



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักด้วยเอ็นไอเอ็ม  
ไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์ของการไหล

โดย

ดร. อัญชลี สำเภา

สิงหาคม 2556



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักด้วยเอนไซม์  
ไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์ของการไหล

Development method for determination of pesticide and heavy  
metal by enzyme biosensor with Flow Injection Analysis

ผู้วิจัย

ดร. อัญชลี สำเนา

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่อง การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักด้วยเอนไซม์  
ไบโอเซนเซอร์ในระบบการวิเคราะห์ของการไหล ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการ  
วิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554 จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลือของ ผศ.ดร. จันทร์เพ็ญ  
อินทรประเสริฐ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ดร. ประนอม แซ่จิ่ง หัวหน้าภาควิชาเคมี ผศ.ดร. จุฑามาส  
จิตต์เจริญ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน รวมทั้งนักศึกษาในที่ปรึกษาได้แก่ นางสาวทยา ฤกษ์  
ชัย นางสาวปิยะนาถ สืบเสนาะ นางสาวพัฒนรา บุชบิณ นางสาวนිරนุช สุพร และนางสาวยุวันดา  
วงษา จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัย

## สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	I
สารบัญรูป	IV
สารบัญตาราง	VII
บทคัดย่อ	VIII
Abstract	X
<b>1. บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
<b>2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>5</b>
2.1 ความหมายของไบโอเซนเซอร์	5
2.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์	5
2.3 เอนไซม์	6
2.4 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์	8
2.5 การตรึงเอนไซม์	10
2.6 วิธีการตรึงเอนไซม์	10
2.7 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	12
2.8 เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	14
2.9 คาร์บอนเพส	15
2.10 สารละลายพอลิเตตราฟลูออโรเอทีลิน หรือ นาฟลอน	16
2.11 ระบบการวิเคราะห์การไหลแบบอัตโนมัติ หรือ โพลินเจคชันอะนาไลซิส	16
2.12 วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม	17
2.13 เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี	18
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
<b>3. วิธีการทดลอง</b>	<b>23</b>
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	23
3.2 สารเคมี	24

## สารบัญ (ต่อ)

3.3 การทดลอง	25
ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	
ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	30
<b>4. ผลการทดลอง</b>	<b>37</b>
<b>ตอนที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ</b>	<b>37</b>
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสตรึงบนคาร์บอนเพสในในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ	37
4.2 ผลการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท	40
4.3 ผลการศึกษาความไวของการวิเคราะห์ปรอท	41
4.4 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ปรอท	42
4.5 ผลการศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์ปรอท	43
4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณปรอทในสารมาตรฐาน DORM-2 ด้วยระบบไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	44
<b>ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ</b>	<b>45</b>
4.7 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ	45
4.8 ผลการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน	48
4.9 ผลการศึกษาความไวของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน	49
4.10 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน	50
4.11 ผลการศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน	51
<b>5. สรุปผลการทดลอง</b>	<b>52</b>
5.1 การวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	52
5.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ	53
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>54</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>56</b>

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างทางเคมีของสารกำจัดศัตรูพืชประเภทคาร์บาเมต	2
2.1	ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์	5
2.2	หลักการการทำงานของไบโอเซนเซอร์	6
2.3	กลไกการทำงานของเอนไซม์	6
2.4	ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key theory)	7
2.5	ทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม	7
2.6	การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน	9
2.7	การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบไม่มีการแข่งขัน	9
2.8	การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบไม่มีการแข่งขันโดยตรง	9
2.9	การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ	10
2.10	การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดติดกับสารตัวกลาง	11
2.11	การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้	11
2.12	การตรึงเอนไซม์ด้วยการทอหุ้มเอนไซม์เอาไว้ในแคปซูล	11
2.13	การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด	12
2.14	โครงสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	12
2.15	หลักการการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่มีการเติมตัวนำส่งอิเล็กตรอน	13
2.16	กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนเมื่อเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสถูกยับยั้งการทำงานด้วย ปรอททำให้ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น้อย สัญญาณกระแสจึงลดลง	14
2.17	กลไกการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	14
2.18	หลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรนบน ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า	15
2.19	โมเลกุลของนาฟิออนซึ่งประกอบด้วยเตตระฟลูออโรเอทิลีนและเปอร์ฟลูออโร- 3,6 ไดออกซะ-4-เมทิล-7-ออกทีน-ซิลโฟนิคเอซิด	16
2.20	วิธีการตรวจวัดในระบบ FIA ในงานวิจัย	17
2.21	โครโนแกรมของสัญญาณการวิเคราะห์ด้วยระบบ FIA	17
2.22	ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง	18
2.23	(A) การจัดระบบการวิเคราะห์ของเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า อ้างอิง ขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าทำงานตรึงด้วยเอนไซม์ และ (B) ภาพจำลองของ การจัดเรียงขั้วไฟฟ้าทั้งสาม	18
2.24	สัญญาณกระแสแอนอดิกเทียบกับเวลาที่วัดได้จากเทคนิคโครโนแอมเพอโร เมตรี	19
3.1	(a) การเตรียมคาร์บอนเพส และ (b) การอัดคาร์บอนเพสใสในอิเล็กโทรเคมีคัล เซลล์	32
3.2	การประกอบเซลล์เข้ากับอิเล็กโทรเคมีคอลเซลล์ (Electrochemical cell)	32

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.3	ระบบการวิเคราะห์ FIA – Auto lab	33
4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและอัตราการไหลของกระแสตัวพา ใช้คาร์บอน เพสต์ริงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสปริมาณ 1.27 U/mm <sup>2</sup> ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อัตราการไหล 1.0 - 4.0 mL.min <sup>-1</sup>	38
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าและความไวใน การวิเคราะห์ ที่อัตราการไหลของกระแสตัวพา 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ศักย์ศักย์ไฟฟ้า +0.42 ถึง +0.50 V ตามลำดับ	39
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและเวลาในการบ่ม เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอทความเข้มข้น 5 mg/L ที่อัตราการไหล 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V ที่ระยะเวลา 2- 10 นาที	40
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของปรอท ที่อัตรา การไหล 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V ระยะเวลาใน การบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท 6 นาที	41
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของปรอท โดยใช้ คาร์บอนเพสต์ริงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ปริมาณ 1.27 U/mm <sup>2</sup> ศึกษา ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีในระบบการไหลแบบอัตโนมัติใช้อัตราการไหล 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ที่ศักย์กระตุ้น +0.46 V ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยปรอท 6 นาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0	42
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของปรอท โดยใช้ คาร์บอนเพสต์ริงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ปริมาณ 1.27 U/mm <sup>2</sup> ศึกษา ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีในระบบการไหลแบบอัตโนมัติใช้อัตราการไหล 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ที่ศักย์กระตุ้น +0.46 V ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยปรอท 6 นาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0	42
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่ได้จากการฉีด 1%(w/v) Glucose ที่อัตราการ ไหล 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V	43
4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและเวลา ที่อัตราการไหล 2.0 mL.min <sup>-1</sup> ใช้ศักย์ กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V ระยะเวลาในการบ่ม เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท 6 นาที	43
4.9	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและอัตราการไหลโดยใช้คาร์บอนเพสต์ริงด้วย เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสปริมาณ 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแ มเพโรเมทรีในระบบไหลอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทาง ไฟฟ้า 0.75 V ในสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำการศึกษา อัตราการไหล 1.0 – 4.0 มิลลิลิตรต่อนาที	46

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	ความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าและความชัน ( $\Delta I/\Delta [ALP]$ ) โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหลของกระแสตัวพา 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นสารตัวกลางไฟฟ้า 0.6 – 0.8 โวลต์ ตามลำดับ	47
4.11	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 mg/L โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำการศึกษาที่ระยะเวลาในการบ่ม 4- 10 นาที	48
4.12	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน 8 นาที ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0	49
4.13	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน 8 นาที ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0	50
4.14	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและเวลาของสารละลาย 4% ไดโซเดียมพินิลฟอสเฟส โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0	50
4.15	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที	51



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	23
3.2	อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย	23
3.3	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	24

## บทคัดย่อ

งานวิจัยได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณปรอทและคาร์โบฟูแรนด้วยวิธีวิเคราะห์ทางอ้อมในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ (1) การวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ และ ส่วนที่ (2) การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

ตอนที่ 1 พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณปรอทโดยตรงและใช้ประโยชน์ของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจากการยับยั้งการทำงานด้วยปรอทแบบการวิเคราะห์ทางอ้อม ตรึงเอนไซม์แบบกายภาพบนผิวหน้าของคาร์บอนเพส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ดังนี้ อัตราการไหลของสารละลายตัวพา ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยปรอท การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท ความไวของการวิเคราะห์ ความเที่ยงตรงของไบโอเซนเซอร์ และขีดความสามารถต่ำสุดต่อการตรวจวัดและการวิเคราะห์ปรอท ผลการทดลองพบว่า อัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่  $+0.46 \text{ V}$  เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยปรอทที่ 6 นาที กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ (y) กับปริมาณปรอท (x) มี 2 แบบ คือ แบบเส้นโค้งได้ความสัมพันธ์  $y = 2.68 \ln x + 12.52$  และ  $R^2 = 0.984$  พบว่าให้ช่วงของการวิเคราะห์ได้ตั้งแต่  $0.5 - 73.5 \text{ mg/L}$  และแบบเส้นตรงได้ 2 ช่วง ความสัมพันธ์  $y = 0.90x + 11.51$  ได้ค่า  $r^2 = 0.906$  และความสัมพันธ์  $y = 0.20x + 16.25$  ได้ค่า  $r^2 = 0.998$  สามารถตรวจวัดปริมาณปรอทในช่วงความเข้มข้น  $0.5-7.5 \text{ mg/L}$  และ  $7.5 - 31.5 \text{ mg/L}$  ตามลำดับ ความไวของการตรวจวัดคือ  $-0.0106$  ถึง  $0.20 \text{ \%Inhibition}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$  ความเที่ยงตรงของไบโอเซนเซอร์ที่  $2.30 \text{ \%RSD}$  และขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์ คือ  $0.14 \text{ mg/L}$  และ  $0.50 \text{ mg/L}$  ตามลำดับ

ตอนที่ 2 พัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ การวิเคราะห์ทางอ้อมของไบโอเซนเซอร์อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน ทำการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธีทางกายภาพบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแบบคาร์บอนเพสของเซลล์เคมีไฟฟ้า ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ดังนี้ อัตราการไหลของสารละลายตัวพา ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ระยะเวลาบ่มเอนไซม์ด้วยคาร์โบฟูแรน ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ความเที่ยงตรงของไบโอเซนเซอร์ ความไวในการตรวจวัดและขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรน ผลการทดลองพบว่า อัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสมคือ  $2.0 \text{ mL}/\text{min}$  ศักย์ไฟฟ้าสำหรับกระตุ้นสารตัวกลางทาง

ไฟฟ้าที่ +0.75 V ระยะเวลาบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรนใช้เวลา 8 นาที ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนที่ 0.016 – 0.050 mg/L กราฟมาตรฐานให้สมการความเป็นเส้นตรง  $y = 1.69x + 1.44$  และ  $r^2 = 0.991$  ความไวในการตรวจวัดเท่ากับ  $1.69 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  ความเที่ยงตรงของไบโอเซนเซอร์ให้ค่า % RSD เท่ากับ 2.80% และขีดความสามารถต่ำสุดที่ตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนคือ 0.008 mg/L

## Abstract

In this research, development of biosensor for the determination of mercury and carbofuran based on flow injection analysis (FIA) was studied. The research was divided into two parts. The first one was about the development of biosensor for the determination of mercury and the second one was about the biosensor for the determination of carbofuran based on flow injection analysis.

Part I about indirect determination of mercury ion studied and utilized by immobilization of glucose oxidase was investigated. The physicochemical immobilization of glucose oxidase (GOx) with 5% w/w manganese oxide as mediator with suitable carbon paste on electrochemical cell based on FIA was reported. Measurements were performed by electrochemically monitoring of electro active substance from the catalytic activity of the enzyme. Optimizations of experiment parameters were investigated in terms of flow rate, voltage, incubation time of enzyme inhibition, working range, precision, sensitivity, limit of detection and quantification, respectively. The results of the biosensor based on FIA revealed optimum conditions with flow rate at  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , voltage of  $+0.46 \text{ V}$  versus Ag/AgCl and incubation time at 6 min. Two types of working ranges response with Hg of biosensor were obtained showing dynamic relation to mercury ion at  $0.5 - 73.5 \text{ mg/L}$  with  $y = 2.68 \ln(x) + 12.52$  and  $R^2 = 0.984$ , and the linear range to mercury ion of  $7.5 - 31.5 \text{ mg/L}$  with  $y = 0.90x + 11.51$  and  $r^2 = 0.906$ . and  $7.5 - 31.5 \text{ mg/L}$  with  $y = 0.20x + 16.25$  and  $r^2 = 0.998$ . Moreover, the biosensor showed the sensitivity of  $-0.0106$  and  $0.20 \text{ \%Inhibition L}\cdot\text{mg}^{-1}$  with precision of  $2.30 \text{ \%RSD}$  and the limit of detection and quantification of  $0.14$  and  $0.50 \text{ mg/L}$  of mercury ion, respectively.

Part II of amperometric biosensor for the determination of carbofuran based on flow injection analysis was developed. Indirect determination of carbofuran could be studied by inhibition and utilized by physical immobilization of enzyme alkaline phosphatase with suitably carbon paste on electrochemical cell. Measurements were performed by electrochemically monitoring the inhibition of the catalytic activity of enzymes. Electrochemical characterization and optimization of experiment parameters were investigated in terms of flow rate, voltage, incubation time of

enzyme inhibition, linear range, precision, sensitivity and detection limit. The results of the biosensor showed optimum conditions with flow rate at 2.0 mL/min and voltage at +0.75 V, 8 minutes of incubation time. Moreover, the biosensor obtained the linear range of 10 – 30  $\mu\text{g/L}$  with linear equation of  $y = 1.69x + 1.44$  and linear regression of  $r^2 = 0.991$  with showing sensitivity  $1.69 \text{ \%Inhibition} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , precision of biosensor at 2.80 % RSD with detection limit of 8  $\mu\text{g/L}$  carbofuran.

## 1. บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

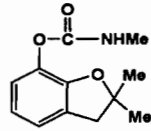
โลหะหนักเป็นสารที่พบอยู่ทั่วไป การปนเปื้อนของโลหะในสิ่งแวดล้อม มีสาเหตุหลายประการ เช่น มาจากธรรมชาติ ดิน น้ำ อากาศ พืช และสัตว์ตามวงจรธรรมชาติ และมาจากของเสียทางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์ ผลิตสี อุตสาหกรรมการชุบโลหะ เป็นต้น

โลหะบางชนิดมีความเป็นพิษแม้จะได้รับปริมาณน้อย บางชนิดเป็นโลหะที่ร่างกายต้องการเพื่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามหากได้รับมากเกินไปก็ทำให้เกิดพิษได้ บางชนิดสะสมอยู่ในร่างกายได้นาน โลหะที่สนใจกันทั่วไปและนักวิชาการหลายประเทศกำลังศึกษาด้านพิษวิทยา ได้แก่ ตะกั่วปรอท แคดเมียม ดีบุก และสารหนู เป็นต้น<sup>[1]</sup>

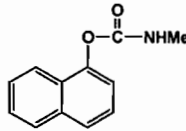
ปรอทเป็นโลหะ ลักษณะเป็นของเหลว สีเงิน ใช้ประโยชน์นำไปทำเทอร์โมมิเตอร์ บารอมิเตอร์ โลหะเจือปรอทเรียกว่า อะมัลกัม (Amalgam) ใช้ในงานทันตกรรม และทำเครื่องมือวิทยาศาสตร์อื่นๆ สารประกอบของปรอทเป็นพิษแต่บางอย่างใช้เป็นยาได้<sup>[1, 2]</sup>

เกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนดไว้ว่ามนุษย์จะต้องได้รับปรอทไม่ควรเกิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าร่างกายได้รับปรอทเข้าไปจะเป็นสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมินามาตะ เป็นต้น ซึ่งถ้าได้รับปริมาณมากเกินไปก็จะเป็นพิษต่อร่างกาย ทำให้มีอาการต่างๆ เช่น ปวดท้องรุนแรง ปวดศีรษะ ปวดตามเนื้อตัว ชา ความจำเสื่อม ไม่มีสมาธิ และสารปรอทส่วนใหญ่สะสมที่สมองของมนุษย์ ทำให้เป็นอันตรายต่อระบบประสาท<sup>[1, 2]</sup> โดยทั่วไปการวิเคราะห์ปริมาณปรอทที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมนิยมวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมทรี (Atomic absorption spectrometry, AAS) นักวิจัยทางสิ่งแวดล้อมได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณปรอทเพื่อประเมินและติดตามการปนเปื้อนของปรอทในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเทคนิค AAS นี้จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์สูง เครื่องมือมีราคาสูง มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยุ่งยาก

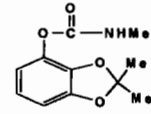
นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืช ในปัจจุบันมนุษย์เรามีความเสี่ยงต่อการนำสารกำจัดศัตรูพืชเข้าสู่ร่างกายมากขึ้นทางการบริโภคอาหาร หรือจากน้ำดื่มที่มีสารเหล่านี้ปนเปื้อน สารกำจัดศัตรูพืชนั้นตกค้างในสิ่งแวดล้อมมาก เนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณการใช้สารกำจัดศัตรูพืชกับพืชผักเพื่อให้ได้ผลผลิตตามที่ต้องการโดยใช้ในปริมาณมากเกินไปและไม่คำนึงความปลอดภัยของผู้บริโภค ทำให้สารกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้ตกค้างในดินหรือไหลลงสู่แม่น้ำ ซึ่งโลหะหนักและสารกำจัดศัตรูพืชจะให้โทษกับร่างกายมนุษย์ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย ถ้าได้รับปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชเข้าไปในร่างกายเกินกว่าที่มาตรฐานกำหนดซึ่งให้มีสะสมในร่างกายไม่เกิน 11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มิฉะนั้นจะส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ หรือสารกำจัดศัตรูพืชปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมากเกินไปก็ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ตัวอย่างสารกำจัดศัตรูพืช เช่น คาร์โบฟูแรน (Carbofuran) คาร์บาริล (Carbaryl) เบนดิโอคาร์บ (Bendiocarb) เอทีโอเฟนคาร์บ (Ethiofencarb) พิริมิคาบ (Pirimicarb) และ โพรพอกเซอร์ (Proppoxur) เป็นต้น แสดงโครงสร้างทางเคมีดังรูป 1.1



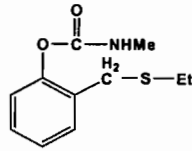
Carbofuran



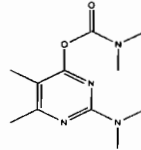
Cabaryl



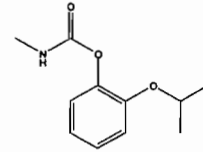
Bendiocarb



Ethiofencarb



Pirimicarb



Propoxur

### รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของสารกำจัดศัตรูพืชประเภทคาร์บาเมต (Carbamate) <sup>[3, 4]</sup>

คาร์โบฟูแรน (carbofuran) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชประเภทคาร์บาเมต (Carbamate) นิยมใช้กำจัดศัตรูพืชหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าว โดยชาวนาใช้คาร์โบฟูแรนในการกำจัดแมลงบั่วในนาข้าวหลังการหว่านข้าว หรือหลังการปักดำ ขณะที่ชาวไร่ใช้คาร์โบฟูแรนกำจัดหนอนและด้วงหลายชนิดที่ทำลายพืชไร่ เช่น หนอนกระทู้ หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด หนอนเจาะยอดข้าวฟ่าง หนอนแมลงวันเจาะต้นถั่วเหลืองและถั่วฝักยาว ด้วงวงวงมันเทศ ด้วงหลอดยาวมันสำปะหลัง เป็นต้น วิธีการใช้ส่วนมากจะใช้หยอดหลุม หรือโรยตามร่องตอนปลูก ซึ่งคาร์โบฟูแรนเป็นสารกำจัดศัตรูพืชชนิดดูดซึมเข้าสู่ราก ลำต้น และใบ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบประสาทที่รวดเร็วและรุนแรง เมื่อคาร์โบฟูแรนเกิดการเผาไหม้จะให้ควันพิษ รวมทั้งไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซพิษตัวหนึ่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดดม หรือกลืนกินเข้าไป จะเกิดอาการวิงเวียน เหงื่อแตก อาเจียน กล้ามเนื้อเกร็ง น้ำลายฟูมปาก และอาจหมดสติได้ <sup>[5]</sup>

การที่คาร์โบฟูแรนตกค้างในสิ่งแวดล้อมนั้นถือเป็นปัญหาที่ทวีความรุนแรงมากขึ้น มีปริมาณที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องมีการติดตามและประเมินความเป็นพิษของสารดังกล่าว ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยทำการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ให้สามารถติดตามปริมาณปรอทและคาร์โบฟูแรนเพื่อทดแทนการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่ทันสมัย เช่น เทคนิคไฮเพอร์ฟอแมนลิควิดโครมาโทกราฟี (High-performance liquid chromatography) เป็นต้น ซึ่งเครื่องมือนี้อาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์สูง มีความยุ่งยากในการตรวจวัด เป็นเครื่องมือที่มีราคาสูง และที่สำคัญไม่สามารถที่จะใช้ในภาคสนามได้ ไบโอเซนเซอร์จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากกลุ่มผู้วิจัยที่จะพัฒนาการตรวจวัดหาปริมาณคาร์โบฟูแรนเป็นอย่างมาก เพราะเป็นเทคนิคที่ไม่มีความยุ่งยากในการตรวจวัด เป็นเครื่องมือที่ราคาไม่สูง และที่สำคัญสามารถที่จะนำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ในภาคสนามได้ <sup>[6, 7]</sup>

ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณปรอทและคาร์โบฟูแรนในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณปรอท

สามารถลดความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่าง หลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือราคาสูง และหลีกเลี่ยงการสัมผัสสารโดยตรงโดยวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาวิธีการเตรียมขั้วไฟฟ้าแบบคาร์บอนเพส
- 1.2.2 ศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนคาร์บอนเพส
- 1.2.3 ศึกษาการทำงานของไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ
- 1.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงบนคาร์บอนเพสในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ โดยศึกษาสภาวะต่างๆดังนี้
  - 1.2.4.1 ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา
  - 1.2.4.2 ศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท นำไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้งสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณปรอท
  - 1.2.4.3 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง (ปรอท)
  - 1.2.4.4 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์
  - 1.2.4.5 ศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์
  - 1.2.4.6 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า
- 1.2.5 ศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
- 1.2.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ตรึงบนคาร์บอนเพสในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ โดยศึกษาสภาวะต่างๆดังนี้
  - 1.2.6.1 ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา
  - 1.2.6.2 ศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน นำไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้งสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบฟูแรน
  - 1.2.6.3 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง (คาร์โบฟูแรน)
  - 1.2.6.4 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์
  - 1.2.6.5 ศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์
  - 1.2.6.6 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณปรอทและคาร์โบฟูแรนในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ อาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase, GOx) ด้วยปรอท และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน โดยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase ; ALP) แบบกายภาพและมีแมงกานีสออกไซด์เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอนใช้สารละลายนาฟิออนช่วยในการเกาะติดของเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดสบน



ผิวหน้าของคาร์บอนเพส (Carbon paste) บนเซลล์เคมีไฟฟ้า (Electrochemical cell) ประเมินการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์คืออัตราการไหลที่เหมาะสมของสารละลายตัวพา ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปรอท กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน ความไวของการวิเคราะห์ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์

