



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง “วิเคราะห์การปนเปื้อนสารบีฟูเรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ
ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอ้อมของอัลคาไลน์ฟอสฟตาเตสไบโอดีไซด์”

Determination of carbofuran contamination in jasmine rice samples
by indirect method-alkaline phosphatase biosensor

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี สำรา

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2558
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย มอบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง “วิเคราะห์การปนเปื้อนการโบนัสในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอ้อมของอัลตราไบโนฟอสฟາเตสใบโอลเซนเซอร์” ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี่

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี และอาจารย์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ นักศึกษาในกลุ่มผู้วิจัย ภาควิชาเคมีทุกท่าน จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี่ด้วย

ผู้วิจัย
กุมภาพันธ์ 2560

บทคัดย่อ

แอมเพอโรเมทริกการ์บอฟูแรนใบโอเซนเซอร์ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยการปรับปรุงบริเวณผิวน้ำข้าไฟฟ้าที่ใช้เป็นบริเวณตรวจวัด โดยตึงหางเคมีด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวินเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์ วิเคราะห์ปริมาณการ์บอฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์ อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส วัดสัญญาณกระแสงการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าลดลงสัมพันธ์กับปริมาณการ์บอฟูแรนเพิ่มขึ้น งานวิจัยตรวจวัดสัญญาณทางไฟฟ้าด้วยวิธีแอมเพอโรเมทร์และศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานของใบโอเซนเซอร์ ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาของการเชื่อมไข้ว่อนใช้มอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณของไดโซเดียมฟีโนฟอสเฟต 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8 ศักย์กระแสตันที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ +0.75 โวลต์ เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ ที่อุณหภูมิห้อง ประเมินการวิเคราะห์ของใบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค่าสัมประสิทธิ์สัมพัทธ์เท่ากับ 0.991) ความไวในการตรวจวัดที่ 7.07 ร้อยละของการยับยั้ง-ลิตรต่อมิลลิกรัม ซึ่ดจำกัดในการตรวจพบและซึ่ดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 1.12 และ 3.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเที่ยงของข้าไฟฟ้าให้ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 4.31 (ข้าไฟฟ้า 3 ข้า) ความเที่ยงของการวิเคราะห์ให้ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 2.80 (วัด 4 ครั้ง) นอกจากนี้ยังได้ประเมินการทำงานของใบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณการ์บอฟูแรนในสารสกัดตัวอย่างข้าวหอมมะลิจำนวน 13 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บมาจากพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี พบร่วมสารสกัดตัวอย่างข้าวหอมมะลิทั้ง 13 แหล่ง การวิเคราะห์ปริมาณการ์บอฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานໂຄรมາໂທກ ราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบร่วมปริมาณการ์บอฟูแรนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิไม่สามารถตรวจจับได้จากใบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานໂຄรมາໂທກราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีซึ่ดจำกัดในการตรวจพบสูงถึง 1.12 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถระบุได้ว่ามีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจพบของหั้งสองวิธี ดังนั้นจึงทำการเติมสารละลายมาตรฐานการ์บอฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในสารสกัดตัวอย่างข้าวหอมมะลิ 3 ตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์หาปริมาณการ์บอฟูแรนด้วยเทคนิคหั้งสอง ตรวจพระดับปริมาณการ์บอฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์ให้ผลการวิเคราะห์ในช่วง 1.43 - 1.57 มิลลิกรัมต่อลิตร เทคนิคมาตรฐานໂຄรมາໂທກราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในช่วง 1.39 - 1.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนมาในสารสกัดที่เติมการ์บอฟูแรนในช่วงร้อยละ 95.6 ถึง 104.8 การวิเคราะห์ปริมาณการ์บอฟูแรนให้ผลเป็นที่น่าพอใจโดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากหั้งสองวิธีด้วยสถิติค่า t พบร่วม t จากการคำนวณ เท่ากับ 2.86, 0.26 และ 0.95 ตามลำดับ ซึ่งมีน้อยกว่าค่า t ในตารางเท่ากับ 4.30 (ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 2) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สรุปได้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณการ์บอฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์กับวิธีมาตรฐานໂຄรมາໂທກราฟีของเหลวสมรรถนะสูงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Abstract

An amperometric carbofuran biosensor was developed. It was constructed on carbon paste electrode chemically immobilized with alkaline phosphatase, bovine serum albumin, glycerol and glutaraldehyde on its sensing area for selective analysis of carbofuran by inhibition of catalytic reaction of alkaline phosphatase using an electrochemical analysis technique. The measurement was done by decreasing of the current signal proportional to increasing amount of carbofuran. Optimum experimental conditions were investigated in amperometric mode as follows: 1.2 unit.cm⁻² enzyme alkaline phosphatase loading on active surface of the electrode, 10 minutes for crosslinking enzyme in glutaraldehyde, 8 % w/v of bovine serum albumin, loading of disodium phenyl phosphate at 5000 mg.L⁻¹, phosphate buffer solution (PBS; 0.1 mol.L⁻¹, pH 8.0) and applied potential of +0.75 V vs Ag/AgCl at room temperature. The designed biosensor yielded a linear range for carbofuran from 1 to 6 mg.L⁻¹ ($r^2 = 0.991$) with a sensitivity of 7.07 % Inhibition-L.mg⁻¹, a detection limit and a quantification limit of 1.12 and 3.75 mg.L⁻¹, a reproducibility of 4.31 %RSD (3 sensors), a repeatability of 2.80 %RSD (4 measurements). Moreover, the proposed biosensor was evaluated to determine carbofuran in Thai Jasmine rice samples and spiked samples. The Thai Jasmine rice samples were sampling from Warinchareonsri market, Mae-kimtiang market and Warin market from Warinchamrab district, Ubonratchathani province. Extractants of the samples and 1.5 mg.L⁻¹ carbofuran spiked samples were determined by the proposed biosensor and the reference high performance liquid chromatography. As the results, there was not detection in extractants. The spiked samples were detected in average concentrations of 1.52 ± 0.08 , 1.43 ± 0.20 and 1.57 ± 0.31 mg.L⁻¹ by the proposed biosensor and 1.39 , 1.40 , 1.40 mg.L⁻¹ by the reference method, respectively. A recovery study of carbofuran in spiked samples showed values ranging from 95.6 to 104.8 %. The determination of carbofuran in spiked samples using the proposed biosensor was satisfactory when compared to the reference technique. Applying the paired t-test, the t-values of 2.86, 0.26 and 0.95, respectively, is significantly smaller than the tabulated critical value of 4.30 at degree of freedom of 2. It indicated that there is no significant statistical difference between these results at a confidence interval for 95 % probability.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	viii
สารบัญรูปภาพ	x
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	xvii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	5
2.1.1 สารกำจัดศัตรูพืช	5
2.1.2 ใบโอเซนเซอร์	6
2.1.3 เอนไซม์	7
2.1.4 เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส	13
2.1.5 โบวีนเซรัมอัลบูมิน	15
2.1.6 กลูตราลตีไซด์	16
2.1.7 กลีเซอรอล	17
2.1.8 คาร์บอนเพส	17
2.1.9 วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม	18
2.1.10 เทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	19
2.1.11 เทคนิคไซคลิกโวลแกรมเมทรี	20
2.1.12 เทคนิคໂຄຣໂນແອມເພອໂຮມທີ່	20
2.1.13 ข้าวหอมมะลิ	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
2.2.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาใบโอลเซนเชอร์	22
2.2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสกัดcarboibeฟูแรนจากสารตัวอย่าง	28
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	30
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	30
3.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ประกอบ และวัสดุเครื่องแก้ว	30
3.1.2 วัสดุเครื่องแก้ว	30
3.2 สารเคมี	31
3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง	32
3.3.1 เตรียมสารละลาย โนโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 มоляร์	32
3.3.2 เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 มоляร์	32
3.3.3 เตรียมสารละลายอิสติกไตรไลต์เกือบ浑ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0	32
3.3.4 เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อบริมาตร	33
3.3.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานcarboibeฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	33
3.3.6 เตรียมสารละlaygluutarัลดีไฮด์ เข้มข้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร	33
3.3.7 เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลคาไลน์ฟอสฟາเตส 2 kU.mL^{-1}	33
3.3.8 เตรียมสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟາเตส	33
3.3.9 เตรียมสารละลายฟีนอล เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร	33
3.3.10 เตรียมสารเขกเซนที่อิ่มตัวด้วยสารอะซิโตในไตรล์ที่อิ่มตัวด้วยสารเขกเซน	34
3.3.11 เตรียมสารอะซิโตในไตรล์ที่อิ่มตัวด้วยสารเขกเซน	34
3.4 การสกัดcarboibeฟูแรนจากข้าวหอมมะลิ	34
3.5 การเตรียมข้าวไฟฟ้าใช้งาน	34
3.5.1 การเตรียมคาร์บอนเพส	34
3.5.2 การเตรียมข้าวไฟฟ้าかるบอนเพส	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6 การเตรียมใบโอเซนเซอร์	35
3.7 วิธีการทดลอง	35
3.7.1 พิสูจน์เอกลักษณ์ทางไฟฟ้าของข้าไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิก โอลแทนเมทรี	35
3.7.2 ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	35
3.7.2.1 ศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	35
3.7.2.2 ศึกษาระยะเวลาในการเข้มข้นเอนไซม์กับกลุ่มสารัจค์ ดีไฮด์	36
3.7.2.3 ศึกษาปริมาณของโบว์นเซรัมอัลบูมิน	36
3.7.2.4 ศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต	36
3.7.2.5 ศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	37
3.7.2.6 ศึกษาศักย์กระตุนที่เหมาะสม	37
3.7.2.7 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม	37
3.7.3 ศึกษาประเมินการทำงานของใบโอเซนเซอร์	37
3.7.3.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ด้วย ใบโอเซนเซอร์	37
3.7.3.2 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ	38
3.7.3.3 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ	38
3.7.3.4 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์	38
3.7.4 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ	39
3.7.4.1 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ ด้วยใบโอเซนเซอร์	39
3.7.4.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ ด้วยเทคนิคโคโรมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
4.1 ผลการพิสูจน์เอกสารลักษณ์ของข้าไฟฟ้า ด้วยเทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	40
4.2 ผลการพิสูจน์เอกสารลักษณ์ของข้าไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิกโอลเทนเมทีรี	41
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของใบโไอเซนเซอร์	42
4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	42
4.3.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการเชื้อมไข้ว่อนไชม์กับกลูตารัลดีไฮด์	43
4.3.3 ผลการศึกษาปริมาณของใบวินเชร์รัมอัลบูมิน	45
4.3.4 ผลการศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีโนฟอสเฟต	45
4.3.5 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	46
4.3.6 ผลการศึกษาศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม	47
4.3.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม	48
4.4 ผลการศึกษาประเมินการทำงานของใบโไอเซนเซอร์	49
4.4.1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นสันตրวงการวิเคราะห์carbofibren	50
4.4.2 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ	51
4.4.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ	51
4.4.4 ผลการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์	51
4.4.4.1 ความเที่ยงของข้าไฟฟ้า	51
4.4.4.2 ความเที่ยงของการตรวจวัด	51
4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณcarbofibrenในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ	52
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	54
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก	60
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	87
ภาคผนวก ง	91

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ประเภทของเอนไซม์	13
ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ประกอบที่ใช้ในการทดลอง	30
ตารางที่ 3.2 วัสดุเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและสังเคราะห์สาร	31
ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	31
ตารางที่ 3.4 เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายน้ำต้านการโบฟูแรน	39
ตารางที่ 4.1 ความเที่ยงของข้าวไฟฟ้า	51
ตารางที่ 4.2 ความเที่ยงของการตรวจวัด	52
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโบฟูแรนในข้าวหอมมะลิ	53
ตารางที่ ข-1.1 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	65
ตารางที่ ข-1.2 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและระยะเวลาในการเข้มไข้ เอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ โดยใช้ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	66
ตารางที่ ข-1.3 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน โดยใช้ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	68
ตารางที่ ข-1.4 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต โดยใช้ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	69
ตารางที่ ข-1.5 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและ pH ของสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ โดยใช้ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	71
ตารางที่ ข-1.6 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและศักย์กระดันที่เหมาะสม โดยใช้ ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	73
ตารางที่ ข-1.7 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโบฟูแรนและอุณหภูมิ โดยใช้ข้าวไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตリングด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี	74

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ ข-2.1 ร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของคาร์บอฟูเรน ช่วง 2.98 ถึง 30.04 มิลลิกรัมต่อลิตร	74
ตารางที่ ข-2.2 ร้อยละการยับยั้งและปริมาณคาร์บอฟูเรนที่ความเข้มข้นต่างๆ	76
ตารางที่ ข-3.1 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานการบีบูเรน จากเทคนิคมาตรฐานโครงสร้างมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	78
ตารางที่ ข-3.2 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากข้าวหอมมะลิที่ทำการเติมปริมาณคาร์บอฟูเรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจากเทคนิคมาตรฐานโครงสร้างมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	79
ตารางที่ ข-4.1 ปริมาณคาร์บอฟูเรนที่วิเคราะห์ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยไบโอดีเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	80

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของคาร์บอฟูเรน	2
รูปที่ 1.2 พื้นที่ที่สูมเก็บข้าวห้อมมะลิ ในอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี	4
รูปที่ 2.1 ไดอะแกรมของใบโวเชนเซอร์ ประกอบด้วยสารชีวภาพ และตัวแปลงสัญญาณที่ทำหน้าที่รับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้า	6
รูปที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์ ตามทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจ	7
รูปที่ 2.3 การตึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ	9
รูปที่ 2.4 การตึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดติดกับสารตัวกลาง	9
รูปที่ 2.5 การตึงเอนไซม์ด้วยการเขื่อมแบบไขว้	9
รูปที่ 2.6 การตึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด	10
รูปที่ 2.7 การตึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ในแคปซูล	10
รูปที่ 2.8 การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) ตัวยับยั้งเข้าແຍ่งจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์	11
รูปที่ 2.9 การยับยั้งแบบไม่มีแข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition)	12
รูปที่ 2.10 การยับยั้งแบบไม่มีแข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition)	12
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	14
รูปที่ 2.12 หลักการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวน้ำข้าวไฟฟ้า และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยการโบนฟูเรนทำให้พื้นอลมีปริมาณลดลง	15
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของโบนเฟร์มอัลบูมิน	16
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์	16
รูปที่ 2.15 การเขื่อมขางของกลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์	16
รูปที่ 2.16 โครงสร้างของกลีเซอรอล	17
รูปที่ 2.17 ผงคาร์บอน	17
รูปที่ 2.18 กราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณการวิเคราะห์กับปริมาณตัวยับยั้ง	18
รูปที่ 2.19 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง	19
รูปที่ 2.20 องค์ประกอบของเครื่องจุลทรรศนาสตร็อกเล็กตอรอนแบบส่องกราด	19
รูปคลื่นของการสแกนศักย์ในเทคนิคไซคลิกโวลเทมเมทรีและสัญญาณกระแสสัมพันธ์กับศักย์ที่ข้าวไฟฟ้าของไซคลิกโวลเทมโนแกรม	20

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.22 ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับเวลา ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์ เมทรี	21
รูปที่ 2.23 ปฏิกิริยาของ HQDP และไซคลิกไวลด์เอมโมแกรมของ (a) 1mM HQDP, (b) 1 mM HQDP+ALP และ (c) 1 mM HQ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.5 อัตราการสแกน 50 mV.s ⁻¹	23
รูปที่ 2.24 ภาพถ่าย SEM ของ (A) Fe ₃ O ₄ -CH และ (B) AChE/Fe ₃ O ₄ -CH	27
รูปที่ 2.25 ภาพถ่าย SEM ของ (A) HNTs และ (B) endophytic extract ตีริงบน HNTs	28
รูปที่ 4.1 รูปร่างลักษณะพื้นผิวของข้าไฟฟ้า : (a) คาร์บอนเพส, (b) คาร์บอนเพสที่ตีริงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ (c) คาร์บอนเพสที่ตีริงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวีนเซรัมอัลบูมิน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศนาศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	41
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้าของข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพส สัญญาณกระแสของสารละลายบัฟเฟอร์ (เส้นกราฟสีดำ) สารละลาย 42 มิลลิกรัมต่อลิตร พีนอล (เส้นกราฟสีแดง) และสารละลาย 6200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดโซเดียมฟีนอลฟอสเฟต (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) ที่ศักย์กระแสตู้น -1.0 ถึง +1.2 โวลต์ เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราสแกน 0.1 โวลต์ต่อวินาที)	42
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ถูกตีริงบนผิวน้ำข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพส ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ เอ็นไซม์กับกลูตาร์ลีดีไซด์ 5 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมินร้อยละ 8 โดยมวลต่อบริมาตร ศักย์กระแสตู้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนอลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร	43

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า	
รูปที่ 4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและระยะเวลาในการเชื่อมไขว้ กับกลูตราล็อกไซด์กับเงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตส ปริมาณเงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณของโบวีนเซรั่มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
รูปที่ 4.5	ภาพผิวน้ำข้าวไฟฟ้าที่ตึงด้วยเงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตสและเชื่อมไขว้ ด้วยกลูตราล็อกไซด์ก่อนการใช้งาน เวลาในการเชื่อมไขว้ 10 นาที และ เวลาในการเชื่อมไขว้ 30 นาที	44
รูปที่ 4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณของโบวีนเซรั่มอัลบูมิน ปริมาณเงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตราล็อกไซด์ 10 นาที ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และ สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร	45
รูปที่ 4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณของไดโซเดียมฟีนิล ฟอสเฟต ปริมาณเงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตาราง เซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตสกับ กลูตราล็อกไซด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเซรั่มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดย มวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0	46
รูปที่ 4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณเงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เงินไชเมอร์อัลค่าไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตราล็อกไซด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเซรั่มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร	47

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยังและศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร	48
รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยังและอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการ เชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณ ของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร	49
รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลาของสารละลาย การโบฟูแรน โดยใช้ขี้วัวไฟฟ้าcarบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของ โบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร : ปริมาณการโบฟูแรน (a) 1.0, (b) 2.0, (c) 3.0, (d) 4.0, (e) 5.0 และ (f) 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	50
รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยังกับความเข้มข้นของสารโบฟูแรน (a) ช่วงไดนามิกส์ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (b) ช่วงความเป็นสัดส่วนที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจวัด ด้วยขี้วัวไฟฟ้าcarบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	50
รูปที่ ก-1.1 ลวดทองแดง และ แท่งเทफлон	61
รูปที่ ก-1.2 การประกอบขี้วัวไฟฟ้า	61
รูปที่ ก-1.3 การบอนเพส	61
รูปที่ ก-1.4 ขี้วัวไฟฟ้าcarบอนเพส	61
รูปที่ ก-1.5 การตึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวน้ำของขี้วัวไฟฟ้า	61

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ ก-1.6 การตรึงกลูตราลตีไซด์	61
รูปที่ ก-2.1 การประกลบเซลล์ข้าไฟฟ้า (1) ข้าไฟฟ้าใช้งานการโบฟูแรนใบโอลูเซนเซอร์ (2) ข้าไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl (3) ข้าไฟฟ้าช่วยแพลทินัม (Pt)	62
รูปที่ ก-2.2 การต่อเซลล์ข้าไฟฟ้า (1) เข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ไฟฟ้า	62
รูปที่ ข-1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้ข้าไฟฟ้าcarบอนเพส ที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 และ 3.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชม์กับ กลูตราลตีไซด์ 5 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวล ต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลาย แบลรงค์, (c) สารละลายคาร์โบฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	64
รูปที่ ข-1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยระยะเวลาในการเชื่อม ไข้ว่อนไชม์กับ กลูตราลตีไซด์ 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าcarบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลรงค์, (c) สารละลายคาร์โบฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	65
รูปที่ ข-1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยมีปริมาณของโบวีน เซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าcarบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิต ต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชม์กับ กลูตราลตีไซด์ 10 นาที ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลาย แบลรงค์, (c) สารละลายคาร์โบฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	67

สารบัญรูปภาพ (๘)

	หน้า	
รูปที่ ข-1.4	ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้ปริมาณได้ ไฮเดอเรียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้น 1300, 2600, 3850, 5063 และ 6300 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้ขั้วไฟฟ้าcarbonบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการ เชื่อมไข้ว่อนไฮเมร์กับ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชรัม ⁺ อัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อบริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายได้ไฮเดอเรียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลลังค์, (c) สารละลายคาร์บอฟูร์ ฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	68
รูปที่ ข-1.5	ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ ใช้ขั้วไฟฟ้าcarbonบอน เพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไฮเมร์กับ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณ ของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อบริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ โดย (a) สารละลายได้ไฮเดอเรียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัม ต่อลิตร, (b) สารละลายแบลลังค์, (c) สารละลายคาร์บอฟูร์ฟูแรน 6 มิลลิกรัม ต่อลิตร	70
รูปที่ ข-1.6	ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้ศักย์กระตุ้น ที่ +0.6, +0.7, +0.725, +0.75, +0.775 และ +0.8 โวลต์ ตามลำดับ ใช้ ขั้วไฟฟ้าcarbonบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิต ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไฮเมร์กับ ⁺ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดย มวลต่อบริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายได้ ไฮเดอเรียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลลังค์, (c) สารละลายคาร์บอฟูร์ฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	72

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ ข-1.7	ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้อุณหภูมิระบบใน การวิเคราะห์ 20, 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้ ข้าวไฟฟ้าcarbонเพสท์ที่ตึงด้วยเงินไชเมล์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิต ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ระยะเวลาในการเชื่อมไข้วัวเงินไชเมล์กับ กลูตราลัดดี้ไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบเวนเซรั่มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดย มวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายได โซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลงค์, (c) สารละลายการใบฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร	หน้า 73
รูปที่ ข-2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของคาร์ใบฟูแรน ตั้งแต่ 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจด้วยการบอนเพสท์ที่ตึงด้วย สารละลายเงินไชเมล์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	75
รูปที่ ข-2.2	ความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งกับปริมาณคาร์ใบฟูแรน 0 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลาย ตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ # 4	76
รูปที่ ข-2.3	ความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งกับปริมาณคาร์ใบฟูแรน 0 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลาย ตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ # 5	77
รูปที่ ข-2.4	ความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งกับปริมาณคาร์ใบฟูแรน 0 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลาย ตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ # 6	79
รูปที่ ข-3.1	โครงมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารมาตรฐานคาร์ใบฟูแรน: (a) 0.5, (b) 1.0, (c) 5.0, (d) 10.0, (e) 20.0, (f) 30.0 และ (g) 100.0 มิลลิกรัม ต่อลิตร	80
รูปที่ ข-3.2	โครงมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารสกัดจากข้าวห้อมมะลิที่ทำการเติม ปริมาณคาร์ใบฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (a) ข้าวห้อมมะลิ # 1, (b) ข้าวห้อมมะลิ # 2, (c) ข้าวห้อมมะลิ # 3, (d) ข้าวห้อมมะลิ # 4, (e) ข้าวห้อมมะลิ # 5, (f) ข้าวห้อมมะลิ # 6, (g) ข้าวห้อมมะลิ # 7, (h) ข้าวห้อมมะลิ # 8, (i) ข้าวห้อมมะลิ # 9 และ (j) ข้าวห้อมมะลิ # 10	81
รูปที่ ข-3.3	ความสัมพันธ์ของพื้นที่พื้นที่กับความเข้มข้นของคาร์ใบฟูแรน	83

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ag/AgCl	ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอรอไรด์
ALP	เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟاتেส
cm ²	ตารางเซนติเมตร
CPE	ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพส
E	ตัวเร่งปฏิกิริยา
e	อิเล็กตรอน
ES	สารประกอบเชิงช้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น
H ⁺	โปรดอน
I	กระแสที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของชั้บสเตรตด้วยเอนไซม์
I ₀	กระแสที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง
KU.mL ⁻¹	กิโลยูนิตต่อมิลลิลิตร
M	โมลาร์
mg.L ⁻¹	มิลลิกรัมต่อลิตร
mL	มิลลิลิตร
mm	มิลลิเมตร
mm ²	ตารางมิลลิเมตร
mM	มิลลิโมลาร์
mV	ค่าศักย์ไฟฟ้าหน่วยเป็นมิลลิโวลต์
n	จำนวนครั้งที่ตรวจวัด
nm	นาโนเมตร
P	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น
pH	ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลาย
Pt	ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลทินัม
r	รัศมีของขั้วไฟฟ้าหน่วยมิลลิเมตร
S	สารตั้งต้น
s	หน่วยของเวลาเป็นวินาที
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
unit.cm ⁻²	ปริมาณเอนไซม์ในหน่วยยูนิตต่อตารางเซนติเมตร
V	ค่าศักย์ไฟฟ้าหน่วยเป็นโวลต์
V ₁ , V ₂	ปริมาตรหน่วยเป็นมิลลิลิตร
°C	องศาเซลเซียส
µM	ไมโครโมลาร์
µL	ไมโครลิตร
µm	ไมโครเมตร
µA	ไมโครแอมป์
̄x	ค่าเฉลี่ย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

%RSD	ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
%v/v	ร้อยละโดยปริมาตร
%w/v	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
%w/w	ร้อยละโดยมวล

บทที่ 1

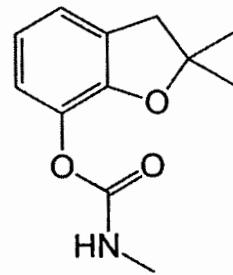
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ข้าวหอมมะลิ (Thai Jasmine rice) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ ว่า *Oryz Sativa L.* เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เป็นข้าวนาปีปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้ง ลักษณะข้าวเปลือกเรียวยาว เมื่อสีเป็นข้าวสารจะได้ข้าวเมล็ดเรียวยาว มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตยเป็นพันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ และเป็นพันธุ์ข้าวที่สร้างชื่อเสียงให้ข้าวไทยเป็นที่รู้จักทั่วโลก ประเทศไทยถือเป็นแหล่งผลิตข้าวหอมมะลิที่มีคุณภาพดีที่สุดแห่งหนึ่ง โดยมีแหล่งเพาะปลูกสำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เขตทุ่งกุลารังไห้) และมีพื้นที่เพาะปลูกครอบคลุมกว่า 19 ล้านไร่ทั่วประเทศไทย¹ โดยจังหวัดอุบลราชธานีเป็นหนึ่งพื้นที่ที่สามารถปลูกข้าวหอมมะลิได้ดีและมีคุณภาพ เนื่องจากสภาพดินฟ้าอากาศและพื้นที่เพาะปลูกเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิเป็นอย่างดี ทำให้ข้าวนาส่วนใหญ่นิยมปลูกข้าวหอมมะลิเป็นจำนวนมาก

