X 100 ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ดังนี้

1) ใส่สารละลาย 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 2 mL ที่ละลายในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 10% Triton-X 100 ในสารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในเซลล์

2) ติดตั้งอุปกรณ์และต่อขั้วไฟฟ้า WE (ไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1) CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ ดังรูปที่ 3.2

3) ทำการตั้งพารามิเตอร์เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีดังนี้ อัตราการสแกน 100 mV/s และช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่สแกนระหว่าง -0.2 ถึง 0.8 V



รูปที่ 3.2 การติดตั้งอุปกรณ์ และขั้วไฟฟ้า

3.1.3.2 ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 10% Triton-X 100 ในสารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

3) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -1.0 V ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี เมื่อ baseline คงที่ เติม 20 µL ของ 1 M H_2O_2 ลงในเซลล์ และเมื่อกระแสเริ่มคงที่ให้เติมสารละลายเพิ่มอีก 2 ครั้ง จะทำให้กระแสเกิดขึ้นแบบขั้นบันได บันทึกผลการทดลอง

4) เปลี่ยนสารละลาย และทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นทำตามข้อ 1)-3) โดยเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าในข้อ 3) เป็น -0.9 -0.8 -0.7 -0.6 -0.5 -0.4 -0.3 -0.2 -0.1 และ 0 V ตามลำดับ

3.1.3.3 ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัด H_2O_2 และมี $K_4Fe(CN)_6$ mediator เป็นตัวช่วยเพิ่มสัญญาณ ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

1) ใส่ 20 mM $K_4Fe(CN)_6$ ใน 10%Triton-X 100 ในสารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

3) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -1.0 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่เติม 20 µL ของ 1 M H_2O_2 ลงในเซลล์ และเมื่อกระแสเริ่มคงที่ให้เติมสารละลายเพิ่มอีก

4) ทำตามข้อ 1)-3) โดยเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าในข้อ 3) เป็น -0.9 -0.8 -0.7 -0.6 -0.5 -0.4 -0.3 -0.2 -0.1 และ 0 V ตามลำดับ

3.1.3.4 ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเตอรอล ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

3) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.7 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่เติม 600 µL ของ 10 mM คอเลสเตอรอลลงในเซลล์

4) ทำตามข้อ 1)-3) โดยเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าในข้อ 3) เป็น -0.6 -0.5 -0.4 -0.3 -0.2 -0.1 และ 0 V ตามลำดับ

3.1.3.5 ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเตอรอลร่วมกับ ChOx และมี $K_4Fe(CN)_6$ mediator เป็นตัวช่วยเพิ่มสัญญาณ ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ใส่ 50 mM $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 40 µL และ ChOx ปริมาตร 10 µL ลงในเซลล์

3) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

4) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.7 V ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่เติม 600 μL ของ 10 mM คอเลสเตอรอลลงในเซลล์

5) ทำตามข้อ 1)-4) โดยเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าในข้อ 4) เป็น -0.6 -0.5 -0.4 -0.3 -0.2 -0.1 และ 0 V ตามลำดับ

3.1.3.6 ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโตรไลต์ที่มีผลต่อการตรวจวัดคอเลสเตอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

3) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.7 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่เติม 600 μL ของ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในเซลล์

4) ทำตามข้อ 1)-3) โดยเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าในข้อ 3) เป็น -0.6 -0.5 -0.4 -0.3 -0.2 -0.1 และ 0 V ตามลำดับ

3.1.3.7 ศึกษาหาความเข้มข้นของ mediator ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเตอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ใส่ ChOx ปริมาตร 10 μL ลงในเซลล์

3) ใส่ 50 mM $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 10 μL ลงในเซลล์

4) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

5) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.3 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่เติม 600 μL ของ 10 mM คอเลสเตอรอลลงในเซลล์