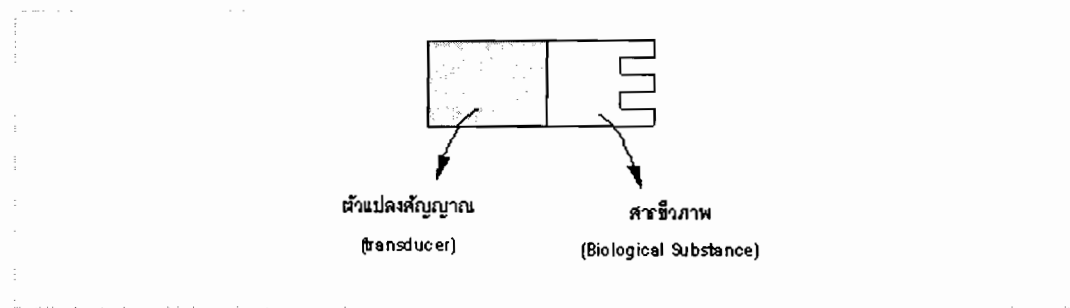
## 2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ความหมายของไบโอเซนเซอร์<sup>[8]</sup>

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) หมายถึง อุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างจำเพาะเจาะจง และใช้ตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ 2 ส่วน คือ ตัวแปลงสัญญาณและสารชีวภาพ

ตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) เป็นอุปกรณ์สำหรับแปลงสัญญาณเฉพาะต่างๆ เช่น อิเล็กตรอน แสง ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า ซึ่งเป็นตัวระบุถึงปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์

สารชีวภาพ (Biological substance) เป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์นี้แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์

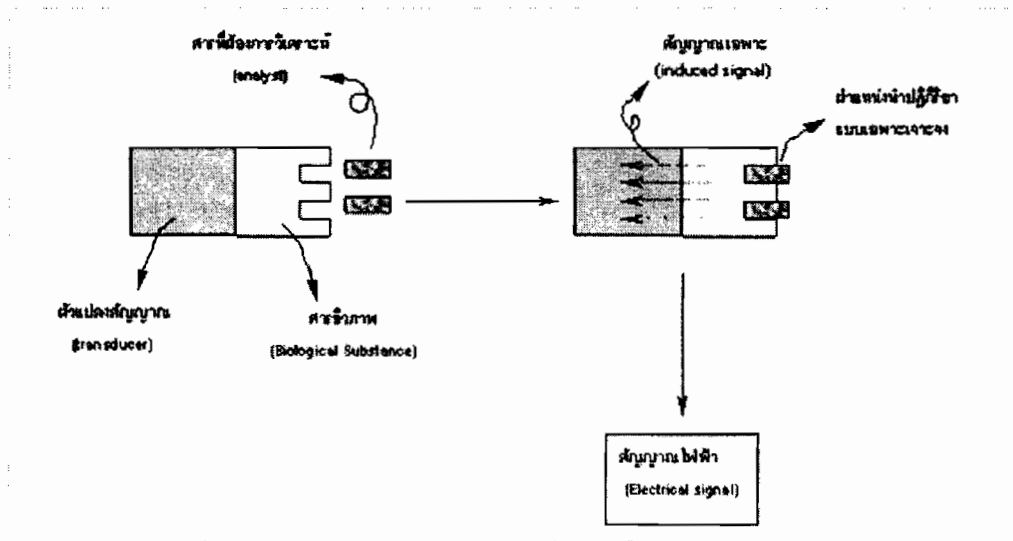
### 2.2. หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์<sup>[9]</sup>

การทำงานของไบโอเซนเซอร์ มีขั้นตอนการทำงานดังนี้

ขั้นตอนแรก ทำการตรึงสารชีวภาพเข้ากับตัวแปลงสัญญาณเพื่อสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องการ

ขั้นตอนที่สอง นำไบโอเซนเซอร์ที่ได้มาทำการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในขั้นตอนนี้ สารที่ต้องการวิเคราะห์จับกับไบโอเซนเซอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะเจาะจงตรงส่วนของสารชีวภาพ ที่ตรึงบนตัวไบโอเซนเซอร์เรียกขั้นตอนนี้ว่ากลไกการจดจำทางชีวภาพ (Biological recognition mechanism) จากการเข้าจับกันทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะ (Indicated signal) ซึ่งอาจเป็นอิเล็กตรอน แสง และอื่นๆ เข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ

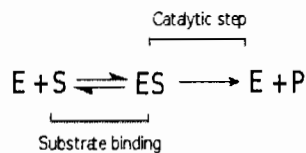
ขั้นตอนที่สาม ตัวแปลงสัญญาณรับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเครื่องอ่านสัญญาณออกมา ทำให้สามารถอ่านค่าได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า เทคนิคของการรับและแปลงสัญญาณทางกายภาพ (Physical transducer technique) ซึ่งกลไกการทำงานนี้สามารถแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์

### 2.3. เอนไซม์<sup>[10]</sup>

เอนไซม์ คือ โปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีน และมหชีวโมเลกุลทั่วไป กล่าวคือ มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์เป็นหลายล้านเท่าด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้ภาวะไม่รุนแรง เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า ซับสเตรต (Substrate) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้ เมื่อเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น ทำให้สารตั้งต้นเกิดการสลายหรือสลายพันธะ แล้วเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้เอนไซม์กลับคืนมา ดังสมการในรูป 2.3

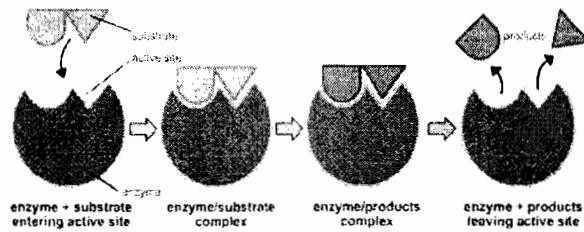


รูปที่ 2.3 กลไกการทำงานของเอนไซม์

เมื่อ E คือ ตัวเร่งปฏิกิริยา  
 S คือ สารตั้งต้น  
 P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

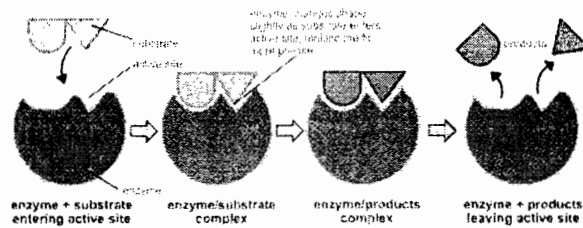
กลไกการทำงานของ เอนไซม์ (Enzyme) มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นซึ่งสามารถอธิบายด้วยทฤษฎีต่อไปนี้

ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (Lock and key theory) โครงสร้างเอนไซม์เปรียบเสมือนแม่กุญแจจึงสวมกันพอดีกับสารตั้งต้น ซึ่งเปรียบเสมือนลูกกุญแจ โดยโครงสร้างของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แสดงการทำงานของเอนไซม์ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key theory)<sup>[11]</sup>

ทฤษฎีเหนียวนำให้เหมาะสม (Induced fit theory) สารตั้งต้นเหนียวนำให้ เอนไซม์ (Enzyme) ปรับรูปร่างให้จับกับสารตั้งต้นได้อย่างเหมาะสม เปรียบเสมือนกับการใส่ถุงมือ ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ทฤษฎีเหนียวนำให้เหมาะสม

### 2.3.1. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

การที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีนั้นต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้

1. ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์
3. ความเป็นกรด-เบส ของสารละลาย
4. อุณหภูมิ
5. ผลลัพท์ที่เกิดขึ้น
6. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

### 2.3.2. หน้าที่ของเอนไซม์<sup>[12]</sup>

หน้าที่ของเอนไซม์ คือการเปลี่ยนแปลงวิถีทางของการเกิดปฏิกิริยาเพื่อลดระดับพลังงานของสภาวะทรานซิชัน (Transition State) โดยการจับยึดกับซับสเตรตและตัวทำปฏิกิริยาอื่นๆ ให้อยู่ในทิศทางที่เหมาะสม ทำให้เกิดการลดพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาลง ซึ่งมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น เมื่อซับสเตรตเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์แล้วไม่สามารถจับยึดกับเอนไซม์ได้อีกต่อไปและหลุดออกจากบริเวณรับปลดปล่อยเอนไซม์ให้เป็นอิสระและพร้อมที่จะจับกับซับสเตรตตัวใหม่เพื่อเร่งปฏิกิริยาต่อไป ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาไปข้างหน้าและปฏิกิริยาย้อนกลับได้ดีเท่าๆ กัน ส่วนปฏิกิริยาเกิดไปในทิศทางใดขึ้นอยู่กับปัจจัยอย่างอื่น เช่น ค่าคงที่ของสมดุล ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ และภาวะของการทดลองอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส เป็นต้น

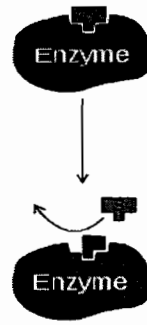
### 2.3.3. การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ (Denaturation)<sup>[10]</sup>

เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปจนสารเริ่มต้นรวมกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง (Active site) ไม่ได้ ทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างทำให้เกิดการหมดสภาพของเอนไซม์ มีหลายกรณีที่เมื่อเอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพไปแล้ว ไม่สามารถกลับคืนมาสู่สภาพที่ทำงานได้อีก เช่น กรณีที่ได้รับอุณหภูมิสูงทั้งนี้เพราะอุณหภูมิสูงทำให้เกิดการสร้างพันธะชนิดโควาเลนต์ระหว่างลูกโซ่ โพลีเพปไทด์ (Polypeptide chain) หรือในลูกโซ่โพลีเพปไทด์เดียวกัน และพันธะเหล่านี้จะมีความคงตัวมากจนไม่สามารถทำให้แตกหักได้

ดังนั้น ในการสกัดเอนไซม์ออกจากพืช หรือการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ จึงต้องทำในที่ๆ มีอุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากความร้อนต่างๆ ที่ถ้าเอนไซม์อยู่ในเซลล์อาจทนต่ออุณหภูมิสูงระดับหนึ่งได้ แต่เมื่อสกัดออกจากเซลล์ความทนทานต่ออุณหภูมิสูงลดลง คาดว่าในระหว่างการสกัดเอนไซม์นั้นได้กำจัดสารป้องกันเอนไซม์ออกไปหรืออาจทำให้สารดังกล่าวเจือจางออกซิเจนและสารที่เป็นสารออกซิไดส์สามารถทำให้เอนไซม์หลายชนิดเสื่อมสภาพได้ โดยมักจะทำให้เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ (Disulfide bridges) ในลูกโซ่โพลีเพปไทด์ที่มี -SH ของกรดอะมิโน ชนิดซิสทีอีน (Cysteine) สารรีดิวซ์สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ในเหตุผลตรงกันข้ามคือ ไปทำลายไดซัลไฟด์ บริดจ์ เกิดเป็น -SH 2 กลุ่ม นอกจากนั้นโลหะหนัก เช่น  $Ag^+$   $Hg^{2+}$  และ  $Pb^{2+}$  ก็สามารถทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้

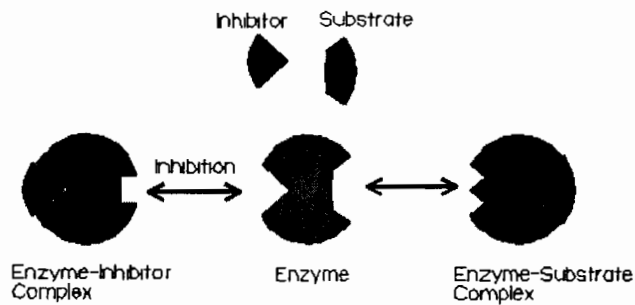
## 2.4. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์<sup>[10, 13]</sup>

2.4.1. สารยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งมาก และเข้าแย่งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เมื่อเกิดการรวมกันเป็นเอนไซม์-สารยับยั้ง (Enzyme-inhibitor) จะทำให้ปริมาณของเอนไซม์ลดลง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง สารยับยั้งเหล่านี้ อาจจะเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนไปก็ได้ การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นให้มากขึ้นจะลดผลของสารยับยั้งแบบแข่งขันได้ ตัวอย่างของสารยับยั้งแบบแข่งขัน คือ มาโลเนท (Malonate) แย่งทำปฏิกิริยากับ succinate dehydrogenase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ปกติจะทำปฏิกิริยากับ succinate ได้ fumarate แต่เมื่อมี malonate สามารถแข่งขันการทำปฏิกิริยาด้วย ดังภาพประกอบ รูปที่ 2.6



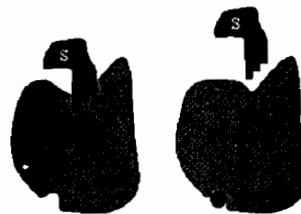
รูปที่ 2.6 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน<sup>[14]</sup>

2.4.2. สารยับยั้งแบบไม่มีการแข่งขัน (Non competitive inhibitor) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะเข้าร่วมกับเอนไซม์แต่จะไม่รวมที่บริเวณเร่งสารพวกนี้มีลักษณะโครงสร้างต่างจากเอนไซม์ที่ถูกยับยั้ง การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นจะไม่สามารถลบล้างผลของสารเหล่านี้ได้ โลหะที่เป็นพิษทั้งหลาย และสารที่รวมหรือทำลาย กลุ่มซัลไฟไฮไดรล มักจะเป็นสารในกลุ่มนี้ เช่น การที่มีออกซิเจนมาก จะทำให้ -SH ถูกออกซิไดซ์ เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ขึ้นมา ซึ่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้ที่บริเวณเร่งรวมกับสารเริ่มต้นไม่ได้ ส่วนโลหะ เช่น  $Hg^{+2}$  และ  $Ag^+$  จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของกลุ่มซัลไฟไฮไดรล เกิดเป็น เมอแคปไทด์ (Mercaptides) ซึ่งไม่ละลายน้ำ



รูปที่ 2.7 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบไม่มีการแข่งขัน<sup>[15]</sup>

2.4.3. สารยับยั้งแบบไม่แข่งขันโดยตรง (Uncompetitive inhibitor) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ชนิดนี้ไม่รวมกับเอนไซม์อิสระ และไม่ผลกระทบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสารเริ่มต้น แต่จะเข้าร่วมกับ เอนไซม์-สารเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสารเริ่มต้นมากขึ้น สารยับยั้งชนิดนี้มักจะพบในปฏิกิริยาซึ่งมีสารเริ่มต้นสองชนิด



รูปที่ 2.8 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบไม่มีการแข่งขันโดยตรง<sup>[16]</sup>

## 2.5. การตรึงเอนไซม์ (Immobilization enzyme)

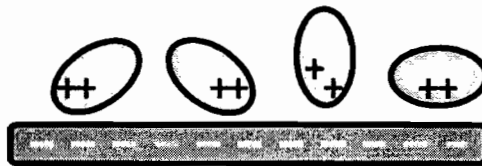
การตรึงเอนไซม์หมายถึง การกำจัดตำแหน่งเอนไซม์ด้วยวิธีทางกายภาพหรือจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ให้อยู่ในช่องว่างที่กำหนด โดยการตรึงเอนไซม์กับตัวยึดเกาะที่ไม่ละลาย ซึ่งเอนไซม์ยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา โดยการตรึงเอนไซม์มีหลักในการพิจารณา ดังนี้

1. เอนไซม์ยังคงแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเคมีภายหลังการตรึงเอนไซม์
2. สารตั้งต้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ถูกตรึง โดยปราศจากการกีดขวางของตัวยึดเกาะหรือเมมเบรน และผลิตภัณฑ์สามารถแพร่ออกได้ง่าย
3. ระบบเอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัว ภายใต้สภาวะที่มีการใช้งานของเอนไซม์ ทั้งนี้การตรึงเอนไซม์จะไม่เกิดประโยชน์ถ้าแอกติวิตีของเอนไซม์ถูกทำลายด้วยกระบวนการตรึง หรือสารตั้งต้นไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาจากเอนไซม์

## 2.6. วิธีการตรึงเอนไซม์ <sup>[17]</sup>

การตรึงเอนไซม์มีวิธีพื้นฐานอยู่ 5 วิธี ดังนี้

1. การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption method) เป็นการใช้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน คือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander waals forces) ซึ่งเกิดจากการรวมแรง 2 ชนิด คือ แรงกระจาย (London dispersion force) และแรงไฟฟ้าสถิต (Electrostatic force) สามารถเกิดการผันกลับของกระบวนการได้ง่าย ซึ่งเป็นข้อดี เพราะสามารถฟื้นฟูสภาพของตัวดูดซับได้ง่ายด้วยสารที่ถูกดูดซับสามารถเกาะอยู่รอบๆ ผิวของสารดูดซับได้หลายชั้น



รูปที่ 2.9 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ <sup>[18]</sup>

2. การตรึงด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง (Connection method) วัสดุหรือสารที่เป็นตัวกลางหรือตัวพุง (Carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำ วิธีนี้มีเทคนิคการทำอยู่หลายรูปแบบ โดยอาจทำการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุงด้วยการตรึงแบบกายภาพหรือด้วยพันธะเคมีที่เรียกว่าพันธะไอออนิกหรือเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ปฏิกิริยาการเกิดพันธะจะมีผลต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์ หรือจะเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพุงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพก็ได้ ซึ่งจะไม่ทำให้โครงสร้าง และแอกติวิตีของเอนไซม์เสียไป แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้จะต้องพิจารณาเลือกตัวพุงให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ และซับสเตรท ซึ่งมีทั้งสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์



รูปที่ 2.10 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดติดกับสารตัวกลาง <sup>[19]</sup>

3. การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (Cross linking method) การตรึงวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุง แต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีแบบโควาเลนต์ ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้เนื่องจากการเชื่อมระหว่าง โมเลกุล ของเอนไซม์กับสารเชื่อมขวาง จะเกิดปฏิกิริยารุนแรง



รูปที่ 2.11 การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้ <sup>[19]</sup>

#### 4. การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (Entrapping method)

การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เป็น ที่นิยม ใช้กัน อย่างกว้างขวาง เพราะเอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้ม และเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพุง หรือ จับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

1. เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ ภายในช่องตาข่ายของสารโพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วิธีนี้อาจเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติหรือสังเคราะห์ก็ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องเลือกชนิดของสารโพลิเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลิเมอร์จะมีปฏิกิริยารุนแรงจนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายได้

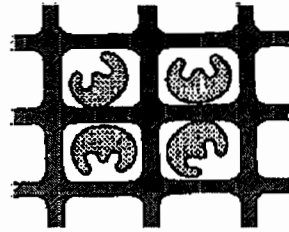
2. เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลเล็กที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารโพลิเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้



รูปที่ 2.12 การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ในแคปซูล <sup>[19]</sup>



5. การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด (Entrapment method) คือ โมเลกุลของเอนไซม์อยู่อย่างอิสระในสารละลายแต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่โดยโครงสร้างที่เป็น lattice ของ gel โดยต้องควบคุมความพรุนของ gel lattice ให้มีความเหมาะสมในการป้องกันการรั่วของเอนไซม์ออกมา และภายใน gel นั้นต้องมีที่ว่างพอให้มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระของ ซับสเตรตและผลิตภัณฑ์

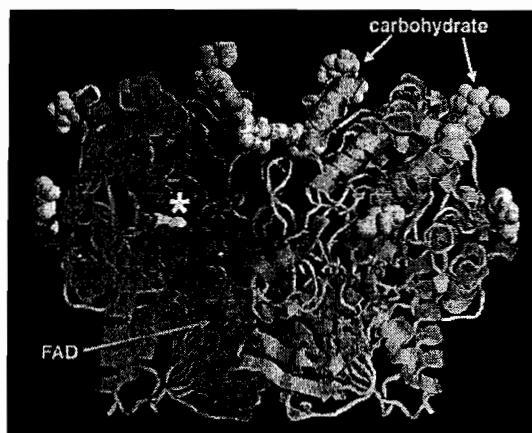


รูปที่ 2.13 การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด<sup>[19]</sup>

ในงานวิจัยนี้ทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแบบห่อหุ้มเอาไว้ โดยใช้สารละลายนาไฟออน ช่วยกักเก็บเอนไซม์ไว้ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าแบบคาร์บอนเพส ซึ่งรายละเอียดของเอนไซม์ทั้งสองในหัวข้อถัดไป

## 2.7 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

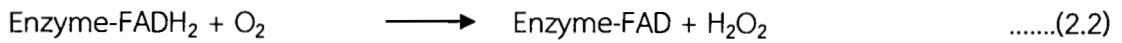
เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส จัดอยู่ในหมู่ออกซิโดรีดักเตส(Oxidoreductase) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.14 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสให้กลายเป็นกลูโคโนแลกโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์<sup>[20]</sup>



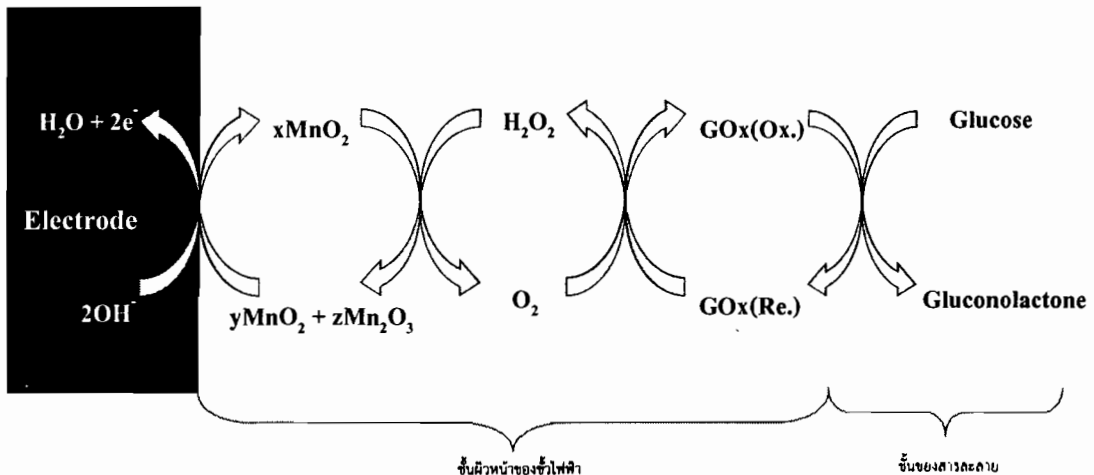
รูปที่ 2.14 โครงสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส<sup>[21]</sup>

จากโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสภายในโครงสร้างมีโคแฟกเตอร์ คือ Flavin adenine dinucleotide (FAD) ทำหน้าที่ในการรับส่งอิเล็กตรอน โคแฟกเตอร์ FAD จะทำหน้าที่ในการรับอิเล็กตรอนจากกลูโคสให้กลายเป็น  $FADH_2$  และกลูโคโนแลกโตนตามลำดับ แสดงดัง

สมการที่ 2.1 จากนั้น  $\text{FADH}_2$  เมื่ออยู่ในสถานะที่มีออกซิเจนจะเกิดการให้อิเล็กตรอน และ  $\text{FADH}_2$  จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ  $\text{FAD}$  และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการที่ 2.2 และกระตุ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังสมการที่ 2.3

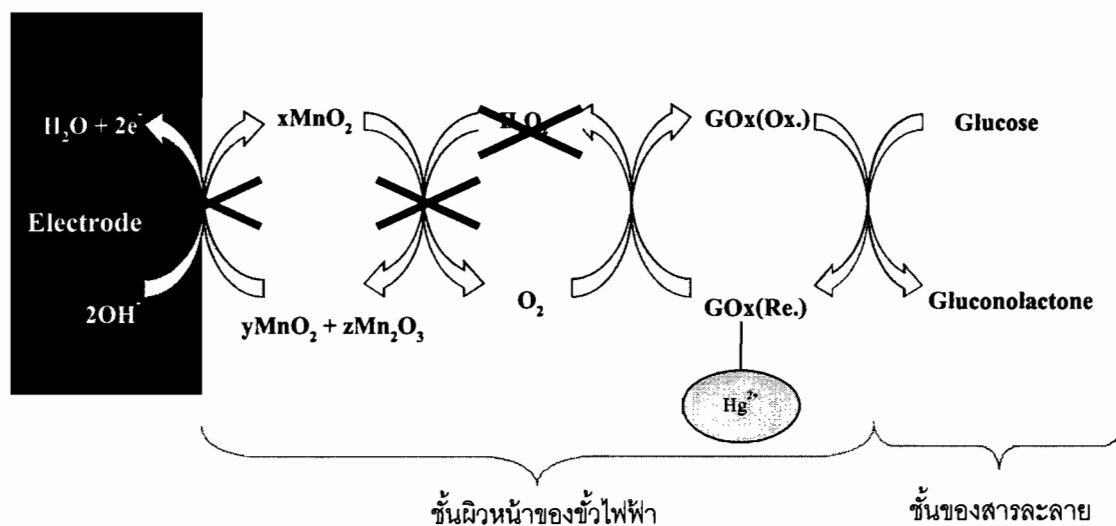


กลุ่มงานของผู้วิจัย ได้เติมสารนำส่งอิเล็กตรอนแมงกานีสออกไซด์ ( $\text{MnO}_2$ ) โดยจะใช้ศักย์กระตุ้นแมงกานีสออกไซด์ที่ ต่ำกว่า + 0.5 V และเร่งการเกิดออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ ดังการส่งผ่านอิเล็กตรอน รูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 หลักการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่มีการเติมตัวนำส่งอิเล็กตรอน

จากหลักการการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสข้างต้น นำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรทโดยอาศัยหลักการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โปรทยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น้อยลง ดังนั้นเมื่อทำการกระตุ้นตัวนำส่งอิเล็กตรอนสัญญาณจากการนำส่งอิเล็กตรอนลดลง ดังรูป 2.16 หลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สามารถตรวจวัดปริมาณโปรทได้

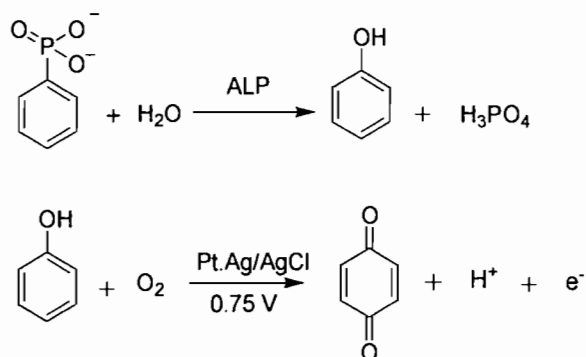


รูปที่ 2.16 กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนเมื่อเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสถูกยับยั้งการทำงานด้วยปรอททำให้ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น้อย สัญญาณกระแสจึงลดลง

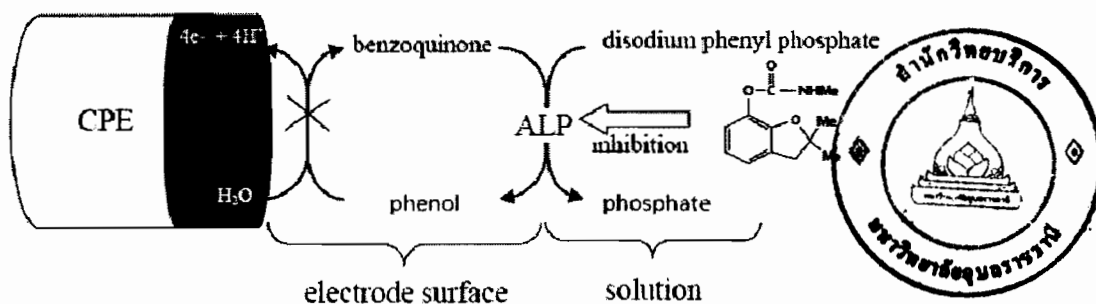
## 2.8 เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)<sup>[22]</sup>

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase, ALP) เป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเฟตจากโมเลกุลหลายชนิด เช่นนิวคลีโอไทด์ โปรตีน และอัลคาลอยด์ กระบวนการดึงหมู่ฟอสเฟตออกเรียกว่า ดีฟอสโฟริเลชัน (Dephosphorylation) ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดของการทำงานของเอนไซม์นี้อยู่ที่ 8.0 และเป็นเอนไซม์ที่พบได้ตามเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายมนุษย์ โดยส่วนใหญ่จะพบตรงบริเวณกระดูก ตับ ไต ลำไส้ รก ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคต่างๆซึ่งสัมพันธ์กับอวัยวะต่างๆเหล่านี้ โดยระดับปกติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยทั่วไปจะอยู่ที่อัตรา 25-100 IU/L อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากกว่า 300 IU/L จะสามารถเป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคที่ร้ายแรง ซึ่งประกอบไปด้วยโรคตับ โรคมะเร็งตับ โรคตับอักเสบ โรคกระดูก มะเร็งกระดูก มะเร็งไต เป็นต้น กลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูเร็น<sup>[23]</sup> แสดงดังรูปที่

2.17



รูปที่ 2.17 กลไกการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส



รูปที่ 2.18 หลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรนบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาของไดไฮโดรเดียมฟีนิลฟอสเฟตเกิดเป็นฟีนอล เมื่อให้ศักย์กระตุ้น 0.75 V เทียบกับขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl จะทำให้เกิดโปรตอน และอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณฟีนอล จากการทำงานของเอนไซม์ แต่เมื่อมีคาร์โบฟูแรนเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถทำงานได้ลดลงหรือไม่สามารถทำงานได้เลยทำให้ได้สัญญาณของฟีนอลลดลงซึ่งขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน ที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง ดังรูป 2.18

## 2.9 คาร์บอนเพส (Carbon paste) <sup>[24]</sup>

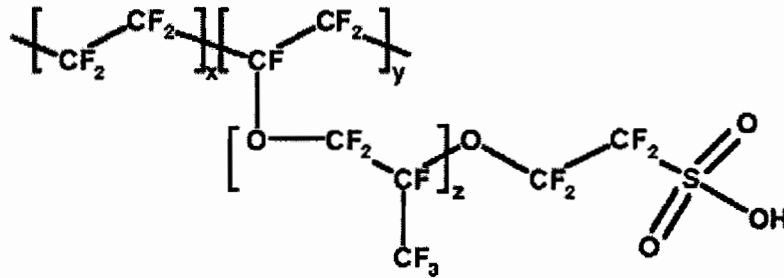
คาร์บอนเพส นิยมใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เนื่องจากมีช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กว้าง กระแสพื้นหลังต่ำ (Background current) ราคาถูก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารหลายชนิด ง่ายต่อการผสมกับสารหลายชนิดที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า องค์ประกอบของคาร์บอนเพส คือ

1. ผงคาร์บอนขนาดนาโน เป็นองค์ประกอบหลักของคาร์บอนเพสที่ใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ ดังต่อไปนี้
  - 1.1 มีขนาดของอนุภาคระดับนาโน
  - 1.2 มีความบริสุทธิ์สูง
  - 1.3 อนุภาคมีการกระจายตัวที่ดี
  - 1.4 มีแรงดูดซับน้อย
2. ตัวเชื่อมประสาน (Binder) ได้แก่ สารจำพวกน้ำมันหรือเรียกว่า Oil ทำหน้าที่เป็นตัวประสานให้ผงคาร์บอนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และทำหน้าที่ร่วมกับผงคาร์บอนเพื่อให้เกิดเป็นคาร์บอนเพส ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้
  - 2.1 มีความเหนียวและไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น
  - 2.2 มีความหนืดสูง
  - 2.3 ละลายในน้ำได้น้อย
  - 2.4 ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

## 2.10 สารละลายพอลิเตตราฟลูออโรเอทีลีน หรือ นาฟิออน<sup>[25]</sup>

สารละลายนาฟิออน (Nafion) ที่มีการเติมแต่งกึ่งก้านด้วยสายโซ่ที่มีหมู่ซัลโฟนิลเพื่อให้เกิดระบบการส่งผ่านโปรตอน จัดเป็นพอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรนที่โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยโมโนเมอร์ ซึ่งมีค่า  $n$  ตั้งแต่ 6 ถึง 10 และ  $m$  มากกว่า 1 ดังรูปที่ 2.19

คุณสมบัติของนาฟิออน คือ ทนต่อสารเคมีไม่ว่าเป็นสภาวะกรด-เบส หรือสัมผัสพวกเปอร์ออกไซด์ คลอรีน และยังทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 125 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังมีองค์การแตกตัวที่สูงทำให้เกิดโปรตอนในปริมาณมาก ทำให้มีสภาพการนำไฟฟ้าที่ดี



รูปที่ 2.19 โมเลกุลของนาฟิออนซึ่งประกอบด้วยเตตราฟลูออโรเอทีลีนและเปอร์ฟลูออโร-3,6 ไดออกซะ-4-เมทิล-7-ออกทีน-ซัลโฟนิล

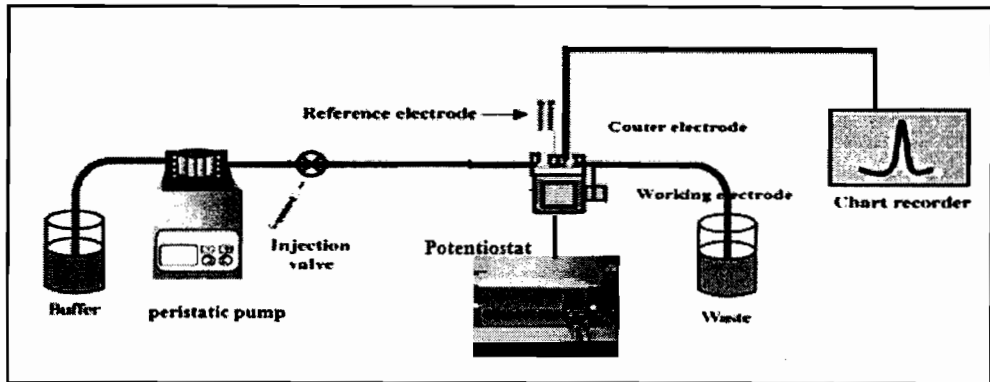
งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในระบบการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติของการไหลหรือเรียกอีกชื่อว่า โฟลอินเจกชันอะนาไลซิส ซึ่งมีรายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

## 2.11 ระบบการวิเคราะห์การไหลแบบอัตโนมัติ หรือ โฟลอินเจกชันอะนาไลซิส (Flow Injection Analysis; FIA)<sup>[26]</sup>

โฟลอินเจกชันอะนาไลซิส (Flow Injection Analysis) หรือเรียกย่อๆ ว่า เอฟไอเอ (FIA) เป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งอาศัยหลักการฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ในระดับไมโครลิตรเข้าสู่กระแสตัวพา ซึ่งอาจเป็นรีเอเจนต์หรือตัวทำละลายหรือสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งไหลอย่างต่อเนื่องภายในระบบท่อ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็ก ด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมและคงที่ สารตัวอย่างกับรีเอเจนต์จะทำปฏิกิริยาเคมีที่ Mixing reactor แล้วไหลเข้าสู่ Flow through cell ของเครื่องตรวจวัดชนิดใดๆ การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบของกระแสรีเอเจนต์ เรียกว่า เอฟไอเอแบบปกติ (Normal FIA หรือ nFIA) ส่วนในกรณีที่มีการฉีดรีเอเจนต์เข้าสู่กระแสของสารตัวอย่าง เรียกว่า เอฟไอเอแบบย้อนกลับ (Reverse FIA หรือ rFIA) การตรวจวัดด้วยระบบ เอฟไอเอ เป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำและความถูกต้องสูง ให้ข้อมูลที่เชื่อถือได้ ประหยัดต้นทุน ใช้สารเคมีในปริมาณน้อย สามารถวิเคราะห์สารเคมีที่ไม่ซับซ้อน ราคาถูก มีประสิทธิภาพ และความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถประยุกต์และพัฒนาได้อย่างต่อเนื่อง

วิธีการวิเคราะห์สารที่ผู้วิจัยเลือกศึกษาคือเทคนิค Flow Injection Analysis (FIA) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเคมีที่ไม่ซับซ้อน ราคาถูก มีประสิทธิภาพและความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถประยุกต์และพัฒนาได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้วัสดุที่หาได้ง่ายในประเทศ โดยในงานวิจัยได้ออกแบบการ

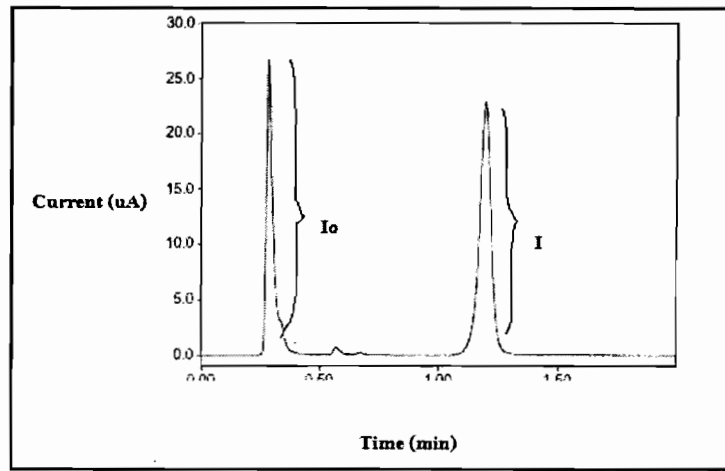
ทดลองโดยใช้อิเล็กโทรเคมีคอลเซลล์มาเชื่อมต่อเป็นระบบการตรวจวัดกับระบบ FIA ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 วิธีการตรวจวัดในระบบ FIA ในงานวิจัย

2.12 วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม

หลักการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอ้อม (Indirect method) ในระบบ FIA เป็นวิธีการวิเคราะห์ โดยติดตามสัญญาณที่ลดลงของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analyte) เมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์มีน้อยสัญญาณที่ได้จะมีค่ามาก แต่ถ้าสารที่ต้องการวิเคราะห์มีค่ามากสัญญาณที่ได้จะมีค่าน้อย ซึ่งสามารถแสดงสัญญาณที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 2.21 และนำไปสู่การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ดังสมการที่ 2.4



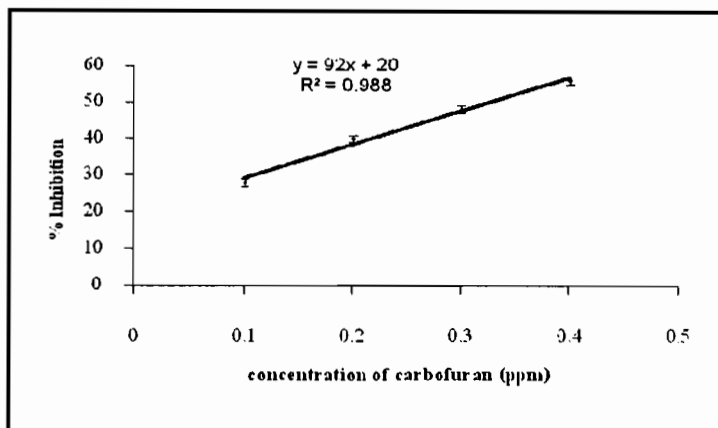
รูปที่ 2.21 โครโนแกรมของสัญญาณการวิเคราะห์ด้วยระบบ FIA

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100$$

..... 2.4

- เมื่อ  $I_0$  คือกระแสที่เกิดจากการคะตาลีไนส์สารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ ( $\mu\text{A}$ )
- $I$  คือ กระแสที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง ( $\mu\text{A}$ )

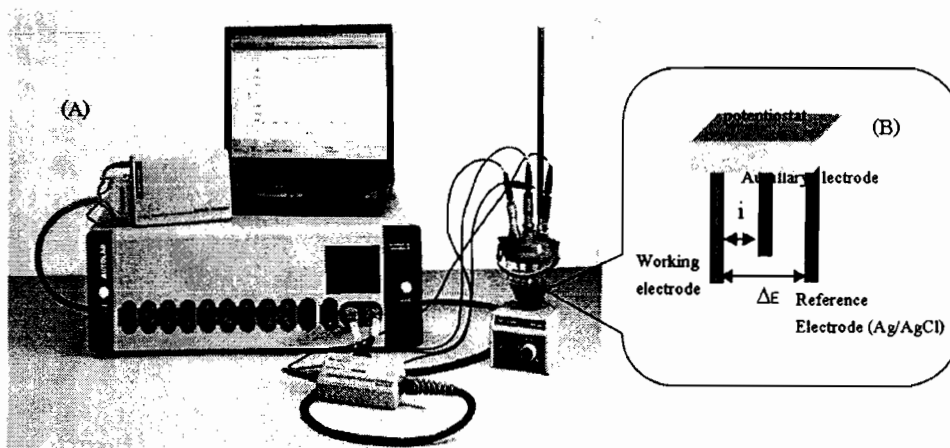
จากข้อมูลที่ได้จะไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง แสดงดังรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง

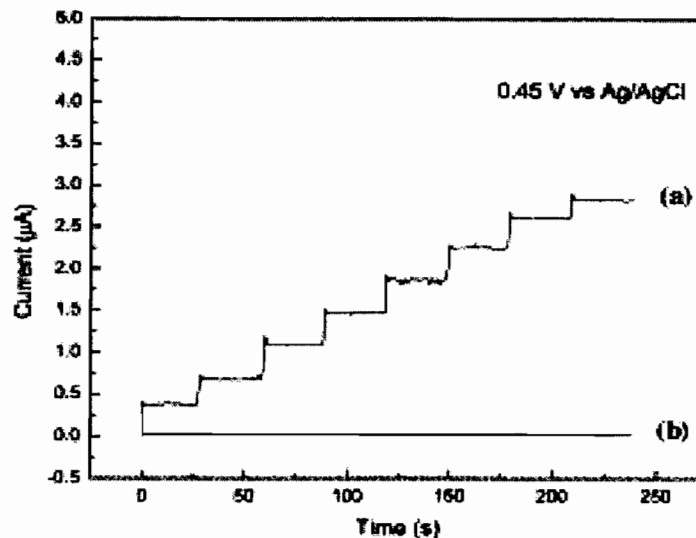
### 2.13 เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี (Chronoamperometry)

เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีเป็นระบบที่ประกอบไปด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) และ ขั้วไฟฟ้าช่วย (Auxillary electrode) โดยหลักการทำงานของเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีเป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าอ้างอิง แสดงแผนภาพเครื่องมือและการจัดเซลล์ ดังรูปที่ 2.23(A) จากนั้นทำการตรวจวัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าช่วย ดังรูปที่ 2.23(B)



รูปที่ 2.23 (A) การจัดระบบการวิเคราะห์ของเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าทำงานตรึงด้วยเฮนโซลิม และ (B) ภาพจำลองของการจัดเรียงขั้วไฟฟ้าทั้งสาม

ซึ่งกระแสที่เกิดขึ้นจะเป็นกระแสแคโทดิกหรือแอโนดิกขึ้นกับสารตัวกลางทางไฟฟ้าว่าจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชัน โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณของกระแสแอโนดิกหรือกระแสแคโทดิกเทียบกับเวลา ดังรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 สัญญาณกระแสแอโนดิกเทียบกับเวลาที่วัดได้จากเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี

#### 2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bertocchi P. และคณะ<sup>[26]</sup> ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อศึกษาผลการยับยั้งบนข้าวไฟฟ้ากลูโคส เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณปรอทในยา โดยอาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ ศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ซึ่งศึกษาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดในแบบและระบบการไหลแบบอัตโนมัติ ที่อัตราการไหล  $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  โดยช่วงที่ศึกษาความเข้มข้นของปรอทอยู่ในช่วง 1-60 ppb ได้ค่า  $\%RSD \leq 2 \%$

Guodong L. และคณะ<sup>[27]</sup> ได้ศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงข้าวไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเพส ศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ศึกษาแมงกานีสออกไซด์ และ Octahedral Molecular Sieves (OMS) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เทียบกับ OMS การเตรียมข้าวไฟฟ้าโดยการปรับปรุงข้าวไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเพสที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และใช้ OMS เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน ใช้สารละลายนาฟิออนช่วยในการตรึงเอนไซม์ให้ติดกับข้าวไฟฟ้า ไบโอเซนเซอร์ที่ได้นั้นใช้ในการตรวจวัดกลูโคส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เช่น ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 และใช้ศักย์ไฟฟ้า +0.3 V เทียบกับข้าวไฟฟ้า Ag/AgCl ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน อยู่ในช่วง 3.5-1.75 mmol/L และ 0.05-0.1 mmol/L ตามลำดับ ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ OMS เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอนมีการตอบสนองที่รวดเร็วและมีเสถียรภาพที่ดี สามารถเตรียมได้ง่ายและมีราคาถูก

Kurt K. และคณะ<sup>[28]</sup> ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมพันธะกับแมงกานีสออกไซด์และกลูโคสออกซิเดซึ่งเป็นข้าวไฟฟ้าแบบ



สกรีน-ปรินท์ โดยใช้การวิเคราะห์ในระบบการไหลอัตโนมัติ ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแบบ สกรีน-ปรินท์ ขึ้นอยู่กับหมึกคาร์บอนที่มีเมงกานีสออกไซด์เป็นสารตัวกลางในการนำส่งอิเล็กตรอน ไบโอเซนเซอร์สามารถทำงานภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ใช้ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จากการทดลองพบว่าในช่วงเชิงเส้นของการตอบสนองในระบบการไหลอัตโนมัติ ที่อัตราการไหล 0.2 mL.min<sup>-1</sup> ปริมาณการฉีดสารตัวอย่าง 0.25 mL ใช้ศักย์ไฟฟ้ากระตุ้น +0.48 V เทียบกับขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl ได้ช่วงความเข้มข้นของกลูโคส 11-13900 mol/L ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 7% และใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสนาน 2 ชั่วโมง

Hasna M. และคณะ<sup>[29]</sup> ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยการยับยั้งของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และ มัลตาโลเตส เพื่อตรวจหาปริมาณปรอท ศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี ในการทดลองใช้ขั้วไฟฟ้าทองคำขาวในการนำส่งอิเล็กตรอนตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ศักย์ไฟฟ้าที่กระตุ้นสารตัวกลางที่ +0.6 V เทียบกับขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl ใช้เวลาในการบ่มปรอท 20 นาที ความเข้มข้นของสับเสตรต (น้ำตาลซูโครส) ระหว่าง  $3.3 \times 10^{-3}$  ถึง  $5.1 \times 10^{-3}$  M ช่วงความเข้มข้นปรอท  $1 \times 10^{-8}$  ถึง  $1 \times 10^{-6}$  M และขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดปรอทที่ 3 ppb

Marcela C. และคณะ<sup>[30]</sup> พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนคาร์บอนเพสและมีคอปเปอร์ออกไซด์ (CuO) เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน ศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี ส่งผลให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นมีค่าลดต่ำลง ซึ่งปกติค่าศักย์ไฟฟ้าของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คือ +0.7 V ผลของการลดลงของศักย์ที่ใช้กระตุ้นส่งผลให้ลดผลของตัวรบกวน เช่น กรดแอสคอร์บิก กรดยูริก และอะซิเตมิโนเฟอร์ (Acetaminopher) ปริมาณที่เหมาะสมของการเติมตัวนำส่งอิเล็กตรอนคอปเปอร์ออกไซด์ คือ 10%(w/w) ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้นั้นมีการตอบสนองที่รวดเร็ว มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานตั้งแต่  $1.35 \times 10^{-2}$  M (2.43 g/L) เป็นต้นไป และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้คือ  $2.0 \times 10^{-5}$  M

Lijun L. และคณะ<sup>[31]</sup> ได้พัฒนา Bionanomultilayer เพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ ศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี ใช้หลักการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่หมู่ไทออล (Thiols) ไบโอเซนเซอร์นี้มีการตอบสนองเชิงเส้นตรงดังนี้ Glutathione (GHS) และ Cysteine (CSH) 0.5-41.0  $\mu$ M ( $R^2=0.9983$ ,  $n=12$ ) และ 0.4-28.8  $\mu$ M ( $R^2=0.9991$ ,  $n=9$ ) ได้ขีดความสามารถต่ำสุด (S/N=3) ของ GHS = 0.09  $\mu$ M และ CSH = 0.06  $\mu$ M

Tang L. และคณะ<sup>[32]</sup> ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อตรวจหาปริมาณปรอทศึกษาด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี ในการทดลองใช้ขั้วไฟฟ้าแพลทินัมในการนำส่งอิเล็กตรอนตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) จากการทดลองพบว่าได้ขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด 0.49 g/L ได้ช่วงการตอบสนองเชิงเส้น 0.49-783.21  $\mu$ g/L และ 783.21  $\mu$ g/L ถึง 25.55 mg/L