ในกระบวนการทางเกษตรกรรม สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่จำเป็นอย่างยิ่ง ที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาด สารกำจัดศัตรูพืช มีหลายประเภท ทั้งสารที่ผลิตจากธรรมชาติ และสารที่สังเคราะห์ขึ้น ส่วนใหญ่เกษตรกรจะใช้สารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น เพราะมีประสิทธิภาพดีและออกฤทธิ์ที่รวดเร็วกว่า โดยสารเหล่านี้ตกลงค้างเจือปนอยู่ในผลผลิต เช่น พืชผัก ผลไม้ เป็นต้น เกษตรกรมักจะไม่คำนึงถึงผลกระทบที่ตามมากมาให้เกิดสารตกค้างเป็นจำนวนมาก ถือเป็นภัยใกล้ตัวที่ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภคได้ตลอดเวลา ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในดิน น้ำ อากาศ ตัวของเกษตรกรเองและยังส่งผลเสียต่อชีวิตร่วมในตลาดค้าข้าวบริเวณนั้นๆด้วย สารกำจัดศัตรูพืชที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือ การใบฟูแรน

การใบฟูแรน (Carbofuran)² ชื่อทางเคมี 2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol N-methylcarbamate เป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มคาร์บามेट มีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 1.1 ใช้กำจัดศัตรูพืช จำพวกแมลงและหนอนตัวกลม ในระหว่างการปลูกและหลังการเก็บเกี่ยว พืชจะสามารถดูดซึมเข้าสู่รากไปสะสมในลำต้นและใบ โดยสารนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟตา塞ส (Alkaline phosphatase, ALP) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเฟตของโมเลกุลในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และเอนไซม์อะชิทิลโคลีนเอสเทอเรส³ (Acetylcholinesterase, AChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางของสิ่งมีชีวิต หากมนุษย์ได้รับสารการใบฟูแรนเข้าสู่ร่างกาย จะมีผลทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ สายตาพร่ามัว มีนงน อ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน หนึ่งอุကมาก ซึ่งเด่นชัด กล้ามเนื้อเกร็ง และอาจทำให้ระบบการหายใจล้มเหลวหากร่างกายได้รับในปริมาณมากเกินไป⁴ ซึ่งองค์กรอนามัยโลก (WHO) กำหนดให้สามารถมีปริมาณสารใบฟูแรนบนเบื้องในอาหารได้ไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของยาบีฟูแรน

การวิเคราะห์หาปริมาณยาบีฟูแรนในผลผลิตทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อมมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณยาบีฟูแรนมีหลายวิธี⁵ เช่น เทคนิคโถกรามาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) แก๊สโถกรามาโทกราฟ (Gas chromatography, GC) การใช้วิธีเอนไซม์อิมมูโนเชค (Enzyme-linked immunoassay, ELISA) และเทคนิคการวัดสี (Colorimetric methods) เทคนิคเหล่านี้ใช้เครื่องมือมีราคาแพง ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือเพื่อให้ได้การวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และไม่สะดวกต่อการนำไปวิเคราะห์ที่นักอุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพขนาดเล็กและสามารถนำไปตรวจวัดสารนอกสถานที่ได้ เช่น ชุดทดสอบ (Test kit) เช่นเซอร์ทางเคมีใบโอเซนเซอร์ เป็นต้น

ใบโอเซนเซอร์ (Biosensor) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารชีวภาพที่สามารถตรวจสารได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีข้อดี คือ ใช้งานง่าย ความไวในการตรวจวัดสูง ลดเวลาในการเตรียมสาร ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น สะดวกต่อการตรวจวัดสารนอกสถานที่ และมีต้นทุนการผลิตต่ำ ใบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วย สensor คือ สารชีวภาพ หน้าที่จะจำสารที่จะวิเคราะห์ (Target analyte) ได้อย่างเฉพาะเจาะจง เรียกว่าตัวรับสัญญาณทางชีวภาพ (Biological detector) อีกส่วนคือ ตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) ทำหน้าที่เปลี่ยนสัญญาณทางเคมีที่เกิดขึ้นไปเป็นสัญญาณอื่นๆ เช่น สัญญาณทางแสง ความร้อน ปริมาณไฮโดรเนียมไอออน ปริมาณไฮดรอกไซด์ไอออน ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า เพื่อจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาและเพอโรเมทริกการยาบีฟูแรนใบโอเซนเซอร์ สำหรับตรวจปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชยาบีฟูแรน โดยเตรียมใบโอเซนเซอร์แบบตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟາเตส โบวีนเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์ลงบนผิวน้ำข้าวไฟฟ้าcarบอนเพส ผู้วิจัยคาดหวังว่าแอมเพอโรเมทริกการยาบีฟูแรนใบโอเซนเซอร์ที่พัฒนานี้ สามารถนำไปเป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณสารยาบีฟูแรนในตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ของเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณยาบีฟูแรนในอนาคตข้างหน้า

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้พัฒนาและเพอโรเมทริกการยาบีฟูแรนใบโอเซนเซอร์ สำหรับตรวจวัดยาบีฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ สุ่มเก็บมาจากพื้นที่ในอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยมีวัตถุประสงค์การดำเนินงานวิจัย ดังนี้

1.2.1 พัฒนาและเพอโรเมทริกการยาบีฟูแรนใบโอเซนเซอร์ โดยเตรียมใบโอเซนเซอร์แบบตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟາเตส โบวีนเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์ลงบนผิวน้ำข้าวไฟฟ้าcarบอนเพส

- 1.2.2 ประเมินการทำงานของแอมเพอโรเมทริกการ์บอฟูแรนไปโอลเซนเซอร์ โดยศึกษาถึงช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์ ความไวในการตรวจวัด ขีดความสามารถต่อสุกใน การตรวจพับและตรวจวัด ความเที่ยงของการวิเคราะห์ และผลของตัวรับกวนในการวิเคราะห์
- 1.2.3 ประเมินการวิเคราะห์การ์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิตัวอย่างโดยใช้แอมเพอโรเมทริก การ์บอฟูแรนไปโอลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น
- 1.2.4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การ์บอฟูแรนด้วยเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

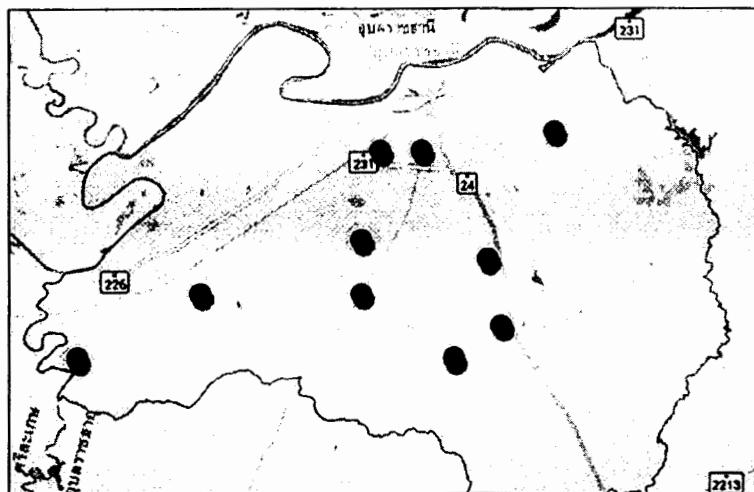
งานวิจัยนี้ปรับปรุงขั้นไฟฟ้าการบอนเพสด้วยการตึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวีนเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตราลีดีไฮด์ เพื่อตรวจวัดปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชชนิดการ์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิที่สุ่มเก็บมาจำนวน 13 ตัวอย่าง จากในอำเภอวารินชำราบจังหวัดอุบลราชธานี ดังรูปที่ 1.2 ด้วยเทคนิคไซคลิกโอลแทมเมทรี และเทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรี โดยมีขอบเขตการวิจัย ดังนี้

1.3.1 ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานของไปโอลเซนเซอร์

- ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
- ระยะเวลาในการเชื่อมไข้วัวเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตราลีดีไฮด์
- ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน
- ปริมาณของไดโซเดียมฟีโนลฟอสเฟต
- pH ที่เหมาะสม
- ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์
- อุณหภูมิในการวิเคราะห์

1.3.2 ศึกษาการทำงานของไปโอลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

- ช่วงความเป็นเส้นตรงการวิเคราะห์
- ขีดจำกัดในการตรวจพับ
- ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ
- ความเที่ยงของการวิเคราะห์
- ศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลการวิเคราะห์การ์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ ด้วยไปโอลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และเทคนิคการวัดสี



รูปที่ 1.2 พื้นที่ที่สุ่มเก็บข้าวหอมมะลิ ในอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

งานวิจัยนี้หากประสบความสำเร็จ ตามวัตถุประสงค์ จะได้ใบโอเซนเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง มีสภาพไวสูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณของคาร์บอฟูแรนได้อย่างถูกต้อง และเป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์การโบฟูแรน

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 สารกำจัดศัตรูพืช

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อกระบวนการทำการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้ได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชเป็นสาร อินทรีย์ สังเคราะห์ แบ่งได้ 4 ชนิด⁶ ดังนี้

1) กลุ่มօร์กานคลอรีน (Organochlorine) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ สารเคมีในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีพิษต่อแมลงทุกชนิด และสัตว์ตัวเดียว ทำให้พบตอกต้านในห่วงโซ่ออาหารและสิ่งแวดล้อมได้นาน บางชนิดตอกต้านนานหลายสิบปี ปัจจุบันประเทศไทยส่วนใหญ่ห้ามไม่อนุญาตให้ใช้สารเคมีในกลุ่มนี้ หรือมีการควบคุมการใช้ ไม่อนุญาตให้ใช้อย่างเสรี เพราะผลกระทบต้านสุขภาพและสิ่งแวดล้อม สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่ ดีตีที (DDT), ดีลดрин (Dieldrin), ออลดริน (Aldrin), ท็อกซาฟีน (Toxaphene), คลอร์เดน (Chlordane), ลินเดน(Lindane), เอนดริน (Endrin) และ เอปตัครอ (Heptachlor) เป็นต้น

2) กลุ่มօร์กานฟอสเฟต (Organophosphate) เป็นกลุ่มที่มีฟอฟอรัสเป็นองค์ประกอบ สารเคมีในกลุ่มนี้จะมีพิษรุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่น โดยเป็นพิษทั้งกับแมลงและสัตว์อื่นๆ ทุกชนิด สารในกลุ่มนี้จะย่อยสลายได้เร็วหลังการใช้งานใช้ได้ดีในพืชผัก ได้แก่ มาลาไซโอน(Malathion), ไดอาซีน (Diazinon), เฟนิโนตโรไฮตอน (Fenitrothion), ไดคลอวอส (Dichlorvos หรือ DDVP) และพิริมิฟอส เมธิล (Pirimiphos methyl) เป็นต้น

3) กลุ่มคาร์บามेट (Carbamate) ซึ่งมีคาร์บาริลเป็นองค์ประกอบสำคัญ เป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมน้อยกว่าพอกออร์กานฟอสเฟต แต่มีอีกด้วยในปริมาณมากสามารถทำให้เกิดพิษได้ สารเคมีที่รู้จักและใช้กันมาก คือ คาร์บาริล (Carbaryl ที่มีชื่อการค้า Savin), คาร์บอฟูแรน (Carbofuran), โพร์พ็อกเซอร์ (Propoxur), เมทธอยมิล (Methomyl), เบนไดโอดิคาร์บ (Bendiocarb) และ เมทธิโอดิคาร์บ (Methiocarb) เป็นต้น

4) กลุ่มสารสังเคราะห์ไฟรีทรอย (Synthetic pyrethroid) เป็นสารเคมีกลุ่มที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีความสัมพันธ์ตามโครงสร้างของไฟรีทริน (Pyrethrin) ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่สกัดได้จากพืชไฟรี หรัม (Pyrethrum) สารเคมีในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อแมลงสูง มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ และไม่ทำให้เกิดปัญหาพิษตอกต้านในสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อเสียคือ คือ มีพิษสูงมากต่อสัตว์น้ำ เช่น ปลา และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในน้ำ และสารเคมีกลุ่มนี้มีราคาแพงจึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่ เดลตาเมธrin (Deltamethrin), ไบโอเรสมธrin (Bioresmethrin), เพอร์เมธrin (Permethrin) และเรสเมธrin (Resmethrin) เป็นต้น

งานวิจัยนี้ศึกษาการพัฒนาคาร์บอฟูแรนไบโอเซนเซอร์ เพื่อใช้สังเคราะห์ปริมาณการป่นเปื้อนของคาร์บอฟูแรนในตัวอย่าง การตรวจวัดจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้งานนอกสถานที่ได้ ไบโอเซนเซอร์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทำการพัฒนาสำหรับการตรวจวัดสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.1.2 ไบโอดเซนเซอร์

ไบโอดเซนเซอร์ (Biosensor) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารชีวภาพที่สามารถตรวจวัดสารได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีข้อดี คือ ใช้งานง่าย ความไวในการตรวจวัดสูง ลดเวลาในการเตรียมสาร ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น สะดวกต่อการตรวจวัดสารนอกรถสถานที่ และมีต้นทุนการผลิตต่ำ⁵ โดยทั่วไปแล้ว ไบโอดเซนเซอร์ ประกอบด้วยอุปกรณ์สำคัญ 2 ส่วน⁷ คือ สารชีวภาพและตัวแปลงสัญญาณ

สารชีวภาพ (Biological substance) เป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เอนไซม์ เอนติเจน แอนติบอดี กรณิวคลีอิก ดีเอ็นเอ เป็นต้น

ตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) เป็นอุปกรณ์สำหรับแปลงสัญญาณเฉพาะต่างๆ เช่น อิเล็กทรอน แสง สี เป็นสัญญาณไฟฟ้าเพื่อเป็นตัวระบุสิ่งปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตัวอย่างตัวแปลงสัญญาณ เช่น ข้าไฟฟ้า เซมิคอนดัคเตอร์ โฟโตเดιเก็ตเตอร์ เป็นต้น

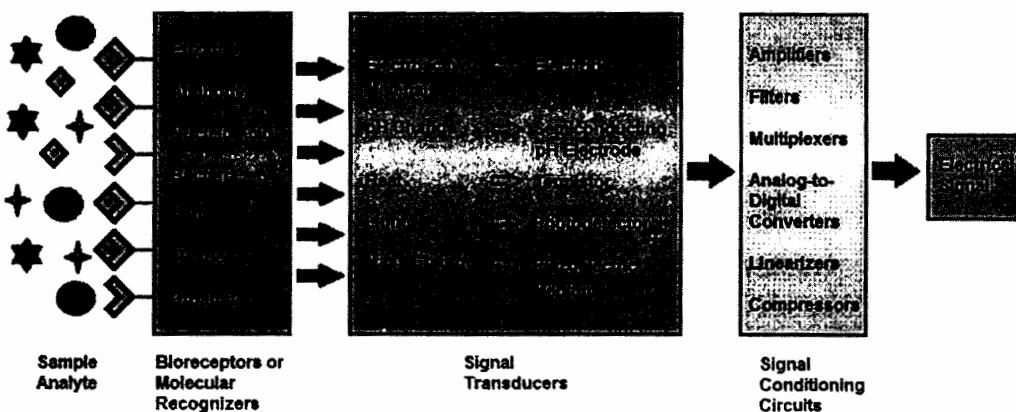
หลักการทำงานของไบโอดเซนเซอร์

หลักการทำงานของไบโอดเซนเซอร์มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การตรึงสารชีวภาพเข้ากับตัวแปลงสัญญาณเพื่อสร้างไบโอดเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องการ

ขั้นตอนที่ 2 นำไบโอดเซนเซอร์ที่ได้มาทำการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในขั้นตอนนี้สารที่ต้องการวิเคราะห์จะจับกับไบโอดเซนเซอร์ที่ทำหน่งจำเพาะเจาะจงตรงส่วนของสารชีวภาพ ที่ตั้งบนตัวไบโอดเซนเซอร์ เรียกขั้นตอนนี้ว่า กลไกการจดจำทางชีวภาพ (Biological recognition mechanism) จากการเข้าจับกันทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะ (Indicated signal) ซึ่งอาจเป็นอิเล็กทรอน แสง และอื่นๆเข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ

ขั้นตอนที่ 3 ตัวแปลงสัญญาณรับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้า ผ่านเครื่องอ่านสัญญาณอิเล็กทรอนิกส์ ทำให้เราสามารถอ่านค่าได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า เทคนิคของการรับและแปลงสัญญาณทางกายภาพ (Physical transduction technique) และเมื่ออ่านค่าได้ก็ทำให้ทราบว่าสารที่วิเคราะห์นั้นเป็นสารใด ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไบโอดเซนเซอร์ ประกอบด้วยสารชีวภาพ และตัวแปลงสัญญาณที่ทำหน้าที่รับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้า⁸

จากหลักการทำงานของใบโอเขนเซอร์จึงนำไปสู่การพัฒนาใบโอเขนเซอร์เพื่อตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูเรน โดยงานวิจัยนี้ใช้ออนไซม์เป็นสารชีวภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้ได้ผลิตภัณฑ์ หรือให้สัญญาณเฉพาะที่ติดตามได้ โดยจะขอถ่วงรายละเอียดของออนไซม์ ดังนี้

2.1.3 เอนไซม์

เอนไซม์ (Enzyme)⁹ คือ กลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่เป็นตัวช่วยและเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่จำเพาะ โดยการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาชีวเคมีที่แน่นอนภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์เป็นหลายล้านเท่าด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาหรือสารตั้งต้นที่เรียกว่า ชับสเตรต (Substrate) สามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์นั้นจะไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น และสามารถเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา โดยการลดพลังงานกระตุนของปฏิกิริยาได้

กลไกการทำงานของเอนไซม์

เมื่อเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น จะเกิดสารประกอบเชิงช้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น ทำให้สารตั้งต้นเกิดการสร้างหรือสลายพันธะแล้วเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้เอนไซม์กลับคืนมา ดังสมการที่ 2.1



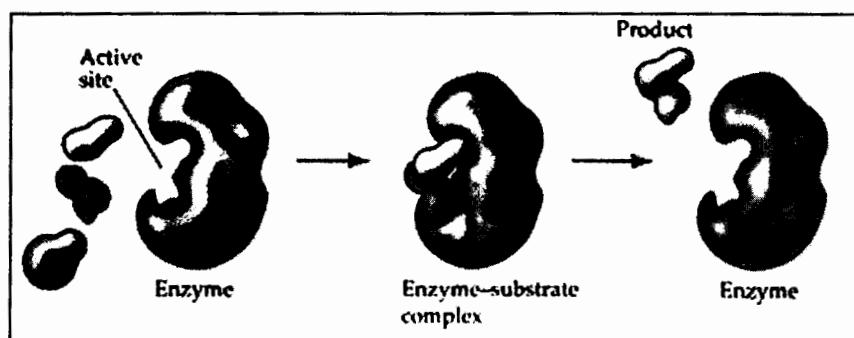
เมื่อ E คือ ตัวเร่งปฏิกิริยา (เอนไซม์)

S คือ สารตั้งต้น (ชับสเตรต)

ES คือ สารประกอบเชิงช้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เนื่องจากเอนไซม์มีส่วนที่เป็นบริเวณเร่ง (Active site) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่จะให้ชับสเตรตเข้ามาจับกับเอนไซม์ได้ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งก่อนและหลังจากจับกับชับสเตรต และสามารถเข้ากันได้พอดีเหมือนกับลูกกุญแจและแม่กุญแจ ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์ ตามทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจ¹⁰

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์ ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ¹¹ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของซับสเตรต เมื่อเอนไซม์คงที่ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจะทำให้อัตราเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น จนถึงจุดๆ หนึ่งแล้วคงที่ และความเข้มข้นของซับสเตรตเข้มข้นเกินไป จะทำให้เอนไซม์หยุดการทำงานได้

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ ซับสเตรตประมาณหนึ่งๆ นั้น ต้องใช้เอนไซม์ประมาณพอดี ถ้าเอนไซม์มากหรือน้อยไปก็จะทำงานได้ผลไม่เต็มที่

3. ความเป็นกรด-เบส ของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในหลายด้าน ตามปกติเอนไซม์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อ pH สูงหรือต่ำกว่า pH ที่เหมาะสม โดย pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 6-8 การที่ pH สูงมากหรือต่ำมาก จะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ

4. อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่งเอนไซม์ทั้งทางบวกและทางลบ ถึงแม้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลเร่งปฏิกิริยา แต่ในขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิก็จะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเปลี่ยนสภาพเดิมของมันได้ง่าย อุณหภูมิที่พอเหมาะสมเท่านั้นจึงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี

5. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถวัดได้ จากอัตราการหายไปของสารเริ่มต้นหรือวัดจากการประยุกต์ของผลิตภัณฑ์ หรือทำหั้ง 2 วิธีพร้อมกัน แต่ไม่ว่าจะวัดโดยวิธีใด จะพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ช้าลงนี้ เพราะเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังเกิดเพราะมีการลดลงของสารเริ่มต้น และผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นหนึ่งอาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ ไม่เลกุลของผลิตภัณฑ์จะรวมกับเอนไซม์แทนสารเริ่มต้นทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

6. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Inhibitors) มีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สารเหล่านี้อาจเป็นสารอนินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรืออาจเป็นสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีโนลิก (Phenolic) หรือโปรตีน เป็นต้น

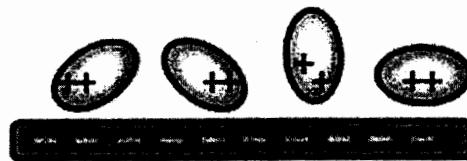
นอกจากนี้การสร้างใบโอเชนเซอร์ การยึดติดเอนไซม์บนผิวน้ำของตัวแปลงสัญญาณมีความสำคัญมาก ดังนั้นจำเป็นต้องเข้าใจระบบการตรึงเอนไซม์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

วิธีการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ หมายถึง การจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ด้วยวิธีทางกายภาพหรือจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ให้อยู่ในช่องว่างที่กำหนด โดยตรึงเอนไซม์กับตัวดึงเกาะที่ไม่ถาวรที่หลักหลายโดยเอนไซม์นั้นยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการตรึงเอนไซม์มีวิธีพื้นฐานอยู่ 5 วิธี¹²

1. การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Adsorption method)

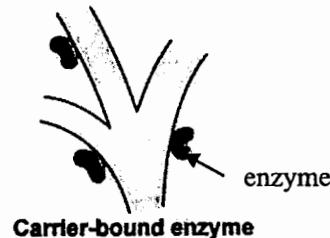
อาศัยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน คือ แรงวนเดอร์วัลล์ส (Vander waals forces) ระหว่างเอนไซม์กับตัวดูดซับใช้ตรึงเอนไซม์ ซึ่งเป็นข้อดี เพราะสามารถพื้นฟูสภาพของตัวดูดซับได้ง่าย ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ¹²

2. การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง (Connection method)

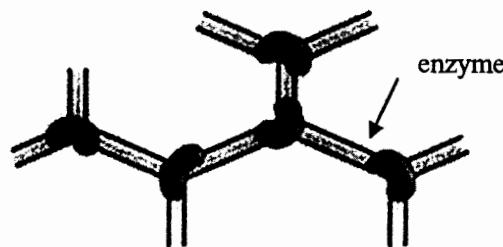
วัตถุหรือสารที่เป็นตัวกลางหรือตัวพยุง (Carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำโดยทำการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพยุงด้วยการตรึงแบบกายภาพหรือด้วยพันธะเคมีที่เรียกว่าพันธะไออ้อนิกหรือเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งจะไม่ทำให้โครงสร้างและแอคติวิตี้ของเอนไซม์เสียไปแต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดติดกับสารตัวกลาง¹²

3. การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (Cross linking method)

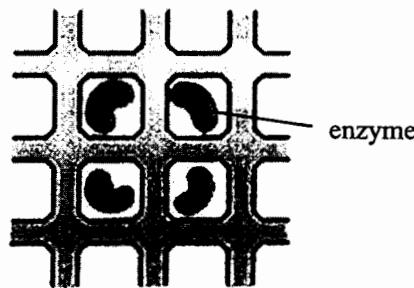
การตรึงเอนไซม์วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุงแต่จะอาศัยสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้มีความสามารถละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงเอนไซม์วิธีนี้จะมีผลต่อโครงสร้างและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เนื่องจากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมอาจจะเกิดปฏิกิริยาrunแรง มีผลทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลง ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบไขว้¹²

4. การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด (Entrapment method)

โมเลกุลของเอนไซม์อยู่อย่างอิสระในสารละลายแต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่โดยโครงสร้างที่เป็นจุดแลตติช (Lattice) ของเจล (Gel) โดยต้องควบคุมความพรุนของเจลแลตติช (Gel lattice) ให้มีความเหมาะสมในการป้องกันการรั่วของเอนไซม์ออกมานะ และภายในเจลนั้นต้องมีที่ว่างพอให้มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระของชั้บสเตรตและผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.6



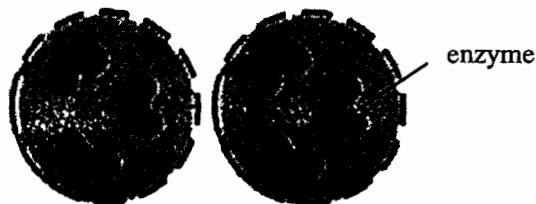
รูปที่ 2.6 การตรึงเอนไซม์ด้วยการกักเก็บเอนไซม์ในพื้นที่จำกัด¹²

5. การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (Entrapping method)

การตรึงเอนไซม์โดยที่เอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้มและเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวพยุง หรือ จับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

5.1 เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้ ภายในช่องทางเดียวของสารโพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ อย่างสม่ำเสมอ สารที่ใช้ห่อหุ้มเอนไซม์วินิจฉัยอาจเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ที่ได้การเตรียมเอนไซม์วินิจฉัย จะต้องเลือกชนิดของสารโพลิเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากสารบางชนิด ขณะเกิดเป็นโพลิเมอร์จะมีปฏิกิริยา/run แรง จนทำให้เสียรากของเอนไซม์เสียหายได้

5.2 เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลที่มีคุณสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้ แต่ เอนไซม์ผ่านออกมานะได้ การเตรียมเอนไซม์วินิจฉัยจะต้องควบคุมสภาพว่าที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดสารโพลิเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นจะมีผลต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ได้ ลักษณะการห่อหุ้ม ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ในแคปซูล¹²

นอกจากการตรึงเอนไซม์มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาและความคงอยู่แล้ว ยังพบว่าการเสื่อมสภาพและการถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังรายละเอียดดังไป

การเสื่อมสภาพของเอนไซม์

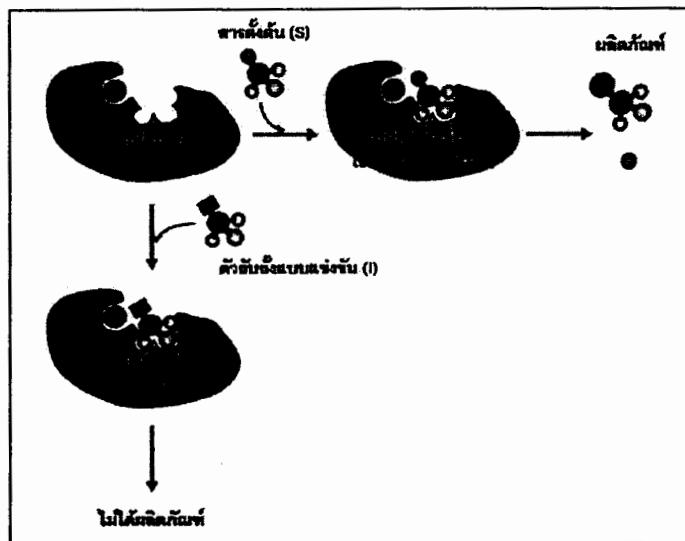
เมื่อโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป จนสารเริ่มต้นไม่สามารถรวมกับเอนไซม์ที่บริเวณร่าง (Active site) จะทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หมดไป ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างทำให้เกิดการหมดสภาพของเอนไซม์ มีหลายกรณีที่เมื่อเอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพไปแล้ว ไม่สามารถกลับคืนมาสู่สภาพที่ทำงานได้อีก เช่น กรณีที่ได้รับอุณหภูมิสูงทั้งนี้ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการสร้างพันธะชนิดโคвалนต์ ระหว่างลูกโซ่ โพลีเปปไทด์ (Polypeptide chain) หรือในลูกโซ่โพลีเปปไทด์เดียวกัน และพันธะเหล่านี้จะมีความคงตัวมากจนทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพได้¹³

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาด้วยยับยั้งของเอนไซม์¹⁴ ทำให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีต่าง ๆ ต่อเซลล์และร่างกาย และยังเป็นเครื่องมือที่ดีในการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ในรายละเอียดการยับยั้งแบ่งออกได้ตามบริเวณที่เข้าจับของสารตั้งต้นบนเอนไซม์ ได้เป็น 2 แบบ คือ จับบริเวณเดียวกับสารตั้งต้น เรียกว่า การยับยั้งแบบแข่งขัน และจับกันคนละบริเวณกับสารตั้งต้น เรียกว่า การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ซึ่งการยับยั้งแบบไม่แข่งขันสามารถเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์ หรือกระทบต่อจนศาสตร์ของเอนไซม์

1. การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition)

การยับยั้งแบบนี้ ตัวยับยั้ง (Inhibitor) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของสารตั้งต้น จึงสามารถเข้าจับกับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบแข่งขันนี้สามารถผันกลับได้ (Reversible) เพราะตัวยับยั้งและสารตั้งต้น พยายามแข่งขันแย่งกันเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่า ก็จะเข้าจับได้ดีกว่า การยับยั้งแบบนี้ เป็นการยับยั้งแบบย้อนกลับได้ โดยการกำจัดตัวยับยั้งออกไปจากสารละลาย หรือโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น สารตั้งต้นที่มีจำนวนความเข้มข้นสูงกว่าจะเข้าแย่งจับที่บริเวณเร่ง ทำให้ตัวยับยั้งหลุดออกไปจากบริเวณเร่ง ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) ตัวยับยั้งเข้าแข่งจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์¹⁴

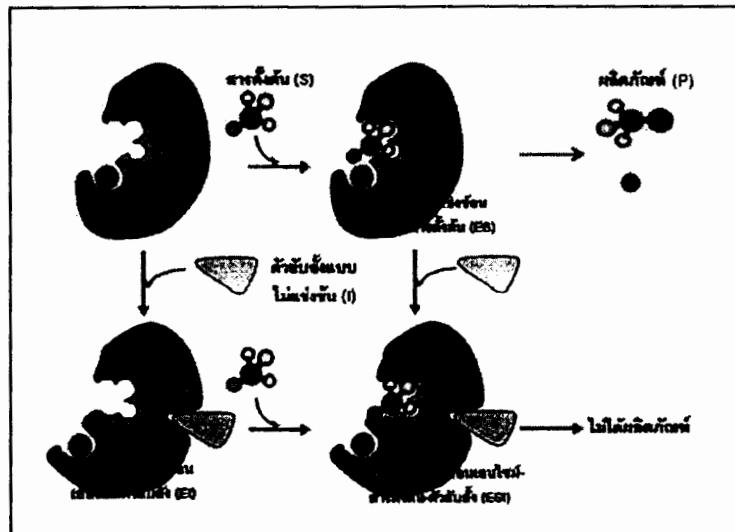
2. การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Noncompetitive และ uncompetitive inhibition)

การยับยั้งแบบไม่แข่งขันนี้ ตัวยับยั้งจะไม่เข้าแข่งขันจับกับบริเวณเร่งโดยตรง แต่จะยับยั้งโดยการเข้ารับกวนการเกิดสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น การยับยั้งแบบไม่แข่งขันนี้ผันกลับได้ โดยการกำจัดตัวยับยั้งออกไปจากสารละลาย แต่จะไม่ย้อนกลับหากเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น เพราะว่าตัวยับยั้งและสารตั้งต้น มีไดจับในบริเวณเดียวกัน การยับยั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

2.1 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition type 1)

เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง โดยเข้าจับได้ทั้งกับสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น และเอนไซม์อิสระ หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งว่า ตัวยับยั้งแบบนี้ เข้าจับกับเอนไซม์

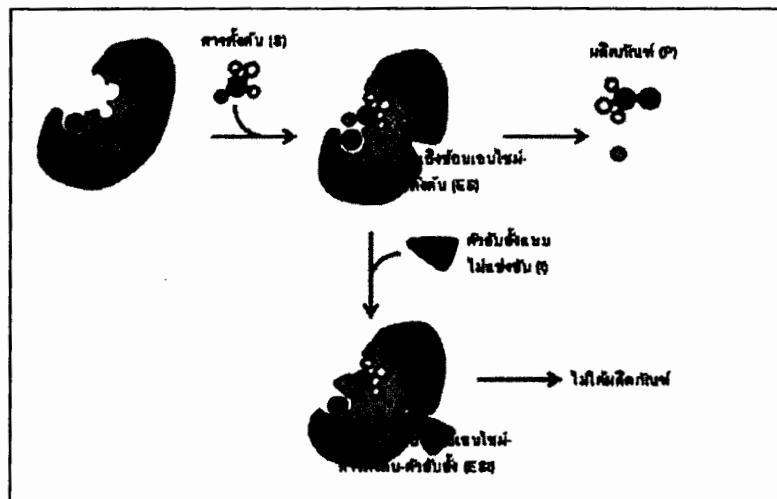
ได้โดยไม่สนใจว่ามีสารตั้งต้นจับอยู่กับเอนไซม์หรือไม่ พนบว่า ตัวยับยั้งแบบนี้ไม่รบกวนการจับของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้หมู่เร่งปฏิกิริยาไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยลง หรือเปลี่ยนไม่ได้เลย ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition)¹⁴

2.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition type 2)

เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับเฉพาะกับสารประกอบเชิงช้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น แต่ไม่จับกับเอนไซม์อิสระ ผลของการจับของตัวยับยั้งทำให้เอนไซม์เสียโครงสร้าง ดังรูปที่ 2.10 ทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ลดลงหรือหมดไป อย่างไรก็ตามเมื่อนำไบวิเคราะห์ ตามสมการของไมเคลลิส-เมนเนน¹⁵ และเขียนกราฟตามสมการลายวีฟเวอร์เบอร์ก¹⁵ พนบว่า ทั้งค่าคงที่ของไมเคลลิส (K_m) และค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) กลับลดลง



รูปที่ 2.10 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition)¹⁴

3. ตัวยับยั้งเอนไซม์แบบไม่ผันกลับ (Irreversible inhibitor)

การยับยั้งแบบแข็งขัน หรือไม่แข็งขัน สามารถผันกลับได้ เมื่อกำจัดเอาตัวยับยั้งออกไปอย่างไรก็ตาม มีตัวยับยั้งบางตัวเข้าจับกับเอนไซม์ด้วยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างตัวยับยั้งกับหมู่ข้าง (Side chain) ของกรดอะมิโนของเอนไซม์หรือโคเอนไซม์ ทำให้ยอนกลับไม่ได้ (Irreversible)

ประเภทของเอนไซม์

เอนไซม์สามารถจำแนกได้หลายวิธี แต่วิธีที่เป็นที่ยอมรับและใช้อย่างกว้างขวาง คือการจำแนกชนิดตามข้อตกลงของเอนไซม์ (Commission on enzymes, E.C.) ซึ่งจำแนกของเอนไซม์ไว้ 6 ประเภท¹⁶ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ประเภทของเอนไซม์

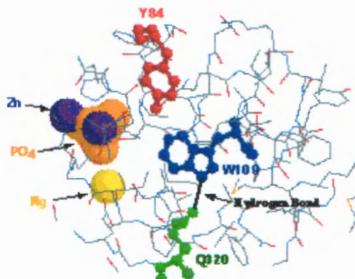
ประเภทของเอนไซม์	ลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาเคมี
1. ออกซิไดเรตักเตส (Oxidoreductase)	เร่งปฏิกิริยาที่มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนระหว่างชั้บสเตรต
2. ทรานส์เฟอเรส (Transferase)	เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมหรือ กลุ่มอะตอมจากตัวให้ (Donor) ไปยังตัวรับ (Acceptor)
3. ไฮโดรเลส (Hydrolase)	เร่งปฏิกิริยาการถลายพันธะเคมีในสารประกอบด้วยน้ำ
4. ไลอส (Lyases)	เร่งปฏิกิริยาการแยกโปรตอน (H^+) ของสารตั้งต้น ทำให้เกิดพันธะคูในผลิตภัณฑ์
5. ไอโซเมอเรส (Isomerase)	เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างจากไอโซเมอร์หนึ่ง เป็นอีกไอโซเมอร์หนึ่ง
6. ไลเกส (Lygases)	เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์หรือการสร้างพันธะชนิดต่างๆ ระหว่างโมเลกุล 2 โมเลกุล ด้วยการถลายพันธะไฟโรฟอสเพตในเอทีพี (ATP)

เอนไซม์มีหลายประเภท ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาใบໂອเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดเอนไซม์โดยอาศัยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (เอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเพต จึงขอกล่าวถึงคุณลักษณะของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในหัวข้อต่อไป

2.1.4 เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

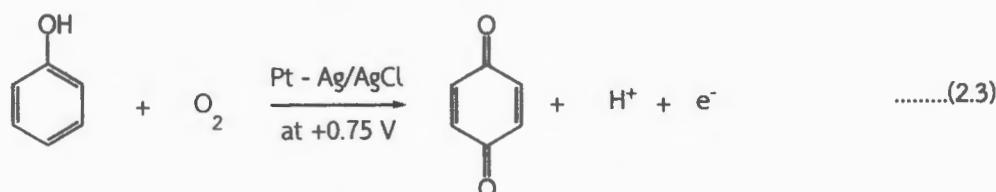
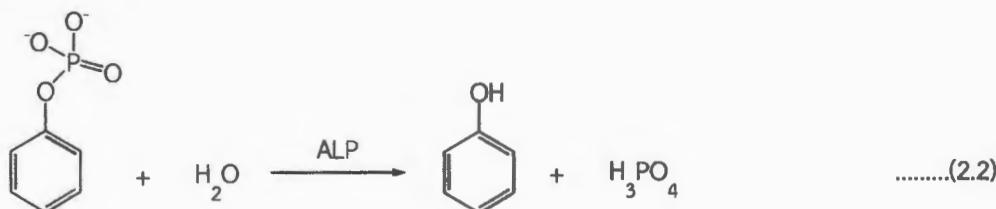
เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส¹⁷ (Alkaline phosphatase, ALP) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ตามเนื้อเยื่อตามร่างกายมนุษย์ โดยส่วนใหญ่จะพบตรงบริเวณกระดูก ตับ ไต และลำไส้เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโมเลกุล 2 ชนิด คือ Zn และ Mg ซึ่งไอออนนี้จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกันระหว่าง glutamine 320 และ tryptophan 109 ดังรูปที่ 2.11 และเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่ฟอสเพตจากโมเลกุลของสารหล่ายชนิด เช่น โปรตีน อัลคาโลย์ด และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น โดยเรียกกระบวนการดึงหมู่ฟอสเพตนี้ว่า ดีฟอสฟอเรลเลชัน (Dephosphorylation) สภาพความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่เหมาะสมที่สุดของการทำงานของเอนไซมน์นี้ คือ 8.0 ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคต่างๆ ซึ่งจะสัมพันธ์กับอวัยวะดังกล่าว โดยระดับปกติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะ

อยู่ที่อัตรา 25-100 IU/L หากความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่า 300 IU/L จะบ่งชี้การเกิดโรคที่ร้ายแรงได้ เช่น โรคตับ มะเร็งตับ ตับอักเสบ โรคกระดูก และมะเร็งไต เป็นต้น

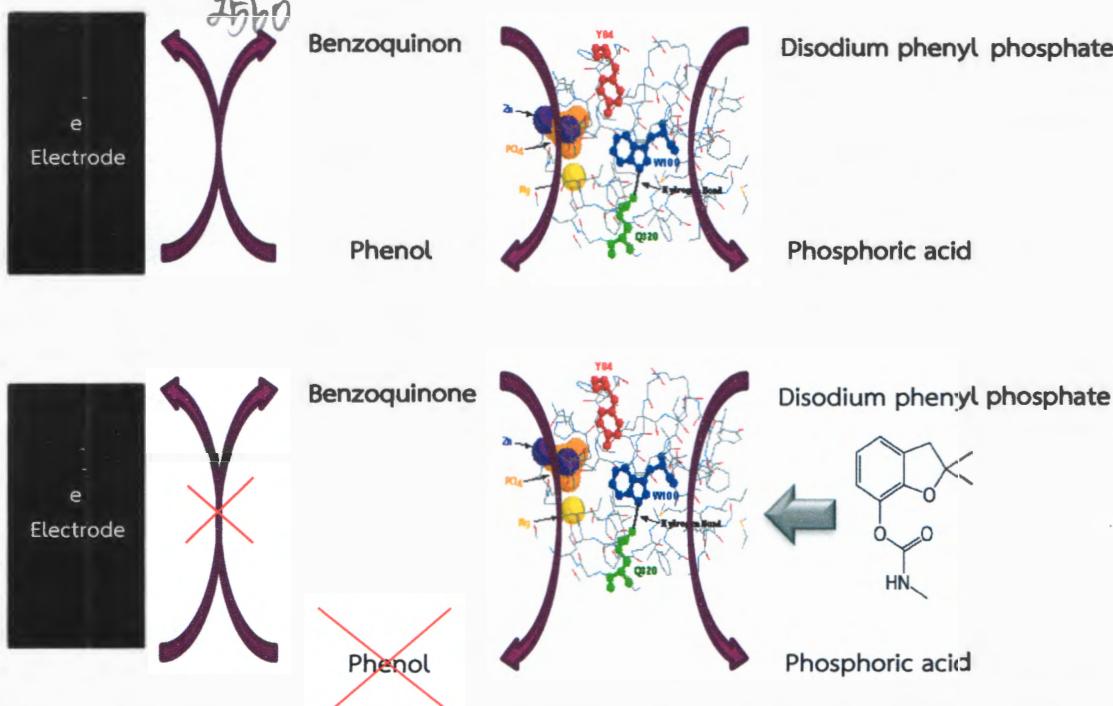


รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส¹⁸

งานวิจัยนี้อาศัยการเร่งปฏิกิริยาดีฟอสโฟเรเล็กซ์ของไดโซเดียมพินิลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เกิดผลิตภัณฑ์เป็นพีโนอลและกรดฟอสฟอริก ดังสมการที่ 2.2 ซึ่งพีโนอลที่เกิดขึ้นเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า เมื่อได้รับศักย์กระตุ้น ที่ +0.75 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอรอไรด์ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้ผลิตภัณฑ์เป็นเบโนโซคิวโนน (Benzoquinone) protoon และอิเล็กตรอน ดังสมการที่ 2.3³⁰



การเร่งปฏิกิริยาดีฟอสโฟเรเล็กซ์ของไดโซเดียมพินิลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์พีโนอลซึ่งเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า เมื่อให้ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมพีโนอลสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอิเล็กตรอนซึ่งเป็นสัญญาณทางไฟฟ้ามีผลให้สามารถตรวจปริมาณฟีโนอลได้ โดยกระแสที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณพีโนอล และปริมาณสารตั้งต้นตามหลักของปริมาณสารสัมพันธ์ ซึ่งอธิบายได้ด้วยแผนภาพ ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 หลักการทำงานของเอนไซม์อัลคลาไลน์ฟอสฟ่าเตสบนผิวน้ำแข็งไฟฟ้า (บบ) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยการโบฟูแรนทำให้พื้นออลมีปริมาณลดลง (ล่าง)

จากหลักการทำงานของเอนไซม์อัลคลาไลน์ฟอสฟ่าเตส จึงนำไปสู่การพัฒนาไปโอลเซนเซอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณการโบฟูแรน ซึ่งอาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ เอนไซม์อัลคลาไลน์ฟอสฟ่าเตสถูกยับยั้งการทำงานด้วยการโบฟูแรน ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาตีฟอสฟอเรเชนของไดโซเดียมฟีโนฟอสเฟตลดลงปริมาณพื้นออลจึงลดลงทำให้สัญญาณกระแสลดลงตามลำดับ ดังนั้นอาศัยหลักการนี้วิเคราะห์หาปริมาณการโบฟูแรนได้ การยับยั้งปฏิกิริยาตีฟอสฟอเรเชนของไดโซเดียมฟีโนฟอสเฟตด้วยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคลาไลน์ฟอสฟ่าเตส เกิดขึ้นจากอันตรกิริยะระหว่างการโบฟูแรนกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ในโครงสร้างของเอนไซม์อัลคลาไลน์ฟอสฟ่าเตส จึงส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพไป หรือ เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงาน

ในการพัฒนาไปโอลเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดการโบฟูแรน ทำการตั้งเอนไซม์อัลคลาไลน์ฟอสฟ่าเตสบนผิวน้ำแข็งไฟฟ้าcarbon electrode ด้วยวิธีการตั้งทางเคมีแบบเชื่อมไขว้โดยใช้ใบวินเซรัมอัลบูมิน กลีเซอรอล และสารละลายกลูตราล็อกตีไฮด์ ในการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์เข้าด้วยกันเพื่อช่วยเก็บเอนไซม์ไว้ที่ผิวน้ำแข็งมีประสีเหลือง ซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียของสารตั้งกล่าวในทัวร์อัลฟ์ไป

2.1.5 ใบวินเซรัมอัลบูมิน

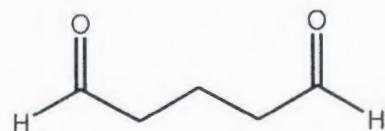
ใบวินเซรัมอัลบูมิน¹⁷ (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนที่นิยมใช้ในทางเชิงเคมีเนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ช่วยป้องกันการยึดเกาะของเอนไซม์กับบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ ช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ และป้องกันการเกาะตัวกันของเอนไซม์ ซึ่งใบวินเซรัมอัลบูมินนี้ จะช่วยให้เอนไซม์มีการกระจายตัวที่ดีขึ้น โครงสร้างของใบวินเซรัมอัลบูมินจะเป็นสายโปรตีนที่มี arachionic acid แทรกอยู่ 7 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของบีวีนเซรัมอัลบูมิน¹⁹

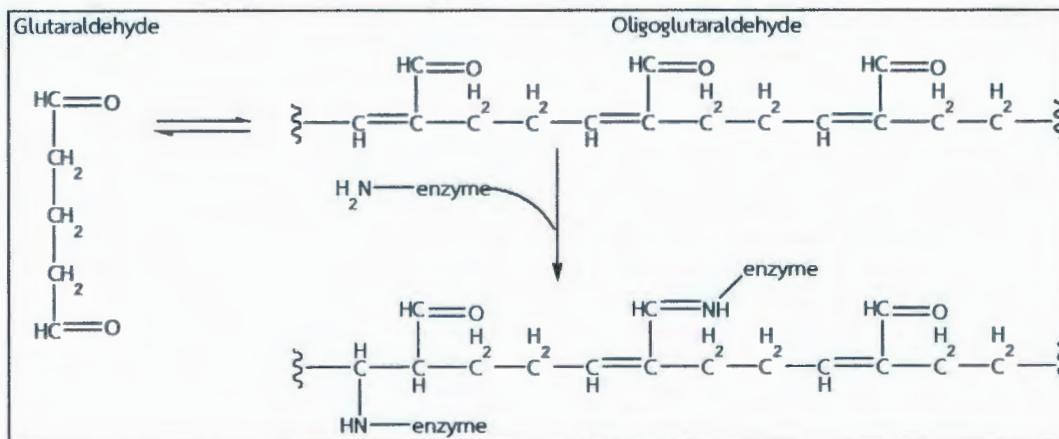
2.1.6 กลูตารัลดีไฮด์

กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) มีสูตรเคมี คือ $C_5H_8O_2$ เป็นอนุพันธ์หนึ่งของฟอร์มัลดีไฮด์ โครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 2.14 เป็นสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี มีกลิ่นฉุนรุนแรง นิยมใช้ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทางการแพทย์และทันตกรรม ใช้บำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรม และใช้เป็นสารกันบูด



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์

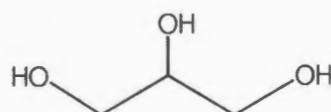
นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเกิดเป็นโครงร่างตาข่ายได้ โดยการสร้างพันธะโค瓦เลนต์ของหมู่อะมิโนในเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเต้กับกลูตารัลดีไฮด์ เกิดโครงร่างตาข่ายขนาดใหญ่ขึ้นมา ดังรูปที่ 2.15 ดังนั้นจึงนำกลูตารัลดีไฮด์มาใช้เพื่อเป็นสารเชื่อมไขว้ในการตรึงเอนไซม์เพิ่มการยึดติดของเอนไซม์บนผิวน้ำขึ้นเพื่อผลให้ใบโอเซนเซอร์มีอายุการใช้งานที่ยาวนานยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.15 การเชื่อมขวางของกลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์²⁰

2.1.7 กลีเซอรอล

กลีเซอรอล²¹ (Glycerol) มีสูตรเคมี คือ $C_3H_8O_3$ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโพลิออล (Polyol) เป็นสารที่เป็นของเหลว หนืด ใส ไม่มีสี ในโมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ ดังรูปที่ 2.16 จึงทำให้ละลายในน้ำได้ดี มีสมบัติในการรวมตัวกับน้ำได้ดี (Hydroscopic) นิยมนำมาใช้เป็นตัวเชื่อมประสานช่วยให้อ่อนไขม์ผสมเข้ากับสารอื่นได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของกลีเซอรอล

2.1.8 คาร์บอนเพส

คาร์บอนเพส²² (Carbon paste) นิยมใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เนื่องจากมีช่วงศักยไฟฟ้าที่กว้าง กระแสพื้นหลังต่ำ (Background current) ราคาถูก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารหลายชนิด ง่ายต่อการผสมกับสารหล่ายชนิดที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า องค์ประกอบที่สำคัญของคาร์บอนเพส มีดังนี้

1. ผงคาร์บอน (Carbon powder) ดังรูปที่ 2.17 เป็นองค์ประกอบหลักของการบอนเพสที่ใช้ทำเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

- 1.1 มีความบริสุทธิ์สูง
- 1.2 อนุภาคมีการกระจายตัวที่ดี
- 1.3 มีแรงดูดซับน้อย

2. ตัวเชื่อมประสาน (Binder) ได้แก่ สารจำพวกน้ำมัน (Oil) ทำหน้าที่เป็นตัวประสานให้ผงคาร์บอนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และทำหน้าที่ร่วมกับผงคาร์บอนเพื่อให้เกิดเป็นการบอนเพส ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

- 2.1 มีความเยื่อยและไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น
- 2.2 มีความหนืดสูง
- 2.3 ละลายในน้ำได้น้อย
- 2.4 ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

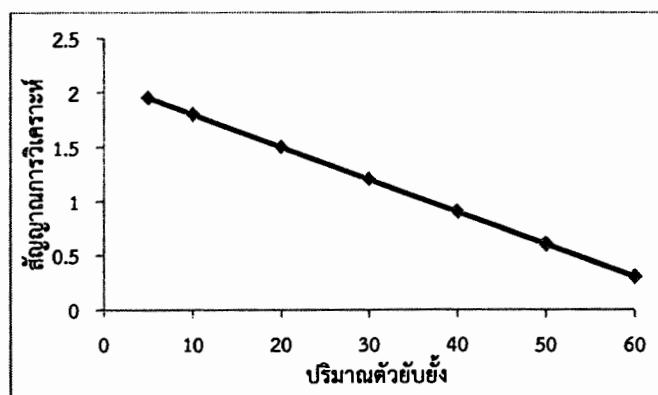


รูปที่ 2.17 ผงคาร์บอน²²

การวิเคราะห์คาร์บอนเพสจะอาศัยหลักการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทางอ้อม ดังรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม ในหัวข้อถัดไป