6) ทำตามข้อ 1)-5) โดยเปลี่ยนปริมาตรของ 50 mM $K_4Fe(CN)_6$ ในข้อ 3) เป็น 20 40 60 และ 80 μL ตามลำดับ

3.1.3.8 ศึกษาหาความสัมพันธ์ของช่วงที่เป็นเส้นตรง ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ใส่ ChOx ปริมาตร 10 μL ลงในเซลล์

3) ใส่ 50 mM $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 60 μL ลงในเซลล์

4) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

5) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.3 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่เติม 10 mM คอเลสเตอรอล โดยที่ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลสุดท้ายเท่ากับ 0.00001 mM ลงในเซลล์

6) ทำตามข้อ 1)-5) โดยเปลี่ยนปริมาตรของ 10 mM คอเลสเตอรอล ในข้อ 3) โดยมีความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลสุดท้ายเท่ากับ 0.0001 0.001 0.01 0.1 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 mM ตามลำดับ

3.1.3.9 ศึกษาหาขีดจำกัดในการตรวจวัด ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ใส่ ChOx ปริมาตร 10 μL ลงในเซลล์

3) ใส่ 50 mM $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 60 μL ลงในเซลล์

4) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

5) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.3 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด วิเคราะห์ซ้ำ 30 ครั้ง

3.1.4 การวิเคราะห์คอเลสเตอรอลในตัวอย่างอาหาร

3.1.4.1 การเตรียมตัวอย่างนม

1) ปิเปตนมปริมาตร 2 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง

2) เติม Methanol ปริมาตร 3 mL

3) นำไปแยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที

4) นำส่วนที่แยกได้เป็นของเหลวสีใสชั้นบนมาระเหยให้แห้ง

5) ทำการปรับปริมาตร 5 mL ด้วย 10%TritonX-100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5

3.1.4.2 วิเคราะห์หาคอเลสเตอรอลในตัวอย่างนม ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี โดยนำขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอที่เลือกได้จากข้อ 3.1.1 มาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 mL ลงในเซลล์

2) ใส่ ChOx ปริมาตร 10 μL ลงในเซลล์

3) ใส่ 50 mM $K_4Fe(CN)_6$ ปริมาตร 60 μL ลงในเซลล์

4) ติดตั้งอุปกรณ์ และต่อขั้วไฟฟ้า WE CE และ RE จุ่มลงในเซลล์ พร้อมใส่แท่งแม่เหล็กและกวนตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 3.2

5) ทำการให้ศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าทำงาน -0.3 V แล้วให้เครื่องเริ่มตรวจวัด เมื่อ baseline คงที่ เติมตัวอย่างนม 200 μL และคอเลสเตอรอลความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 50 μL ลงในเซลล์

6) ทำตามข้อ 1)-5) โดยเปลี่ยนปริมาตรของ 10 mM คอเลสเตอรอล ในข้อ 5) เท่ากับ 100 150 และ 200 μL ตามลำดับ

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1) เครื่องวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Analyzer) รุ่น 1230A ยี่ห้อ CH Instruments, Europe

2) เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง (Balance Analytical) รุ่น AG 204 ยี่ห้อ Mettler Toledo, Switzerland

3) เครื่องวัดความกรด-เบส (pH meter) รุ่น MP 220 ยี่ห้อ Mettler Toledo, Switzerland

4) เครื่องแมกเนตริกสเตอร์เลอร์ (Magnetic Stirrer) รุ่น mini ยี่ห้อ VELP Scientifica, Europe

5) ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10 100 และ1000 μL รุ่น

6) ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5 10 50 250 500 และ 1000 mL

7) บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 10 50 100 และ 500 mL

8) แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

9) หลอดหยด (Dropper)

10) ขวดน้ำกลั่น (Wash bottle)

11) ช้อนตักสาร (Spatula)

12) ขั้วไฟฟ้า (Electrodes)

WE: คาร์บอนจากไส้ดินสอที่สร้างขึ้น

RE: Silver/silver chloride (Ag/AgCl)