Joanne H. W. และคณะ<sup>[33]</sup> ได้พัฒนา alkaline phosphatase ที่ใช้มีลักษณะการใช้งานได้ครั้งเดียว โดยเป็นการตรวจวัดการผลิตฟีนอล โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส , pH 10 ใช้ความเข้มข้นของ glucose , ascorbic acid และ urea ที่ความเข้มข้น 10 mM/L , 5 mg/L และ 400 mg/L ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้ถูกเปรียบเทียบโดยใช้ spectrophotometry ใน bovine serum ช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่างข้อมูลของไบโอเซนเซอร์และความเข้มข้นของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) มีความสัมพันธ์กัน

Franco M. และคณะ<sup>[34]</sup> ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์ ชนิด alkaline phosphatase เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม organophosphorous และ organochlorinated agent ทำวิจัยโดยเตรียมเซนเซอร์สองแบบ แบบแรกใช้แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ตรึงเอนไซม์ alkaline phosphatase และ 3-indoxyl phosphate เป็นสับสเตรท (substrate) แบบที่สองใช้เทคนิคโวลแทมเมตรี โดยติดตามสารตัวกลางทางไฟฟ้า (electroactive product) ของเอนไซม์ alkaline phosphatase โดยใช้สับสเตรท phenyl phosphate และ ascorbate-2-phosphate ทั้งสองแบบได้เงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ คือใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH=8 เวลาของการบ่ม 30-60 นาที ผลการวิจัยพบว่า สัญญาณที่วัดต่ำสุดคือ 0.5 - 6  $\mu\text{g/L}$

Galezowska A. และคณะ<sup>[35]</sup> พัฒนาไบโอเซนเซอร์ในระบบ Flow Injection Analysis เพื่อศึกษาความไวของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterases (AChE) ด้วยสารกำจัดศัตรูพืช organophosphorus โดยการตรึงเอนไซม์ AChE ด้วย polyvinylalcohol polymer (PVA-AWP) บนขั้วไฟฟ้าแบบ screen printed graphite โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ต้องมีการบ่มเอนไซม์ AChE ด้วยตัวยับยั้งซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชประเภท organophosphorus โดยเปรียบเทียบการใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ malaoxon (MO), chlorfenvinphos (CFV), and chlorpyrifos-oxon (CPO) แล้วนำไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นตรวจวิเคราะห์ในน้ำตัวอย่าง โดยพบว่าช่วงความเข้มข้นที่สามารถวิเคราะห์ได้ของ CPO เท่ากับ 0.005 - 0.08  $\mu\text{g/L}^{-1}$  และ CFV เท่ากับ 0.005 - 10  $\mu\text{g/L}^{-1}$  ค่าขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์ของ CPO CFV และ MO เท่ากับ 0.005 0.01 และ 0.002  $\mu\text{g/L}^{-1}$  ตามลำดับ

Erol A. และคณะ<sup>[36]</sup> ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้ตรวจวัดคาเฟอีนโดยอาศัยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ โดยใช้ glutaraldehyde เป็น crosslink - agent บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ceramic based gold screen printed โดยการตรวจหาปริมาณคาเฟอีนทำได้โดยการใช้คาเฟอีนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยการตอบสนองของเอนไซม์จะลดลงเมื่อปริมาณคาเฟอีนเพิ่มขึ้น ช่วงความเข้มข้นที่ตรวจวัดปริมาณคาเฟอีนได้อยู่ที่ 0.1- 10  $\mu\text{M}$  ขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน คือ 0.08  $\mu\text{M}$

Leopoldo D. C. และคณะ<sup>[37]</sup> พัฒนารูปการตรวจวัดของ alkaline phosphatase บนฐาน p-Hydroxyphenyl phosphate ซึ่งถูกไฮโดรไลซ์โดย alkaline phosphatase ให้เป็น hydroquinone แทนการตรวจวัดโดยตรง การขยายวงจรถูก oxidize ไปสู่ quinone ที่พื้นผิวอิเล็กโทรดและรีดิวซ์กลับไปสู่ hydroquinone โดยกลูโคสออกซิเดสในรูปของ glucose พบว่า detection limit ของ alkaline phosphatase เท่ากับ  $2.5 \times 10^{-14}$  M ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบ detection limit ด้วยวิธีมาตรฐาน (Colorimetry , Fluorimetry , Chemiluminescence) โดยใช้เวลารอบ 10 นาที และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

### 3. วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้จัดทำที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งมีการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการทดลอง ดังนี้

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

##### 3.1.1 เครื่องมือ เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	เครื่องมือ	บริษัท (รุ่น)
1	Analytical balances	Denver Instrument (TB-214)
2	AUTOLAB (Potentiostat)	Metrohm (PG11)
3	Counter electrode : Pt	CH-Instrument
4	Electrochemical cell	-
5	Hotplate & Stirrer	VELP SCIENTIFICA
6	Injection port	Water
7	Peristaltic pump	Ismatec
8	pH meter	Metrohm (T521309)
9	Reference electrode : Ag/AgCl	CH-Instrument
10	Vertex	Labnet

##### 3.1.2 อุปกรณ์ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย

ลำดับที่	อุปกรณ์	ขนาด
1	Beaker	50, 100, 250, 500 และ 1000 mL
2	Brown bottle	-
3	Cylinder	10, 25, 50, และ 100 mL
4	Magnetic bar	-
5	Micro pipette	10, 100 และ 1000 $\mu$ L
6	Pipette	1, 2, 5, 10 และ 25 mL
7	pH paper	-

8	Tips	-
9	Volumetric flask	5, 10, 25, 50, 100, 250 และ 500 mL
10	Water bottle	-
11	Storage bottle	-
12	Spoon	-
13	Stirring rod	-

3.2 สารเคมี สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย มีหลายเกรดและสั่งซื้อมาจากหลายบริษัท แสดงดังตารางที่ 3.3  
 ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	รายการ	ระดับความบริสุทธิ์	บริษัทที่ผลิต
1	Ammonium hydroxide	AR grade	Carlo erba
2	Alkaline phosphatase		Sigma Aldrich
3	Carbon nanopowder	99.0	Sigma Aldrich
4	Citric acid	99.7	Analar
5	Di-sodium hydrogen phosphate	99.0	Carlo erba
6	Enzyme glucose oxidase	AR grade	Sigma Aldrich
7	Glucose powder	-	-
8	Hydrochloric acid	37.0	Carlo erba
9	Hydrogen peroxide	Analytical grade	Fisher scientific
10	Mercury (Hg <sup>2+</sup> ) standard solution	AR grade	SCP science
11	Mineral oil	AR grade	Acros
12	Manganese dioxide	AR grade	-
13	Nafion	AR grade	Fluka
14	Sodium hydroxide	AR grade	SCP science

## ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

### 3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

#### 3.3.1 เตรียมสารละลาย 0.2 M ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) มา 7.0980 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 250 mL เก็บในขวดเก็บสาร

#### 3.3.2 เตรียมสารละลาย 0.1 M กรดซิตริก (0.1 M Citric acid)

ชั่งกรดซิตริก (Citric acid) มา 2.1014 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 100 mL เก็บในขวดเก็บสาร

#### 3.3.3 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โพรไทด์เกลือฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 (Phosphate buffer)

สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ปริมาตร 100 mL เตรียมได้จากการผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 M (จากวิธีการเตรียม 3.3.1) กับสารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 M (จากวิธีการเตรียม 3.3.2) โดยผสมสารละลาย 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ปริมาตร 81.0 mL และ 0.1 M Citric acid 19.0 mL คนให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นวัดความเป็นกรด-เบสของสารละลายด้วยเครื่องวัด pH ถ้าสารละลายไม่ได้ความเป็นกรดเบสตามที่ต้องการ ปรับ pH ของสารละลายด้วย 1.0 M HCl ในกรณีที่ต้องการให้สารละลายมี pH ต่ำลงและปรับ pH ของสารละลายด้วย 1.0 M NaOH ในกรณีที่ต้องการให้สารละลายมี pH สูงขึ้น จากนั้นนำสารไปเก็บในตู้เย็น

#### 3.3.4 เตรียมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1%w/v Glucose solution)

ชั่งกลูโคสมา 1.00xx g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 100 mL ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นนำสารไปเก็บในตู้เย็น

#### 3.3.5 เตรียมสารละลายปรอท (Stock solution) ความเข้มข้น 100 mg/L (100 mg/L Mercury standard solution)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานปรอท 1000 mg/L ปริมาตร 1000  $\mu\text{L}$  และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตร 10 mL

#### 3.3.6 เตรียมสารละลายปรอทความเข้มข้น 5 mg/L (5 mg/L Mercury standard solution) ปริมาตร 10 mL

ปิเปตสารละลายปรอท 100 mg/L (จากการเตรียม ข้อ 3.3.5) ปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 10 mL

### 3.3.7 การเตรียมสารละลายนาฟิออน (Nafion solution)

ปิเปตสารละลายนาฟิออนปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  ทำให้เป็นเบสเล็กน้อยด้วย 0.1 M สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ โดยตรวจสอบค่า pH ให้ได้ประมาณ 7-8 ด้วยกระดาษทดสอบค่า pH จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น

### 3.3.8 การเตรียมคาร์บอนเพส (Carbon paste)

ชั่งผงคาร์บอนขนาดนาโนปริมาณ 0.4750 g และผงแมงกานีสออกไซด์ 0.0250 g เติมน้ำมัน Mineral oil ทีละ 100  $\mu\text{L}$  (โดยไซมิลโคโรปิเปตขนาด 1000  $\mu\text{L}$ ) กวนให้เกิดเพสพร้อมกับเติมน้ำมัน Mineral oil จนปริมาตร รวมเป็น 450  $\mu\text{L}$  คนจนเกิดคาร์บอนเพสที่สมบูรณ์ เก็บไว้ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการนำไปใช้งาน

### 3.3.9 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase solution)

ชั่งผงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.10xx g ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 1000  $\mu\text{L}$  ผสมด้วยเครื่องผสมวอร์เทก เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

### 3.3.10 การเตรียมสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Enzyme casting)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจากการเตรียมข้อ 3.3.9 ปริมาตร 40  $\mu\text{L}$  เติมนสารละลายนาฟิออนปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  (จากการเตรียม ข้อ 3.3.7) และน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมวอร์เทก เป็นเวลานาน 30 นาที จะได้สารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

## 3.4 การเตรียมคาร์บอนเพสบนอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ (Electrochemical cell)

อัดคาร์บอนเพสที่เตรียมจาก ข้อ 3.3.8 ลงในอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ ให้เต็มและแน่น ใช้กระดาษซังสารขัดผิวหน้าคาร์บอนเพสให้เรียบและสม่ำเสมอ

## 3.5 การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase immobilization)

ปิเปตสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส จากวิธีการเตรียม ข้อ 3.3.10 ลงบนผิวหน้าคาร์บอนเพสที่อัดแน่นในเซลล์ (ดังวิธีการเตรียม 3.4) โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ลงบนผิวหน้าคาร์บอนเพสด้านละ 5  $\mu\text{L}$  จากนั้นรอสารละลายเอนไซม์แห้ง ปิเปตสารละลายเอนไซม์ซ้ำอีกครั้ง แล้ว

ปล่อยให้สารละลายเอนไซม์แห่งที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับอิเล็กโทรเคมีเซลล์ที่พร้อมใช้งานต่อไป

### 3.6 วิธีการทดลอง

#### 3.6.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ ทำการศึกษาที่สภาวะการทำงานต่างๆ ดังนี้

##### 3.6.1.1 ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสม

1. เตรียมคาร์บอนเพส ดังวิธีการเตรียม 3.3.8 และ วิธีการเตรียม 3.4 และ ตรึง

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ดังวิธีการเตรียม 3.5

2. ประกอบอิเล็กโทรเคมีเซลล์ (Electrochemical cell) ที่มีขั้วไฟฟ้าทั้งสามขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งานไปโอเซนเซอร์ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม และต่อกับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ให้ศักย์แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งานกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และวัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นของเครื่องมือวิเคราะห์ (Auto-Lab analyzer) ที่เชื่อมต่อกับระบบการไหลแบบอัตโนมัติที่มีเพอริสแตร์ติกปั๊ม (Peristaltic pump) เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมตรี

3. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง

4. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพา ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

5. ศึกษาอัตราการไหลที่ 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

6. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1

##### 3.6.1.2 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

1. วิธีการทดลองเหมือนการทดลอง 3.6.1.1 ข้อ 1-2

2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง ด้วยอัตราการไหล 2.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (ตามเงื่อนไขอัตราการไหลที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.6.1.1)

3. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพา

4. ศึกษาศักย์กระตุ้นของสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่ +0.42 +0.44 +0.46 +0.48 และ +0.50 V

5. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.2



### 3.6.1.3 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท

1. วิธีการทดลองเหมือนการทดลอง 3.6.1.1 ข้อ 1-2
2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง ด้วยอัตราการไหล  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (ตามเงื่อนไขอัตราการไหลที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.6.1.1) ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า  $+0.46 \text{ V}$  (ตามเงื่อนไขศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.6.1.2)
  3. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร  $100 \mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพาวัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น “ $I_0$ ”
  4. ฉีดสารละลายปรอทความเข้มข้น  $5 \text{ mg/L}$  ปริมาตร  $100 \mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพาใช้เวลาการไหลในท่อนโซนของปรอทถึงอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ เป็นเวลา 4 วินาที หยุดอัตราการไหลโดยปิดปั๊มเป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง แล้วฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร  $100 \mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพา สัญญาณกระแสที่ได้กำหนดให้ค่ากระแสเป็น “ $I$ ”
  5. ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 3-5 โดยเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ 4 6 8 และ 10 นาที ตามลำดับ
  6. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.3

### 3.6.2 ศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท

1. วิธีการทดลองเหมือนการทดลอง 3.6.1.3 ข้อ 1-2
2. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร  $100 \mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพาวัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น “ $I_0$ ”
  3. ฉีดสารละลายปรอทความเข้มข้น  $5 \text{ mg/L}$  ปริมาตร  $100 \mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพาใช้เวลาการไหลในท่อนโซนของปรอทถึงอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ เป็นเวลา 4 วินาที จากจุดฉีดสาร จากนั้นหยุดอัตราการไหลโดยปิดปั๊มเป็นเวลา 6 นาที (ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท) เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง แล้วฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร  $100 \mu\text{L}$  เข้าไปในกระแสตัวพา สัญญาณกระแสที่ได้กำหนดให้ค่ากระแสเป็น “ $I$ ”
  4. ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 3-5 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของปรอท 0.5 1.0 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 12.0 14.0 และ  $16.0 \text{ mg/L}$  ตามลำดับ
  5. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.2

### 3.6.3 ศึกษาความไวของการวิเคราะห์ปรอท

1. เตรียมวิธีการทดลองเหมือนการทดลอง 3.6.1.3 ข้อ 1-2

2. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในกระแสดัวพาวัดสัญญาณ กระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น “I<sub>0</sub>”

3. ฉีดสารละลายปรอทความเข้มข้น 5 mg/L ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในกระแสดัวพาวัด ใช้เวลาการไหลในท่อนโซนของปรอทถึงอิเล็กโทรเคมีเซลล์ เป็นเวลา 4 วินาทีจากจุดฉีดสาร จากนั้นหยุดอัตราการไหลโดยปิดปั๊มเป็นเวลา 6 นาที (ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอทที่เหมาะสม จากการทดลองที่ 3.6.1.3) เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด เปิดปั๊มให้กระแสดัวพาวัดในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง แล้วฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในกระแสดัวพาวัด สัญญาณกระแสที่ได้ กำหนดให้ค่ากระแสเป็น “I”

4. ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 3-5 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของปรอท 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 mg/L ตามลำดับ

5. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.3

### 3.6.4 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ปรอท

1. วิธีการทดลองเหมือนการทดลอง 3.6.1.3 ข้อ 1-2

2. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในกระแสดัวพาวัดสัญญาณ กระแสที่เกิดขึ้น

3. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคสซ้ำอีก 9 ครั้ง

4. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.4

### 3.6.5 ศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์ปรอท

1. วิธีการทดลองเหมือนการทดลอง 3.6.1.3 ข้อ 1-2

2. ฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในกระแสดัวพาวัดสัญญาณ กระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น “I<sub>0</sub>”

3. ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในระบบการไหล จับเวลาจนครบ 4 วินาทีจากจุดฉีดสาร จากนั้นหยุดอัตราการไหลโดยปิดปั๊มเป็นเวลา 6 นาที (ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่เหมาะสม จากการทดลองที่ 3.6.1.3) เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด เปิดปั๊มให้กระแสดัวพาวัดในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง แล้วฉีดสารละลาย 1% (w/v) กลูโคส ปริมาตร 100  $\mu$ L เข้าไปในกระแสดัวพาวัด สัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น กำหนดให้ค่ากระแสเป็น “I” ซึ่งคิดเป็นสัญญาณรบกวน (Noise)

4. แสดงผลการทดลองข้อ 3-5 โดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (สัญญาณรบกวน) เป็นสารละลายปรอทความเข้มข้น 0.14 mg/L (เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ S/N = 3) วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น “I”

5. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.5

## ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบพูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

### 3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

#### 3.7.1 เตรียมสารละลาย 0.2 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $0.2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ ) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) มา 7.0980 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

#### 3.7.2 เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ กรดซิตริก ( $0.1 \text{ M Citric Acid}$ ) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งกรดซิตริก (Citric Acid) มา 2.1014 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

#### 3.7.3 เตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือฟอสเฟตซิตริก บัฟเฟอร์ pH 8 (Phosphate Citric Buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมได้จากการผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กับสารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH 8 ใช้  $0.2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$  ปริมาตร 95.4 มิลลิลิตร และ  $0.1 \text{ M Citric Acid}$  ปริมาตร 4.6 มิลลิลิตร แล้ว นำสารที่ได้ไปวัดความเป็นกรด-เบสของสารละลายด้วย pH-Meter และปรับ pH ของสารละลายด้วย  $1.0 \text{ M HCl}$  ในกรณีที่ต้องการให้สารละลายมี pH ต่ำลงและ  $1.0 \text{ M NaOH}$  ในกรณีที่ให้สารละลายมี pH สูงขึ้น เก็บสารละลายที่ได้ในขวดเก็บสารแล้วนำสารไปเก็บในตู้เย็น ติดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม

#### 3.7.4 เตรียมสารละลาย 4.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (4%W/V Disodium Phenyl Phosphate Solution) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตมา 4.0000 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

### 3.7.5 เตรียมสารละลายคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 100 mg/L (100 mg/L Carbofuran) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งคาร์โบฟูแรนมา 0.0010 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

### 3.7.6 เตรียมสารละลายคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 10 mg/L (10 mg/L Carbofuran) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

### 3.7.7 การเตรียมสารละลาย นาฟิออน

ปิเปตสารละลายนาฟิออน มา 500 ไมโครลิตรทำให้เป็นกลางด้วย 0.1 M สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ตรวจสอบค่า pH ให้ได้ประมาณ 7 ด้วยกระดาษทดสอบค่า pH ติดฉลากระบุ ชื่อ วัน เดือน ปี ที่ทำการเตรียม แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

### 3.7.8 การเตรียมคาร์บอนเพส

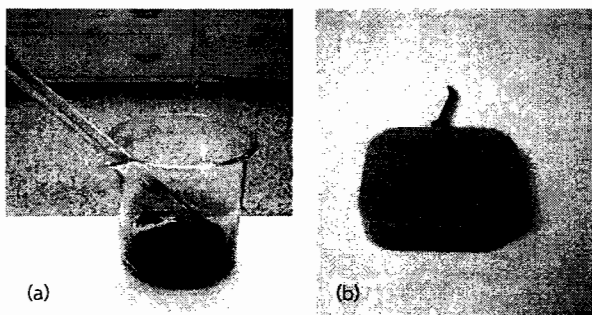
ชั่งผงคาร์บอนขนาดนาโนปริมาณ 0.5000 กรัม เติม mineral oil ทีละ 100 ไมโครลิตร กวนให้คาร์บอนเพสกับ Mineral oil เข้ากัน เติม mineral oil ปริมาตรรวมได้ 450 ไมโครลิตร และคนจน เกิดเป็นคาร์บอนเพส เก็บไว้ในโถดูดความชื้น

### 3.7.9 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 KU/ml ปริมาตร 40 ไมโครลิตร สารละลายนาฟิออน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ น้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันด้วยเครื่อง Vertex จากนั้นติดฉลาก ระบุ ชื่อ วัน เดือน ปี ที่ทำการเตรียม แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นรอการใช้งาน

## 3.8 การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Working electrode)

อัดคาร์บอนเพสที่เตรียมจากข้อ 3.7.8 ลงในอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ให้เต็มและแน่นแล้วใช้กระดาษขึงสารขัดผิวหน้าคาร์บอนเพสให้เรียบและสม่ำเสมอ ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 (a) การเตรียมคาร์บอนเพส และ (b) การอัดคาร์บอนเพสใส่ในอิเล็กโทรเคมีเซลล์

### 3.9 การตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

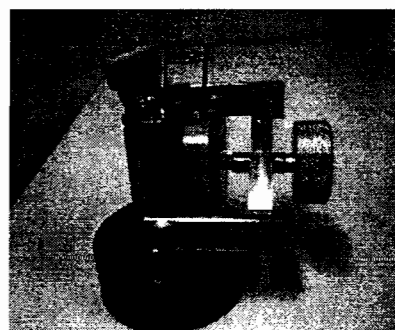
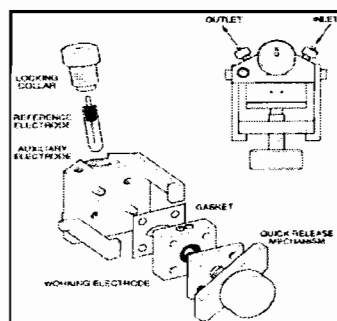
1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 KU/ml ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายนาฟิออน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ น้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสม Vertex

2. ปิเปตสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ลงบนผิวหน้าคาร์บอนเพสที่เตรียมได้จากการทดลอง ข้อ 3.8 ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร รอให้แห้ง

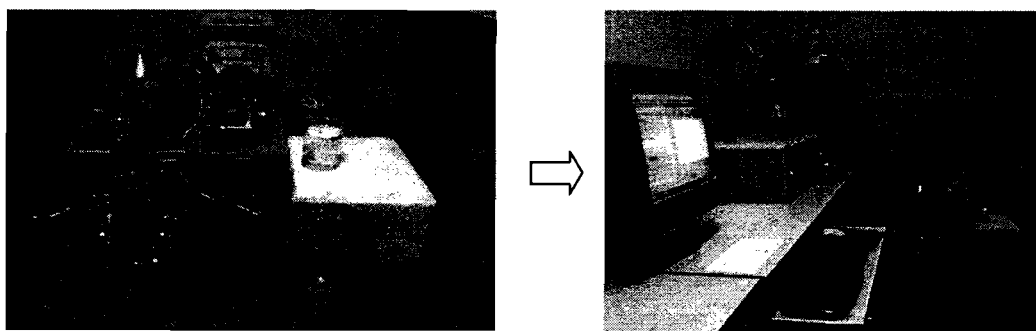
3. เก็บคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาหนึ่งคืน ได้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ใช้ในการวิเคราะห์

4. นำขั้วไฟฟ้าใช้งานที่ได้ไปประกอบเข้ากับอิเล็กโทรเคมีคอลเซลล์ที่เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 3.2 แล้วต่อเข้ากับ ระบบการวิเคราะห์ FIA ประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้าทั้งสาม (ขั้วไฟฟ้าใช้งานไบโอเซนเซอร์ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl และขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม) เข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (Potentiostat) ของเครื่องมือวิเคราะห์ Auto-Lab ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอ-โรเมทรี ดังรูปที่

3.3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.2 การประกอบเซลล์เข้ากับอิเล็กโทรเคมีคอลเซลล์ (Electrochemical cell)