2.1.9 วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม

วิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม (Indirect method) เป็นวิธีการวิเคราะห์โดยการติดตามสัญญาณที่ลดลงสัมพันธ์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analyte) เมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณน้อยค่าสัญญาณจะลดลงมาก ในทางตรงข้ามเมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณมากค่าสัญญาณจะลดลงน้อย แสดงความสัมพันธ์ของสัญญาณกระแสงกับปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 2.18



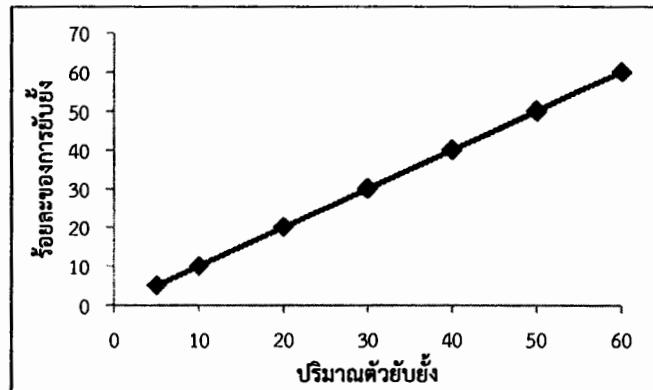
รูปที่ 2.18 กราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณการวิเคราะห์กับปริมาณตัวยับยั้ง¹⁷

นำผลของสัญญาณที่ได้มามาทำเป็นกราฟมาตรฐานเทียบ ในกรณีการวิเคราะห์ด้วยหลักการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ด้วยสารที่ต้องการวิเคราะห์ (ตัวยับยั้ง) ใช้ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง ดังสมการที่ 2.4

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{|I_0 - I|}{|I_0|} \right] \times 100 \quad \dots\dots\dots(2.4)$$

เมื่อ I_0 คือ กระแสที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของชั้บสเตรตด้วยเอนไซม์ (μA)
 I คือ กระแสที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง
 (μA)
 $\% \text{ Inhibition}$ คือ ร้อยละของการยับยั้ง

สามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งกับปริมาณตัวยับยั้ง ดังรูปที่ 2.19



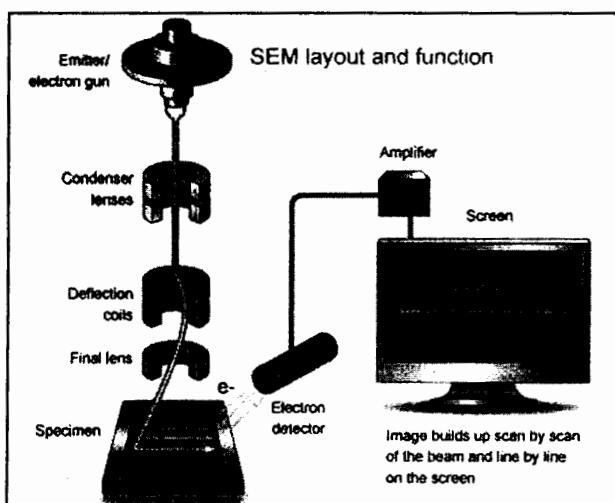
รูปที่ 2.19 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรับซึ้งกับปริมาณตัวบัญชี

งานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงข้าไฟฟ้าcarบอนเพสเพื่อสร้างเป็นใบโอเซนเชอร์วิเคราะห์ปริมาณcarบอน และประเมินการทำงานของใบโอเซนเชอร์ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ คือ เทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคไซคลิกโอลแทมเมทรี และเทคนิคโครงโนแอมเพอร์เมทรี แต่ละเทคนิคมีหลักการ ดังนี้

2.1.10 เทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เทคนิคนี้²³ อาศัยการไฟกัสสำหรับอิเล็กตรอนกราดลงบนผิวชิ้นงานสัญญาณที่เกิดขึ้นจากอันตรกิริยะระหว่างอิเล็กตรอนที่ตกรอบหัวกับผิวชิ้นงานจะถูกถ่ายทอดผ่าน ระบบตรวจวัดและอิเล็กตรอนิกส์ประยุบนำภาพคล้ายกับภาพที่เห็นทางจลโนทัศน์ สัญญาณที่ใช้ในการสร้างภาพมีหลายชนิด เช่น อิเล็กตรอนทุติยภูมิ, อิเล็กตรอนกระเจิงกลับ หรือรังสีเอกซ์ เป็นต้น แสดงองค์ประกอบของเครื่องมือ ดังรูปที่ 2.20 เทคนิคนี้สามารถใช้ศึกษา สัมฐานวิทยาของชิ้นงาน สภาพผิวของชิ้นงาน จุดกพร่องบริเวณใกล้ผิวชิ้นงาน โดยมีหลักการทำงาน ดังนี้

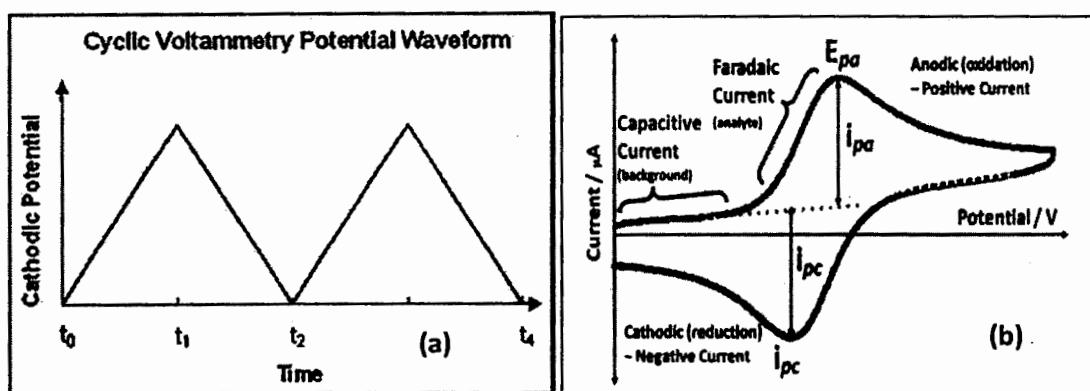
1. Electron gun ทำหน้าที่ผลิตกลุ่มอิเล็กตรอน
2. กลุ่มอิเล็กตรอนผ่าน condenser lenses กล้ายเป็นลำอิเล็กตรอน
3. ลำอิเล็กตรอนจะผ่าน objective lenses
4. ลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนผิวของชิ้นงาน เกิด secondary electron
5. สัญญาณจาก secondary electron ถูกแปลงไปเป็นสัญญาณประกายภาพบนจอรับภาพ (CRT)



รูปที่ 2.20 องค์ประกอบของเครื่องจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด²⁴

2.1.11 เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

ไซคลิกโวลแทมเมทรี¹² (Cyclic voltammetry) หรือโวลแทมเมทรีแบบรอบเป็นวิธีการสแกนศักย์ไฟฟ้าเชิงเส้นตรงแบบคลื่นรูปสามเหลี่ยม ดังรูปที่ 2.21 (a) ระบบประกอบไปด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) และขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode) ขั้วไฟฟ้าทั้งสามขั้วจุ่มอยู่ในสารละลายที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสารอิเล็กโทรไลต์ที่ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ใช้ในปริมาณที่มากเกินพอ การสแกนศักย์ของเทคนิคนี้ คือให้ศักย์กับระบบที่ใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานแบบบันดาลเด็กจุ่มในสารละลายที่ไม่มีการคนหรือการกวน ซึ่งสัญญาณกระแสตุ้นแบบสามเหลี่ยมนี้เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าสองค่า ค่าแรกเป็นการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าแบบเส้นตรงไปจนถึงจุดสูงสุด แล้วลดลงแบบเส้นตรงโดยมีความชันเท่ากับความชันในช่วงแรก

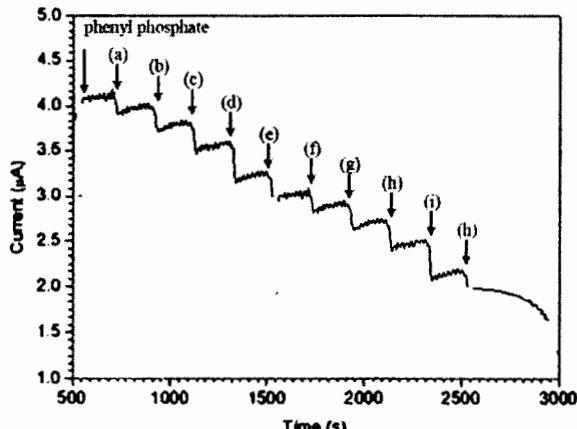


รูปที่ 2.21 รูปคลื่นของการสแกนศักย์ในเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี²⁵ (a) และสัญญาณกระแสสัมพันธ์กับศักย์ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าของไซคลิกโวลแทมเมทรี (b)

โวลแทมเมทรีแบบรอบเป็นการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้นกับศักย์ไฟฟ้า การตอบสนองที่อยู่ในรูปของการสแกนไปข้างหน้าและย้อนกลับ และการสแกนศักย์จากกลับไปบวก ดังรูปที่ 2.21 (b) เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการยืนยันนิติของสาร ซึ่งสามารถศึกษาได้จากเอกลักษณ์ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือดักชันที่ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นศักย์เฉพาะของสารนั้นๆ

2.1.12 เทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี

เทคนิคโครโนแอมเพอร์เมทรี (Chronoamperometry) เป็นเทคนิคที่ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าช่วย เป็นเทคนิคที่ศึกษาปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลติกของสารที่สนใจภายใต้สภาวะที่มีการคนสารละลาย ทำให้มีการขนส่งสารละลายใหม่ๆไปยังผิวน้ำขั้วไฟฟ้าโดยวิธีการภาพ เพื่อให้เกิดกระบวนการรีดอกซ์อย่างต่อเนื่อง โดยชั้นของการแพร่จะถูกกำจัดโดยชั้นแคบๆ หลักการทำงาน คือ ให้ศักย์ที่คงที่ระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือดักชันของสารตัวอย่างที่ผิวน้ำของขั้วไฟฟ้า และวัดสัญญาณกระแสที่ค่าความเข้มข้นต่างๆของสารตัวอย่าง ทำให้เทคนิคนี้มีข้อดี คือ มีความไวในการตรวจเคราะห์สูง เนื่องจากมีการขนส่งมวลสารภายในสภาวะไฮโดรไดนามิกเดิมมากขึ้น ทำให้สถานะคงตัวค่อนข้างเร็วและวัดสัญญาณกระแสได้แม่นยำสูง กระแสไฟฟ้าที่ได้จะขึ้นกับปริมาณสารที่เกิดปฏิกิริยา รีดอกซ์บนผิวน้ำของขั้วไฟฟ้าตามเวลา โดยกระแสจะเกิดที่บริเวณชั้นกระแสการแพร่ (Diffusion current) ดังรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับเวลา ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรมิตร²⁶

งานวิจัยนี้พัฒนาใบโอเชนเซอร์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารบีฟแวนในข้าวหอมมะลิ รายละเอียดคร่าวๆของข้าวหอมมะลิ ดังทัวข้อต่อไป

2.1.13 ข้าวหอมมะลิ

ข้าวหอมมะลิ¹ (*Thai Jasmine Rice*) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ ว่า *Oryz Sativa L.* เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยจัดเป็นข้าวนาปี ปลูกได้ เพียงปีละ 1 ครั้ง ลักษณะข้าวเปลือกเรียวยาว เมื่อสีเป็น ข้าวสาร จะได้ ข้าวเมล็ดเรียว ข้าว ขาวใสเป็นเงา แกร่ง มีห้อง ไข่น้อย มีกลิ่นหอมคล้าย ใบเตย เป็นพันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศและเป็นพันธุ์ข้าวที่สร้าง ชื่อเสียง ให้ข้าวไทยเป็นที่รู้จักทั่วโลก

แหล่งปลูกข้าวหอมมะลิที่สำคัญของไทย

ประเทศไทยถือเป็นแหล่งผลิตข้าวหอมมะลิที่มีคุณภาพดีที่สุดแห่งหนึ่ง โดยมีแหล่งเพาะปลูกสำคัญ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เขตทุ่งกุลรั้องให้) และมีพื้นที่เพาะปลูกครอบคลุมกว่า 19 ล้านไร่ทั่วประเทศไทย โดยมีแหล่งผลิตสำคัญ คือ จังหวัดสุรินทร์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ นครราชสีมา อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด รองลงมา คือภาคเหนือ เนื่องจากสภาพดินฟ้าอากาศและพื้นที่เพาะปลูกของทั้งสองภาคคล้ายคลึงกัน เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ กล่าวคือ สภาพพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ดอน ฝันจะเริ่มต้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ช่วงนาจะเริ่มห่อน้ำได้ ในเดือนมิถุนายน และเพาะปลูกอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม เมื่อฝนเริ่มตก ประมาณเดือนตุลาคมจนถึงต้นเดือนพฤษจิกายนจึงเริ่มเก็บเกี่ยวช่วงเดือนพฤษจิกายนความชื้นจะน้อย เพราะเป็นช่วงที่ลมหนาวจากเมืองจีน เริ่มพัดเข้ามาในสองภาคนี้ ทำให้อากาศแห้งเหมาะสมในการเก็บเกี่ยว การตาก การนวด ก็ทำได้ง่าย เพราะน้ำแห้งมากแล้ว ไม่มีฝน จึงทำให้ได้เมล็ดข้าวที่มีคุณภาพ

คุณสมบัติของข้าวหอมมะลิ

ข้าวหอมมะลิที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายคือพันธุ์ ข้าวดอกมะลิ 105 และ พันธุ์ กข. 15 ความหอมของข้าวหอมมะลิ เกิดจากสารระเหยชื่อ 2-acetyl-1-pyrone ซึ่งเป็นสารที่ระเหยหายไปได้ การรักษาความหอมของข้าวหอมที่ดีต้องเริ่มต้นแต่ การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาข้าวเปลือกการสีข้าว และ การเก็บรักษาข้าวที่สีเรียบร้อยแล้วการจะรักษาความหอมของข้าวเอาไว้ ต้องพยายามหลีกเลี่ยงสภาวะ แวดล้อมที่ร้อน อบอ้าว และมีความชื้นสูง การตากแดดหรือใกล้สถานที่ร้อนจัดเป็นเวลานานๆ เป็นสิ่งที่

ควรหลีกเลี่ยงอย่างยิ่งสภาวะที่เหมาะสมคือที่มีอุณหภูมิห้องเย็น มีการถ่ายเทของอากาศดี ความชื้นไม่สูง

ข้าวหอมใหม่ หมายถึงข้าวหอมที่เพิ่งเก็บเกี่ยวมาได้ลักษณะนี้ และมีการดูแลรักษาอย่างดี ก่อนที่จะนำมารับประโภค ข้าวหอมใหม่จะให้ความหอมของหุบต้ม ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากข้าวชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ข้าวหอมที่หุงแล้ว ยังมีลักษณะ นุ่มนวลเนียบ มีเยาง เกาะตัวกันพอสมควรมีรสชาตior่อย

ข้าวหอมที่เก็บไว้นานขึ้น (ข้าวเก่า) คือ ข้าวที่เก็บเกี่ยวมาแล้วเก็บไว้เป็นเวลานาน 5-6 เดือนขึ้นไป ความหอมจะเจือจากลง รวมทั้ง ความนุ่มนวลเนียวยลดลงด้วย เมื่อนำข้าวหอมนี้มาหุงจะต้องใช้ปริมาณน้ำมาก ขึ้นกว่าข้าวใหม่ ถึงแม้ความหอมจะลดน้อยลงไปแต่ยังคงมี รสชาตiorอยเหมือนเดิม ส่วนความนุ่มนวลนั้น แม้จะลดลงบ้างเมื่อเทียบกับข้าว-หอมใหม่ แต่ก็ไม่ร่วนแข็งกระด้างเหมือนข้าวชนิดอื่น ๆ

ดังนั้น ผู้วิจัยได้พัฒนาใบโไอเซนเซอร์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณสารใบฟูแรนที่ปนเปื้อนในข้าวหอมมะลิ ที่สุ่มเก็บมาจากตลาดในท้องถิ่น ได้แก่ ตลาดวารินเจริญศรี ตลาดแม่กิมเตียงและตลาดวาริน อำเภอวินชาราบ จังหวัดอุบลราชธานี ผู้วิจัยได้สร้างงานวิจัยนี้โดยทำการศึกษาค้นคว้างานวิจัยจากนักวิจัยหลายกลุ่มซึ่งได้รายงานไว้ในหัวข้อดังไป

2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษา พัฒนา และปรับปรุงจากการงานวิจัยหลายกลุ่ม ดังนี้

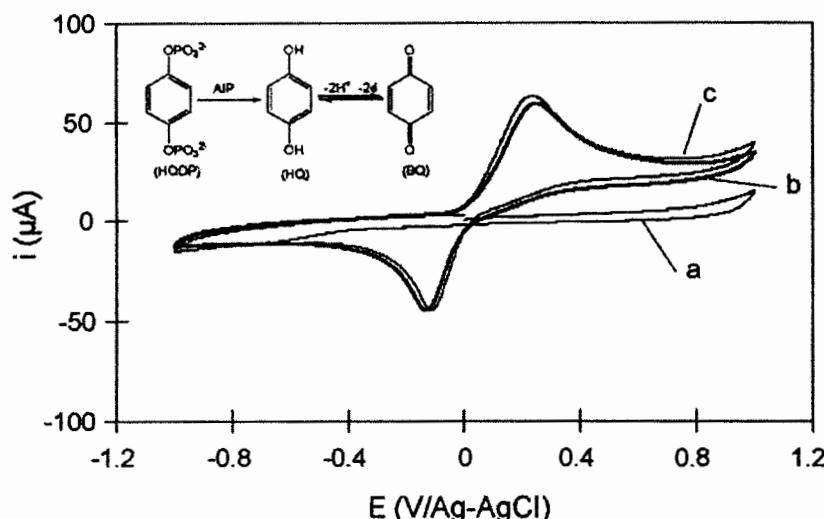
2.2.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาใบโไอเซนเซอร์

ในปี ค.ศ. 2004 F. Mazzei และคณะ²⁵ ศึกษาระบบทรวจวัดทางชีวไฟฟ้าเคมีสำหรับตรวจสารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟاتаз (Alkaline phosphatase, ALP) ด้วยสารกำจัดศัตรูพืชมาลาไฮอ่อน (Malathion) และ 2,4-ไดคลอโรฟีนออกซีอะซิติก แอซิด (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) ซึ่งเป็นสารจำพวกอุบัติภัยฟอสฟอรัสและอุบัติภัยคลอริเนต การเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟاتاز ศึกษาในสองส่วน คือ แอมเพอโรเมทริกอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสใบโไอเซนเซอร์ โดยใช้ 3-อินดอกอชิลฟอสเฟต (3-Indoxyl phosphate) เป็นสารตั้งต้น และอีกส่วนคือระบบโอลแทมเมทริ โดยใช้ฟีนิลฟอสเฟต (Phenyl phosphate, PP) และ แอสคอร์เบต-2-ฟอสเฟต (Ascorbate-2-phosphate, A-2-P) เป็นสารตั้งต้น ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ สารละลายไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มอลต่อลิตร pH 8.0 ระยะเวลาในการบ่มสาร 30 ถึง 60 นาที และได้ช่วงความเป็นกรดเป็นด่างของสารวิเคราะห์มาลาไฮอ่อน และ 2,4-D เท่ากับ 1.5 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.2 ถึง 45 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขึ้นจำกัดในการตรวจพบของมาลาไฮอ่อน และ 2,4-D เท่ากับ 0.5 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2008 G. Valdés-Ramírez และคณะ²⁶ พัฒนาแอมเพอโรเมทริกอะซิทิลโคลีน เอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) ใบโไอเซนเซอร์ สำหรับตรวจหาปริมาณ สารใบฟูแรน (Carbofuran), คาร์บาริล (Carbaryl), เมทิลพาราออกโซน (Methyl paraoxon) และไดคลอโรฟ (Dichlorvos) ในสารละลายฟอสฟेटบัฟเฟอร์ที่มีอีซิโตในไตรอล 5% ศึกษาใบโไอเซนเซอร์ที่ต่างกัน 3 ข้าว ใช้เอนไซม์ต่างชนิด คือ เอ็นไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส จากปลาไฟฟ้า จากการตัดแบ่งพันธุกรรม (B394) และจากแมลงวันทอง (Wild-type B1) และใช้โคบล็อกฟาราโนน (Cobalt(II))

phthalocyanine) เพื่อช่วยในการตีรังเอนไซม์โดยเกิดการเข้ามาร่วมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ และนำไปทดสอบการกำจัดศัตรูพิษทั้ง 4 ชนิด ผลการทดลองพบว่า ในโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรของการวิเคราะห์ การตีรังเอนไซม์มีความคงที่ สามารถเก็บไปโอเซนเซอร์ไว้ได้นาน ขึ้นจำกัดที่ตัวจำจัดได้ด้วย เอนไซม์ B394 พบ ไดคลาวอส 9.6×10^{-11} มอลต่อลิตร เมทิลพาราออกซอน 2.7×10^{-9} มอลต่อลิตร เอนไซม์ B1 พบ คาร์บอฟูแรน 4.5×10^{-9} มอลต่อลิตร และห้งเอนไซม์ B1 และเอนไซม์จากปลาไฟฟ้า พบ คาร์บาริล 1.6×10^{-7} มอลต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพิษที่เติมลงในตัวอย่างผลไม้แอปเปิลให้ผลการทดลองที่ดีสามารถใช้งานได้จริง

ในปี ค.ศ. 2008 C. Mousty และคณะ²⁷ พัฒนาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไปโอเซนเซอร์โดย ตีรังเอนไซม์แบบกายภาพ ใช้ไฮดรอกไซเด้เมทريคซ์ที่มีชั้นไฮดรอกไซด์ 2 ชั้น (Different layered double hydroxides, LDH) ที่เกิดจาก Zn_2Al-Cl และ Mg_2Al-CO_3 ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเมมเบรน ALP/LDH หาสภาวะของวิธีการตีรังเอนไซม์ การเข้ากันได้ของสาร และผลของสารละลายบัฟเฟอร์ ผลการทดลองพบว่าวัสดุขนาดนาโน MgAl-LDH ช่วยเพิ่มความเสถียรในการตีรังเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และใช้ 25 % กลูตารัลดีไฮด์ที่อิ่มตัวในการเข้มข้นไขว้สารชีวโมเลกุลเข้าด้วยกันการทำงานร่วมกันของการตีรัง LDH กับสารตั้งต้นไฮดรอกวิโนนไดฟอสเฟต (Hydroquinone diphosphate, HQDP) ให้การตอบสนองที่รวดเร็ว และมีศักย์กระตุ้นการทำงานของไปโอเซนเซอร์ ALP/MgAl-LDH ที่ 0.4 โวลต์ ดังรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.23 ปฏิกิริยาของ HQDP และไฮคลิกโวโลแรมโมแกรม²⁷ ของ (a) 1 mM HQDP, (b) 1 mM HQDP+ ALP และ (c) 1 mM HQ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.5 อัตราการสแกน 50 mV.s⁻¹

ในปี ค.ศ. 2010 งานวิจัยระดับปริญญาตรีของ นีรนุช สุพร²⁸ พัฒนาไปโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณการบีบอัดด้วยวิเคราะห์ทางอ้อม ตีรังและใช้ประโยชน์ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากการยับยั้งการทำงานด้วยการบีบอัด โดยตีรังเอนไซม์แบบเคมีบันผิวน้ำของคาร์บอนเพส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ได้ผลการทดลอง ดังนี้ ศักย์กระตุ้นสารตัวกลางทางไฟฟ้า +0.75 โวลต์ เพียงกับข้าไฟฟ้าอ้างอิง ชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ สภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ pH

7.5 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์บอฟูแรน 0.5 ถึง 3.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 4.0 ถึง 7.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ความไวของการตรวจวัด คือ -2.78 ร้อยละการยับยั้งลิตรต่อไมโครกรัม ขึ้นจำกัดในการตรวจพบของคาร์บอฟูแรน 0.53 ไมโครกรัมต่อลิตร และขึ้นจำกัดที่ตรวจวัดปริมาณได้ ของคาร์บอฟูแรน 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร

ในปี ก.ศ. 2010 E. Akyilmaz และคณะ²⁹ พัฒนาใบโอเซนเซอร์ตรวจวัดค่าเฟอิน อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยการตึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับสารเชื่อมไขว้กลูตารัลดีไฮด์บนข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทองที่ปรับปรุงผิวน้ำข้าวด้วยชั้นของซิสเทามีน (Cysteamine) ซึ่งค่าเฟอินจะไปยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขันใช้หลักการนี้ในการสร้างใบโอเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณค่าเฟอิน พบว่าสภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลายไกลชีนบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ 30 องศาเซลเซียส ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ค่าเฟอิน 0.1 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ ขึ้นจำกัดในการตรวจพบ 0.08 ไมโครโมลาร์

