ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246134

รายงานการวิจัย
เรื่อง
การสร้างคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์ด้านนุ่มต่ำร่วมกับเครื่องเตรียมวัดทางอีไฟฟ้าแบบพกพา

ดร. อัญชนา ปรีชารมภ์ชัย
นศ. ดร. พิทักษ์ อยู่มี

พ.ศ. 2554
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

b00251394

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246134

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การสร้างคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์ต้นทุนต่ำร่วมกับเครื่องตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบพกพา

ดร.อัญชนา ปรีชาวรพันธ์

ผศ. ดร.พิทักษ์ อยู่มี

พ.ศ. 2554

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและเป็นไปตามวัตถุประสงค์ ทั้งนี้เกิดจากความร่วมมือของหลายฝ่ายดังนี้คือ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงครามที่ได้สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนสำหรับการทำวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงครามที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องแก้วสำหรับการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเคมี และนักศึกษา นางสาวธิดารัตน์ ปัญญาศรี ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

ดร.อัญชนา ปรีชาวรพันธ์

งานวิจัยเรื่อง การสร้างคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์ต้นทุนต่ำร่วมกับเครื่องตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแบบพกพา

ผู้วิจัย ดร.อัญชนา ปรีชาวรพันธ์ และ ผศ. ดร.พิทักษ์ อยู่มี

ปีที่วิจัย 2553

บทคัดย่อ

246134

ได้ทำการพัฒนาแอมเปอร์โรเมทริกคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์ต้นทุนต่ำโดยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานร่วมกับคอเลสเตอรอลออกซิเดสและโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต (II) เป็นตัวกลางการเกิดสัญญาณไฟฟ้า โดยศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี การตรวจวัดคอเลสเตอรอลวิเคราะห์ในสารละลายที่เติมด้วยคอเลสเตอรอลออกซิเดสเอนไซม์ และโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรต (II) สำหรับเป็นตัวกลางช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะของไบโอเซนเซอร์ พบว่ามีความไวเท่ากับ 0.105 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.1 ไมโครโมลาร์ ช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ และค่าความสัมพันธ์ R^2 = 0.991 จากการนำไปประยุกต์วิเคราะห์คอเลสเตอรอลในตัวอย่างนมพบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล เท่ากับ 0.3332 มิลลิโมลาร์

Title : Fabrication of a low cost cholesterol biosensor with a portable electrochemical detector

Author : Dr. Anchana Preechaworapun and Assist. Prof. Dr. Pitak Youmee

Year : 2010

Abstract

246134

A low cost amperometric cholesterol biosensor was developed using a pencil carbon working electrode with cholesterol oxidase (ChOx) and a $K_4Fe(CN)_6$ mediator. The pencil carbon electrodes were characterized with cyclic voltammetry. The cholesterol oxidase and the $K_4Fe(CN)_6$ mediator were modified in solution, where the presence of the $K_4Fe(CN)_6$ mediator enhanced the sensitivity and selectivity of biosensor. An analysis of the system showed a sensitivity of 0.105 μA mM^{-1}, a detection limit of 0.1 μM, a wide linear range from 0.1 μM to 1.5 mM, and a correlation coefficient of R = 0.991. This system was applied to investigate cholesterol in milk, measuring a cholesterol level of 0.3332 mM.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 แนวคิดทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย	3
2.1.1 เทคนิคโวลแทมเมทรี	3
2.1.2 ความสำคัญของคอเลสเตอรอล	7
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**12**
3.1 ระเบียบวิธีวิจัย	12
3.1.1 ศึกษาการเตรียมขั้วไฟฟ้า สำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า	12
3.1.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย	13
3.1.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า	14
3.1.4 การวิเคราะห์คอเลสเตอรอลในตัวอย่างอาหาร	18
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	19
3.3 สารเคมี	20
3.3.1 การสร้างขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอนจากไส้ดินสอ	20
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	20
3.3.3 การเตรียมสารละลาย	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	**22**
4.1 การเตรียมขั้วไฟฟ้า สำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า	22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย 24

4.2.1 เลือก mediator ระหว่าง $K_4Fe(CN)_6$ และ $K_3Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อ H_2O_2 24

4.2.2 การศึกษาผลของก่อนและหลังการเติมเอนไซม์ HRP ที่มีผลต่อ $K_4Fe(CN)_6$ mediator และ H_2O_2 26

4.2.3 การศึกษา $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อคอเลสเตอรอล 27

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า 28

4.3.1 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีไฟฟ้าของ $K_3Fe(CN)_6$ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี 28

4.3.2 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี 29

4.3.3 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัด H_2O_2 และมี $K_4Fe(CN)_6$ mediator เป็นตัวช่วยเพิ่มสัญญาณ ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี 31

4.3.4 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเตอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี 32

4.3.5 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเตอรอลร่วมกับ ChOx เอนไซม์ และมี $K_4Fe(CN)_6$ mediator เป็นตัวช่วยเพิ่มสัญญาณ ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี 34

4.3.6 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโตรไลต์ที่มีผลต่อการตรวจวัดคอเลสเตอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี 35

4.3.7 การศึกษาหาความเข้มข้นของ mediator ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเตอรอล ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมทรี 37

4.4 การหาความสัมพันธ์ของช่วงที่เป็นเส้นตรง 38

4.5 การวิเคราะห์คอเลสเตอรอลในตัวอย่าง 39

บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ **41**

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก ก รูปการทดลอง	44
ภาคผนวก ข การเผยแพร่งานวิจัย โปสเตอร์ RPUS และ full paper	47
ภาคผนวก ค การเผยแพร่งานวิจัยงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ REMSEA 2010	57
ประวัติผู้วิจัย	61