รูปที่ 3.3 ระบบการวิเคราะห์ FIA – Auto lab

### 3.10 วิธีการทดลอง

3.10.1 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในระบบที่มีการไหลแบบอัตโนมัติ ทำการศึกษาที่สภาวะต่างๆ ดังนี้

#### 3.10.1.1 ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสม

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.8 และ 3.9
2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง
3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต (4% Disodium phenyl phosphate) ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 V วัดค่ากระแสที่เกิดขึ้น
4. ศึกษาอัตราการไหลที่ 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 มิลลิตรต่อนาที
5. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.7.1

#### 3.10.1.2 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.8 และ 3.9
2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง
3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิล ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ที่ไหลด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิตรต่อนาที วัดค่าสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น

4. ศึกษาศักย์กระตุ้นของสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่ 0.60 0.65 0.70 0.75 และ 0.80 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์
5. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.7.2

### 3.10.1.3 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน ในระบบที่มีการไหลแบบอัดโนมิติ

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.8 และ 3.9
2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง
3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ที่ไหลด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อ ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I_0$
4. ฉีดสารละลายคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา เมื่อเริ่มสับสวิทช์ injection valve ให้จับเวลาจนครบ 5 วินาที จากนั้นปิดปั๊ม โดยปิดปั๊มเป็นเวลา 4 นาที (ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน) แล้วเปิดปั๊มเพื่อชะคาร์โบฟูแรนออกจากระบบการไหล แล้วฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่าน injection volume ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I$
5. ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 2- 4 โดยเปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ เป็น 5 6 7 8 9 และ 10 นาที ตามลำดับ
6. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.7.3

### 3.10.2 ศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.4 และ 3.5
2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง
3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ที่ไหลด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อ นาที ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I_0$
4. ฉีดสารละลายคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 12.5 ppb ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา เมื่อเริ่มสับสวิทช์ injection valve ให้จับเวลาจนครบ

5 วินาที จากนั้นปิดปั๊ม โดยปิดปั๊มเป็นเวลา 8 นาที แล้วเปิดปั๊มเพื่อชะคาร์โบฟูแรนออกจากระบบการไหล แล้วฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่าน injection volume ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I_0$

5. ทำซ้ำการทดลองที่ 4 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนเพิ่มขึ้น ทำการทดลองจนไม่มีการลดลงของกระแสที่เกิดขึ้น

6. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.8

### 3.10.3 ศึกษาความไวของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.8 และ 3.9

2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง

3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ที่ไหลด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I_0$

4. ฉีดสารละลายคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 16 ppb ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา เมื่อเริ่มสับ injection valve ให้จับเวลาจนครบ 5 วินาที จากนั้นปิดปั๊ม โดยปิดปั๊มเป็นเวลา 8 นาที แล้วเปิดปั๊มเพื่อชะคาร์โบฟูแรนออกจากระบบการไหล แล้วฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่าน injection volume ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I_0$

5. ทำซ้ำการทดลองที่ 4 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนเป็น 18, 20, 22 ppb ตามลำดับ

6. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.9

### 3.10.4 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision)

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.4 และ 3.5

2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง

3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิล ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ที่ไหลด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น โดยฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตจำนวน 10 ครั้ง

4. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.10



### 3.10.5 ศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน

1. เตรียมเซลล์ไฟฟ้า ตามหัวข้อ 3.4 และ 3.5
2. ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็นกระแสตัวพาในระบบการไหล เปิดปั๊มให้กระแสตัวพาในระบบไหลอย่างต่อเนื่อง
  3. ฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ที่ไหลด้วยอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I_0$
  4. ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา สับสวิทช์ของ injection valve ไปที่ตำแหน่ง inject เมื่อเริ่มสับสวิทช์ ให้จับเวลาจนครบ 5 วินาที จากนั้นปิดปั๊มเป็นเวลา 8 นาที แล้วเปิดปั๊มเพื่อชะคาร์โบฟูแรนออกจากระบบการไหล แล้วฉีดสารละลาย 4% (w/v) ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ผ่านระบบฉีดสาร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าไปในกระแสตัวพา วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I$  ของ สัญญาณรบกวน (Noise)
  5. ทำซ้ำการทดลองที่ 4 แต่เปลี่ยนจากการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 เป็น คาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 16 ppb วัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นซึ่งกำหนดให้ค่ากระแสที่ได้เป็น  $I$  ของการวิเคราะห์
  6. แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 4.11

#### 4. ผลการทดลอง

##### **ตอนที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ**

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติโดยใช้คาร์บอนเพสต์ริงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสแบบกายภาพบนอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์และเชื่อมต่อกับระบบการไหลแบบอัตโนมัติ หลักการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสให้เกิดเป็นกลูโคโนแลคโตน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า และมีแมงกานีสออกไซด์เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน เมื่อให้ศักย์กระตุ้นสารนำส่งอิเล็กตรอนจะทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดโปรตอนและอิเล็กตรอน ทำการวัดสัญญาณกระแสทางไฟฟ้าทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ งานวิจัยนี้อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เมื่อมีปรอทเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ทำให้ทำงานได้ลดลงมีผลทำให้ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น้อยลง อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการวิเคราะห์ปริมาณปรอท ซึ่งเป็นหลักการวิเคราะห์ทางอ้อมของไบโอเซนเซอร์

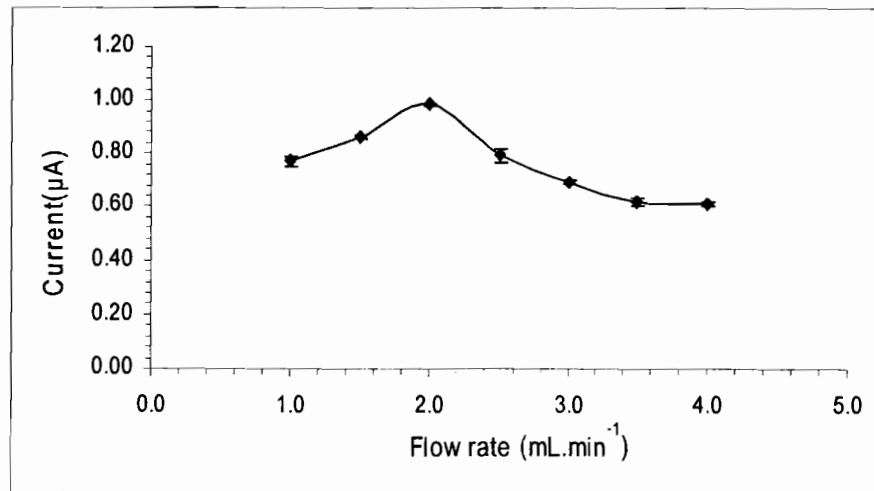
การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติจำเป็นต้องศึกษาหาค่าประกอบและสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สัญญาณการวิเคราะห์ที่ดี ศึกษาสภาวะต่างๆดังนี้ ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท ความไวของการวิเคราะห์ ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ช่วงการวิเคราะห์ของกราฟมาตรฐาน ขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และการวิเคราะห์ (Limit of quantification, LOQ)

#### 4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสตรึงบนคาร์บอนเพสต์ริงในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ

เพื่อให้ได้สภาวะการทำงานที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์ จึงได้ทำการศึกษาสภาวะการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสตรึงบนคาร์บอนเพสต์ริงบนอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ ผลการทดลองของสภาวะต่างๆที่ศึกษา ดังนี้

##### 4.1.1 ผลการศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา

อัตราการไหลของกระแสตัวพามีผลต่อสัญญาณกระแสของการตรวจวัดเนื่องจากสารตัวกลางทางไฟฟ้าจะถูกผลิตขึ้นจากการที่กลูโคสถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงบนคาร์บอนเพสต์ริง ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาที่อัตราการไหลของกระแสตัวพาตั้งแต่ 1.0 - 4.0 mL.min<sup>-1</sup> ผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์สัญญาณกระแสของปฏิกิริยา ( $\mu\text{A}$ ) กับอัตราการไหลของกระแสตัวพา ดังรูปที่ 4.1



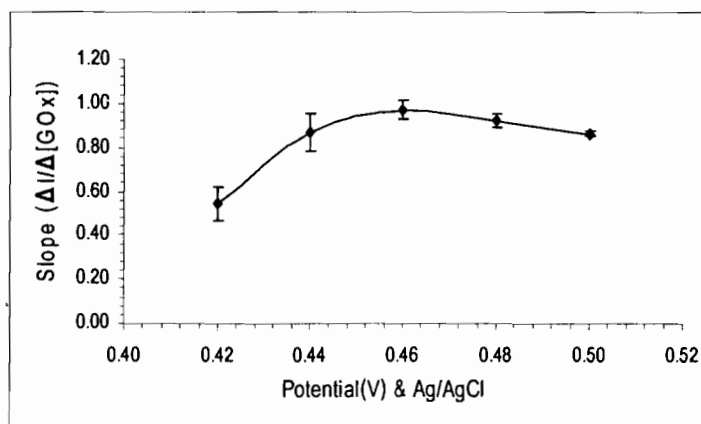
รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและอัตราการไหลของกระแสตัวพา ใช้คาร์บอนเพสต์ริงด้วย เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสปริมาณ 1.27 U/mm<sup>2</sup> ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อัตราการไหล 1.0 - 4.0 mL.min<sup>-1</sup>

จากรูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสกับอัตราการไหลของกระแสตัวพา ที่ 2.0 mL.min<sup>-1</sup> ให้ค่าเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ค่ากระแสสูงที่สุดและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำที่สุด %RSD = 0.3 เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการไหลอื่นซึ่งให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.8 - 3.1 จากข้อมูลพบว่าที่อัตราการไหลที่ 1.0 - 1.5 mL.min<sup>-1</sup> ให้ค่าสัญญาณกระแสต่ำและพิสัยกว้าง จึงไม่เหมาะสมที่จะเลือกใช้อัตราการไหลที่ค่านี้ และที่อัตราการไหล 2.5 - 4.0 mL.min<sup>-1</sup> นั้นค่าสัญญาณกระแสลดลงเนื่องจากท่อนโซนของสารละลายกลูโคสไหลผ่านผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเร็วจึงทำให้การเร่งปฏิกิริยาเกิดไม่สมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยจึงเลือกอัตราการไหลของสารตัวพาที่ อัตราการไหล 2.0 mL.min<sup>-1</sup>

นอกจากนี้งานวิจัยยังต้องศึกษาศักย์ที่ใช้ในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่ผลิตจากปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์ ดังหัวข้อถัดไป

#### 4.1.2 ผลการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

จากการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสให้กลายเป็นกลูโคโนแลกโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการทดลองสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ศักย์ +0.70 V เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl ซึ่งศักย์ที่ใช้กระตุ้นนี้เป็นศักย์ที่สารจำพวกกรดแอสคอบิก กรดฮิวมิก สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้สัญญาณรบกวนการวิเคราะห์ได้ ดังนั้น กลุ่มผู้วิจัยจึงมีการเติมสารนำส่งอิเล็กตรอน แมงกานีสออกไซด์ ที่ใช้ศักย์กระตุ้นไฟฟ้าในช่วง +0.40 V ถึง +0.50 V แทนการกระตุ้นศักย์ออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังข้อมูลรูปที่ 4.2 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์กับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นแมงกานีสออกไซด์



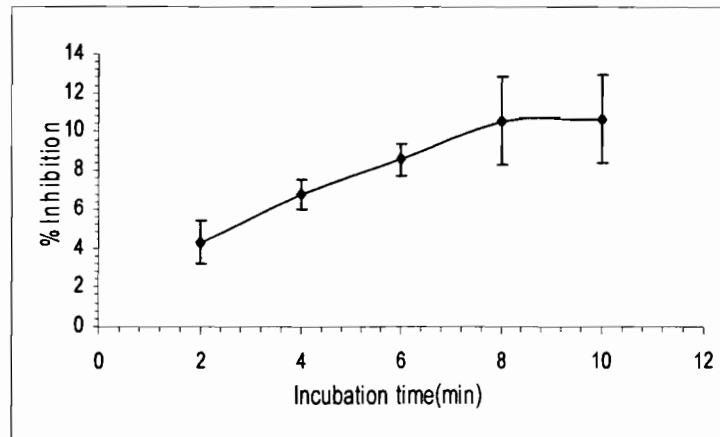
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าและความไวในการวิเคราะห์ ที่อัตราการไหลของกระแสตัวพา 2.0 mL.min<sup>-1</sup> ศึกษาศักย์ไฟฟ้า +0.42 ถึง +0.50 V ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์กับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นพบว่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุด คือ +0.46 V เนื่องจากให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ 0.969  $\mu\text{A.L.mol}^{-1}$  และให้ความเป็นเส้นตรง  $r^2 = 0.970$  เหมาะสมที่สุด ศักย์กระตุ้นในการศึกษานี้พบว่ามีความต่ำกว่างานวิจัยของ Kurt K. และคณะ ซึ่งใช้ศักย์กระตุ้นที่ +0.48 V<sup>[28]</sup> ทำให้งานวิจัยนี้สามารถเลี่ยงศักย์รบกวนการวิเคราะห์จากสารอื่นได้ดีขึ้น

ยิ่งไปกว่านั้น งานวิจัยนี้เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ได้ดียิ่งขึ้น จำเป็นต้องศึกษาระยะเวลาที่เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยปรอท เพื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ปริมาณปรอท รายละเอียด ดังหัวข้อถัดไป

#### 4.1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท

จากผลการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบที่มีการไหลแบบอัดโนมิติ ตรงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนผิวหน้าคาร์บอนเพส พบว่าเมื่อฉีดสารละลายตัวยับยั้งปรอทเข้าไปในระบบการไหลแบบอัดโนมิติ โดยให้ท่อนโซนของสารละลายปรอทไหลผ่านผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ตรงด้วยเอนไซม์ในอัตราการไหลที่เหมาะสมคือ 2.0 mL.min<sup>-1</sup> (จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1) นั้นไม่สามารถทำให้ปรอทยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้ จึงต้องทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้งปรอท โดยศึกษาระยะเวลาบ่มตั้งแต่ 2 ถึง 10 นาที โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.1.1 – 4.1.2 ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3

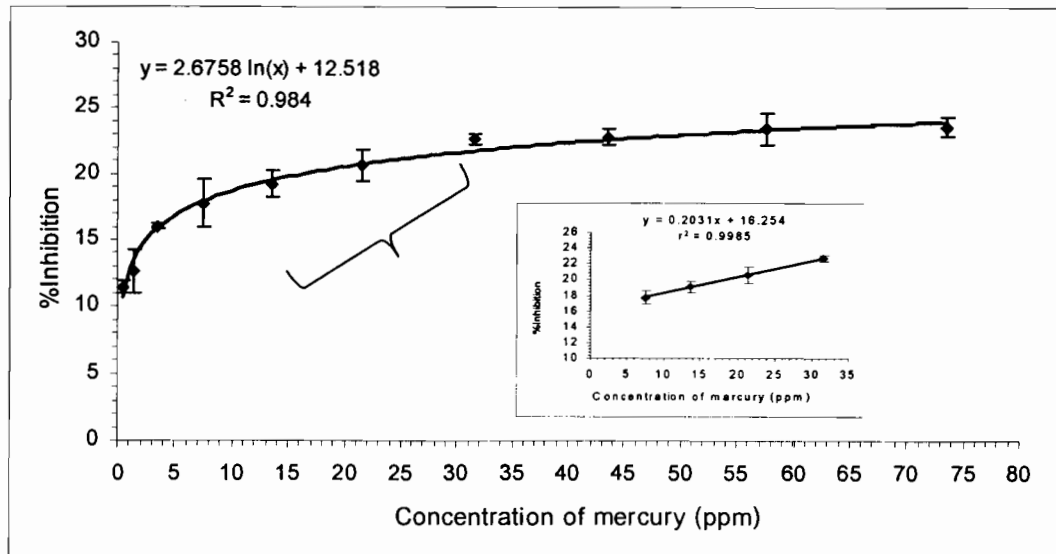


รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอทความเข้มข้น 5 mg/L ที่อัตราการไหล 2.0 mL.min<sup>-1</sup> ใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V ที่ระยะเวลา 2- 10 นาที

จากรูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับระยะเวลาที่บ่มเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท พบว่าระยะเวลา 6 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเริ่มคงที่และให้ค่าความแม่นยำของสัญญาณตรวจวัดสูง % RSD = 9.5 เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาบ่มอื่นๆ ที่ให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 11.50 - 26.13 และเวลาบ่ม 6 นาทีนี้เป็นระยะเวลาที่สั้นกว่างานวิจัยของ Hasna M. และคณะ จึงเลือกระยะเวลาในการบ่มที่ 6 นาที เพื่อทำการศึกษาต่อไป

#### 4.2 ผลการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท

งานวิจัยนี้อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอทโดยวิธีวิเคราะห์ทางอ้อม โดยตรงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนผิวหน้าคาร์บอนเพส และศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพื่อนำไปสู่การสร้างความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับปริมาณปรอทโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.1.1 - 4.1.3 ซึ่งผลการทดลองได้กราฟความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของปรอท ที่อัตราการไหล 2.0 mL.min<sup>-1</sup> ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท 6 นาที

จากผลการทดลอง ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์กับปริมาณปรอท พบว่า ได้กราฟความสัมพันธ์ แบบเส้นโค้ง  $y = 2.68 \ln x + 12.52$  และ  $R^2 = 0.984$  ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5-73.5 mg/L ซึ่งสามารถแบ่งช่วงเส้นตรงของการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ช่วง  $y = 0.90x + 11.51$  และ  $r^2 = 0.906$  ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5-7.5 mg/L และ แบบเส้นตรง  $y = 0.20x + 16.25$  และ  $r^2 = 0.999$  สามารถตรวจวัดปริมาณปรอทในช่วงความเข้มข้น 7.5-31.5 mg/L แสดงข้อมูลทั้งหมดดังตารางที่ 4.1 จากข้อมูลนำไปสู่การวิเคราะห์ปริมาณปรอทในตัวอย่างน้ำและอาหารต่อไปในงานอนาคต

ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับปริมาณปรอท

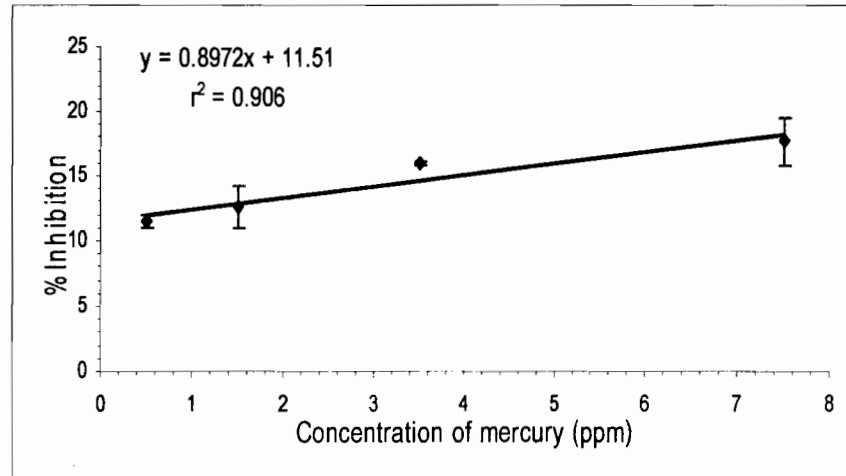
ความสัมพันธ์	ช่วงการวิเคราะห์	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
กราฟเส้นโค้ง $y = 2.68 \ln x + 12.52$	0.5 - 73.5 mg/L	$r^2 = 0.984$
กราฟเส้นตรง $y = 0.90x + 11.51$	0.5 - 7.5 mg/L	$r^2 = 0.906$
กราฟเส้นตรง $y = 0.20x + 16.25$	7.5 - 31.5 mg/L	$r^2 = 0.999$

#### 4.3 ผลการศึกษาความไวของการวิเคราะห์ปรอท

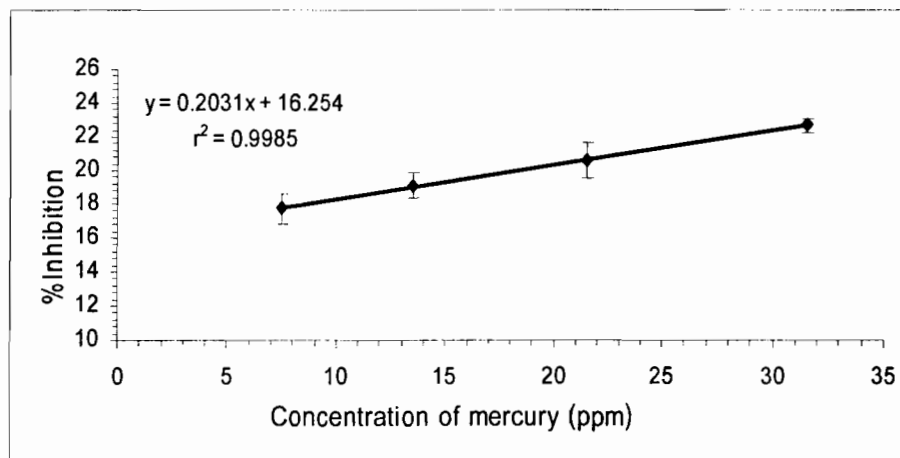
ไบโอเซนเซอร์ที่ตรวจวัดปริมาณปรอทในระบบการไหลแบบอัตโนมัติสามารถหาความไวของการวิเคราะห์ได้ 2 แบบ

1. จากกราฟเส้นโค้ง (Non-linear) ความไวของการวิเคราะห์สามารถหาได้จาก  $dy/dx$  พบว่าให้ค่าความไวคือ  $0.0106 \text{ \%Inhibition} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$  ที่ความเข้มข้น 7.5-31.5 mg/L

2. จากกราฟเส้นตรง (Linear) พิจารณาจากความสัมพันธ์  $y = 0.90x + 11.51$   $r^2 = 0.906$  และ  $y = 0.20x + 16.25$   $r^2 = 0.999$  ความไวในการวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 0.90 และ  $0.20 \text{ \%Inhibition} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$  ดังรูปที่ 4.5 และรูปที่ 4.6



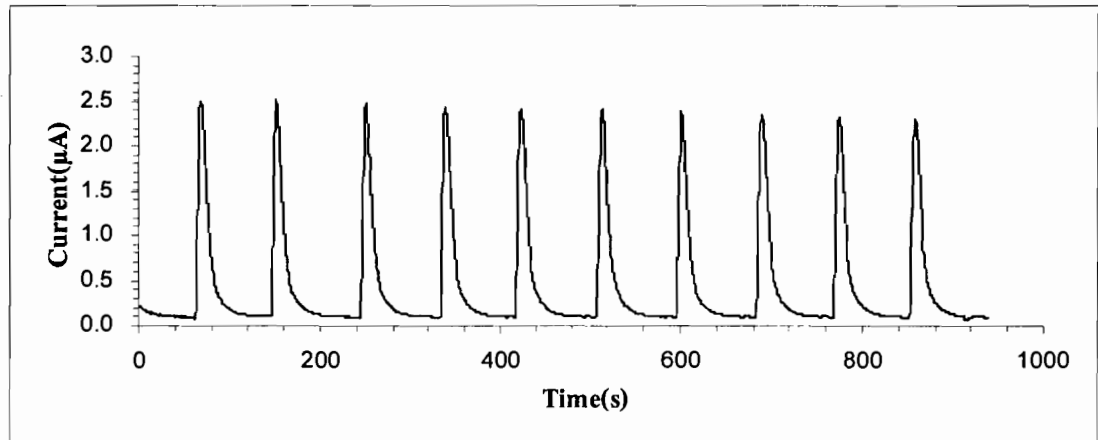
รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของปรอท โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ปริมาณ  $1.27 \text{ U/mm}^2$  ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบการไหลแบบอัตโนมัติใช้อัตราการไหล  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  ที่ศักย์กระตุ้น  $+0.46 \text{ V}$  ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยปรอท 6 นาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของปรอท โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ปริมาณ  $1.27 \text{ U/mm}^2$  ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบการไหลแบบอัตโนมัติใช้อัตราการไหล  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  ที่ศักย์กระตุ้น  $+0.46 \text{ V}$  ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยปรอท 6 นาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