ในปี ก.ศ. 2011 งานวิจัยระดับปริญญาตรีของยุวันดา วงศ์¹⁷ พัฒนาใบเอนไซมาติกใบโอเซนเซอร์ตึงด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวน้ำข้าวไฟฟ้าcarbonเพส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณprotoและคาร์บอฟูแรน อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยprotoสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และคาร์บอฟูแรนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส วิเคราะห์หาปริมาณprotoและคาร์บอฟูแรนด้วยหลักการวิเคราะห์ทางอ้อม ประเมินการทำงานของใบเอนไซมาติกใบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณprotoในน้ำด้วยอย่างที่มีการเติมproto 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารตัวอย่างมาตรฐานที่มีการรับรองจากสถาบันวิจัยแห่งชาติประเทศไทย (สารตัวอย่างปลาฉลามหู, DORM-2) ที่รับรองปริมาณproto 4.64 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการวิเคราะห์ตรวจพบปริมาณprotoที่ 2.17 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.29 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างพริกชี้ฟู และพริกขาว จากตลาดสดท้องถิ่น อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี ผลการวิเคราะห์ตรวจพบปริมาณคาร์บอฟูแรนที่ 5.55 ± 0.07 และ 5.52 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และประเมินการทำงานเทียบกับเทคนิคมาตรฐานยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรเมทร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรน เมื่อเปรียบเทียบทางสกิดพบร่วมกับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสามารถนำไปเอนไซมาติกใบโอเซนเซอร์นี้ไปตรวจวัดในตัวอย่างจริงได้

ในปี ก.ศ. 2011 S. B. Adelaju และคณะ³⁰ ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ใบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) และกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde, GLA) ในชั้นของการเชื่อมไขว้ตึงสารเพียร์น นิวคลีโอไฮด์ ฟอสฟอร์เจส (Purine nucleoside phosphorylase, PNP) กับสารแทนที่นออกซิเดส (Xanthine oxidase, XOD) เพื่อพัฒนาเป็นโพแทนซิโเมทริกฟอสเฟตใบโอเซนเซอร์ ซึ่งจะแบ่งเป็นชั้นภายใน คือ ชั้นของ BSA-GLA และชั้นภายนอก คือ ชั้นของ BSA-GLA-PNP-XOD โดยการรวมกันของชั้น BSA-GLA จะช่วยเพิ่มการยึดเกาะของชั้น BSA-GLA-PNP-XOD ได้ดี ส่งผลให้เพิ่มความเสถียรให้แก่ฟอสเฟตใบโอเซนเซอร์ได้ดียิ่งขึ้น เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า การตึงเอนไซม์ในชั้นนอกจะใช้ กลูตารัลดีไฮด์ ร้อยละ 4.5 โดยปริมาตร ใบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 6.8 โดย

มวลต่อปริมาตร อัตราส่วนแซนท์นออกซิเดสต่อเพียรีน นิวคลีโอไฮด์ พอสฟอรีเลส เท่ากับ 1:8 และระยะเวลาที่ฟิล์มแห้ง 30 นาที สารละลายนีตรีส-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ฟอสเฟต 40 ถึง 120 ไมโครโมลต่อลิตร ขึ้นจำกัดในการตรวจพบของฟอสเฟต 20 ไมโครโมลต่อลิตร และใบโอเซนเซอร์มีความเสถียร 21 วัน

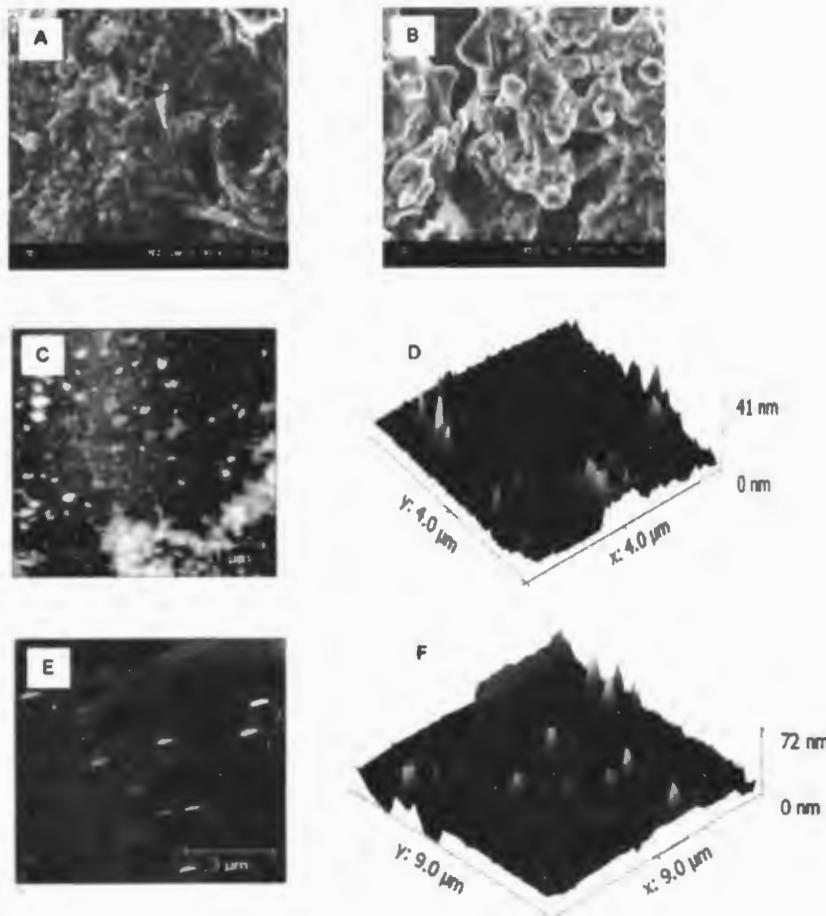
ในปี ค.ศ. 2012 X. Sun และคณะ² พัฒนาแอมเพอโรเมทริกอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรน โดยการตรึงเยื่อหلامชั้นของทองคริสตัลขนาดนาโน (Gold nanocrystals, DpAu) และ 4-4'-ไดโอดิสเบนเซนีไทออล (4,40-Thiobisbenzenethiol, DMDPSE) ลงบนชิ้นไฟฟ้าทองเพื่อสร้างแอมเพอโรเมทริกอิมมูโนเซนเซอร์ วิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแอมเมทรี (Cyclic voltammetry, CV) และเทคนิคการวัดความต้านทานเชิงช้อนทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) ศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนระหว่างแอนติكار์โบฟูแรน โนโนโคลอนอล แอนติบอดี กับคาร์โบฟูแรน ด้วยเทคนิคดิฟเฟอร์เรนเชียลพัลส์โวลแอมเมทรี (Differential pulse voltammetry, DPV) และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 0.1×10^6 ถึง 1.0×10^6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นจำกัดในการตรวจพบ 0.06 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อิมมูโนเซนเซอร์นี้มีช่วงการวิเคราะห์กว้าง แม่นยำ เสถียร จำเพาะเจาะจงกับสารและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อนำมาตรวจวัดในสารตัวอย่างผักกาดหอม กะหล่ำปลี พริกเขียว มะเขือเทศ กระเทียมจีน และสตรอเบอร์รี่ พบร้อยละการได้กลับคืน ร้อยละ 82.0 -109.2 แสดงให้เห็นว่าอิมมูโนเซนเซอร์นี้สามารถนำไปใช้งานได้จริงในการตรวจหาปริมาณคาร์โบฟูแรนในพืช ผัก ผลไม้

ในปี ค.ศ. 2013 A. Samphao และคณะ²⁶ พัฒนาแอมป์โรเมทริกใบโอเซนเซอร์เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณคาร์โบฟูแรนด้วยการวิเคราะห์ทางอ้อม อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการใบฟูแรนจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ตึงอยู่บนผิวน้ำชิ้นไฟฟ้าcarbon แพส เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ เทคนิคโคนโนแอมเพอโรเมทรี ผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ ศักย์กระแสตุ้น $+0.75$ โวลต์เทียบกับชิ้นไฟฟ้าอ้างอิง ชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ สารละลายนีตรีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มิลต่อลิตร pH 8.5 พบร้อยละความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรน 10 ถึง 97 ไมโครกรัมต่อลิตร ขึ้นจำกัดในการตรวจพบ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเที่ยงของการวิเคราะห์ ร้อยละ 2.3 ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ทดลอง 3 ครั้ง) และมีความเที่ยงของใบโอเซนเซอร์ ร้อยละ 3.4 (3 ชิ้น)

ในปี ค.ศ. 2013 Q. Zhou และคณะ³¹ พัฒนาแอมเพอโรเมทริกอะซิทิลโคเลินเอสเทอร์เรส (AChE) ใบโอเซนเซอร์ โดยใช้ออนุภาคทินไดออกไซด์ขนาดนาโน (SnO_2 NPs), คาร์บอฟิลิกกราฟีน (Carboxylicgraphene, CGR) และ เนฟิออน (Nafion, NF) ปรับปรุงบนชิ้นไฟฟ้าแกลสเซียร์บอน (GCE) เพื่อทำการตรวจวัด เมทิลพาราไธออล (Methyl parathion) และ คาร์โบฟูแรน (Carbofuran) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เตรียมด้วยเทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) เทคนิคเอกซิเรย์ดิฟแฟร์กชัน (X-ray diffraction, XRD) และเทคนิคฟูเรียร์傅รานส์ฟอร์ม อินฟราเรดスペกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) และศึกษาผลของการทำงานของเอนไซม์โดยมีอะซิทิลไอกโคลีน คลอไรด์ (ATCl) เป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์คือ สารละลายนีตรีอะซิทิลไอกโคลีน คลอไรด์ pH 7.4 สารละลายนีตรีฟอสเฟต

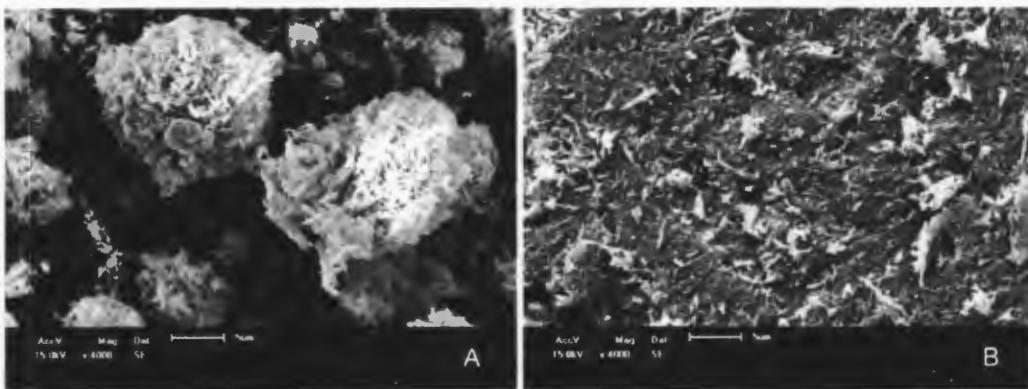
บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร pH 7.4 และได้ช่วงความเป็นกรดด่างของการวิเคราะห์เมทิลพารา ไ tho อล 10^{-13} ถึง 10^{-10} มิลลิลิตร และ 10^{-10} ถึง 10^{-8} มิลลิลิตร และช่วงความเป็นกรดด่างของการวิเคราะห์การโบฟูแรน 10^{-12} ถึง 10^{-10} มิลลิลิตร และ 10^{-10} ถึง 10^{-8} มิลลิลิตร ซึ่งจำกัดในการตรวจพบของ เมทิลพาราไ tho อล 5×10^{-14} มิลลิลิตร และ การโบฟูแรน 5×10^{-13} มิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2014 T. Jeyapragasam และคณะ⁵ พัฒนาสแกร์เวฟโวลแทนเนทริกไปโอเซนเชอร์ความไวสูงสำหรับตรวจวัดปริมาณการโบฟูแรน โดยปรับปรุงผิวนาน้ำข้าวไฟฟ้าแกลสซีคาร์บอนด้วยการตึงเอนไซม์อะซิทิลโคเลินเอสเทอเรส (AChE) บนพิล์มไอرونออกไซด์-ไคโตซานขนาดนาโน (AChE/Fe₃O₄-CH/GCE) พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เตรียมด้วยเทคนิคฟูเรียร์ ทرانส์ฟอร์ม อินฟราเรด เปกโตรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) และวิเคราะห์การตึงเอนไซม์บนพิล์มด้วยเทคนิคความต้านทานเชิงชั้นทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) เทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องกล้อง (Scanning electron microscopy, SEM) และกล้องจุลทรรศน์แบบแรงดึงดูด (Atomic force microscope, AFM) ศึกษาการยับยังการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคเลินเอสเทอเรสด้วยการโบฟูแรน โดยมีอะซิทิลไธโอดีโอลีน คลอไรด์ (ATCl) เป็นสารตั้งต้นผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ตึงลงบนพิล์มไอرونออกไซด์-ไคโตซานขนาดนาโนมีการปักคุณภาพของแผ่นพิล์มโดยสังเกตจากการของเทคนิค SEM และ AFM ดังรูปที่ 2.27 ผลการศึกษาจาก AFM ของ Fe₃O₄-CH (C) 2D, (D) 3D และ AChE/ Fe₃O₄-CH (E) 2D, (F) 3D เมื่อนำไปโอเซนเชอร์มาวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ ความเข้มข้นของอะซิทิลไธโอดีโอลีน คลอไรด์ 1.0×10^{-3} มิลลิลิตร ความเข้มข้นของการโบฟูแรน 1.0×10^{-5} มิลลิลิตร ระยะเวลาในการบ่มตัวยับยังใช้เวลา 15 นาที ได้ช่วงความเป็นกรดด่างของการวิเคราะห์การโบฟูแรน 5.0×10^{-9} ถึง 9.0×10^{-8} มิลลิลิตร ซึ่งจำกัดในการตรวจพบ 3.6×10^{-9} มิลลิลิตร และนำไปโอเซนเชอร์ไปตรวจวัดหาปริมาณการโบฟูแรนในตัวอย่างพบว่ามีร้อยละการได้กลับคืน ร้อยละ 96 ถึง 97 และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐานโครม่าโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าไปโอเซนเชอร์นี้สามารถนำไปใช้วัดปริมาณการโบฟูแรนในตัวอย่างได้จริง



รูปที่ 2.24 ภาพถ่าย SEM ของ (A) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CH}$ และ (B) $\text{AChE}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CH}^5$

ในปี ก.ศ. 2015 G. F. Grawe และคณะ³² พัฒนาใบโอเซนเซอร์ โดยการตีง Isolated endophytic fungus *Eupenicillium shearii* FREI-39 esterase บน Halloysite nanotubes (HNTs) ด้วยวิธีการคุณตัดขับทางกายภาพ และใช้ผงกราไฟต์ คาร์บอนนาโนทิวบ์ผนังหลายชั้น และมีเนื้อร่องรอยอย่างรับตรวจหาปริมาณสารใบฟูแรน โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ผ่านวิธีสแกว์เวฟโอลแทม เมทรี (SWV) ผลการทดลองการคุณตัดขับของเอนไซม์บน Halloysite nanotubes ดังรูปที่ 2.28 ภาพถ่าย SEM ของ HNTs และ endophytic extract ตีงบน HNTs ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ ปริมาณเอนไซม์ 0.5 ยูนิต ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กับตัวยับยั้งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 นาที ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ค่าใบฟูแรน 5.0 ถึง 100.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดในการตรวจพบ 1.69 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดที่ตรวจปริมาณได้ 5.13 ไมโครกรัมต่อลิตร และร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง ร้อยละ 103.8 ± 6.7 ถึงร้อยละ 106.7 ± 9.7 ความเสถียรของใบโอเซนเซอร์ 20 สัปดาห์ เมื่อนำไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนานี้ไปตรวจสารใบฟูแรนในตัวอย่างน้ำเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ด้านสถิติค่าที่ (*t*-test)



รูปที่ 2.25 ภาพถ่าย SEM ของ (A) HNTs และ (B) endophytic extract ตรึงบน HNTs³²

2.2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสกัดสารใบพูแรนจากสารตัวอย่าง

ในปี ค.ศ. 2005 J. F. Huertas-Pérez และคณะ³³ วิเคราะห์ปริมาณสารใบพูแรนในตัวอย่างผักกาดหอมด้วยเทคนิค Flow-injection chemiluminescence ทำการสกัดสารสารใบพูแรนโดยซึ่งตัวอย่างผักกาดหอมมา 20 กรัม หลังจากนั้นติดสารใบพูแรนที่ทราบความเข้มข้น (2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทึ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหันตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (Ethyl acetate) 35 มิลลิลิตร และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลไฟต์ (anh. Na₂SO₄) 30 กรัม แล้วนำสารที่ได้ไปกรองโดยใช้ตัวกรองสูญญากาศ (Vacuum) โดยใช้เอทิลอะซีเตทปริมาตร 15 มิลลิลิตร ล้างกระดาษกรองและขูดรูปซึ่งพู หลังจากนั้นกำจัดตัวทำละลายโดยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ให้เหลือปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทิลอะซีเตทปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำสารที่ได้ไปผ่านตัวกรองอะลูมีน่า (Alumina cartridge, มีอะลูมีน่า 1.5 กรัม) ชะตัวยเมทานอล 3 มิลลิลิตร และน้ำ 3 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen stream) จนกว่าแห้ง ได้ซึ่งความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์สารใบพูแรน 0.06 ถึง 0.5 มิโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขึ้นจำกัดในการตรวจพบ 0.02 มิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2012 X. Sun และคณะ³⁴ พัฒนาแอมเพอร์โรมทริกอิมมูโนเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณสารใบพูแรนในกะหล่ำปลี โดยใช้ออนุภาคทองขนาดนาโน (AuNPs) แมกเนติก (Fe_3O_4) ห่อสารบอนผนังหลายชั้น (FCNTs) และไคลโตกาน (CS) ได้เป็นอนุภาค AuNPs/CS- Fe_3O_4 -FCNTs สร้างขึ้นเป็นแผ่นพิล์มด้วยใบวินเชร์มอลบูมิน (BSA) และปรับปรุงผิวน้ำขึ้นไฟฟ้าแกลสซีคาร์บอน สกัดสารใบพูแรนจากกะหล่ำปลี โดยเริ่มต้นจากล้างด้วยน้ำปราศจากไออกอน 3 ครั้ง แล้วพ่นสารใบพูแรนความเข้มข้นต่างๆ ลงบนผิwtตัวอย่าง ทึ้งไว้ 24 ชม. หลังจากนั้นเอาราดตัวอย่างมา 10 กรัม หันให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 85 โดยปริมาตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในสารละลายนอกสเปตบัฟเฟอร์โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที แล้วเอาออกมายกสารปั่นให้เยิ่งเป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็ว 6000 rpm และเก็บส่วนของของเหลวใบวิเคราะห์ ได้ซึ่งความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์สารใบพูแรน 1 ถึง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.1 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีขีดจำกัดในการตรวจพบ 0.032 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาในสารตัวอย่าง พบร้อยละการได้กลับคืนถึงร้อยละ 90.7 ถึง ร้อยละ 110.4 และพบว่าแอมเพอร์โรมทริกอิมมูโนเซ็นเซอร์นี้ มีความเที่ยงสูง ความไวในการตรวจวัดสูง และมีความเสถียร สามารถนำไปใช้ดัดปริมาณสารใบพูแรนในตัวอย่างจริงได้

ในปี ค.ศ. 2012 งานวิจัยระดับปริญญาโทของสุภาพร บังพรม³⁵ ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดแมลงcarbofiphenylด้วยเทคนิควัดสีในพريกช์หนูสด 10 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจากพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ กับปฏิกิริยาไดอะโซไทด์เช่นของสารcarbofiphenylกับสารพาราในไตรองนิลีน (*p*-nitroaniline, PNA) ภายใต้สภาวะเบส ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีไวน์แดงที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารcarbofiphenyl คือ การcarbofiphenyl 3.12 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายน้ำเดี่ยมไฮดรอกไซด์ 6.3 กรัมต่อลิตร สารละลายน้ำในไตรองนิลีน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายน้ำเดี่ยมในไตร็ต 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใน 25 มิลลิลิตร) สภาพความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 11.8 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์carbofiphenyl 0.5 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดในการตรวจพบ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดที่ตรวจวัดปริมาณได้ 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารcarbofiphenylในพريกช์หนูสด 10 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิควัดสีเพ办法การปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 4.99 ถึง 10.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาและทดลองที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยมีการใช้ อุปกรณ์ เครื่องมือวิเคราะห์ สารเคมี และวิธีการทดลอง ดังนี้

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ประกอบ และวัสดุเครื่องแก้ว งานวิจัยนี้ได้มีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ อุปกรณ์ประกอบ และวัสดุเครื่องแก้ว ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ประกอบที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	เครื่องมือ	บริษัท (รุ่น)
1.	AUTOLAB (Potentiostat)	Methrohm (PG12)
2.	Counter electrode : Pt	CH-Instrument
3.	Hot plate	VELP SCIENTIFICA
4.	Magnetic stirrer	Methrohm
5.	pH meter	EUTECH INSTRUMENTS pH501
6.	Reference electrode : Ag/AgCl	CH-Instrument
7.	Vertex	Labnet
8.	Homogenizer	IKA (RW20)
9.	Rotary evaporator	BUCHI

3.1.2 วัสดุเครื่องแก้ว

วัสดุเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและสังเคราะห์สาร ดังตารางที่ 3.2 และวัสดุสำหรับ ประกอบข้าไฟฟ้าเพื่อเตรียมเป็นใบโอเซนเซอร์ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 วัสดุเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและสังเคราะห์สาร

ลำดับที่	วัสดุเครื่องแก้ว	ขนาด
1.	บีกเกอร์ (Beaker)	50 100 และ 1000 mL
2.	ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	5 10 20 25 50 100 250 และ 500 mL
3.	ช้อนตักสาร (Spatula)	-
4.	ขวดน้ำประปาจากไอโอน (Bottles deionized water)	-
5.	แท่งแม่เหล็กคันสาร (Magnetic bar)	1 cm
6.	ไมโครปิเพต (Micropipette)	10-100 μ L และ 100-1000 μ L
7.	ขวดเก็บสารสีชา (Bottle ember)	50 และ 100 mL
8.	ขวดเก็บสาร (Bottle clear)	500 mL
9.	กระบอกตวงสาร (Cylinder)	25 และ 100 mL
10.	แท่งแก้วคันสาร (Stirring rod)	-
11.	ขวดรูปชามพู่ (Erlenmeyer flask)	250 mL
12.	กระจานาฬิกา (Watch glass)	-
13.	ปิเพต (Pipette)	5 10 และ 20 mL
14.	กรวยแยก (Separatory funnel)	250 mL
15.	ขวดก้นกลม (Round bottom flask)	250 mL

3.2 สารเคมี งานวิจัยนี้ใช้สารเคมี มีเกรดความบริสุทธิ์และสั่งซื้อมาจากหอการค้าบริษัท ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	รายการ	ระดับความบริสุทธิ์	บริษัทที่ผลิต
1.	น้ำมันแร่ (Mineral oil)	AR grade	Acros
2.	อะซิโตไนโตรล (Acetonitrile)	AR grade	Analar
3.	헥แซน (Hexane)	AR grade	Analar
4.	ฟีโนล (Phenol)	ACS-For analysis	CARLO ERBA
5.	กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)	37.0 %	CARLO ERBA
6.	โมโนโซเดียมไดไฮดรอเจนฟอสเฟต (Monosodium dihydrogen phosphate)	AR grade	CARLO ERBA
7.	คาร์บอยูราน (Carbofuran)	99.0 %	Chem service

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ลำดับที่	รายการ	ระดับความบริสุทธิ์	บริษัทที่ผลิต
8.	ไบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)	98.0 %	Merck
9.	ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต (Disodium phenyl phosphate)	AR grade	Sigma Aldrich
10.	เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Enzyme alkaline phosphatase)	AR grade	Sigma Aldrich
11.	กลีเซอรอล (Glycerol)	AR grade	Sigma Aldrich
12.	กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	25.0 %	Sigma Aldrich
13.	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate)	99.0%	Sigma Aldrich
14.	ผงคาร์บอน (Carbon nanopowder)	99.9 %	Sigma Aldrich

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

3.3.1 เตรียมสารละลาย โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 มोลาร์ ($0.1 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่งโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 3.45xx กรัม ละลายด้วยน้ำประศากล้วอนและปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อวันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.2 เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 มोลาร์ ($0.1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ซึ่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไฮปต์ไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 6.70xx กรัม ละลายด้วยน้ำประศากล้วอนและปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อวันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.3 เตรียมสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือหบุนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 (Phosphate buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสม 0.1 มोลาร์ สารละลายโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (การเตรียม 3.3.1) กับ 0.1 มोลาร์ สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น ปริมาตร 85 มิลลิลิตร (การเตรียม 3.3.2) จากนั้นตรวจสอบ pH ของสารละลายด้วยเครื่องวัด pH เมื่อไดสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.8 เก็บสารละลายที่ได้ในขวดเก็บสาร ติดฉลาก ระบุชื่อ วันเดือนปีที่เตรียม รอการใช้งานต่อไป

3.3.4 เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (10 %w/v $C_6H_5PO_4Na_2$) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ซึ่งไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตไดไฮเดรต ($C_6H_5PO_4Na_2 \cdot 2H_2O$) $2.330x$ กรัม ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และปรับปริมาตรจนครบ 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสารติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ($100 mg.L^{-1} C_{12}H_{15}NO_3$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ซึ่งคาร์โบฟูแรน ($C_{12}H_{15}NO_3$) $0.005x$ กรัม ละลายด้วยอะซิโตไนโตรล 226 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.6 เตรียมสารละลายกลูตราล็อกดีไฮด์ เข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร (2.5 %v/v $OHC(CH_2)_3CHO$) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปีเปต 25 % โดยปริมาตร กลูตราล็อกดีไฮด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำประจากไอออนจนครบ 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.7 เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส $2 KU.mL^{-1}$

ปีเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 (การเตรียม 3.3.3) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงในเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส (P6772-2KU) ซึ่งมีลักษณะเป็นผง หลังจากนั้น ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส $2 KU.mL^{-1}$ ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.8 เตรียมสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส

ซึ่งโบวีนเซรัมอัลบูมิน $0.04xx$ กรัม ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 (การเตรียม 3.3.3) ปริมาตร 420 ไมโครลิตร ลงในขวดเตรียมสารขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปีเปตสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส $2 KU.mL^{-1}$ (การเตรียม 3.3.7) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 30 นาที ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม และเก็บไว้ในตู้เย็น

3.3.9 เตรียมสารละลายฟีโนล เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ($1000 mg.L^{-1}$) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ซึ่งฟีโนล (Phenol) $0.025x$ กรัม ละลายด้วยน้ำประจากไอออนและปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดเก็บสาร ติดฉลากระบุชื่อ วันเดือนปี ที่ทำการเตรียม