CE: Platinum (Pt)

3.3 สารเคมี

3.3.1 การสร้างขั้วไฟฟ้าใช้งานไส้ดินสอ

1) กาว Epoxy A กับ B

2) ไส้ดินสอ 2B และ HB ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm ยี่ห้อ Staedtler Rotring Pilot Faber-Castell และ QuanTum

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) Hydrogen peroxide; H_2O_2, MW = 34 g/mol, Density = 1.11 g/L, Assay 30%, AR Grade ผลิตโดย Merck Germany

2) Potassium chloride; KCl, MW = 74.55 g/mol ผลิตโดย Ajax Finechem Australia

3) Sodium phosphate monobasic dihydrate; $NaH_2PO_4.2H_2O$, MW = 156.01 g/mol ผลิตโดย Fluka

4) Sodium phosphate dibasic dodecahydrate; $Na_2HPO_4.12H_2O$, MW = 358.14 g/mol ผลิตโดย Fluka

5) Potassium hexacyanoferrate (II)3-hydrate; $K_4[Fe(CN)_6]$.3H2O, MW = 422.39 g/mol ผลิตโดย Riedel-De Haen

6) Potassium hexacyanoferrate (III); $K_3[Fe(CN)_6]$, MW = 329.26 g/mol ผลิตโดย Riedel-De Haen

7) Cholesterol Oxidase; 4.01mg solid; 39 unit/mg protein ผลิตโดย Sigma

8) Cholesterol; $C_{27}H_{46}O$, MW = 386.66 g/mol ผลิตโดย Sigma

9) Triton X-100, for molecular biology ผลิตโดย Sigma

10) Peroxidase from horseradish (HRP) (using pyrogallol) 19.7 mg solid; 254 Purpurogallin units/ mg solid ผลิตโดย Sigma

3.3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.3.1 เตรียมสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.1 M โดยชั่ง KCl 3.73 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ขวดวัดปริมาตร 500 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.2 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 0.05 M โดยชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ 1.950 g และ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 4.476 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเทสารละลายแต่ละชนิดลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL ทำการปรับ pH สารละลายเป็น 7.5 โดยการผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด ด้วยการวัดความเป็นกรด-เบนในหัววัดเครื่อง pH meter

3.3.3.3 เตรียมสารละลายผสม $K_4Fe(CN)_6$/ $K_3Fe(CN)_6$ ความเข้มข้น 10 mM โดยชั่ง $K_4Fe(CN)_6$ 0.0422 g และ $K_3Fe(CN)_6$ 0.0329 g ละลายด้วยสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.1 M เทใส่ขวดวัดปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.1 M

3.3.3.4 เตรียมสารละลาย $K_4Fe(CN)_6$ ความเข้มข้น 0.1 M โดยชั่ง $K_4Fe(CN)_6$ 0.4223 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ขวดวัดปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.5 เตรียมสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ ความเข้มข้น 0.1 M โดยชั่ง $K_4Fe(CN)_6$ 0.3292 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ขวดวัดปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.6 เตรียมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 1 M โดยปิเปตสารละลาย H_2O_2 ปริมาตร 0.978 mL ละลายด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 0.05 M เทใส่ขวดวัดปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 0.05 M

3.3.3.7 เตรียมสารละลายคอเลสเตอรอลความเข้มข้น 10 mM โดยชั่งคอเลสเตอรอล 0.0386 g ละลายด้วยสารละลาย 10% Triton X-100 ให้ความร้อนจนละลายแล้วทิ้งไว้ให้เย็น เทใส่ขวดวัดปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยสารละลาย 10% Triton X-100

3.3.3.8 เตรียมสารละลาย 10% Triton X-100 ปริมาตร 10 mL โดยปิเปตสารละลาย Triton X-100 ปริมาตร 1 mL ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 0.05 M เทใส่ขวดวัดปริมาตร 10 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 0.05 M