#### 4.4 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ปรอท

จากการทดลองได้ทำการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ แล้วทำการตรวจวัดสัญญาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยากลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 4.1.1 – 4.1.2 โดยทำการตรวจวัด 10 ครั้ง พบว่าไบโอเซนเซอร์ตอบสนองให้ %RSD เท่ากับ 2.30 ดังรูปที่ 4.7

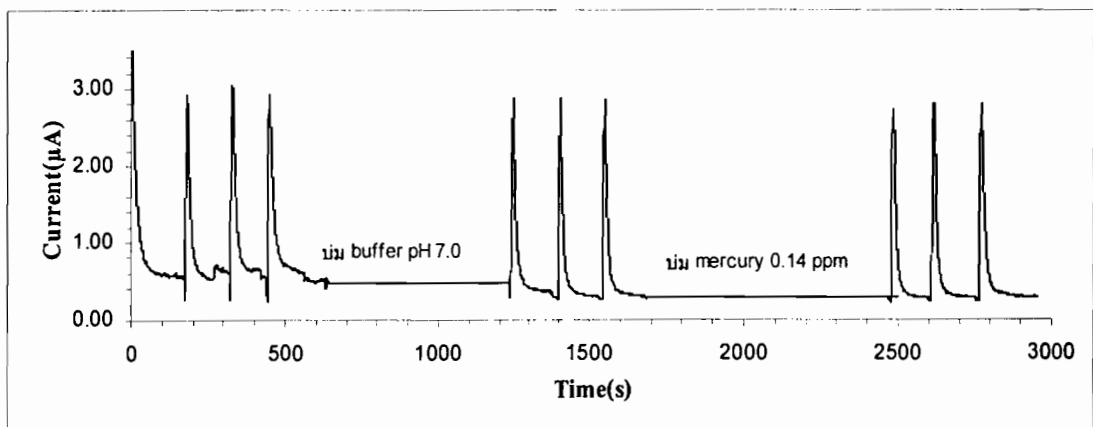


รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสที่ได้จากการฉีด 1%(w/v) Glucose ที่อัตราการไหล 2.0 mL.min<sup>-1</sup> ใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V

จากรูปที่ 4.7 พบว่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ให้ค่าความเที่ยงตรงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marcela C. และคณะ<sup>[30]</sup> ซึ่งศึกษาการตรวจวัดกลูโคสด้วยคาร์บอนเพสต์ริงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ให้ค่าความเที่ยงตรงของข้อมูลที่ % RSD  $\leq 2$  และให้ค่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ที่สูงกว่างานวิจัยของ Kurt K. และคณะ<sup>[28]</sup> ที่วิเคราะห์ด้วยไบโอเซนเซอร์ให้ค่า %RSD เท่ากับ 7% และค่าที่วิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนานี้ยอมรับและให้ค่าการวิเคราะห์ที่ดีเนื่องจากให้ %RSD  $\leq 10$  ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

#### 4.5 ผลการศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์ปรอท

ทำการทดสอบหาขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดปรอท ซึ่งศึกษาจากสัญญาณรบกวนและสัญญาณการวิเคราะห์ โดยคำนวณมาจาก 3S/N พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของปรอทที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 0.14 mg/L และยืนยันค่าขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์จากวิธีการทดลองที่ 3.6.5 ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและเวลา ที่อัตราการไหล 2.0 mL.min<sup>-1</sup> ใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.46 V ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท 6 นาที



สำหรับขีดความสามารถในการวิเคราะห์สามารถตรวจสอบจาก 10 S/N พบว่าความเข้มข้นของปรอทที่ 0.50 mg/L ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 10% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์ที่ 0.50 mg/L

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณปรอทในสารมาตรฐาน DORM-2 ด้วยระบบไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

พบว่าการทดสอบความถูกต้องในการวิเคราะห์ปริมาณปรอทในสารมาตรฐาน DORM-2 ซึ่งมีปริมาณปรอททั้งหมด 9.11 mg/Kg<sup>[38]</sup> ในงานวิจัยนี้ตรวจพบปรอท 9.07 mg/Kg คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมา 99.6 % จึงสามารถสรุปได้ว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณปรอทได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานวิเคราะห์ปริมาณปรอทในตัวอย่าง เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณปรอท ทดแทนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโคลเวเปอร์เจเนอเรนชันสเปกโตรสโกปี

## **ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ**

### **ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาคาร์บอนเพสที่ถูกตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยการตรึงทางกายภาพ ซึ่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะคาตาไลซ์โคเดียมฟีนิลฟอสเฟตเกิดเป็นฟีนอลเมื่อให้ศักย์กระตุ้น 0.75 V เทียบกับขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl จะทำให้เกิดโปรตอน และอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณฟีนอลที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ งานวิจัยนี้อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อมีคาร์โบฟูแรนเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถทำงานได้ลดลง ทำให้ได้สัญญาณของฟีนอลลดลงซึ่งขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรนที่เพิ่มขึ้นเป็นการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอ้อม

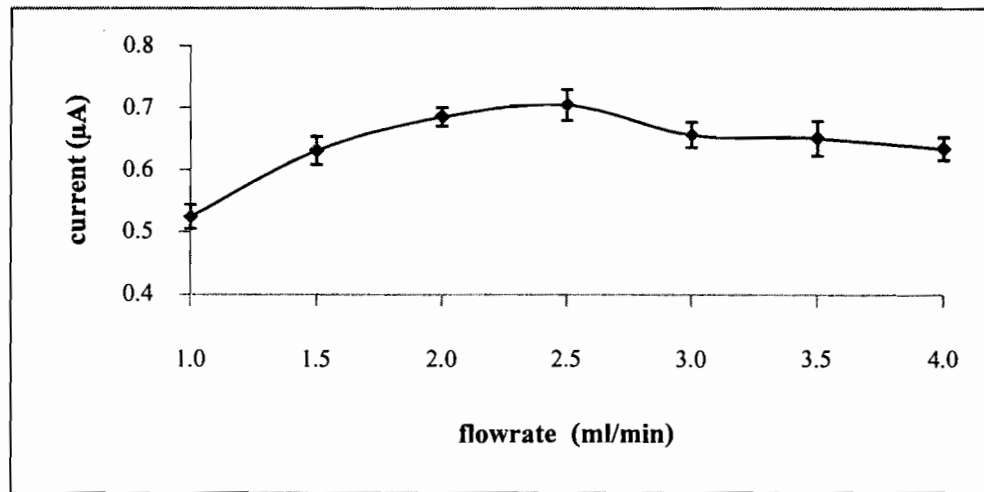
การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ จำเป็นต้องศึกษาองค์ประกอบและสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สัญญาณการวิเคราะห์ที่ดี โดยทำการศึกษาดังนี้ ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา ศึกษาศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นตัวกลางทางไฟฟ้าที่เหมาะสม ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน ศึกษาความไวของการวิเคราะห์ ศึกษาความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ และศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์

### **4.7 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในระบบการไหลแบบอัตโนมัติ**

เพื่อให้ได้ไบโอเซนเซอร์ที่เหมาะสม จึงได้ทำการศึกษาสภาวะการทำงานของคาร์บอนเพสที่ถูกตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในระบบที่มีการไหลแบบอัตโนมัติที่สภาวะต่าง ๆ ดังนี้ ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า และศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน

#### **4.7.1 ผลการศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสม**

จากการศึกษาการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบที่มีการไหลแบบอัตโนมัติ โดยตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าของคาร์บอนเพส พบว่าอัตราการไหลที่แตกต่างกันจะทำให้ค่าสัญญาณฟีนอลแตกต่างกัน และรูปร่างของพีคแตกต่างกัน ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสม จึงทำการศึกษาอัตราการไหลตั้งแต่ 1.0 – 4.0 มิลลิลิตรต่ออนาที แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.9

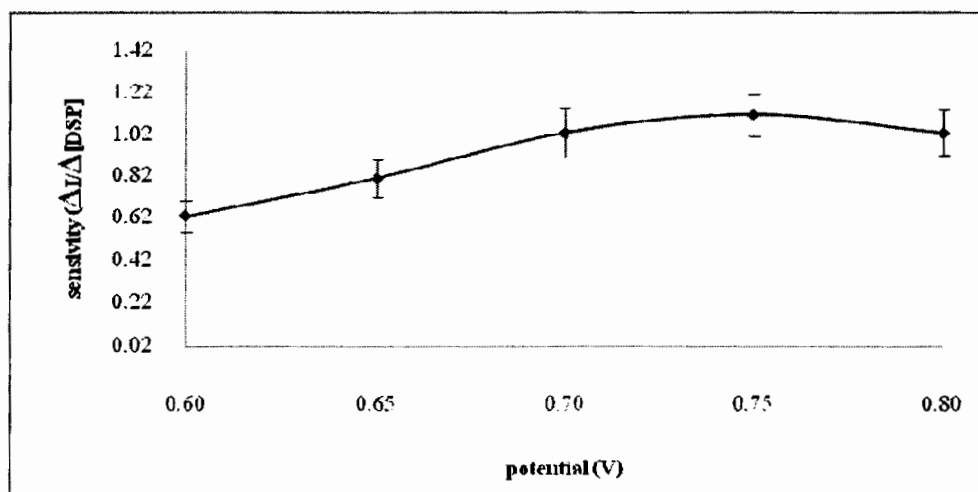


รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและอัตราการไหลโดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสปริมาณ 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลอินเจคชันอะนาไลซิส ใช้ศักย์กระตุ้นยสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 V ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำการศึกษาอัตราการไหล 1.0 – 4.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากรูปที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสกับอัตราการไหลของกระแสตัวพพบว่าอัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุด คือ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากให้ค่ากระแสที่สูงและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ต่ำที่สุด และจะเห็นว่าที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาทีนั้นค่ากระแสสูงที่สุดแต่เนื่องจากว่าที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอัตราการไหลที่สูงทำให้เอนไซม์สามารถหลุดออกจากผิวหน้าได้ง่ายเนื่องจากในงานวิจัยเป็นการตรึงเอนไซม์แบบกายภาพ และประกอบกับมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง ดังนั้นจึงเลือกอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นค่าที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 4.7.2 ผลการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า

จากการศึกษาการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบที่มีการไหลแบบอัตโนมัติ โดยตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าคาร์บอนเพส พบว่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้นสัญญาณของฟีนอลมีค่ามากกว่า +0.7 โวลต์ ดังนั้นจำเป็นต้องหาศักย์กระตุ้นสัญญาณทางไฟฟ้าที่เหมาะสม จึงทำการศึกษาศักย์กระตุ้นตั้งแต่ 0.6 – 0.8 โวลต์ แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.10

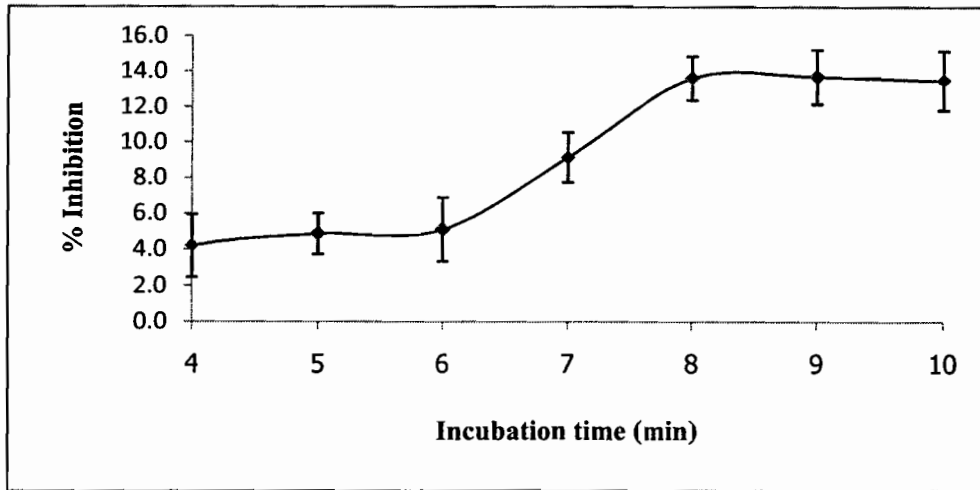


รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าและความชัน ( $\Delta I/\Delta$  [ALP]) โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสปริมาณ 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอิเล็กโทรไลต์ ใช้อัตราการไหลของกระแสตัวพา 2.0 มิลลิเมตรต่อนาที ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นสารตัวกลางไฟฟ้า 0.6 – 0.8 โวลต์ ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความไวในการวิเคราะห์กับศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นพบว่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.75 โวลต์ เนื่องจากมีความไวในการวิเคราะห์เหมาะสมที่สุดและความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด เป็นค่าที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 4.7.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน

จากการศึกษาการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบที่มีการไหลแบบอัตโนมัติ โดยการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าคาร์บอนเพส พบว่าหากฉีดด้วยบั๊บบังเข้าไปในระบบให้ไหลผ่านผิวหน้าเอนไซม์ในอัตราการไหลที่เหมาะสมคือ 2.0 มิลลิเมตรต่อนาที (จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1) นั้นไม่สามารถทำให้คาร์โบฟูแรนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ จึงต้องทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ด้วยด้วยบั๊บบัง โดยศึกษาที่ระยะเวลา 4 – 10 นาที แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.11

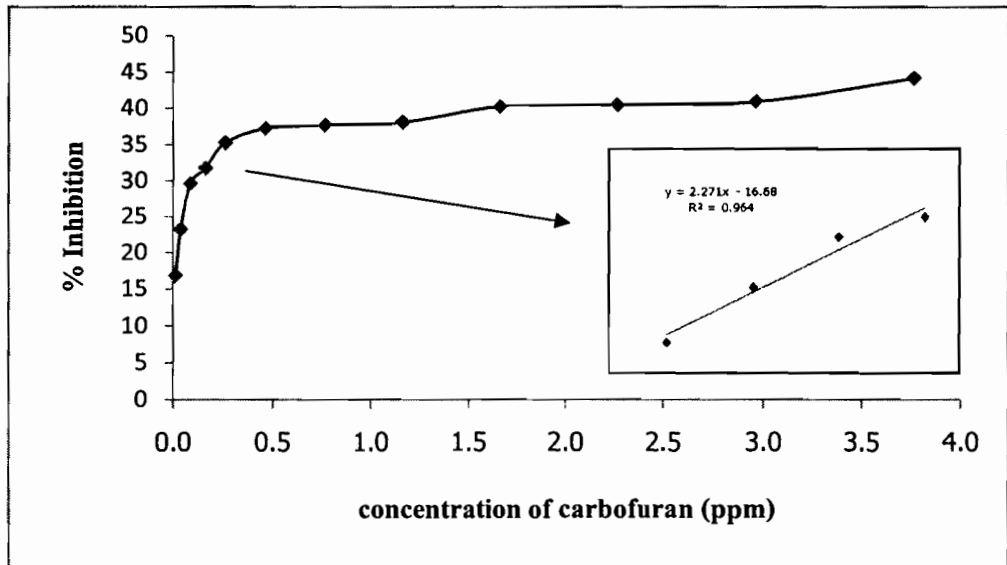


รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ด้วยคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 mg/L โดยใช้คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ในสารละลาย เกือหนุนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำการศึกษาที่ระยะเวลาในการบ่ม 4- 10 นาที

จากรูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งกับระยะเวลาที่ในการบ่ม เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน พบว่าระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมที่สุดคือ 8 นาที เนื่องจากปีนระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเริ่มคงที่ จึงเป็นค่าที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 4.8 ผลการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน

ในงานวิจัยนี้อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรนโดยวิธีวิเคราะห์ทางอ้อม ทำการศึกษาโดยตรงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าคาร์บอนเพสโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.7.1 - 4.7.3 และให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.12

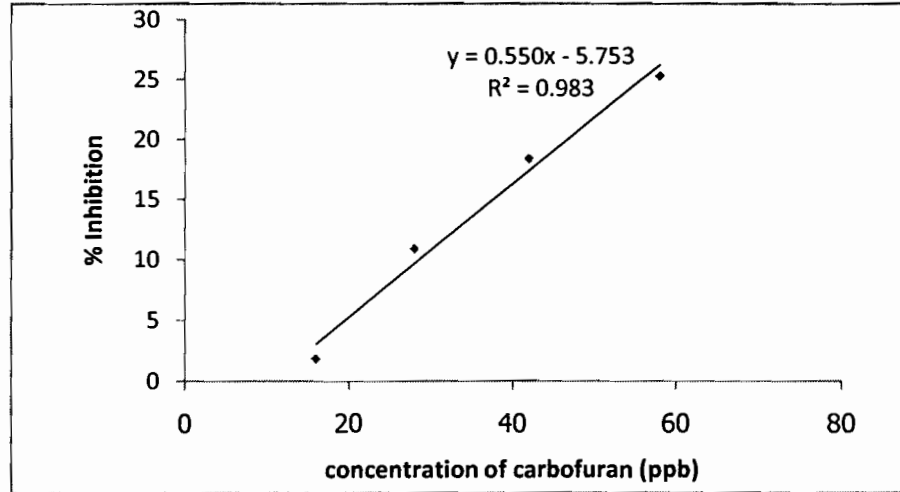


รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโมแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอิเล็กโทรไลต์ไฮดรอกไซด์ไอออนิก 2.0 มิลลิเมตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 8 นาที ในสารละลายเกลืออนินทรีย์บัฟเฟอร์ pH 8.0

จากผลการทดลองรูปที่ 4.12 ได้ทำการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยสารละลายคาร์บอนไดออกไซด์และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ได้กราฟความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.12 สามารถเลือกช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ได้ คือ 16 – 50 ppb

#### 4.9 ผลการศึกษาความไวของการวิเคราะห์คาร์บอนไดออกไซด์

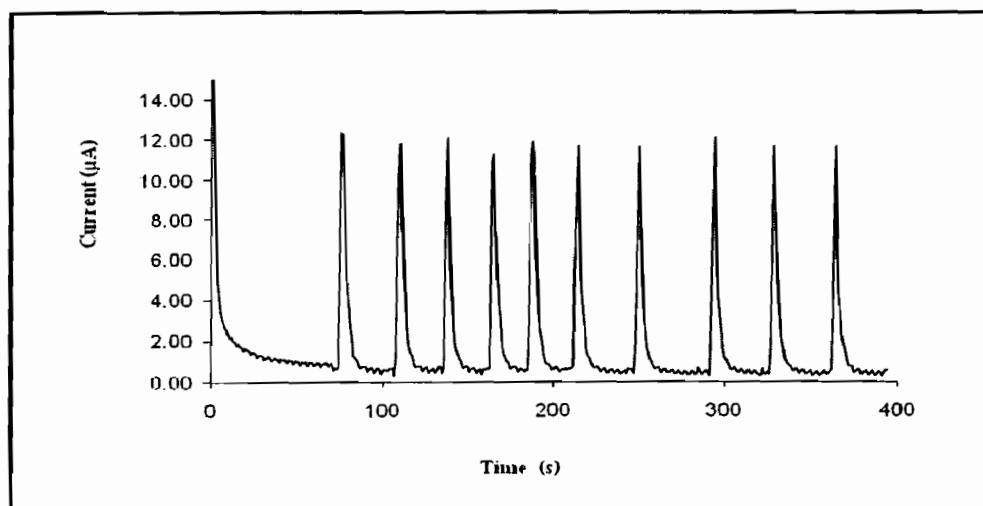
จากการทดลองหาความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ทำให้สามารถบอกความไวของการวิเคราะห์นั้นได้จากค่าความชันของความเป็นเส้นตรงจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน โดยใช้คาร์บอนเพสต์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโมแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอีนเจกชันอะนาไลซิสใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน 8 นาที ในสารละลายเกลือทูนุสเฟดบัฟเฟอร์ pH 8.0

#### 4.10 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน

จากการทดลองได้ทำการทดสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบโพลีอีนเจกชันอะนาไลซิส โดยเตรียมไบโอเซนเซอร์ แล้วทำการตรวจวัดสัญญาณของพินอลที่เกิดขึ้นจากการคะตาไลไนต์โคโคเดียมฟีนิลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยทำการตรวจวัด 10 ครั้ง พบว่าไบโอเซนเซอร์ตอบสนองให้ %RSD เท่ากับ 2.86 ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14

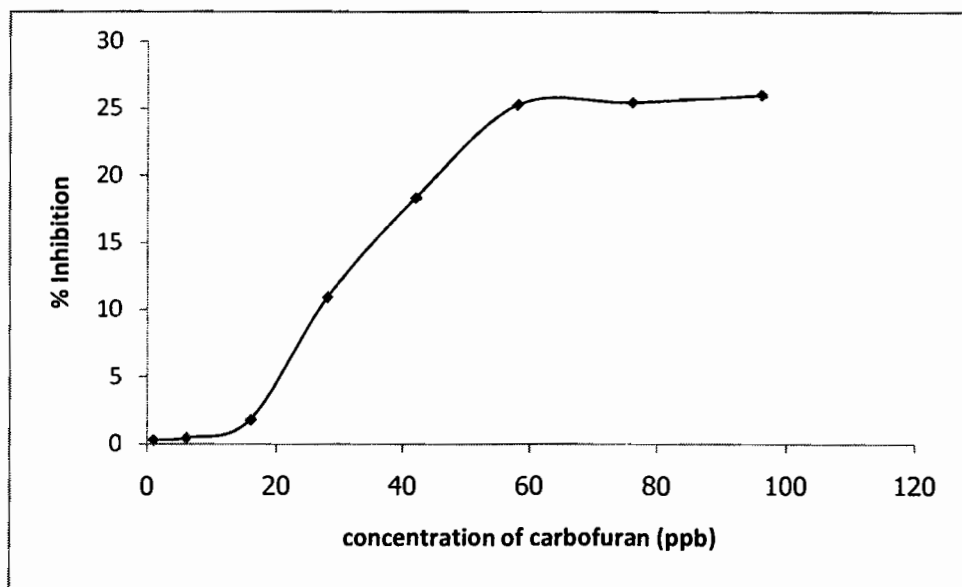


รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสและเวลาของสารละลาย 4% ไดไฮโดรอะซิโตน โดย ใช้คาร์บอนเพสต์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิค

โครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0

#### 4.11 ผลการศึกษาขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน

ทำการทดสอบหาขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์คาร์โบฟูแรนได้ คือ 16 ppb (การเลือกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์จากผลการทดลองหัวข้อ 4.8 มาศึกษายืนยันว่าเป็นค่าขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์ ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์โบฟูแรน โดยใช้คาร์บอนเพสต์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า 0.75 โวลต์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน 8 นาที ในสารละลายเกลือหนูนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0



## 5. สรุปผลการทดลอง

### 5.1 การวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

งานวิจัยได้ทำการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณปรอทโดยวิธีทางอ้อม ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีและระบบการไหลแบบอัตโนมัติ ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นประกอบด้วยสารทางชีวภาพคือเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงแบบกายภาพบนคาร์บอนเพสในอิเล็กโทรเคมีคัลเซลล์ การทำงานของไบโอเซนเซอร์นี้ให้สัญญาณกระแสแอนอดิกจากการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคโนแลคโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมีสารนำส่งอิเล็กตรอนแมงกานีสออกไซด์ 5% (w/w) สามารถใช้ศักย์กระตุ้นที่ต่ำลงโดยทำการกระตุ้นสารนำส่งอิเล็กตรอนแทนการใช้ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าเพื่อลดปัญหาการรบกวนจากตัวรบกวนอื่นๆที่เกิดศักย์ออกซิเดชันที่ตรงหรือใกล้เคียงกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การวิเคราะห์ปรอทด้วยไบโอเซนเซอร์นี้อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอท เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่เที่ยงต้องศึกษาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ โดยศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวพา ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้งปรอท กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปรอท ความแม่นยำของการวิเคราะห์ ความไวของการวิเคราะห์ และขีดความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดและการวิเคราะห์ปรอท ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมเป็นดังนี้