3.3.10 เตรียมสารเอกเซนที่อิ่มตัวด้วยสารอะซิโตในไตรล์

นำสารอะซิโตในไตรล์ใส่ในกรวยแยกและค่อยเติมสารเอกเซนลงในสารอะซิโตในไตรล์ เขย่าจนเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน นำชั้นสารอะซิโตในไตรล์มาใช้ในการสกัดสาร

3.3.11 เตรียมสารอะซิโตในไตรล์ที่อิ่มตัวด้วยสารเอกเซน

นำสารเอกเซนใส่ในกรวยแยกและค่อยเติมสารอะซิโตในไตรล์ลงในสารเอกเซน เขย่าจนเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน นำชั้นเอกเซนมาใช้ในการสกัดสารต่อไป

3.4 การสกัดสารใบพูแรนจากข้าวห้อมมะลิ³⁷

1. ซึ่งตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ 20.xx กรัม
2. เติมเอกเซนที่อิ่มตัวด้วยสารละลายอะซิโตในไตรล์ปริมาตร 80 มิลลิลิตร (การเตรียม 3.3.10)
3. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่องผสมสารความเร็วสูง (Homoginizer) ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที นาน 5 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
4. เก็บสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ใส่ในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะซิโตในไตรล์ที่อิ่มตัวเอกเซน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดสารด้วยกรวยแยกขนาด 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น เก็บสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของสารละลายอะซิโตในไตรล์กรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (สกัด 2 ครั้ง) (การเตรียม 3.3.11)
5. นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในชุดกันกลมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยหมด
6. ละลายสารที่เหลืออยู่ด้วยสารละลายอะซิโตในไตรล์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตร

3.5 การเตรียมข้าวไฟฟ้าใช้งาน

3.5.1 การเตรียมคาร์บอนเพส

1. ซึ่งผงคาร์บอน ปริมาณ 0.70xx กรัม
2. เติมน้ำมันแร่ ปริมาณ 0.30xx กรัม ผสมให้เข้ากัน กวนจนเป็นเนื้อเดียวกันจนเพส
3. เก็บเพสในโถดูความชื้น

3.5.2 การเตรียมข้าวไฟฟ้าคาร์บอนเพส

1. ตัดสายไฟยาว 12 เซนติเมตร เอาจำนวนของสายไฟด้านปลายทั้งสองด้านออก 1.0 เซนติเมตร ขัดสารที่เคลือบผิวทองแดงออกด้วยกระดาษรายละเอียดและบัดกรีติดกับแผ่นทองแดงเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร
2. ตัดแท่งเทफลอนยาว 11.5 เซนติเมตร เจาะรูกลวงภายในเพื่อให้สวมสายไฟได้ และคว้านส่วนบนให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ลึก 0.5 เซนติเมตร
3. สวมสายไฟ (เตรียมจากข้อ 1) เข้าในแท่งเทฟลอนในส่วนบนและอัดกาวโพลิเมอร์บริเวณด้านล่างของแท่งเทฟลอนเพื่อยึด牢固ทางตรงกับแท่งเทฟลอนให้แน่น รอการแห้ง

4. อัดかるบอนเพสที่เตรียมได้ (จากข้อ 3.5.1) ลงในผิวน้ำข้าไฟฟ้าที่เตรียมได้ให้เต็มและแน่นแล้ว จากนั้นใช้แผ่นเทฟลอนขัดผิวน้ำかるบอนเพสให้เรียบและสม่ำเสมอ (ภาคผนวก หมวด ก-1 รูปที่ ก-1.1 ถึง ก-1.4)

3.6 การเตรียมใบโอเซนเซอร์

ตึงสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสบนผิวน้ำかるบอนเพส

1. ปีเปตสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (การเตรียม 3.3.8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวน้ำかるบอนเพส และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2. ครัวข้าไฟฟ้าที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในชุดแก้วขนาดเล็ก บรรจุสาร 5 มิลลิลิตร ละลายกลูตารัคตีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที (ภาคผนวก หมวด ก-1 รูปที่ ก-1.5 ถึง ก-1.6)

3. เมื่อครบกำหนดเวลา นำข้าไฟฟ้าออกจากการขัดของสารละลาย และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ใบโอเซนเซอร์ที่ต้องการ

3.7 วิธีการทดลอง

3.7.1 พิสูจน์เอกสารชี้ว่าทางไฟฟ้าของข้าไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

1. เตรียมข้าไฟฟ้าかるบอนเพส

2. ประกอบเซลล์ข้าไฟฟ้าทั้งสาม: ข้าไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ และข้าไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (ภาคการประกอบข้าไฟฟ้าและเครื่องมือ ที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-2.1 และ ก-2.2) เลือกโปรแกรมเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

3. ปีเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายและจุ่มข้าไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์นั้น

4. ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -1.0 โวลต์ ถึง +1.2 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 0.1 โวลต์ ต่อวินาที บันทึกผลการทดลอง

5. ทำข้า ข้อ 4 โดยใช้สารละลายฟีโนอล เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (การเตรียม 3.3.9) บันทึกผลการทดลอง

6. ทำการศึกษาด้วยวิธีการเดิน ตั้งแต่ ข้อ 2-5 ด้วยข้าไฟฟ้าตรงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

7. ผลการทดลอง 4.2

3.7.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

3.7.2.1 ศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

1. เตรียมข้าไฟฟ้าかるบอนเพสที่รังด์ด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 0.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร

2. ประกอบเซลล์ข้าไฟฟ้าทั้งสาม: ข้าไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ และข้าไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (ภาคการประกอบข้าไฟฟ้าและเครื่องมือ ที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-2.1 และ ก-2.2) กำหนดศักย์กระตุ้นที่ +0.75 โวลต์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพромิตร

3. ปีเปตสารละลายน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่บรรจุสารละลายน้ำ

4. จุ่มชี้วัดไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์ข้อ 3 ที่วางบนเครื่องมือการสารและทำการໄล์ออกซิเจนออกจากสารละลายน้ำบัฟเฟอร์โดยการแท่นที่ด้วยแก๊สอาร์กอน เป็นเวลา 5 นาที

5. ภาชนะละลายน้ำด้วยเครื่องมือการสารที่อัตราการหมุน 200 รอบต่อนาทีจากนั้นเริ่มให้ศักย์กระตุ้น สังเกตสัญญาณกระแสพื้นหลังจนคงที่

6. ปีเปตสารละลายน้ำไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียม 3.3.4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไปในเซลล์ข้อ 3 ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก สังเกตสัญญาณกระแสจนคงที่

7. ปีเปตน้ำประชาจากไออกอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

8. ปีเปตสารละลายน้ำโรบูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเตรียม 3.3.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จนกระตุ้นสัญญาณกระแสคงที่ บันทึกผลการทดลอง

9. ทำข้อที่ 1-8 โดยเปลี่ยนสารละลายน้ำใหม่ อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส เป็น 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 และ 3.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

10. ผลการทดลอง 4.3.1 และภาคผนวก ฯ หมวด ฯ-1.1

3.7.2.2 ศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไข่ม์กับกลูตราล็อก

1. เตรียมชี้วัดไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายน้ำใหม่ อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร

2. นำชี้วัดไฟฟ้าที่มีเอนไซม์ไปวิเคราะห์ (ไม่มีการเชื่อมไข้ว่อนไข่ม์กับกลูตราล็อก)

3. ศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไข่ม์กับกลูตราล็อก โดยนำชี้วัดไฟฟ้าที่มีเอนไซม์ไปแขวนไว้ของกลูตราล็อก (ดังรูปที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-1.6) เป็นเวลา 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.2 และภาคผนวก ฯ หมวด ฯ-1.2

3.7.2.3 ศึกษาปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน

1. เตรียมชี้วัดไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายน้ำใหม่ อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร และระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไข่ม์กับกลูตราล็อก 10 นาที

2. ศึกษาปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน เข้มข้นร้อยละ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.3 และภาคผนวก ฯ หมวด ฯ-1.3

3.7.2.4 ศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต

1. เตรียมชี้วัดไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายน้ำใหม่ อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไข่ม์กับกลูตราล็อก 10 นาที และปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร

2. ศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้น 1300, 2600, 3800, 5000

และ 6250 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.4 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.4

3.7.2.5 ศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1. เตรียมข้าไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเข้มไข้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร และปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ศึกษาสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.5 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.5

3.7.2.6 ศึกษาศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม

1. เตรียมข้าไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเข้มไข้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0

2. ศึกษาศักย์กระตุ้น ที่ +0.600, +0.700, +0.725, +0.750, +0.775 และ +0.800 โวลต์เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.6 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.6

3.7.2.7 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

1. เตรียมข้าไฟฟ้า และจัดอุปกรณ์การวิเคราะห์เหมือน การทดลอง 3.7.2.1 ใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเข้มไข้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และศักย์กระตุ้น +0.750 โวลต์

2. ศึกษาอุณหภูมิที่ 20, 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3. ผลการทดลอง 4.3.7 และภาคผนวก ข หมวด ข-1.7

3.7.3 ศึกษาประเมินการทำงานของใบโอเซนเซอร์

3.7.3.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ด้วยใบโอเซนเซอร์

1. เตรียมข้าไฟฟ้าかるบอนเพส (การเตรียม 3.5)

2. ประกอบเซลล์ข้าไฟฟ้าทั้งสาม: ข้าไฟฟ้าใช้งาน (จากข้อ 1) ข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ และข้าไฟฟ้าช่วยแพลทินัมเข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ (ภาคการประกอบข้าไฟฟ้าและเครื่องมือ ที่ภาคผนวก ก รูปที่ ก-2.1 และ ก-2.2) กำหนดศักย์กระตุ้นที่ +0.75 โวลต์ เลือกโปรแกรมเทคนิคโครโนแอมเพромทรี

3. ปฏิเสธสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่บรรจุสารละลาย

4. จุ่มข้าวไฟฟ้าทั้งสามลงในเซลล์ข้อ 3 ที่วางบนเครื่องมือการสาร และทำการໄລءอกซีเจนในสารละลายบัฟเฟอร์โดยการแทนที่ด้วยแก๊สออกซิเจน เป็นเวลา 5 นาที

5. ภาณุสารละลายด้วยเครื่องมือการสารที่อัตราการหมุน 200 รอบต่อนาทีจากนั้นเริ่มให้ศักย์กระตุน สังเกตสัญญาณกระแสฟาร่าเดอิก หลังจากนั้นที่

6. ปีเปตสารละลายไดโซเดียมฟินิลฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียม 3.3.4) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรลงไปในเซลล์ข้อ 3 ทำการวัดกระแสฟาร่าเดอิก สังเกตสัญญาณกระแสที่

7. ปีเปตน้ำประชาจากไออกอน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการวัดกระแสฟาร่าเดอิก

8. ปีเปตสารละลายคาร์บอฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเตรียม 3.3.5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในเซลล์ ทำการวัดสัญญาณกระแสฟาร่าเดอิก จากนั้นปีเปตสารละลายคาร์บอฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปทุกๆ 100 วินาที บันทึกผลการทดลอง

9. ผลการทดลอง 4.4.1 และภาคผนวก ฯ หมวด ฯ-2.1

3.7.3.2 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

1. ทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1

2. คำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบต่ำสุดจาก $3SD/Slope$

3. ผลการทดลอง 4.4.2 และภาคผนวก ฯ หมวด ฯ-2.2

3.7.3.3 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ

1. ทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1

2. คำนวณหาขีดความสามารถในการตรวจวัดปริมาณต่ำสุดจาก $10SD/Slope$

3. ผลการทดลอง 4.4.3 และภาคผนวก ฯ หมวด ฯ-2.3

3.7.3.4 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์

3.7.3.4.1 ความเที่ยงของข้าวไฟฟ้า

1. เตรียมข้าวไฟฟ้าかるบอนเพส (การเตรียม 3.5) จำนวน 3 ข้าว

2. การทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1 ข้อ 2-8

3. ทำข้าวกับข้าวไฟฟ้าอีก 2 ข้าว

4. คำนวณหาความเที่ยงของข้าวไฟฟ้า

5. ผลการทดลอง 4.4.4.1

3.7.3.4.2 ความเที่ยงของการตรวจวัด

1. เตรียมข้าวไฟฟ้าかるบอนเพส (การเตรียม 3.5)

2. ทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1 ข้อ 2-7

3. ปีเปตสารละลายคาร์บอฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีการเตรียม 3.3.5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ทำการวัดกระแสฟาร่าเดอิก จากนั้นปีเปตสารละลายคาร์บอฟูแรน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป บันทึกกระแส และทำข้าวจำนวน 3 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง

4. คำนวณหาความเที่ยงของการตรวจวัด
5. ผลการทดลอง 4.4.4.2

3.7.4 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ

3.7.4.1 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยไบโอดีเซนเซอร์

1. สุ่มเก็บตัวอย่างข้าวหอมมะลิ จากตลาดพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี จำนวน 13 ตัวอย่าง

2. สกัดตัวอย่าง ดังวิธีการ 3.4

3. เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายน้ำมาตรฐานคาร์บอฟูแรน ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายน้ำมาตรฐานคาร์บอฟูแรน ด้วยวิธีเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

สารละลาย	ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร			
	1	2	3	4
สารละลาย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร คาร์บอฟูแรน (มิลลิลิตร)	0.00	0.05	0.10	0.15
สารสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	0.10	0.10	0.10	0.10
ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ครบ 5 มิลลิลิตร			

4. เตรียมข้าวไฟฟ้าcarbbonเพส (การเตรียม 3.5)
5. การทดลองตามวิธีการ 3.7.3.1 ข้อ 2-7
6. ปีเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ทำการวัดกระแสฟาราเดอิก จนกระทั่งได้สัญญาณคงที่ บันทึกผลการทดลอง
7. ผลการทดลอง 4.5 และภาคผนวก ข หมวด ข-2.4

3.7.4.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิคมาตรฐานโคโรมาโนกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. ทดลองตามวิธีการ 3.7.4.1 ข้อ 1-3
2. ส่งตัวอย่างไปตรวจวัดที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ. 4 จังหวัดอุบลราชธานี
3. ผลการทดลอง 4.5 และภาคผนวก ข หมวด ข-3.1

บทที่ 4

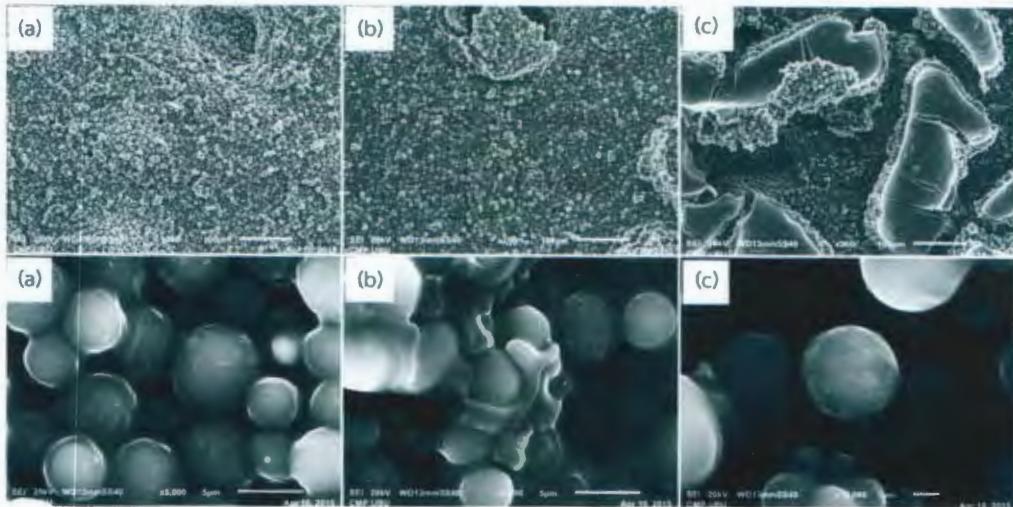
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ปรับปรุงข้าไฟฟ้าcarบอนเพสพัฒนาเป็นไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดค่าโรบูร์โดยการตึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวินเชรัมอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตราลัลดีไฮด์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัด ป้องกันการหลุดของเอนไซม์ออกจากผิวน้ำข้าไฟฟ้า การวิเคราะห์ปริมาณค่าโรบูร์อาศัยหลักการของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเร่งปฏิกิริยาฟอสฟอเรชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตให้ผลิตภัณฑ์ฟีโนลและกรดฟอสฟอริก ให้ศักย์กระตุนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟีโนลจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นเบนโซควิโนน PROTON และอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนเป็นสัญญาณเฉพาะที่เครื่องแปลงสัญญาณสามารถรับและแปลงสัญญาณนี้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้

นอกจากนี้งานวิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณค่าโรบูร์โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ทางอ้อมของไปโอเซนเซอร์ คือการโรบูร์แนสารณรับยังการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาดีฟอสฟอเรชันของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต โดยการโรบูร์แนสร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเรninในโครงสร้างของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพไปหรือถูกยับยั้งทำให้ผลิตฟีโนลได้ลดลงค่าสัญญาณกระแสที่ได้จึงลดลงตามลำดับ สัญญาณที่ลดลงแปรผันตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของการโรบูร์

ดังนั้น งานวิจัยเริ่มต้นจากการปรับปรุงข้าไฟฟ้าcarบอนเพสเพื่อพัฒนาเป็นไปโอเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาเอกลักษณ์ของผิวน้ำข้าไฟฟ้าด้วยเทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่อง粒และยืนยันการผลิตสารตัวกลางทางไฟฟ้าคือฟีโนลที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแتمเมทรี หลังจากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ระยะเวลาในการเขื่อนไฟฟ้า เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตราลัลดีไฮด์ ปริมาณโบวินเชรัมอัลบูมิน ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม สภาวะ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ และปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการทำงานของไปโอเซนเซอร์ และประเมินการทำงานของไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาถึงช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ความไวในการตรวจวัด ซึ่งจำกัดในการตรวจพบและตรวจวัด ความเที่ยงของ การวิเคราะห์ จากนั้นประเมินการทำงานของไปโอเซนเซอร์ โดยวิเคราะห์ค่าโรบูร์โดยไฟฟ้าในข้าวหอมมะลิที่สุ่มเก็บมาจากพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคมาตรฐานໂຄรมາໂທກرافีของเหลวสมรรถนะสูง

4.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผิวน้ำข้าไฟฟ้า ด้วยเทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่อง粒เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของผิวน้ำข้าไฟฟ้าcarบอนเพส ผู้วิจัยได้พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่อง粒 ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการศึกษารายละเอียดลักษณะพื้นผิว ดังรูปที่ 4.1

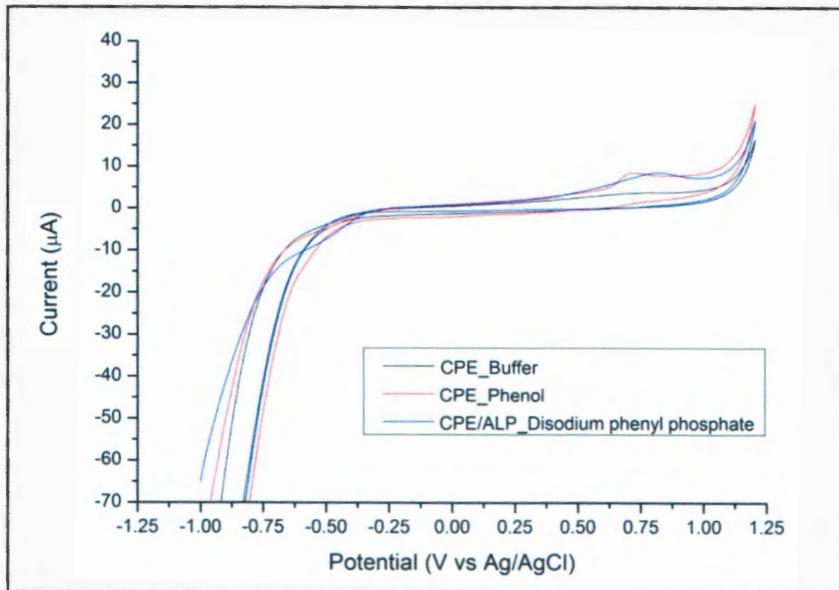


รูปที่ 4.1 รูปร่างลักษณะพื้นผิวของข้าไฟฟ้า: (a) คาร์บอนเพส, (b) คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ (c) คาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวีนเซรั่มอัลบูมิน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอนแบบส่องการดู

ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคของคาร์บอนมีรูปร่างเป็นทรงกลมและซ้อนกันอยู่ ดังรูปที่ 4.1(a) เมื่อตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสลงบนคาร์บอนเพสจะเห็นว่า มีสารเกาะอยู่กับคาร์บอนเพส ซึ่งเกิดจากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไปเกาะอยู่บนพื้นผิวของคาร์บอนเพส ดังรูปที่ 4.1(b) และเมื่อตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวีนเซรั่มอัลบูมินลงบนคาร์บอนเพสจะเห็นว่า มีสารเกาะตัวกันบนพื้นผิวน้ำคาร์บอนเพสซึ่งเกิดจากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวีนเซรั่มอัลบูมินเกิดการสร้างพันธะกันส่งผลให้กลุ่มก้อนโปรดตันน้ำมีขนาดใหญ่ขึ้น

4.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของข้าไฟฟ้า ด้วยเทคนิคไซคลิกไโอลแทมเมธี

การทดลองนี้ยืนยันการทำงานของข้าไฟฟ้าかるบอนเพสที่ปรับปรุงพิวน้ำข้าไฟฟ้าโดยการตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวีนเซรั่มอัลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์เพื่อพัฒนาเป็นใบโอเชอร์ โดยศึกษาสัญญาณการตอบสนองของข้าไฟฟ้าต่อฟีโนลซึ่งเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของไดโซเดียมฟีโนลฟอสเฟตด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้ข้าไฟฟ้าかるบอนเพสที่มีการตรึงและไม่ตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและศักย์ไฟฟ้าของข้าวไฟฟ้าcarบอนเพส สัญญาณกระแสของสารละลายน้ำฟีฟอร์ (เส้นกราฟสีดำ) สารละลายน้ำ 42 มิลลิกรัมต่อลิตร พีนอล (เส้นกราฟสีแดง) และสารละลายน้ำ 6200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดโซเดียมพีนอลฟอสเฟต (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) ที่ศักย์กระตุ้น -1.0 ถึง +1.2 โวลต์ เทียบกับข้าวไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ อัตราสแกน 0.1 โวลต์ต่อวินาที

ผลการทดลองพบว่าข้าวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นตอบสนองต่อพีนอล ให้สัญญาณกระแสแอนอดิก (เส้นกราฟสีแดง) ที่ศักย์ $+0.75$ โวลต์²⁶ ที่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณกระแสของแบล็ค (เส้นกราฟสีดำ) และเมื่อศึกษาข้าวไฟฟ้าที่ตزرุด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบร้าให้สัญญาณกระแสทางแอนอดิกที่ศักย์ $+0.60$ ถึง $+0.80$ โวลต์ ซึ่งมีศักย์ที่ทำหน่งใกล้เคียงกับศักย์ของพีนอล แสดงว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส สามารถเร่งปฏิกิริยาของไดโซเดียมพีนอลฟอสเฟตเกิดผลิตภัณฑ์เป็นพีนอล ซึ่งเป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้าได้

จากการศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกใช้ข้าวไฟฟ้าcarบอนเพสตزرุดด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นข้าวไฟฟ้าใช้งานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์บอฟูแรนด้วยเทคนิคໂຄโนແອມເພວໂຮມທີ່ รายละเอียดดังทั้งหัวข้อถัดไป

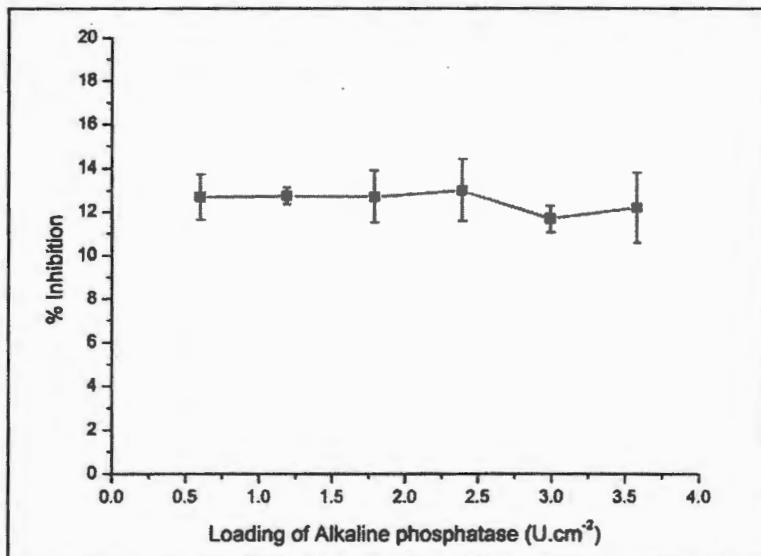
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของใบโอเซนเชอร์

เพื่อให้ได้ข้าวไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นคาร์บอฟูแรนใบโอเซนเชอร์ที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ระยะเวลาการเข้มขี้ไวร์ระหว่างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกูลูตาเรลตีไฮด์ ปริมาณใบวีนเซรัมอัลบูมิน ปริมาณไดโซเดียมพีนอลฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการทำงานของใบโอเซนเชอร์ สภาวะ pH ของสารละลายน้ำ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นและอุณหภูมิ ผลการศึกษา ดังนี้

4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

การทำงานของคาร์บอฟูแรนใบโอเซนเชอร์อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยคาร์บอฟูแรน โดยคาร์บอฟูแรนสร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเชอร์ใน

โครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพไปหรือถูกยับยั้ง การศึกษาปริมาณเอนไซม์จึงมีความสำคัญ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เหมาะสมที่ต้องบันผิวน้ำของข้าไฟฟ้า ศึกษา ปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 0.6 ถึง 3.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.3