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
3.1 ปริมาตรของสารละลายที่เติมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อ H_2O_2	13
3.2 ปริมาตรของสารที่เติมเพื่อทดสอบ $K_4Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อคอเลสเตอรอล	14
4.1 ผลการทดลองที่ได้จากไส้ดินสอแต่ละยี่ห้อ	23

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของเซลล์โวลแทมเมทรี	4
2.2 ลักษณะของขั้วไฟฟ้าช่วย (แพลตินัม) แบบต่างๆ ที่มา: http://nkw.ac.th	5
2.3 ขั้วไฟฟ้าแบบต่างๆ (ก) ดิสค์อิเล็คโทรด (ข) ขั้วไฟฟ้าหยดปรอทแขวนลอย (ค) ขั้วไฟฟ้าหยดปรอท ที่มา: เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2549	6
2.4 ผังแสดงวงจรโวลแทมเมทรี อะนาไลเซอร์ 1, 2, 3 แทน Op-amp ที่มา: เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2549	7
2.5 กระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลใน HMG-CoA reductase pathway ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:HMG-CoA_reductase_pathway.png	9
3.1 ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้ดินสอ	12
3.2 การติดตั้งอุปกรณ์ และขั้วไฟฟ้า	15
4.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ 10 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ ที่ตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอชนิด 2B ของยี่ห้อต่างๆ (Rotring Pilot Faber-Castrll Staedtler และ QuanTum) ที่อัตราการสแกน 100 mV/s	23
4.2 สีของสารละลาย (A) 0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ และ (B) 0.1 M $K_3Fe(CN)_6$	25
4.3 สีของสารละลาย 0.02 mM $K_4Fe(CN)_6$ mediator และเอนไซม์ HRP หลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที โดยมีความเข้มข้นของ H_2O_2 ต่างกันดังนี้ (A) 0 mM (B) 0.2 mM (C) 0.4 mM (D) 0.6 mM และ (E) 0.8 mM	25
4.4 สีของสารละลาย 0.02 mM $K_3Fe(CN)_6$ mediator และเอนไซม์ HRP หลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สารละลายที่เติมตามตารางที่ 3.1 โดยมีความเข้มข้นของ H_2O_2 ต่างกันดังนี้ (A) 0 mM (B) 0.2 mM (C) 0.4 mM (D) 0.6 mM และ (E) 0.8 mM	26
4.5 สีของสารละลาย 0.02 mM $K_4Fe(CN)_6$ mediator ก่อนเติมเอนไซม์ HRP หลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที โดยมีความเข้มข้นของ H_2O_2 ต่างกันดังนี้ (A) 0 mM (B) 0.2 mM (C) 0.4 mM (D) 0.6 mM และ (E) 0.8 mM	27

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.6	การเปลี่ยนแปลงของสี $K_4Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อการเติมคอเลสเตอรอลที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อตั้งทิ้งไว้ 30 นาที โดยมีความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลต่างกันคือ (A) 0 mM (B) 1.67 mM (C) 3.33 mM และ (D) 6.67 mM	28
4.7	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของกระแสพื้น (10%Triton-X 100 + 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5) และ 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ละลายใน 10%Triton-X 100 + 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่อัตราการสแกน 0.1 V/s	29
4.8	แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัด H_2O_2 โดยมี 10% Triton-X 100 ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) เป็นอิเล็กโตรไลต์ ให้ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -1.0 ถึง 0.0 V	30
4.9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของ H_2O_2 และศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากรูปที่ 4.8 ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -1.0 ถึง 0.0 V	30
4.10	แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัด H_2O_2 โดยมี 10% Triton-X 100 ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) และมี $K_4Fe(CN)_6$ เป็น mediator ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -1.0 ถึง 0.0 V	31
4.11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของ H_2O_2 เมื่อมี mediator และศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากรูปที่ 4.10 ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V	32
4.12	แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัดคอเลสเตอรอล ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V	33
4.13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของคอเลสเตอรอล และศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากรูปที่ 4.12 ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V	33
4.14	แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัดคอเลสเตอรอลร่วมกับ ChOx เอนไซม์ โดยมี 10%Triton x-100 และมี $K_4Fe(CN)_6$ เป็น mediator ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V	34
4.15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของคอเลสเตอรอล ร่วมกับ ChOx เอนไซม์ และมี $K_4Fe(CN)_6$ เป็น mediator และศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V ที่ได้จากรูปที่ 4.14	35
4.16	แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0 V	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.17	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของฟอสเฟตรบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ ศักย์ไฟฟ้า ที่ได้จากรูปที่ 4.16 ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V	36
4.18	แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัด $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V ที่ความเข้มข้นของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ต่างๆ ตั้งแต่ 0.25 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 mM	37
4.19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V ที่ความเข้มข้นของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ต่างๆ ตั้งแต่ 0.25 0.50 1 1.5 และ 2.0 mM	38
4.20	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล (0.0001 0.5 1.0 และ 1.5 mM) กับกระแสรีดักชันเฉลี่ย (n=3) จากเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V	39
4.21	กราฟ Standard addition แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ย ของคอเลสเตอรอล (n=3) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก ในตัวอย่างนม ที่ศักย์ไฟฟ้า - 0.3 V	40