1. อัตราการไหลของกระแสตัวพาที่  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
2. ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่  $+ 0.46 \text{ V}$
3. ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยปรอทที่เวลา 6 นาที
4. ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบการไหลแบบอัตโนมัติให้กราฟความสัมพันธ์ แบบเส้นโค้ง  $y = 2.68 \ln(x) + 12.52$   $R^2 = 0.984$  ให้ช่วงของการวิเคราะห์ ปรอท  $0.5 - 73.5 \text{ mg/L}$  ซึ่งสามารถแบ่งช่วงการวิเคราะห์ออกเป็นสองช่วงคือ แบบที่เป็นเส้นตรง  $y = 0.90 x + 11.51$   $r^2 = 0.906$  ให้ช่วงของการวิเคราะห์ปรอท  $0.5 - 7.5 \text{ mg/L}$  แบบที่เป็นเส้นตรง  $y = 0.20 x + 16.25$   $r^2 = 0.999$  ให้ช่วงของการวิเคราะห์ปรอท  $7.5 - 31.5 \text{ mg/L}$
5. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่า  $\% \text{RSD} = 2.30$
6. ความไวของการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นพบว่าไบโอเซนเซอร์ให้ความไวในการตรวจวัด 2 แบบ แบบที่ไม่เป็นเส้นตรงคือ  $- 0.0106 \text{ \%Inhibition} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$  และแบบเป็นเส้นตรงที่  $0.20$  และ  $0.90 \text{ \%Inhibition} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$
7. ขีดความสามารถต่ำสุดของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดปริมาณปรอท คือ  $0.14 \text{ mg/L}$  และขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์คือ  $0.50 \text{ mg/L}$
8. ประเมินผลการวิเคราะห์ปริมาณปรอทในสารตัวอย่างมาตรฐาน DORM-2 พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมา  $99.6\%$

## 5.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยไบโอเซนเซอร์ในระบบการไหลอัตโนมัติ

งานวิจัยนี้ทำการพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนโดยวิธีทางอ้อม ศึกษาโดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรนทางอ้อมของไบโอเซนเซอร์อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน โดยปฏิกิริยาคะตาไลน์ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสให้ผลิตภัณฑ์ฟูแรนมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นลดลงเป็นผลให้สัญญาณลดลง การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่ใช้งานในระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิสสำหรับการวิเคราะห์ สามารถเตรียมคาร์บอนเพสและตรึงสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวหน้าคาร์บอนเพสแบบการตรึงทางกายภาพ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์จำเป็นต้องหาองค์ประกอบและสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสม จึงได้ทำการศึกษาหาอัตราการไหลของกระแสตัวพา ศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการกระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ช่วงความเป็นเส้นตรงของไบโอเซนเซอร์ต่อการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน ความแม่นยำของการวิเคราะห์ ความไวของการวิเคราะห์ และขีดความสามารถต่ำสุดของการวิเคราะห์ ผลการทดลองพบว่า

1. อัตราการไหลของกระแสตัวพาที่  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
2. ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่  $+ 0.75 \text{ V}$
3. ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์โบฟูแรน 8 นาที
4. ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิสให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์  $0.016 - 0.05 \text{ mg/L}$  carbofuran
5. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่า  $\%RSD = 2.30$
6. ขีดความสามารถต่ำสุดของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบฟูแรน คือ  $0.008 \text{ mg/L}$

## เอกสารอ้างอิง

1. Sha, L.; Xue-yi, G.; Ning-chuan, F.; Qing-hua, T. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2010, 20, 187-191.
2. Li, P.; Feng, X.B.; Qiu, G.L.; Shang, L.H.; Li, Z.G. *Hazardous*. 2009, 168, 591-601.
3. Padilla, S.; Marshall, R.S.; Hunter, D.L.; Lowit, A. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007, 219, 202-209.
4. Cool M., Jankowski. *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, Vol.5 (Eds. Hutson, D.H. and Roberts, T.R.), Wiley, Chichester, UK, 1985; p 87-142
5. Tripathi, G.; Kachhwaha, N.; Dabi, I. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010, 96, 30-35.
6. Dragica, V.; Slavoljub, Lj. Vitorocic; Slavica, M.; Nesko, K. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008, 25, 334-341.
7. Siriwan, S.; Prospichaya, K.; Punnee, A.; Chusak, L.; Booncharoen, W.; Panote, T. *Biosensor and Bioelectronics*. 2005, 21, 445-454.
8. <http://www.biomed.in.th/biosensor/>(accessed date 03/03/11)
9. <http://www.civil.mut.ac.th/06/เอนไซม์-enzyme-ตอนที่-1/> (accessed date 22/12/11)
10. [http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY3\\_enzyme.htm](http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY3_enzyme.htm) (accessed date 22/12/11)
11. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Two\\_substrates.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Two_substrates.png) (accessed date 22/12/11)
12. [http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd\\_site/enzyme\\_function.htm](http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/enzyme_function.htm) (accessed date 23 /02/12)
13. Afsaneh, S.; Elaheh, F. *Analytica Chimica Acta*. (in the press)
14. [http://en.wikibooks.org/wiki/A-level\\_Biology\\_Foundation/enzymes](http://en.wikibooks.org/wiki/A-level_Biology_Foundation/enzymes)(accessed date 15/03/54)
15. <http://www.civil.uwaterloo.ca/enve375/Background.htm> (accessed date 15/03/12)
16. <http://www.knowledgerush.com/kr/encyclopedia/Enzyme> (accessed date 15/03/12)
17. [http://www.sc.chula.ac.th/clubs/FoodClub/Page\\_16.htm](http://www.sc.chula.ac.th/clubs/FoodClub/Page_16.htm) (accessed date 22/12/11)
18. [http://th.wikipedia.org/wiki/alkaline\\_phosphatase](http://th.wikipedia.org/wiki/alkaline_phosphatase) (accessed date 12/01/12)
19. Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* 11, 471-478
20. <http://www.indogulfgroup.com> (glucose oxidase) (accessed date 12/01/11)
21. <http://beta.rcsb.org/pdb/static/>( Exploring the Structure) (accessed date 12/01/11)
22. <http://www.medtechzone.com/data/chem/ALP.php> (accessed date 07/08/13)
23. Joanne,H.; Kevin,B.; Chung-Chin,L. *Sensor*. 2009, 9, 8709-8721.
24. Svancara, I.; Vytras, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J. *Electroanalysis*. 2009, 9, 217-228.

25. <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/nafion.html> (accessed date 12/01/54)
26. Bertocchi, P.; Ciranni, E.; Compagnone, D.; Magearu, V.; Palleschi, G.; Pivutoiu, S.; and Valvo, L. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999, 20, 263-269.
27. Xiaoli C. P.; Guodong L. P.; Yuehe L. P. *Biology*. 2005, 1, 130-135.
28. Emir, T.; Josef, K.; Emira K.; Beyene, N.W.; Helmut, M.; Emin, S.; Sabina, B.; Kurt, K. *Talanta*. 2005, 65, 559-564.
29. Hasna M.; Aziz A.; Serge C.; Christine M. *Analytica Chimica Acta*. 2005, 543, 143-149.
30. Guillermina, L. L.; Marcela C.; Rodri G.; Gustavo A. R. *Talanta*. 2005, 66, 467-471.
31. Lijun L.; Fengna X.; Yiming Z.; Zhichun C.; Xianfu L. *Sensors and Actuators* . 2009, 135, 642-649.
32. Liu J.; Xu X.; Tang L.; Zeng G. *Transactions of Nonferrous Metals Societ* . 2009, 19, 235-240.
33. Joanne,H.; Kevin,B.; Chung-Chin,L. *Sensor*. 2009, 9, 8709-8721.
34. Mazzei, F.; Botre, F.; Montilla, S.; Pilloton, R.; Podesta, E.; Botre, C. *J. Electroanalytical Chemistry*. 2004, 574, 95-100.
35. Galezowska, A.; Sikora, T.; Istamboulie, G.; Trojanowicz.; Polec, I.; Nunes, G.S.; Nogue, T.; Marty, L. *Sensor and Materials*. 2008, 20, 299-308.
36. Erol, A.; Mehmet, T. *Electrochemical Acta*. 2010, 55, 5195-5199.
37. Caiana, L.; Bernacca, G.; Bordin, F.; Fenu, S.; Garetto, F. *J. Electroanalytical Chemistry*. 1995, 382, 129-135.
38. [www.nrc-cnrc.gc.ca/obj/inms-ienm/.../DORM-2\\_e.pdf](http://www.nrc-cnrc.gc.ca/obj/inms-ienm/.../DORM-2_e.pdf) (accessed date 01/02/12)

ภาคผนวก

## ตารางที่ 1ก ผลลัพธ์ที่ได้

ผลงาน	ดัชนีตัววัดความสำเร็จ
1. เทคโนโลยีใหม่	นำเอนไซม์อิเล็กโทรดไปใช้ให้เกิดประโยชน์
2. องค์ความรู้ใหม่	การวิเคราะห์ปรอทและคาร์โบฟูแรนด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรดในระบบการไหลอัตโนมัติ
3. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	สถาบันการศึกษาต่างๆ
4. การผลิตนักศึกษา	ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาโทจำนวน 1 คน คือ นางสาวปิยะนาถ สืบเสนาะ
5. การตีพิมพ์ผลงาน	ตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารนานาชาติ 1 ชิ้น  A. Samphao, P. Suebsanoh, Y. Wongs, B. Pecec, J. Jitchareon and K. Kalcher, "Alkaline Phosphatase Inhibition-Based Amperometric Biosensor for the Detection of Carbofuran" <i>Int. J. Electrochem. Sci.</i> , 8 (2013) 3254-3264
6. เผยแพร่งานวิชาการ	เข้าร่วมประชุมวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 ครั้ง  1. A. Samphao, W. Phadungkit, D. Nakapricha and K. Kalcher, "Indirect method of biosensor for the determination of $Hg^{2+}$ " Regional Electrochemistry Meeting of South-East Asia 2010 (REMSEA2010), Bangkok, Thailand, 16-19 <sup>th</sup> November 2010  2. Piyanart Suebsanoh, Kurt Kalcher, Anchalee Samphao, "Indirect Method of Biosensor for Determination of Mercury Based on Flow Injection Analysis" The 2 <sup>nd</sup> Regional Symposium on Biosensors, Biodiagnostics and Biochips (ASEAN <sup>+</sup> 2013)

## **Alkaline Phosphatase Inhibition-Based Amperometric Biosensor for the Detection of Carbofuran**

*A. Samphao<sup>1,\*</sup>, P. Suebsano<sup>1</sup>, Y. Wongs<sup>1</sup>, B. Pekec<sup>2</sup>, J. Jitchareon<sup>1</sup> and K. Kalcher<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190 Thailand

<sup>2</sup>Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, Karl-Franzens-University, A-8010 Graz, Austria

\*E-mail: [scanchsa@mail2.ubu.ac.th](mailto:scanchsa@mail2.ubu.ac.th)

*Received: 26 January 2013 / Accepted: 13 February 2013 / Published: 1 March 2013*

---

An indirect amperometric biosensor was designed for the detection of carbofuran exploiting inhibition of the enzymatic activity of alkaline phosphatase immobilized on a carbon nano-powder paste electrode (CNPPE). Measurements were performed by chronoamperometrical monitoring on the inhibition of the enzyme activity. Experimental parameters were investigated and optimized. The biosensor showed optimum performance at an operation potential at +0.75 V vs Ag/AgCl at pH 8.5 (stirred phosphate buffer solution, 0.1 mol/L). The calibration curve had a dynamic range of 10 - 97 µg/L carbofuran with a detection limit at 10 µg/L. The repeatability was 2.3 % (3 measurements, 50 µg/L), the reproducibility was 3.4 % (3 sensors). The determination of carbofuran in spiked water and chili samples using the proposed biosensor was satisfactory when compared to a spectrophotometric reference method. The results showed no significant difference at 95 % confidence level with t-test statistics.

---

**Keywords:** Alkaline phosphatase, Amperometric biosensor, Enzyme inhibition-based biosensor, Carbon paste electrode, Indirect method, Carbofuran

### **1. INTRODUCTION**

Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate) is one of the most toxic carbamate pesticides; it is frequently used for the control of insects in agriculture and food production because it inhibits cholinesterase. Nevertheless it exhibits significant toxicity to humans and wildlife animals causing nerve disorder and immunological respiratory diseases [1-3]. Commonly used analytical methods for the determination of carbofuran are high performance liquid chromatography, gas chromatography coupled to mass spectrometry, and spectrophotometry [4-6].

These conventional techniques are sensitive, reliable and precise. However, they have some disadvantages such as complex and time consuming analytical processes, relatively high costs, and requirement of highly trained personnel. Alternative assays to detect carbofuran were devoted to the implementation of biosensors in environmental analysis owing to some advantages, such as rapidity, use of small, portable and low cost instruments, fast signal response and low detection levels for quantitative detection.

Most biosensors for detecting toxic substances are relying on the inhibition of the activity of an enzyme [7-13]. Indirect biosensors for herbicides or pesticides have been mainly designed with acetylcholinesterase [14-23].

For the determination of carbofuran alkaline phosphatase has been used in a few cases [24-27]. An electro-inactive substrate releases a product which can be electrochemically detected at the electrode surface. Usually phenolic phosphate esters are employed which deliver the free phenol upon enzymatic hydrolysis; the latter is electrochemically oxidized to a quinone subsequently. With a constant substrate concentration inhibition leads to a decrease in the activity of the enzyme and as a consequence to a decrease of the response signal which is proportional to the amount of inhibitor in the sample.

In this work, a new designed biosensor based on a carbon nanopowder paste is proposed to fabricate alkaline phosphatase inhibition-based amperometric biosensor for the detection of carbofuran. The designed biosensor is based on alkaline phosphatase cross-linked with bovine serum albumin and glutaraldehyde immobilized on the surface of a carbon nanopowder paste electrode. Preliminary studies showed that carbon nanopowder paste electrodes provide good response with low current background currents, a wider window potential range and long term stability compared to the ordinary carbon paste electrode. The performance of this new type of biosensor was evaluated by cyclic voltammetry and hydrodynamic amperometry. Details on the practical design and its applications of this biosensor will be discussed.

## **2. EXPERIMENTAL**

### *2.1 Chemicals and reagents*

Alkaline phosphatase (ALP, P6772- 2 KU), bovine serum albumin (BSA), carbon powder (size < 50 nm) and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water was refined with a purification system (Milli-Q, Millipore) and had a specific resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm; it was used throughout the experiments. The supporting electrolyte was a phosphate buffer solution (PBS, 0.1 M) prepared by mixing aqueous NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solutions (0.1 M) to achieve the desired pH (usually 8.5). The disodium phenyl phosphate stock solution (DSP, 10 % m:v) and carbofuran standard solution (100 mg/L) were prepared freshly in phosphate buffer solution pH 8.5 according to the needs.



## 2.2 Apparatus

For electrochemical measurements a computer-controlled electrochemical workstation (Potentiostat/Galvanostat, Metrohm PGSTAT12) was used to perform cyclic voltammetric measurements; a corresponding software (GPES) was used to register signals and evaluate the data. pH was measured with a pH-meter from Sartorius (pH Meter PP-50). Spectrophotometric measurements were done with a Lambda 25 spectrophotometer from Perkin Elmer.

## 2.3 Biosensor design

Carbon paste (CE) was prepared by thoroughly mixing carbon nanopowder (1.00 g) and paraffin oil (0.30 g) until homogenous consistency was achieved; afterwards it was left to stand overnight before use. The electrode holder was a plastic syringe tube (diameter 5.8 mm, length 40 mm) and was filled with the carbon paste. Electrical contact to the paste was established by inserting a copper wire into the back of the paste. The CPE electrode surface was polished with weighing paper until a smooth surface by optical inspection was obtained.

The alkaline phosphatase solution for casting the bio-film was prepared by mixing bovine serum albumin (0.040 g) with 40  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution of alkaline phosphatase (2 KU/mL), 20  $\mu\text{L}$  of glutaraldehyde solution (2.5 %) and 20  $\mu\text{L}$  of glycerol and adjusting the final volume to 500  $\mu\text{L}$  with phosphate buffer solution (pH 8.0). The mixture was gently agitated by a vortex shaker at room temperature for 15-20 min. The biosensor was fabricated by dropping 20  $\mu\text{L}$  of the enzyme casting solution onto the surface of the carbon paste electrode (28 mm<sup>2</sup>). The electrode was dried at room temperature and then stored at +4 °C in a refrigerator until use.

## 2.4 Sample pretreatment

### Water sample

1 L of water sample from a natural reservoir was passed through a filter paper (Whatman, grade 1) and an aliquot (100 mL) of the filtrate was spiked with an appropriate concentration of carbofuran. The spiked sample was transferred into a separatory funnel for extraction with 100 mL dichloromethane by shaking for 10-20 min. Then, the extract was evaporated to a residual volume of 1-2 mL with a rotary *evaporator* (water bath temperature 40 °C). The remaining liquid was dissolved in methanol (5 mL), transferred to a volumetric flask (10 mL), and made up to the mark with deionized water. The blank solution was likely prepared by using deionized water instead of natural water (modified from [28]).

### Chili samples

Bird's eye and yellow chili samples were purchased at a local fresh market in the north eastern part of Thailand. The peppers were initially homogenized in a blender; afterwards, 20.0 g of each sample were weighed into Erlenmeyer flasks and 80 mL of hexane (saturated with acetonitrile) were added and agitated for 5-10 min. The extract was filtered and transferred into a separatory funnel. The extraction was performed by adding 50 mL of acetonitrile (saturated with hexane) by vigorously

shaking for 15-20 min. The acetonitrile phase was isolated and evaporated to a volume of 1-2 mL by a rotary *evaporator*; the residue was carefully transferred into a volumetric flask (5 mL) and made up to the mark with methanol. The blank solution was analogously prepared by omitting the chili peppers (modified from [28]).

### 2.5 Electrochemical measurement

The electrochemical cell was composed of a Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode, a platinum counter electrode, and a modified carbon paste working electrode (ALP/CPE). All potentials mentioned in the text refer to the silver-silver chloride reference electrode.

If not mentioned otherwise PBS (0.1 mol/L, pH 8.5) was used as supporting electrolyte.

Cyclic voltammograms were recorded from -0.1 to +1.5 V with a scan rate of 10 mV/s.

All chronoamperometric measurements were carried out in stirred phosphate buffer solutions (approx. 300 rpm) at room temperature with an operation potential of +0.75 V.

The current response was recorded with 500 mg/L disodium phenyl phosphate as the standard substrate concentration. Signals were evaluated as the difference of the registered steady state current to the current obtained before addition of the analyte.

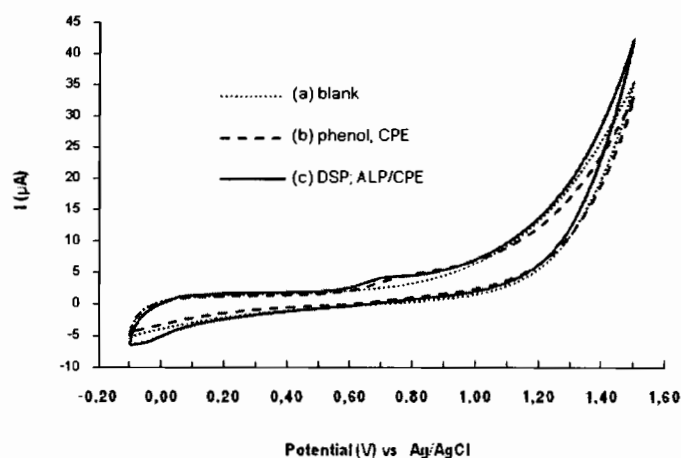
### 2.6 Spectrophotometric analysis

Spectrophotometry was chosen as a reference method modified from the report of Chu and Fan [28]. Carbofuran was in a first step hydrolyzed to the corresponding phenol in alkaline medium. Afterwards p-nitroaniline was diazotized by the aid of sodium nitrite in acidic solution forming the p-nitrobenzene diazonium salt, which couples to the aromatic ring of 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ol to yield p-nitroaniline-5-amino-2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ol which is a wine-red azo dye with an absorption maximum at 520 nm. The standard addition method was chosen to determine carbofuran in the sample solutions using a concentration range of 0-5 mg/L carbofuran.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

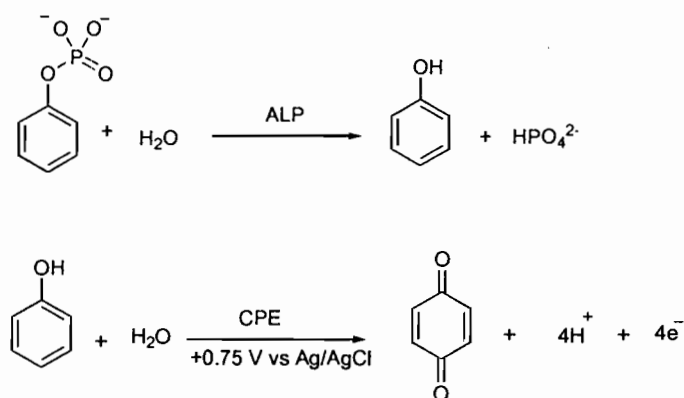
### 3.1 Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry uncovers that under the chosen experimental conditions phenol is oxidized electrochemically at the nano-powder carbon paste at around 0.7 V (Figure 1). As oxidation products finally quinoid structures are formed after primary oxidation to o- or p-dihydroxybenzene. When employing the biosensor with phenyl phosphate similar electrochemical behavior is found (Fig.1, curve c) which clearly demonstrates that the enzyme is catalytically active retaining fast kinetics; thus the intermediate phenol is reasonably rapidly formed to be monitored electrochemically by the carbon paste electrode.



**Figure 1.** Cyclic voltammograms of phenol with a CPE and of DSP with the biosensor; (a) blank, CPE (dotted line); (b) 1000 mg/L phenol, CPE (broken line); (c) 500 mg/L DSP, ALP/CPE (solid line); supporting electrolyte PBS 0.1 M, pH 8.5; scan rate 10 mV/s

Figure 2 summarizes the overall electrode reactions occurring at the biosensor.



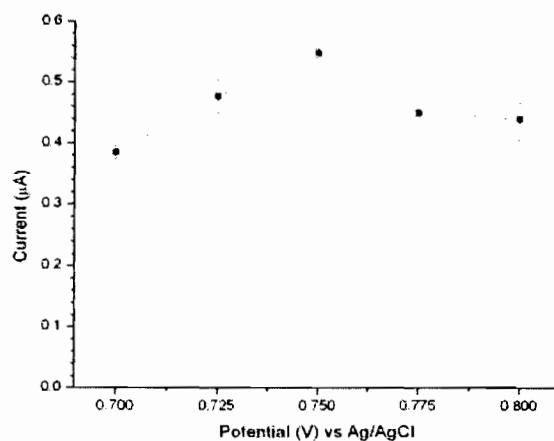
**Figure 2.** Measurement principle of the ALP/CPE biosensor

### 3.2 Effect of operating potential

In hydrodynamic amperometry (amperometric measurements with agitated liquids) a crucial parameter is the operating potential. In the present study the dependence of the applied potential on an ALP/CPE exposed to a stirred solution of the supporting electrolyte containing phenyl phosphate was investigated (Fig.3).

The electrode shows an almost linearly increasing current with an increasing potential up to +0.75 V; beyond this the signal decreases again the reason for which is not completely clear. One possibility could be the formation of oxidized products other than benzoquinone or of polymers which are sorbed on the surface and reduce its active area. Another explanation is the occurrence of possible

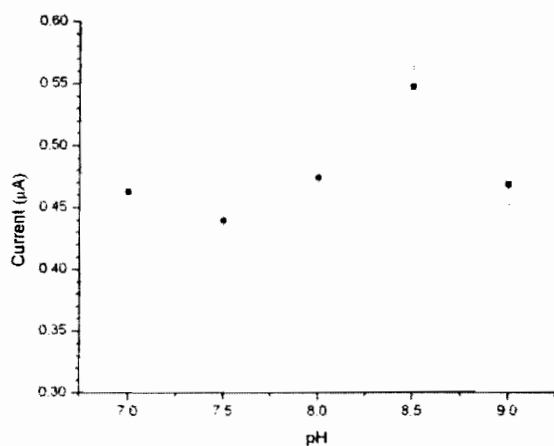
potential-dependent sorption processes of oxidation products. For further studies a potential of 0.75 V was chosen as optimum value.