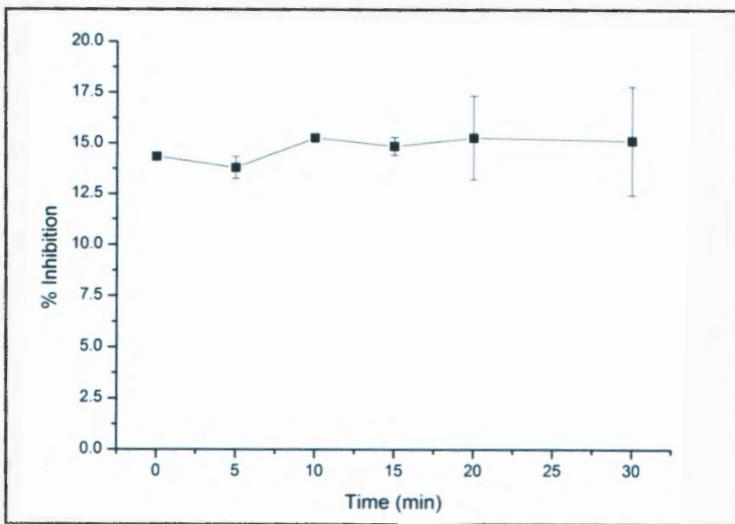
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ถูกต้องบนผิวน้ำ ข้าไฟฟ้าcarboronเพส ระยะเวลาในการเชื่อมไข้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ 5 นาที ปริมาณของโบวินเซรั่มอัลบู มิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระดุน +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายได โซเดียมพินิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาพบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้น การยับยั้งด้วยคาร์บอฟอร์น ไม่มีผลต่อร้อยละของการยับยั้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกปริมาณเอนไซม์ที่ผิวน้ำข้าไฟฟ้า 1.2 ยูนิตต่อตาราง เซนติเมตร (120 มิลลิต่อมิลลิลิตร) เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดและมีค่าความแปรปรวนของข้อมูลต่ำ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระยะเวลาของการเชื่อมไข้วเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัล ดีไฮด์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

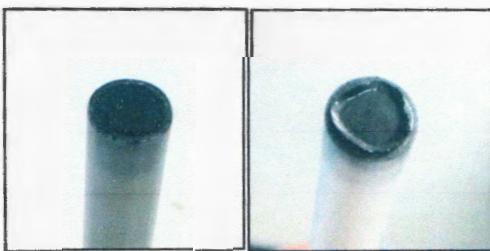
4.3.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมไข้วเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์

กลูตารัลดีไฮด์มีคุณสมบัติเกิดเป็นโครงร่างทาง化ایไดโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ของหมู่อะ มิโนของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ เพิ่มการยึดติดของเอนไซม์บนผิวน้ำ เพิ่มความเสถียร ในการใช้งานของใบโอลเซนเซอร์ การเชื่อมไข้วกกลูตารัลดีไฮด์ต้องใช้เวลาที่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาเวลา ที่กลูตารัลดีไฮด์เชื่อมไข้วเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาระยะเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 30 นาที ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและระยะเวลาในการเชื่อมไข้วกคุตราลตี้ไฮด์กับเงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส ปริมาณเงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณของโบวีน เชร์มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระดุน +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาพบว่าที่เวลาเริ่มต้นของการเชื่อมไข้วกคุตราลตี้ไฮด์กับเงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตส ให้ผลร้อยละของการยับยั้งด้วยการใบฟูแรนเท่ากับ 12.70 คราร์บิฟูแรนสามารถเข้าไปยับยั้งการทำงานของ เงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตสได้โดยตรงโดยไม่ผ่านชั้นของกลูตราลตี้ไฮด์ส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งมีค่าสูงและ ความแปรปรวนของข้อมูลต่ำ แต่พบว่าความเสถียรของการคงอยู่ของเงนไซเมอร์ ในขณะที่เมื่อเวลาการเชื่อม ไข้วกคุตราลตี้ไฮด์กับเงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตสเพิ่มมากขึ้น ชั้นของกลูตราลตี้ไฮด์จะหนาขึ้นทำให้การใบฟู แรนเข้าไปยับยั้งการทำงานของเงนไซเมอร์ได้ช้าลงเนื่องจากต้องผ่านชั้นของกลูตราลตี้ไฮด์ นอกจากนี้กลูตราลตี้ ไฮด์มีการรวมตัวเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานๆ ส่งผลให้สารหลุดออกจากการผิวน้ำข้าวไฟฟ้า ดังรูปที่ 4.5 ค่าการ วิเคราะห์จึงมีความแปรปรวนสูงมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกระยะเวลาในการเชื่อมไข้วกคุตราลตี้ไฮด์กับ เงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตสที่ 10 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งมีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ E. Akyilmaz และคณะ³¹ ใช้กลูตราลตี้ไฮด์ เน็งขันร้อยละ 5 โดยปริมาตร และระยะเวลาในการเชื่อมไข้วกเงนไซเมอร์กับกลูตราล ตี้ไฮด์ 30 นาที



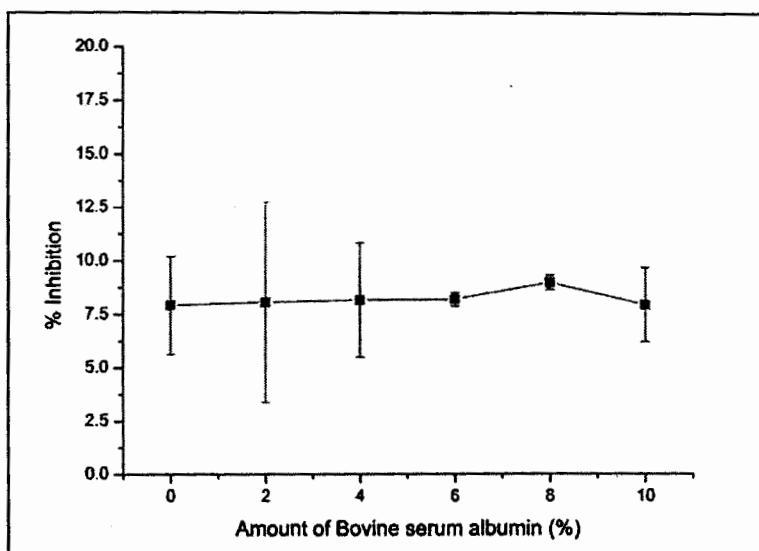
รูปที่ 4.5 ภาพผิวน้ำข้าวไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเงนไซเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟ่าเตสและเชื่อมไข้วกด้วยกลูตราลตี้ไฮด์ก่อนการ ใช้งาน เวลาในการเชื่อมไข้ว 10 นาที (ซ้าย) และเวลาในการเชื่อมไข้ว 30 นาที (ขวา)

โบวีนเชร์มอัลบูมินเป็นอีกหนึ่งตัวแปรที่มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาปริมาณ ของโบวีนเชร์มอัลบูมิน รายละเอียดดังท้าข้อตัดไป

4.3.3 ผลการศึกษาปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน

โบวีนเซรัมอัลบูมินเป็นโปรตีนที่นิยมใช้ในทางชีวเคมี เพราะมีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ ช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ ป้องกันการรวมตัวกันของเอนไซม์ ช่วยให้เอนไซม์มีการกระจายตัวที่ดีขึ้น และช่วยป้องกันการยึดเกาะของเอนไซม์กับบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมินที่เหมาะสมต่อการปรับปรุงผิวน้ำข้าวไฟฟ้า ศึกษาปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 0 ถึง 10 โดยมวลต่อปริมาตร ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.6

จากการศึกษาพบว่าปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลต่อร้อยละของการยับยั้ง แต่เมื่อมีปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินในปริมาณน้อยค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์มีค่าสูงมากเนื่องจากเอนไซม์มีการรวมตัวกันส่งผลให้บริเวณเร่งมีปริมาณลดลง การโบทฟ์แรนเข้าไปสร้างอันตรกิริยาได้น้อยลงทำให้ร้อยละของการยับยั้งมีความแปรปรวนสูง งานวิจัยนี้เลือกปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินที่ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ใกล้เคียงกับผลงานวิจัยของ S. B. Adelojun และคณะ³² ที่ใช้ปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 6.8 โดยมวลต่อปริมาตร



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟอเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชม์อัลคาไลน์ฟอสฟอเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร

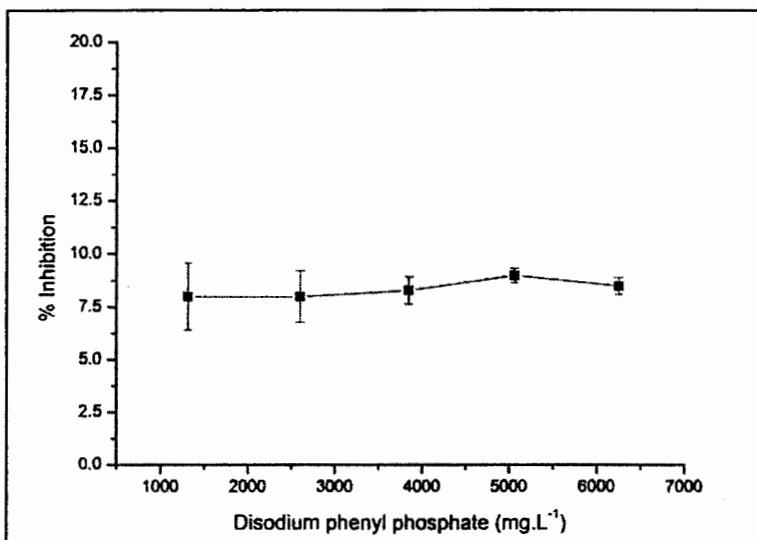
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของข้าวไฟฟ้า หลังจากนั้นจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ได้แก่ ปริมาณไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต สภาวะ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ศักย์กระตุ้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม ผลการทดลองดังทัวร์อัดได้

4.3.4 ผลการศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต

ความเข้มข้นของสับสเตรตมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์ปริมาณคงที่ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรตจะทำให้อัตราเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งแล้วจะคงที่ และความเข้มข้นของสับสเตรตมากเกินไปจะทำให้เอนไซม์หยุดการทำงานได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาปริมาณไดโซเดียมฟีนิล

ฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ โดยศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 1300 ถึง 6200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.7

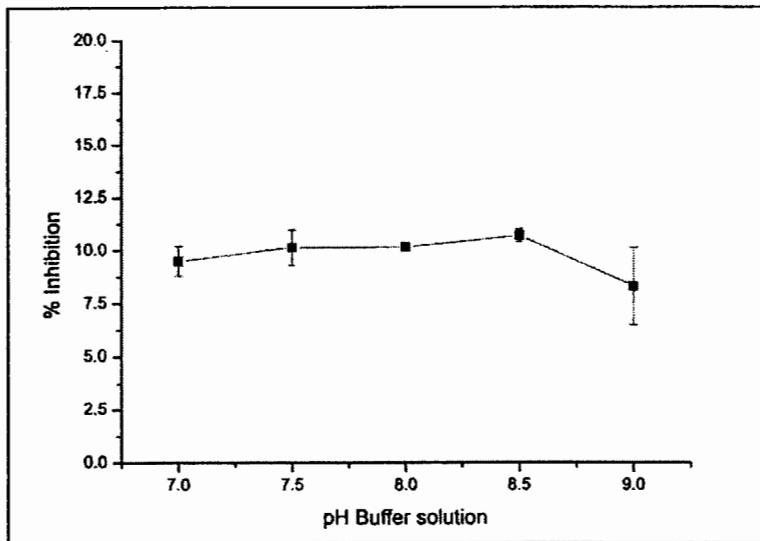
เมื่อกำหนดปริมาณเอนไซม์คงที่ บริเวณเร่งของเอนไซม์จะมีปริมาณจำกัด ปริมาณไดโซเดียม ฟีนิลฟอสเฟตมากขึ้นทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีจำนวนมากขึ้น งานวิจัยนี้ให้ร้อยละการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตที่มากขึ้น แต่พบว่าร้อยละการยับยั้งไม่ได้มีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นสภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากมีค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์ต่ำ



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชเม้อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชร์มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0

4.3.5 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สภาวะความเป็นกรดเบสของสารละลายบัฟเฟอร์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ การทำงานของเอนไซม์จะลดลง เมื่อ pH สูงหรือต่ำมากเกินไป ส่งผลให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้

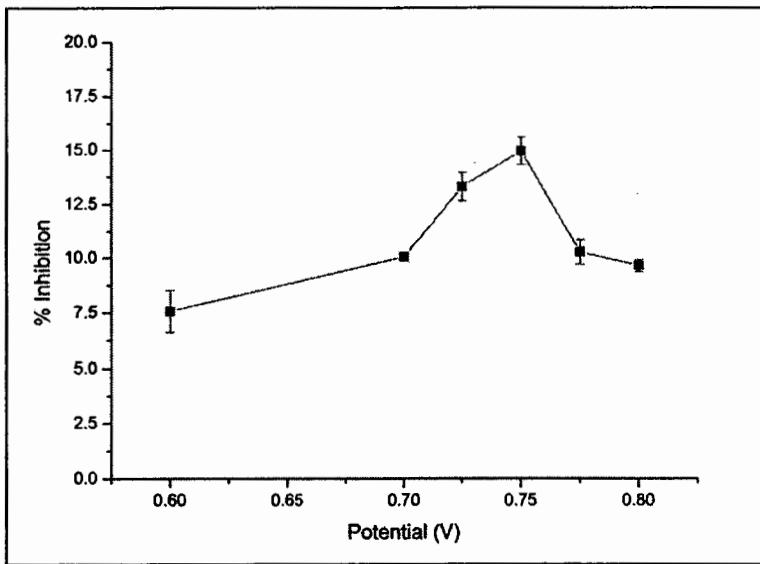


รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและ pH ของสารละลายน้ำฟอสฟอร์ ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเข้มข้นเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลไดอีด 10 นาที ปริมาณของโนวีนเชร์ร์มอลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายน้ำโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษา pH ของสารละลายน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ที่ pH 7 ถึง 9 ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.8 จากผลการศึกษา พบว่าร้อยละการยับยั้งมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงสภาวะที่ pH 8.5 และหลังจากนั้นจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสารละลายน้ำฟอสฟอร์ที่เหมาะสม คือ pH 8.0 เป็นสภาวะที่เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วยการนำไปฟูแรนได้ดีที่สุด และมีความเที่ยงมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่อ้างอิงจากบริษัท sigma Aldrich³⁶ ที่ระบุว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่ pH 8

4.3.6 ผลการศึกษาศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม

ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมเพื่อให้สารตัวกลางทางไฟฟ้าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันได้มีผลต่อความไวในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงศึกษาศักย์กระตุ้นที่ +0.6 ถึง +0.8 โวลต์เพื่อใช้กระตุ้นพื้นอลให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.9



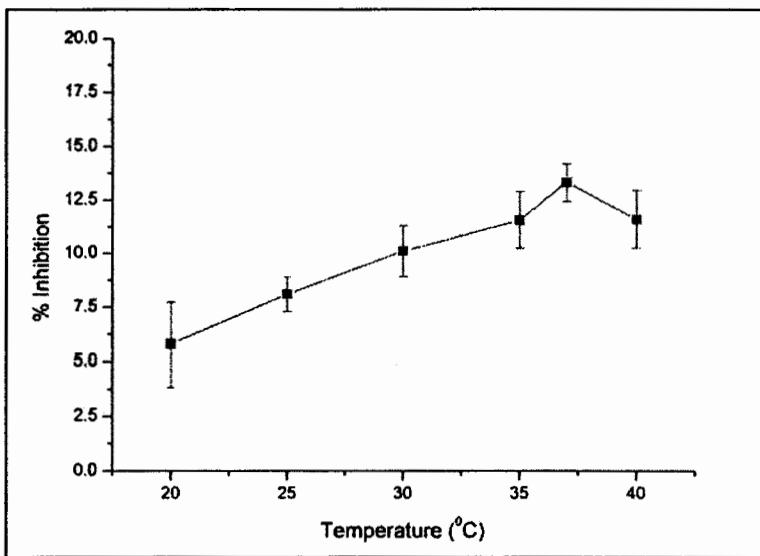
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและศักย์กระตุนที่เหมาะสม ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมีผลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และสารละลายไดโซเดียมพีโนลฟอสเพต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษา พบร่วมกับร้อยละการยับยั้งจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อศักย์กระตุนเพิ่มขึ้นจนถึงศักย์กระตุนที่ +0.750 โวลต์ และร้อยละการยับยั้งจะลดลงเมื่อศักย์กระตุนมากกว่า +0.775 โวลต์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศักย์กระตุนที่เหมาะสมในการกระตุนสารตัวกลางทางไฟฟ้า คือ +0.750 โวลต์ เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์ เนื่องจากมีค่าร้อยละการยับยั้งที่สูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ A. Samphao และคณะ²⁶ ให้ผลการทดลองในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของข้าไฟฟ้าかるบอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเชื่อมไขว้ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เกิดกระแสแอกโนดิกสูงสุดที่ศักย์ไฟฟ้า +0.750 โวลต์เทียบกับข้าไฟฟ้าอ้างอิงชิลเวอร์-ชิลเวอร์คลอไรด์

4.3.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งสามารถคงสภาพทำงานได้ดีในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้นแต่ในขณะเดียวกันจะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงศึกษาอุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.10

จากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิต่ำเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาน้อย แต่มีอุณหภูมิสูงขึ้นร้อยละการยับยั้งมีค่าสูงขึ้นจากอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส และร้อยละการยับยั้งจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เกิดจากเอนไซม์เสื่อมสภาพไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบร่วมกับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสให้ร้อยละการยับยั้งสูงที่สุด ซึ่งเป็นสภาวะที่เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสทำงานได้ดี แต่ผู้วิจัยเลือกอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่อุณหภูมิห้องควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีร้อยละการยับยั้งที่ยอมรับได้และสะดวกต่อการวิเคราะห์



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อบริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ และสารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

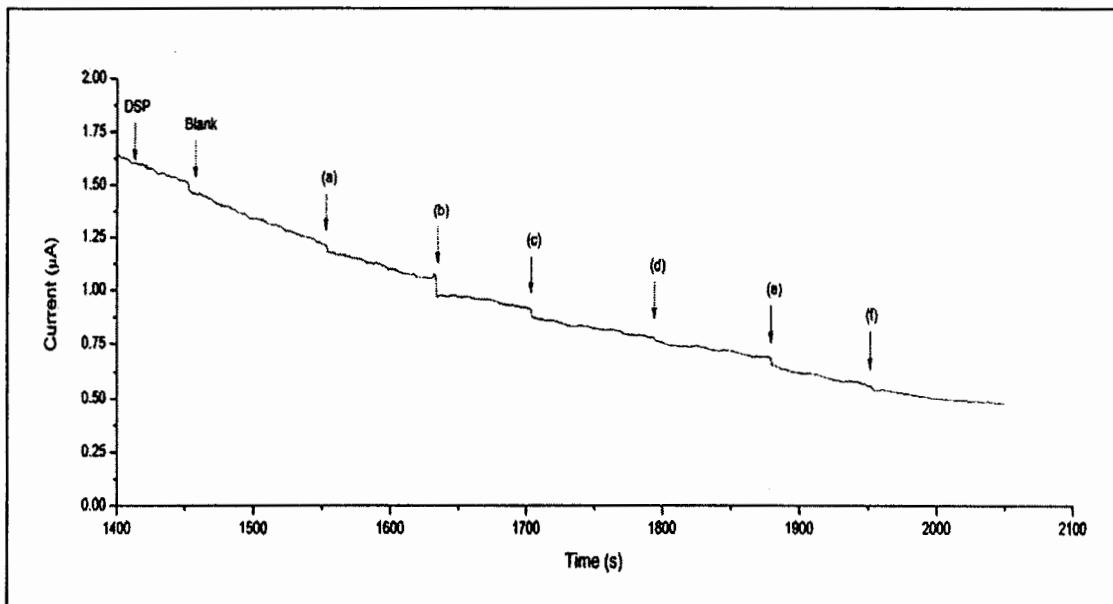
เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จากนั้นจำเป็นต้องประเมินการทำงานของใบโอเซนเซอร์ รายละเอียดดังหัวข้อถัดไป

4.4 ผลการศึกษาประเมินการทำงานของใบโอเซนเซอร์

เพื่อประเมินความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนด้วยข้าไฟฟ้าที่ทำการปรับปรุงขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นใบโอเซนเซอร์ จึงได้ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คาร์บอฟูแรน ขึ้นจำกัดในการตรวจพับและตรวจวัดปริมาณคาร์บอฟูแรน ความเที่ยงของการวิเคราะห์ เป็นต้น

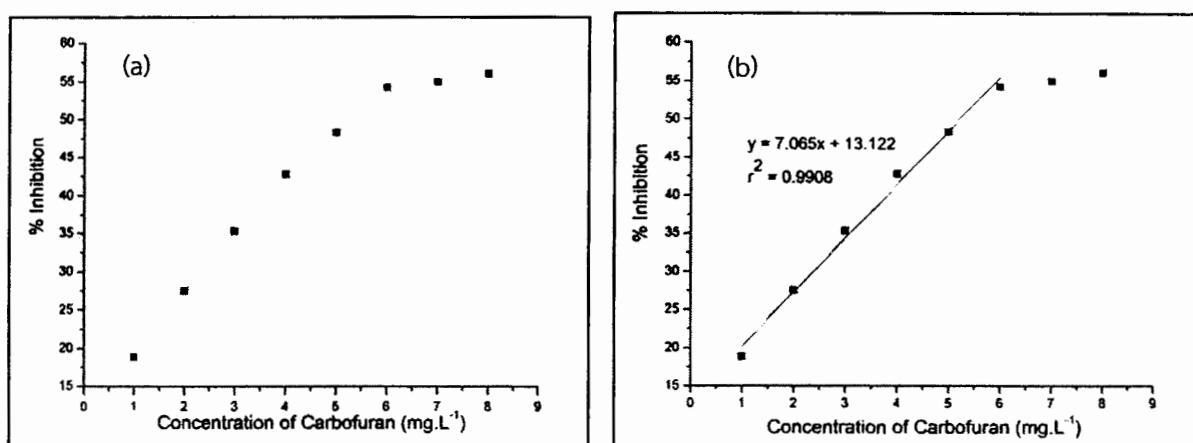
4.4.1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรน

ความสามารถในการทำงานของข้าไฟฟ้าcarbon pestที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เพื่อสร้างเป็นใบโอเซนเซอร์ในการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอฟูแรน ผลการศึกษา ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลาของสารละลายน้ำในฟูแรน โดยใช้ข้าไฟฟ้า คาร์บอนเพสที่ตึงด้วยเงินใช้ม้อลคลาไลน์ฟอสฟາเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้ เงินใช้ม้อลคลาไลน์ฟอสฟາเตสกับกลุ่มรัลลีด์ 10 นาที ปริมาณของเบวินเซรัมอัลบูมินร้อยละ 8 โดยมวลต่อ ปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ศักย์กระดัน +0.75 โวลต์ และสารละลายน้ำในฟูแรน 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร : ปริมาณการ์โนบูแรน (a) 1.0, (b) 2.0, (c) 3.0, (d) 4.0, (e) 5.0 และ (f) 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองพบว่าสัญญาณกระแสลดลงเป็นขั้นบันไดชัดเจนตามความเข้มข้นของสาร์โนบูแรน ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยังกับความเข้มข้นของสาร์โนบูแรน ได้ช่วงไดนามิกส์ ดังรูปที่ 4.12(a) และเลือกช่วงความเป็นเส้นตรงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร์โนบูแรนที่ช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพัทธ์ (r^2) เท่ากับ 0.991 ดังรูปที่ 4.12(b)



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยังกับความเข้มข้นของสาร์โนบูแรน (a) ช่วงไดนามิกส์ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (b) ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจด้วยข้าไฟฟ้า คาร์บอนเพสที่ตึงด้วยเงินใช้ม้อลคลาไลน์ฟอสฟາเตส

4.4.2 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ทดสอบขีดจำกัดในการตรวจพบcarboใบฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์ พิจารณาขีดจำกัดในการตรวจพบจาก $3SD/slope$ คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการยับยั้งกับสภาพไว้ในการวิเคราะห์มีค่าเป็น 3 เท่า จากผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบที่ความเข้มข้นต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ

ทดสอบขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณของcarboใบฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์ พิจารณาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณจาก $10SD/slope$ คำนวณอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการยับยั้งกับสภาพไว้ในการวิเคราะห์มีค่าเป็น 10 เท่า จากผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณที่ความเข้มข้นต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 3.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4.4 ผลการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์

4.4.4.1 ความเที่ยงของข้าวไฟฟ้า

ทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ของใบโอเซนเซอร์ โดยเตรียมข้าวไฟฟ้า かるบอนเพสที่ตึงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จำนวน 3 ข้าว ทำการตรวจวัดสัญญาณของไฟนอลที่ลดลงที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยcarboใบฟูแรน และทำการหาค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งจากข้าวไฟฟ้าทั้งสามข้าว ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1 พบร่วมกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 4.31 มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 5 จึงสามารถยอมรับความเที่ยงของข้าวไฟฟ้าได้

ตารางที่ 4.1 ร้อยละการยับยั้งเฉลี่ยตามปริมาณcarboใบฟูแรนที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

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

4.4.4.2 ความเที่ยงของการตรวจวัด

ทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ปริมาณcarboใบฟูแรนที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 4 ครั้งด้วยข้าวไฟฟ้า 1 ข้าว ของใบโอเซนเซอร์ ตารางที่ 4.2 พบร่วมกับโอเซนเซอร์ตอบสนองให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 2.80 มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 5 จึงสามารถยอมรับความเที่ยงของการวิเคราะห์ได้

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการยับยั้งเฉลี่ยตามปริมาณคาร์บอฟูแรนที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

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

4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ

ทำการประเมินการทำงานของใบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณคาร์บอฟูแรนผู้วิจัยวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิที่สุ่มเก็บจาก 13 แหล่ง คือ ตลาดวารินเจริญศรี ตลาดแม่กินเตียง ตลาดวาริน บ้านก่อ ตลาดหัวขุยง ร้านชัยเจริญ ร้านเหรียญห้อง ตลาดบุ่งหวาน บ้านศรีโคเหนือ บ้านทุ่งเกษม บ้านธาตุ บ้านบุ่งใหม่ บ้านศรีโคได้ ในพื้นที่ อ.วาริน อำเภอ จ.อุบลราชธานี โดยทำการสกัดคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิที่สุ่มเก็บมาจาก 13 แหล่ง (ข้าวห้อมมะลิ # 1-3, 7-16) และเติมปริมาณคาร์บอฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวอย่างสารสกัดจาก 3 แหล่ง (ข้าวห้อมมะลิ # 4-6) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในสารสกัดจากข้าวห้อมมะลิด้วยใบโอเซนเซอร์และเทคนิคมาตรฐานโคลอมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

จากข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานโคลอมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง พบร่วงปริมาณคาร์บอฟูแรนที่ป่นเป็นฝุ่นในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิไม่สามารถตรวจวัดได้จากใบโอเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานโคลอมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง ซึ่งมีขีดจำกัดในการตรวจพบสูงถึง 1.12 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถระบุได้ว่ามีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจพบของทั้งสองวิธี ดังนั้นจึงทำการเติมสารละลายมาตรฐานคาร์บอฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในสารสกัดตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ 3 ตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอฟูแรนด้วยเทคนิคทั้งสอง ตรวจพบระดับปริมาณคาร์บอฟูแรนด้วยใบโอเซนเซอร์ให้ผลการวิเคราะห์ในช่วง 1.43 - 1.57 มิลลิกรัมต่อลิตร เทคนิคมาตรฐานโคลอมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงในช่วง 1.39 - 1.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนมาในช่วงร้อยละ 95.6 - 104.8 จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากทั้งสองเทคนิคด้วยสถิติค่า t พบร่วง ใบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันกับเทคนิคมาตรฐานโคลอมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดย $t_{\text{tabulated}}$ มีค่าเท่ากับ 4.3 ที่ $\text{degree of freedom} = 2$ และ $t_{\text{calculated}}$ อยู่ในช่วง 0.26- 2.81 ซึ่งค่า $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า $t_{\text{tabulated}}$ แสดงว่า ผลการวิเคราะห์ด้วยใบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณคาร์บอฟูแรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิได้จริง

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณการโบฟูแรนในข้าวห้อมมะลิตัวบิวตี้เบิร์นเซอร์และเทคนิคมาตรฐาน
โคลามาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สารสกัดข้าวห้อมมะลิ	ปริมาณการโบฟูแรน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	ไฮโซเซอร์	HPLC
ข้าวห้อมมะลิ # 1	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 2	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 3	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 4	1.52 ± 0.08	1.39 ± 0.01
ข้าวห้อมมะลิ # 5	1.43 ± 0.20	1.40 ± 0.01
ข้าวห้อมมะลิ # 6	1.57 ± 0.31	1.40 ± 0.02
ข้าวห้อมมะลิ # 7	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 8	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 9	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 10	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 11	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 12	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 13	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 14	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 15	ND.	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 16	ND.	ND.