**Figure 3.** Dependence of the current of ALP/CPEs on the operating potential; stirred phosphate buffer solution, pH 8.5; 500 mg/L disodium phenyl phosphate

### 3.3 Influence of pH

The effect of the pH on the performance of the biosensor is of great importance, because the three-dimensional structure of the enzyme and the electrochemical response of the biosensor were depended on the different pH values. For the effect of pH, the biosensor responses with different pH value from 7.0 to 9.0 were investigated.



**Figure 4.** Effect of pH on the amperometric response of ALP/CPEs; phosphate buffer 0.1 M; 500 mg/L disodium phenyl phosphate; operating potential +0.75 V

Additionally the electrochemical reaction may be dependent on this parameter in case that hydronium ions are consumed or released in the course of the electron transfer process, which is valid indeed for the oxidation of phenol (Fig.2).

To optimize the measurement medium its pH was varied within 7.0 – 9.0 (Fig. 4). The highest activity was obtained at pH 8.5. Alkaline phosphatases show a pH-optimum *in vitro* between 7.3 and 9.2 depending on the source and also on the substrate concentration [29]; the bovine variety (used in this work) has an optimum at around pH 8.5 [30] which has been exactly found in our study. Therefore, this value which is also similar to experimental conditions described by Pingarron's group [31] was chosen for further investigations.

### 3.4 Enzyme inhibition-based biosensor

For the indirect determination of analytes by inhibition of an enzyme the substrate concentration is held constant, and the decrease of the response signal is monitored after addition of the inhibitor. This principle was applied to the determination of carbofuran with an ALP/CPE biosensor using disodium phenyl phosphate as a substrate (Fig.5). The response current drops when carbofuran is present in the test solution; the extent of inhibition is proportional to the concentration of carbofuran. The mechanism of the inhibition of the enzyme by carbofuran is its strong binding to zinc and magnesium which are essential cofactors of alkaline phosphatase close to its active center [32, 33]. Thus, the determination of carbofuran can be realized according to the inhibition degree of the enzyme. A typical chronoamperogram of an ALP/CPE biosensor for successive additions of the same amount of carbofuran under optimal experimental conditions can be seen in Figure 6. The anodic current decreases due to the presence of increasing amounts of the carbofuran causing inhibition of the activity of alkaline phosphatase immobilized on the CPE. In this work, the concentration of disodium phenyl phosphate solution was kept constant as 500 mg/L, whereas the concentration of the inhibitor was increased stepwise by adding defined amounts of carbofuran (Fig. 6). The relative inhibition, expressed in percents, was evaluated as  $(I_0 - I) / I_0 \times 100$ , where  $I_0$  and  $I$  are the current response in the absence and in the presence of the inhibitor, respectively; its dependence on the inhibitor concentration is shown in Fig. 7. The dynamic range for the indirect method was evaluated from 10 to 97  $\mu\text{g/L}$  carbofuran.

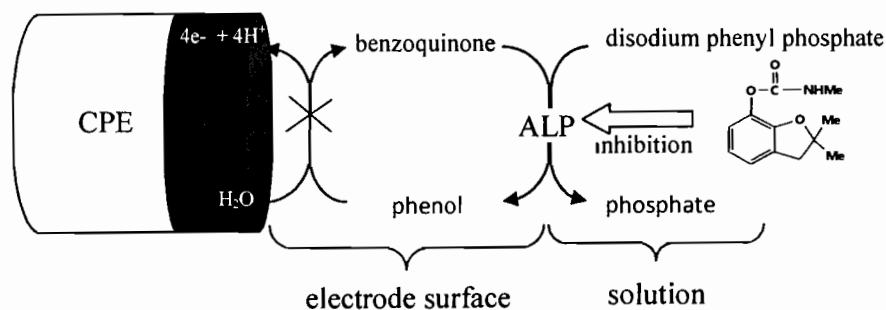
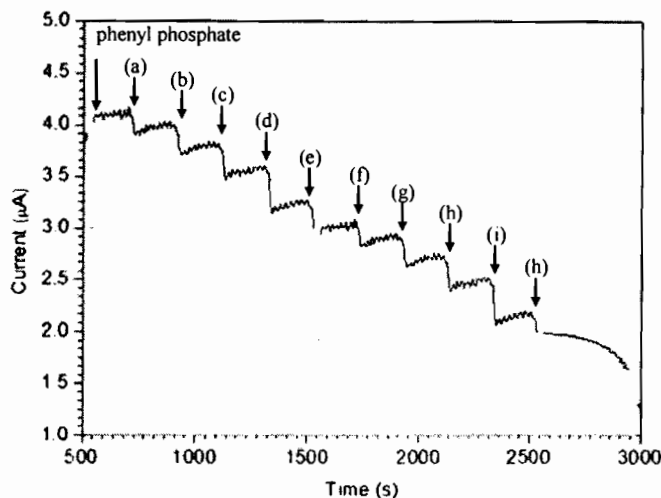
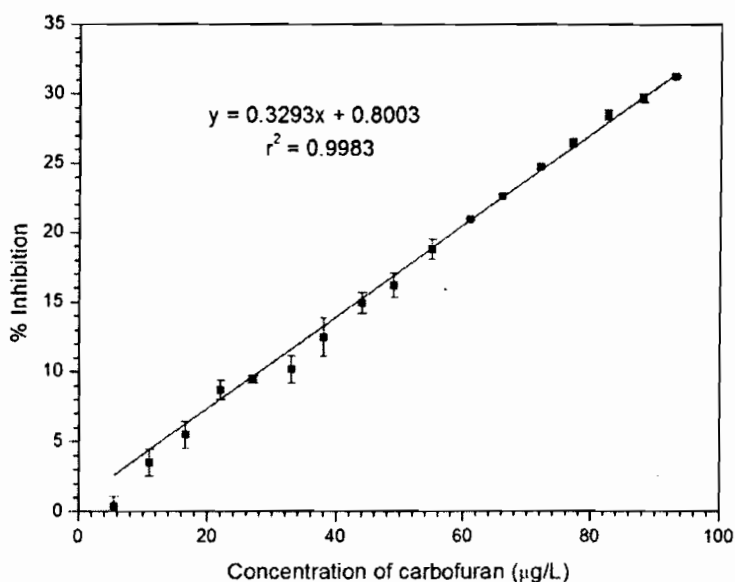


Figure 5. Inhibition of the ALP/CPE biosensor with carbofuran

Below 10  $\mu\text{g/L}$  of carbofuran the calibration plot deviates from linearity with an estimated practical detection limit of about 5  $\mu\text{g/L}$ . Above 100  $\mu\text{g/L}$  the graph levels off (not shown). For 50  $\mu\text{g/L}$  carbofuran the repeatability was enumerated as 2.32 % ( $n = 3$  measurements). The reproducibility was determined as 3.38 % ( $n = 3$  sensors).



**Figure 6.** Amperometric response of a ALP/CPE to the addition of carbofuran; phosphate buffer (0.1 M, pH 8.5), 500 mg/L disodium phenyl phosphate; operation potential +0.75 V; carbofuran concentrations: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 and (h)100  $\mu\text{g/L}$



**Figure 7.** Relative inhibition of a ALP/CPE biosensor by carbofuran of concentration 5 - 97  $\mu\text{g/L}$ ; 0.1 M phosphate buffer solution pH 8.5 containing 500 mg/L disodium phenyl phosphate; operation potential at + 0.75 V; the data represent mean values and standard deviations of three measurements

### 3.5 Selectivity

Selectivity is an important aspect for the performance of an inhibition-based enzyme catalytic process. In this study fenobucarb and carbaryl (two other carbamate insecticide) as well as some metal ions were investigated on their possible interfering effect on the determination of carbofuran under the same experimental conditions. The results show that Fe(III), Cu(II), Cd(II), Mn(II), Pb(II) and Cr(VI) practically exert no inhibition on the enzyme even at concentrations of up to 100 mg/L. As expected carbaryl and fenobucarb which belong to the same chemical class of insecticides have a similar effect as carbofuran at even low concentration. Therefore the method is applicable to the determination of carbamate insecticides as a summation parameter.

### 3.6 Detection limit

The detection limit was evaluated as the lower end of the linear dynamic range of the sensor, i.e., as 10 µg/L carbofuran.

### 3.7 Stability

The long-term stability of the biosensor was monitored during storage at +4 °C in a refrigerator. The biosensor's response to 500 mg/L disodium phenyl phosphate as a function of the storage time yielded a loss in activity approximately 50 % during 2 weeks but was still useful for performing inhibition experiments of carbofuran.

The biosensor presented here shows high sensitivity combined with a low detection limit compared to previous works (LOD 0.02 mg/L) [25, 26], a wider linear range with otherwise similar result to the works of Mazzie et.al. and Thavarungkul et.al. [24, 25]. The biosensor described in this paper consumes less time for the measurement due to omittance of incubation [24-27]. We may conclude that these advantages could be achieved by the use of carbon nanopowder to produce the carbon paste rather than micro-particles. It may be expected that CNPPEs could improve the performance of many other analytical procedures employing conventional CPEs. Moreover, the biosensor presented here is easy to construct and operate, high precise and exhibits longer stability than ALP-biosensors described before.

### 3.8 Application of biosensor to samples

The biosensor based on ALP/CPE was applied to natural water as a sample matrix and chili samples. A concentration of about 10 mg/L carbofuran was spiked to the water sample (which did not show any inhibition of the biosensor without spiking), and the recovery was determined. The standard addition method was chosen for all sample measurements to exclude matrix effects. The results were compared with data obtained by spectrophotometric analysis (Table 1). The analysis of the statistically significant difference of the two techniques showed that the results obtained with the biosensor were in

satisfactory agreement with data from the reference method obtained at 95% confidence level using the t-test model. It can be seen from the results that the biosensor provides slightly lower concentrations than the reference method; nevertheless the obtained data underline that the method is applicable for a quick determination of carbofuran in chili pepper samples.

**Table 1.** Determination of carbofuran in spiked water and chilli samples with the biosensor and with spectrophotometric method

Sample	Biosensor	Spectrophotometry
Natural water	n.d.	-
Spiked natural water	9.18 ± 0.10 mg/L	-
Bird's eye chili	5.55 ± 0.07 mg/Kg	5.93 ± 0.14 mg/Kg
Yellow chili	5.52 ± 0.06 mg/Kg	5.62 ± 0.07 mg/Kg

n.d. = not detected

#### 4. CONCLUSION

Inhibition of the enzymatic activity of alkaline phosphatase immobilized onto the surface of carbon nanopowder paste electrode was exploited for the determination of carbofuran. The data show that the performance of the biosensor in terms of detection limit, dynamic range, stability, precision is satisfactory facilitating qualitative and quantitative determination of carbofuran. The biosensor is inexpensive, simple to operate and shows short response time. The biosensor seems promising for being applied in environmental analysis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University (Thailand), the Thailand Research Fund (TRF-CHE Research Grant for New Scholar, project # MRG5280072), the scholarship support from Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Ubon Ratchathani University, and the financial assistance from AseaUniNet.

#### References

1. F. Arduini, F. Ricci, C.S. Tuta, D. Moscone, A. Amine, G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta*, 580 (2006) 155
2. T. J. Lin, K. T. Huang, C. Y. Liu, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2006) 513
3. Y. R. Guo, S. Y. Liu, W. J. Gui, and G. N. Zhu. *Anal. Biochem.*, 389 (2009) 32
4. G. Wang, Z. Hou, Y. Sun, R. Zhang, K. Xie, R. Liu, *J. Hazard. Mater.*, 129 (2006) 22
5. J. Chen, W. Zhao, W. Liu, Z. Zhou, M. Yang, *Food Chem.*, 115 (2009) 1038
6. P.S. Chen, S.D. Huang, *Talanta*, 69 (2006) 669
7. R. E. Adam, P. W. Car, *Anal. Chem.*, 7 (1978) 994
8. C. Borrebaek, B. Mattiasson, *Anal. Biochem.*, 107(1980) 446



9. C. Dumschat and H. Müller, *Anal. Chim. Acta.*, 252 (1991) 7
10. C. La Rosa, F. Pariente, L. Hernández, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta.*, 308 (1995) 129
11. T. Danzer, G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta.*, 318 (1996) 275
12. M.D. Luque de Castro, M. C. Herrera, *Biosens. Bioelectron.*, 18(2003) 279
13. Y.D. Tanimoto de Albuquerque, L. F. Ferreira, *Anal. Chim. Acta.*, 596 (2007) 210
14. J.L. Marty, B. Leca, T. Noguer, *Analisis Magazine*, 26 (1998) 144
15. L. Pogacnik, M. Franko, *Talanta*, 54 (2001) 631
16. S. Andreescu, T. Noguer, V. Magearu, J-L Marty, *Talanta*, 57 (2002) 169
17. M.D. Luque de Castro, M.C. Herrera, *Biosens. Bioelectron.*, 18 (2003) 279
18. A. Vakurov, C.E. Simpson, C.L. Daly, T.D. Gibson, P.A. Millner, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 1118
19. A. Vakurov, C.E. Simpson, C.L. Daly, T.D. Gibson, P.A. Millner, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 2324
20. R. Prakash Deo, J. Wang, I. Block, A. Mulchandani, K. A. Joshi, M. Trojanowicz, W. Chen, Y. Lin, *Anal. Chim. Acta.*, 530 (2005) 185
21. K. Dutta, D. Bhattacharyay, A. Mukherjee, S.J. Setford, A.P.F. Turner, P. Sarkar, *Ecotox. Environ. Safe.*, 69 (2008) 556
22. G. P. Nikoleli, D.P. Nikolelis, N. Psaroudakis, and T. Hianik, *Anal. Lett.*, 44(2011)1265
23. P. Raghu, B.E. Kumara Swamy, T. Madhusudana Reddy, B.N. Chandrashekar, K. Reddaiah, *Bioelectrochemistry*, 83 (2012) 19
24. F. Mazzei, F. Botre, S. Montilla, R. Pilloton, E. Podesta, C. J. Botre, *Electroanal. Chem.*, 574 (2004) 95
25. S. Suwansa-arda, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul, C. Limsakul, B. Wongkittisuksa, P. Thavarungkula, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005) 445
26. X. Sun, S. Du, X. Wang, *Eur. Food Res. Technol.*, 235 (2012) 469
27. X. Sun, Q. Li, X. Wang, S. Du, *Anal. Lett.*, 45 (2012) 1604
28. N. Chu and S. Fan, *Spectrochim. Acta. A*, 74 (2009) 1173
29. M. H. Ross, J. O. Ely, J. G. Archer, *J. Biol. Chem.*, 192 (1958) 561
30. M. Harada, N. Udagawa, K. Fukasawa, B.Y. Hiraoka, M. Mogi, *J. Dental Res.*, 65 (1986) 125
31. B. Serra, M.D. Morales, A.J. Reviejo, E.H. Hall, J.M. Pingarron, *Anal. Biochem.*, 336(2005)289
32. P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Biochemistry*, 41(2002) 3207
33. F. J. Olorunniji, A. Igunnu, J. O. Adebayo, R. O. Arise, S.O. Malomo, *Biokemistri*, 19 (2007) 43

# The Second Regional Electrochemistry Meeting of South-East Asia

16-19 November 2010  
Maha Chulalongkorn Building, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

## BOOK OF ABSTRACTS REMSEA 2010

Hosted by:



NSTDA

PA-03	Microscale Autotitrator with pH-ISFET Detection for Analysis of Acid Dissociation Constant in Pharmaceutical Products <i>Kanchana Uraisin, Sasitorn Yongyai, Nuchutha Thamsumet, Opas Trithaveesak, Duangjai Nachapricha</i>	108
PA-04	Indirect Method of Biosensor for the Determination of Mercury <i>Anchalee Samphao, Warunee Phadungkit, Duangjai Nacapricha, Kurt Kalcher</i>	109
PA-05	Miniaturization of Detection System in Rotating Disc Electrode Technique for Analysis of Transferrin using ELISA <i>Sasithorn Muncharoen, H. Brian Halsall, William R. Heineman, Duangjai Nacapricha</i>	110
PA-06	Methanol Electrooxidation on Pt Adsorbed Activated Carbon Cloth Catalyst <i>Surin Saipanya, Thapanee Sarakonsri, Jaroon Jakmunee</i>	111
PA-07	Potentiometric Cadmium Selective Electrode Based Calix[4]arene Derivative Having 2-(Bis(2-pyridyl methyl)aminomethyl)aniline as an Ionophore <i>Wittaya Ngeontae, Utisawadee Khamjumhol, Chomchai Suksai, Thawatchai Tuntulani</i>	112
PA-08	Application of Iron Hexacyanoferrate Membranes in Ions Transport <i>Xinzhan Andrew Lee, Binh T. T. Nguyen, Jin Qiang Ang, Chee-Seng Toh</i>	113
PA-09	Electrochemical Sensing of Hydrogen Peroxide by using Membrane-Electrode System <i>Lai Peng Wong, Jin Qiang Ang, Nguyen Thi Thanh Binh, Chee Seng Toh</i>	114
PA-10	Development of Membrane – Based Electrochemical Immunosensor for the detection of <i>Escherichia coli</i> cells <i>Ming Soon Cheng, Lin Zhuo, Kelly Suk Hiang Lau, Vincent T. K. Chow, Chee-Seng Toh</i>	115
PA-11	Durability of WC Support under Fuel Starvation of PEMFC <i>Doyoung Kim, Junseok Choe, Yongsug Tak</i>	116
PA-12	Low-potential Photoelectrochemical Biosensing Using Porphyrin Functionalized TiO <sub>2</sub> Nanoparticles <i>Wenwen Tu, Yitong Dong, Jianping Lei, Huangxian Ju</i>	117
PA-13	Ion Transfer Voltammetry of Phenylpropanolamine at Water 1,2-Dichloroethane Interface <i>Irdhawati, Buchari, Indra Noviantri, Slamet Ibrahim, Hirosuke Tatsumi</i>	118
PA-14	Outer Membrane Protein as a Novel Biorecognition Element for Phage Lambda Detection <i>Saluma Samanman, Martin Hedström, Proespichaya Kanatharana, Panote Thavarungkul, Bo Mattiasson</i>	119
PA-15	Flow Injection Anodic Stripping Voltammetric Method for Determination of Cadmium and Lead <i>Wanita Powsakul, Manuel Miro, Jaroon Jakmunee</i>	120
PA-16	Flow Injection Amperometric Detection for Screening of Antioxidant Activity <i>Puttaporn Klayprasert, Jaroon Jakmunee</i>	121
PA-17	Flow Injection Conductometric Detection With On-line Gas Diffusion Separation for Determination of Ammonium in soil <i>Pattama Yanu, Jaroon Jakmunee</i>	122
PA-18	Electrochemical Detection coupled with Paper-based Microfluidic Devices for Glucose Analysis in Human Serum <i>Wijitar Dungchai, Orawon Chailapakul, Charles S. Henry</i>	123
PA-19	Determination of Trace Level Copper by Adsorptive Stripping Voltammetric Method <i>Sudkate Chaiyo, Orawon Chailapakul, Weena Siangproh</i>	124
PA-20	Crown Ether/Nafion Modified Bismuth Film Screen-Printed Carbon Electrode for Anodic Stripping Voltammetric Determination of Trace Heavy Metals <i>Kannika Keawkim, Orawon Chailapakul, Suchada Chuanuwatanakul, Shoji Motomizu</i>	125
PA-21	On-line Preconcentration and Determination of Trace Heavy Metals by Sequential Injection Coupled with Anodic Stripping Voltammetry <i>Benjawan Ninwong, Suchada Chuanuwatanakul, Orawon Chailapakul, Shoji Motomizu</i>	126
PA-22	Electrochemical Parameters of Sequential Injection-Anodic Stripping Voltammetric Determination of Mercury using In Situ Plated Gold Film Screen-Printed Electrode <i>Eakkasit Punrat, Suchada Chuanuwatanakul, Orawon Chailapakul, Shoji Motomizu</i>	127

## PA-04: Indirect Method of Biosensor for the Determination of Mercury

Anchalee Samphao<sup>1,\*</sup>, Warunee Phadungkit, Duangjai Nacapricha<sup>2</sup>, Kurt Kalcher<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190 Thailand

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400 Thailand

<sup>3</sup>Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, Karl-Franzens-University, Universitaetspl.1, A-8010 Graz, Austria

\*E-mail: scanchsa@mail2.ubu.ac.th



Anchalee Samphao  
scanchsa@mail2.ubu.ac.th  
Electroanalytical Chemistry

An amperometric enzymatic biosensor for the determination of mercury was developed. Indirect determination of mercury could be studied by inhibition and utilized by immobilization of enzyme glucose oxidase with suitably designed electrochemical sensor. Measurements were performed by electrochemically monitoring the inhibition of the catalytic activity of enzymes. Physicochemical immobilization of the enzyme on tip of carbon paste electrode modified with 5% (w/w) MnO<sub>2</sub> as a mediator was studied. Electrochemical characterization and optimization of experiment parameters were investigated in terms of voltage, the amount of enzyme unit per surface area of electrode, pH, linear range, reproducibility, detection limit, reversibility of the enzyme, sensor's lifetime, interferences and the evaluation of the biosensor for the determination of mercury compared with standard technique atomic absorption spectrometry. As the results, the biosensor showed optimum conditions at 0.46 volt, enzyme loaded at 0.56 U/mm<sup>2</sup> for 4 layers on the electrode surface area, optimum pH at 7.0 with phosphate buffer. The linear response of the biosensor was at 2.50 - 32.50 with the detection limit of 50 ppb Hg<sup>2+</sup>. The reproducibility was good with 4.70 % RSD. Furthermore, the sensor yielded a stable and reproducible response for over 24 days with stored dry at 4 °C.

**Keywords:** Biosensors • Glucose Biosensor • Indirect Method • Enzyme Inhibition • Mercury

October 11, 2013

Ms. Piyanart Suebsanoh  
Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,  
Faculty of Science,  
Ubon Ratchathani University,  
Ubon Ratchathani, 34190 Thailand

Dear Ms. Piyanart Suebsanoh

Abstract Ref: 0083\_1\_BS-PP-0068

Topic "Indirect Method of Biosensor for Determination of Mercury Based on Flow Injection Analysis"

**Greeting from AseanPlus2013.**

It is our pleasure to inform you that your submitted abstract has been accepted for **Poster presentation** at the 2nd Regional Symposium on Biosensors, Biodiagnostics and Biochips (ASEAN<sup>+</sup> 2013) to be held during 11-13 December 2013 at Mae Fah Luang University, Chiang-Rai, Thailand.

The full programme will be added to the website [www.aseanplus2013.com](http://www.aseanplus2013.com) as soon as possible. The website also give information on registration fees, accommodation and the programme. Affiliation reference numbers will be changed to superscript in the final programme if relevant.

Each poster is asked to display throughout the conference. The poster session date and time will be notified four weeks after the deadline of abstract acceptance.

Please bring your poster to the registration desk in front of the conference room on 11 December 2013 to get your poster number. The format for your poster presentation is attached  
**Deadline of early bird rate of reregistration is NOVEMBER 5, 2013. Please kindly LOGIN to register.**

For registration rate, travel and accommodation information, please kindly visit our website at:

Registration: <http://www.aseanplus2013.com/registration-fee>

Accommodation-travel: <http://www.aseanplus2013.com/hotel-reservations>

Thank you for your interest in participating in the conference.

We look forward to seeing you at the conference in ASEAN+2013 meeting.

With regards



Werasak Surareungchai

Chairman

ASEAN<sup>+</sup>2013: The 2<sup>nd</sup> Regional Symposium on Biosensors Biodiagnostics and Biochips Symposium

### Posters For Main Conference

#### Format

The dimensions of the poster should not exceed 90 cm wide x 120 cm high.

Poster presenters are responsible for printing their own poster prior to the conference and bringing it to Please kindly note that no printing service is available on site.

Please ensure that your poster is fixed to the board corresponding to your final poster number. Indicate this poster number with your poster.

#### Material

Material will be available for the hanging of posters at the Registration area.

Posters should be mounted from the morning on the first day of conference and must be dismantled at the conclusion of sessions on the last day.

It is the responsibility of the presenters to bring, put up and take down their posters.

#### Timings

Each poster will be on display throughout the conference.

Poster presenters should refer to the program in order to know the exact date and time to present their poster.