ND. = non detection

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ปรับปรุงขั้วไฟฟ้ารบอนเพสพัฒนาเป็นไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดคาร์บอฟูเวนโดยการตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โบวีนเชร์มอลบูมิน กลีเซอรอลและกลูตารัลดีไฮด์ การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูเวนยังมีการเร่งปฏิกิริยาปฎิกิริยาฟอสฟอสฟอเรสเซนของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตให้ผลิตภัณฑ์ฟีนอลของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การวัดสัญญาณการวิเคราะห์ โดยให้ศักย์กระตุ้นการเกิดออกซิเดชันของฟีนอลให้ผลิตภัณฑ์เป็นเบนโซควิโนน PROTON และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนเป็นสัญญาณเฉพาะที่เครื่องแปลงสัญญาณสามารถรับและแปลงสัญญาณเฉพาะนี้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้ และตรวจวัดปริมาณคาร์บอฟูเวนโดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ทางอ้อม

การเตรียมไปโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูเวนนั้น สามารถเตรียมขั้วไฟฟ้ารบอนเพสและตรึงทางเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและกลูตารัลดีไฮด์ ผู้วิจัยได้ศึกษาลักษณะพื้นผิวของผิวน้ำขั้วไฟฟ้ารบอนเพสด้วยเทคนิคจลทรรศนอิเล็กตรอนแบบส่องกราด พิสูจน์เอกลักษณ์ทางไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแกรมเมทรี ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไปโอเซนเซอร์ ได้แก่ ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ระยะเวลาในการเข้มไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ ปริมาณโบวีนเชร์มอลบูมิน ปริมาณไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต สภาวะ pH ของสารละลาย ศักย์ไฟฟ้า และอุณหภูมิ เป็นต้น จากนั้นประเมินการทำงานของไปโอเซนเซอร์ โดยศึกษาถึงช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ความไวในการตรวจวัดขีดจำกัดในการตรวจพบและตรวจวัด ความเที่ยงของการวิเคราะห์ และเปรียบเทียบข้อมูลการวิเคราะห์การบอฟูเวนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคมาตรฐานໂຄຣນາໂທກرافีของเหลวสมรรถนะสูง

ผลการทดลอง พบว่า

1. ขั้วไฟฟ้ารบอนเพสเมื่อตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวีนเชร์มอลบูมินลงบน карт์บอนเพส พบร่วมสาร geleate ตัวกันบนผิวน้ำขั้วไฟฟ้ารบอนเพสซึ่งเกิดจากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและโบวีนเชร์มอลบูมินเกิดการสร้างพันธะกันส่งผลให้เกิดกลุ่มก้อนโปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้น
2. เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถเร่งปฏิกิริยาของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตเกิดผลิตภัณฑ์คือฟีนอลซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อให้ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม
3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ มีดังนี้
 - 3.1 ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร
 - 3.2 ระยะเวลาในการเข้มไขว้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสกับกลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที
 - 3.3 ปริมาณของโบวีนเชร์มอลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร
 - 3.4 ปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 3.5 pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เท่ากับ 8.0
 - 3.6 ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ +0.750 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์
 - 3.7 อุณหภูมิท้องเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์
4. ผลการประเมินการทำงานของไปโอเซนเซอร์
 - 4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงการวิเคราะห์การบอฟูเวน 1 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ r^2

- เท่ากับ 0.991
- 4.2 ความไวของการตรวจวัดที่ 7.07 ร้อยละของการยับยั้ง-ลิตรต่อมิลลิกรัม
 - 4.2 ขีดจำกัดในการตรวจพบที่ 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.3 ขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณที่ 3.75 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.4 ความเที่ยงของข้าไฟฟ้าในการวิเคราะห์ พบร่วมให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 4.31
 - 4.5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ พบร่วมไปโอเซนเซอร์ตอบสนอง ให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 2.80
5. การศึกษาหาปริมาณคาร์บอฟูเรนในตัวอย่างข้าวห้อมมะลิ
 - 5.1 สารสกัดข้าวห้อมมะลิที่สุ่มเก็บมาจาก ในพื้นที่ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี ตรวจไม่พบปริมาณการบอฟูเรนด้วยไปโอเซนเซอร์และเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
 - 5.2 สารสกัดจากตัวอย่างข้าวห้อมมะลิที่ทำการเติมปริมาณคาร์บอฟูเรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจวัดด้วยไปโอเซนเซอร์ พบริมาณคาร์บอฟูเรนที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 1.52 ± 0.08 , 1.43 ± 0.20 และ 1.57 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบริมาณคาร์บอฟูเรน ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยที่ 1.39, 1.40 และ 1.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ
 - 5.3 ผลการวิเคราะห์ให้ร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนมาในช่วงร้อยละ 95.6 - 104.8
 6. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากห้องสองเทคนิค โดยใช้สถิติค่า t พบร่วม t จากการคำนวณเท่ากับ 2.86, 0.31 และ 0.95 ตามลำดับ ซึ่งมีน้อยกว่าค่า t ในตาราง เท่ากับ 4.30 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สรุปได้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูเรนด้วยไปโอเซนเซอร์กับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

- (1) <http://www.afet.or.th/2013/th/products/BHMR/>. (Accessed 12 January 2015)
- (2) Sun, X.; Zhu, Y.; Wang, X. *Food Control* 2012, 28, 184-191.
- (3) Wang, M.; Huang, J.; Wang, M.; Zhang, D.; Chen, J. *Food Chemistry* 2014, 151, 191-197.
- (4) Padilla, S.; Marshall, R. S.; Hunter, D. L.; Lowit, A. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007, 219, 202-209.
- (5) Jeyapragasam, T.; Saraswathi, R. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2014, 191, 681-687.
- (6) <http://www.greennet.or.th/node/265>. (Accessed 12 January 2015)
- (7) <http://www.vcharkarn.com/varticle/38381>. (Accessed 15 January 2015)
- (8) <http://www.intechopen.com/books/pesticides-advances-in-chemical-and-botanical-pesticides/evolution-and-expectations-of-enzymatic-biosensors-for-pesticides>. (Accessed 15 January 2015)
- (9) <http://www.school.net.th/library/snet5/topic8/enzyme.html>. (Accessed 15 January 2015)
- (10) http://www.nakhamwit.ac.th/pingpong_web/BioMolecular.htm. (Accessed 23 January 2015)
- (11) <http://www.thaieditorial.com/ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์>. (Accessed 23 January 2015)
- (12) กาญจนा คุณพาที, การพัฒนาเอทานอลใบโ去买เซอร์เพื่อตรวจวัดหาปริมาณ เอทานอลในตัวอย่างไวน์, สารนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.
- (13) <http://vichakarn.triamudom.ac.th/comtech/studentproject/sci/bio1/enzyme/PAGE/Untitled-9.html>. (Accessed 23 January 2015)

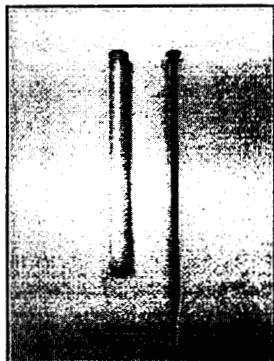
- (14) <https://sites.google.com/site/biotechnology55/dna-technology/2-5-kar-yabyang-xensim>. (Accessed 23 January 2015)
- (15) <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/enzyme/chapter5/ch5l1.htm>. (Accessed 11 June 2015)
- (16) <http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/053.htm>. (Accessed 23 January 2015)
- (17) ยุวันดา วงศ์, การวิเคราะห์ทางอ้อมของใบเอนไซม์มาติกใบโอลเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณprotoที่อยู่ในน้ำตัวอย่างและสารตัวอย่างมาตรฐานที่มีการรับรองและค่าคงที่ในตัวอย่างพริก, สารนิพนธ์วิทยาศาสตร์บันทึก, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.
- (18) <http://www.umich.edu/~protein/AP/D2O/AP-structure.html>. (Accessed 24 January 2015)
- (19) <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=37&evtc=Suggest&evta=Moleculeof%20the%20Month&evtl=OtherOptions>. (Accessed 24 January 2015)
- (20) <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immethod.html>. (Accessed 24 January 2015)
- (21) <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1926/glycerol>. (Accessed 3 February 2015)
- (22) <http://dir.indiamart.com/impcaf/carbon-powder.html>. (Accessed 3 February 2015)
- (23) <http://www.microscopic.center.sci.buu.ac.th/images/website/EM.pdf>. (Accessed 11 June 2015)
- (24) <http://www.ammrf.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php>. (Accessed 11 June 2015)
- (25) Mazzei, F.; Botre, F.; Montilla, S.; Pilloton, R.; Podestà, E.; Botrè, C. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2004, 574, 95-100.
- (26) Valdés-Ramírez, G.; Cortina, M.; Ramírez-Silva, M. T.; Marty, J.-L. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008, 392, 699-707.
- (27) Mousty, C.; Kaftan, O.; Prevot, V.; Forano, C. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2008, 133, 442-448.
- (28) นีรนุช สุพร, การวิเคราะห์ทางอ้อมของใบโอลเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณค่าคงที่ในตัวอย่างพริก, สารนิพนธ์วิทยาศาสตร์บันทึก, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.
- (29) Akyilmaz, E.; Turemis, M. *Electrochimica Acta* 2010, 55, 5195-5199.
- (30) Adelaju, S. B.; Lawal, A. T. *Analytica Chimica Acta* 2011, 691, 89-94.
- (31) Zhou, Q.; Yang, L.; Wang, G.; Yang, Y. *Biosensors and Bioelectronics* 2013, 49, 25-31.

- (32) Grawe, G. F.; de Oliveira, T. R.; de Andrade Narciso, E.; Moccelini, S. K.; Terezo, A. J.; Soares, M. A.; Castilho, M. *Biosensors and Bioelectronics* 2015, 63, 407-413.
- (33) Huertas-Pérez, J. F.; Grimalz-Gracia, L.; García-Campaña, A. M.; González-Casado, A.; Martínez Vidal, J. L. *Talanta* 2005, 65, 980-985.
- (34) Sun, X.; Li, Q.; Wang, X.; Du, S. *Analytical Letters* 2012, 45, 1604-1616.
- (35) สุภาพร บังพรม, การวิเคราะห์สารกำจัดแมลงคาร์โนบฟูแรนในตัวอย่างพริกขี้หมูสด (*Capsicum frutescens* Linn.), วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี, อุบลราชธานี.
- (36) <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5521?lang=en®ion=TH>. (Accessed 11 June 2015)

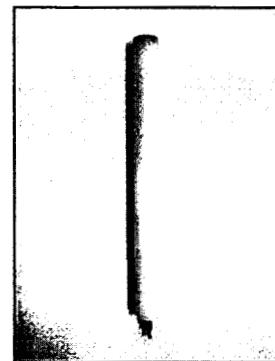
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

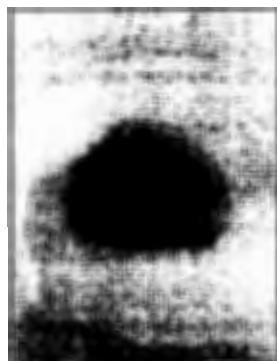
หมวด ก-1 การประกอบข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพส



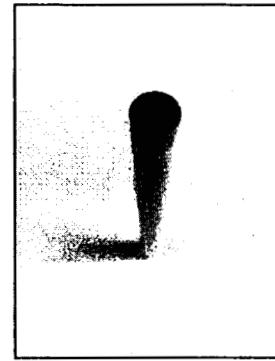
รูปที่ ก-1.1 ลวดทองแดง และ แท่งเทฟล่อน



รูปที่ ก-1.2 การประกอบข้าไฟฟ้า



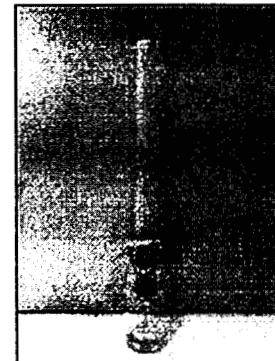
รูปที่ ก-1.3 คาร์บอนเพส



รูปที่ ก-1.4 ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพส



รูปที่ ก-1.5 การตึงเอ็นไขมอัลค่าไลน์
พอสฟາเตสนับผิวน้ำของข้าไฟฟ้า

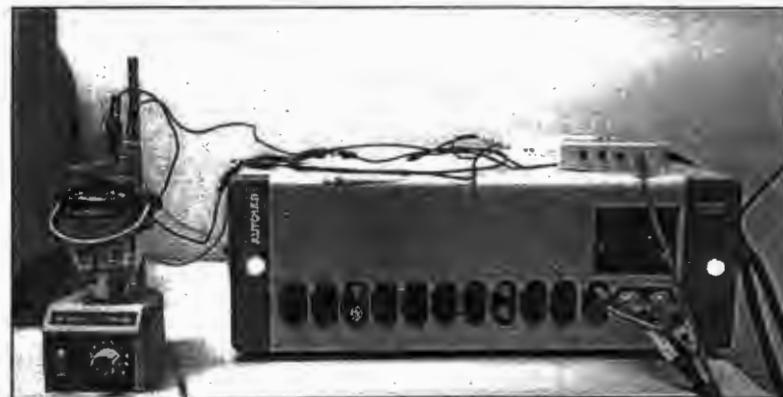


รูปที่ ก-1.6 การตึงกลูต้าลีเยร์

หมวด ก-2 การประกอบขั้วไฟฟ้าทั้งสามขั้วเข้ากับเซลล์ไฟฟ้าของเครื่องวิเคราะห์ไฟฟ้า



รูปที่ ก-2.1 การประกอบเซลล์ขั้วไฟฟ้า (1) ขั้วไฟฟ้าใช้งานการโนฟูแรนใบโอเซนเซอร์ (2) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl (3) ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (Pt)

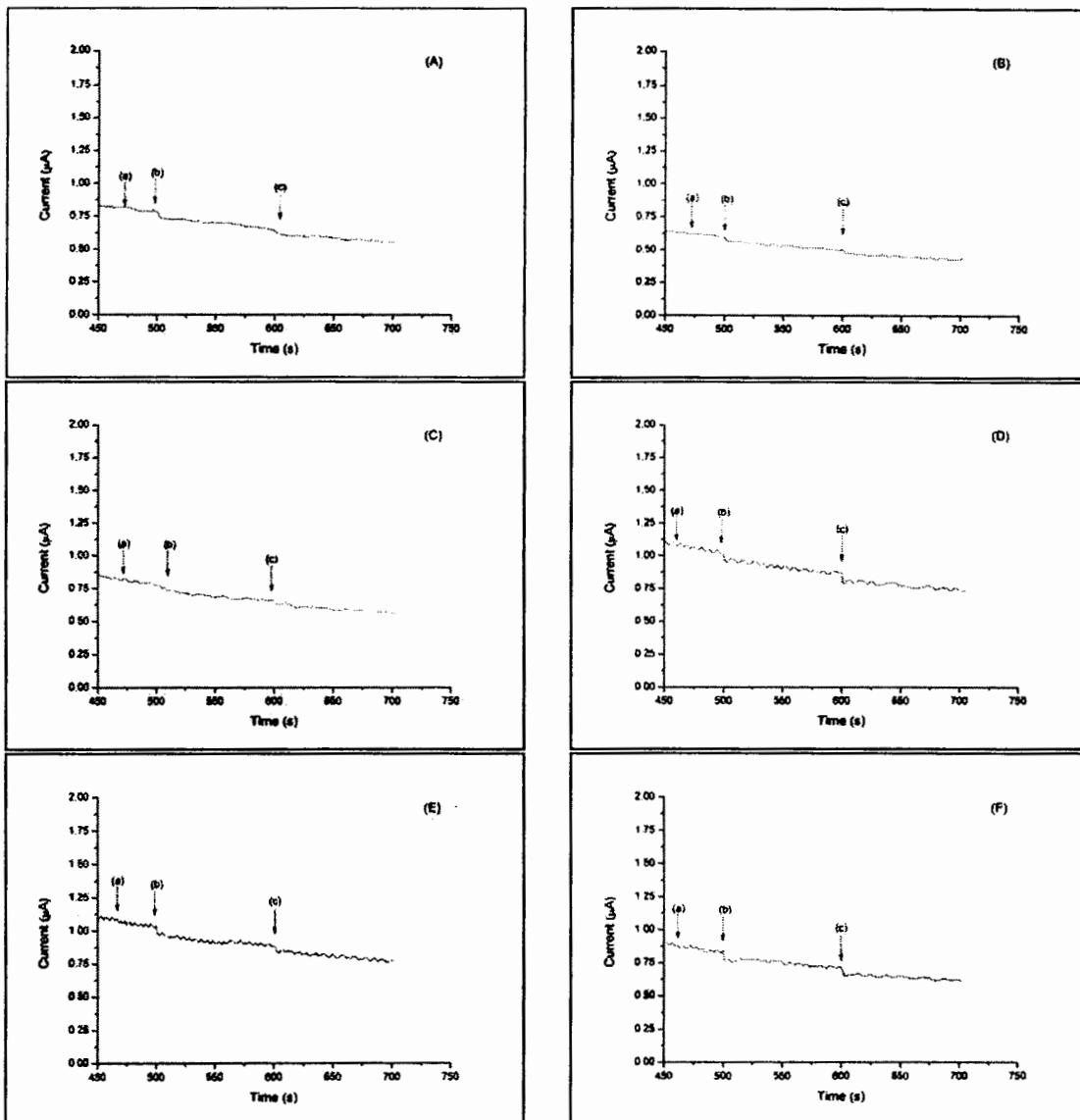


รูปที่ ก-2.2 การต่อเซลล์ขั้วไฟฟ้า (1) เข้ากับเครื่องควบคุมศักย์ไฟฟ้า

ภาคผนวก ข

**ผลการทดลองการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของใบโอเซนเชอร์
เพื่อตรวจหาปริมาณสารบีฟูแรน**

**หมวดที่ ข-1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของใบโอเซนเชอร์
หมวดที่ ข-1.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส**



รูปที่ ข-1.1 ความสันพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้ชี้วัดไฟฟ้าcurrent บนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 และ 3.6 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนเอนไซม์กับ กลูตรารัลเดไฮด์ 5 นาที ปริมาณของโบวินเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระแส +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายน้ำเดย์มีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายน้ำเดย์มีนิลฟอสเฟต 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

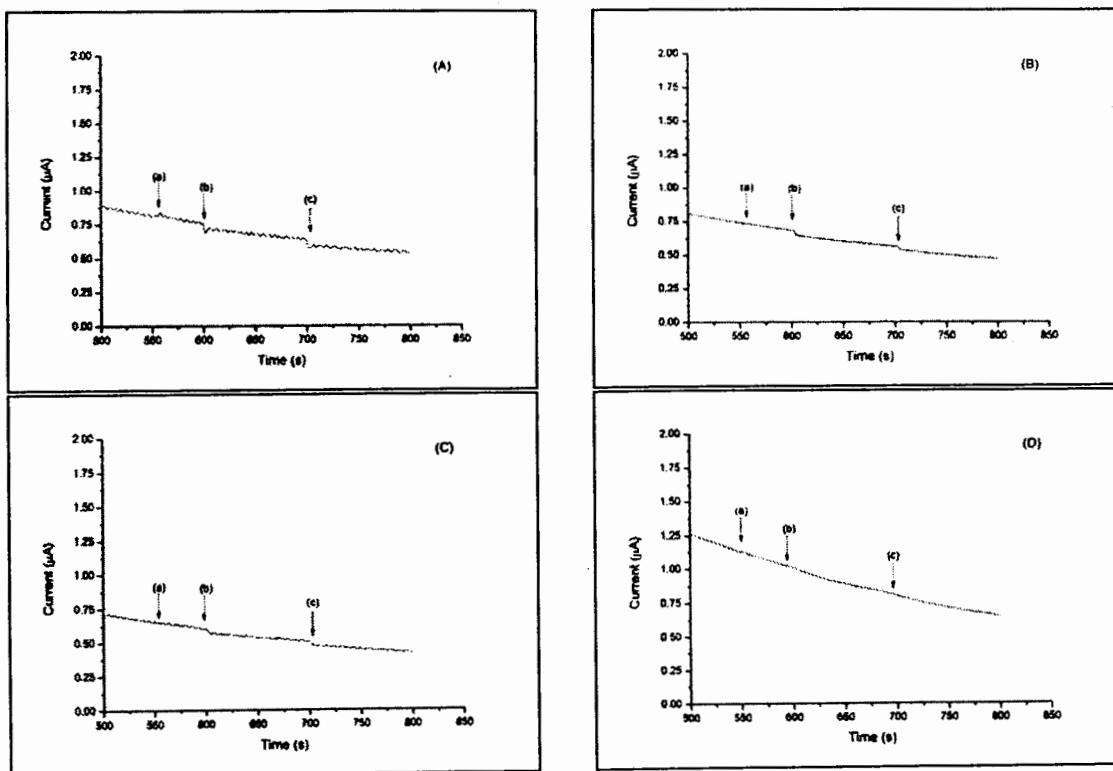
จากข้อมูลรูปที่ ข-1.1 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยังด้วยสารบีฟูแรน โดยใช้ชี้วัดไฟฟ้าcurrent บนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.1

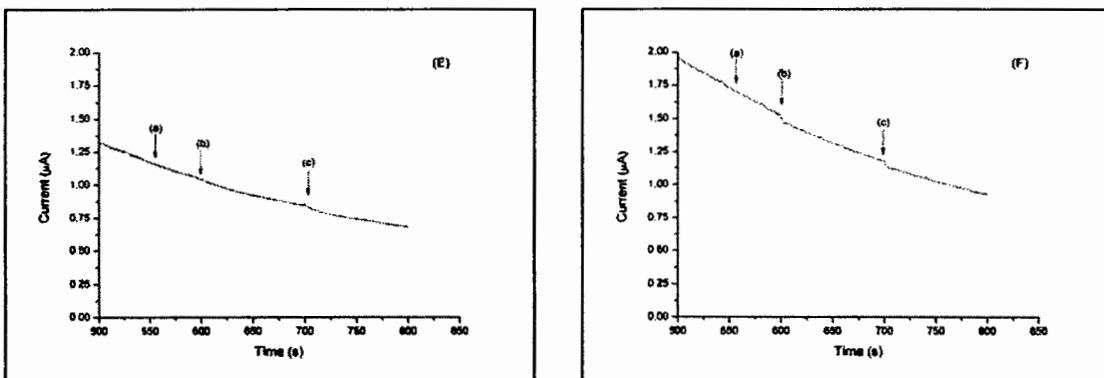
ตารางที่ ข-1.1 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการโน้มไฟฟ์และปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้ชิ้วไฟฟ้าcarbonเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครงแอมเพโรมทรี

ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (unit.cm ⁻²)	ร้อยละของการยับยั้ง (%) ^a (Mean ± SD); (n=3)
0.6	12.69 ± 1.06
1.2	12.75 ± 0.41
1.8	12.71 ± 1.20
2.4	12.99 ± 1.41
3.0	11.67 ± 0.61
3.6	12.19 ± 1.62

^aร้อยละของการยับยั้ง = (กระแสพื้นหลัง – กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-1.2 การศึกษาระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชม์กับกลูตราล็อกไฮด์





รูปที่ ข-1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชเม็กับกลูตราล็ดไฮเดรต 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณของโบวีนเร้มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอลสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายน้ำโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายน้ำฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อ

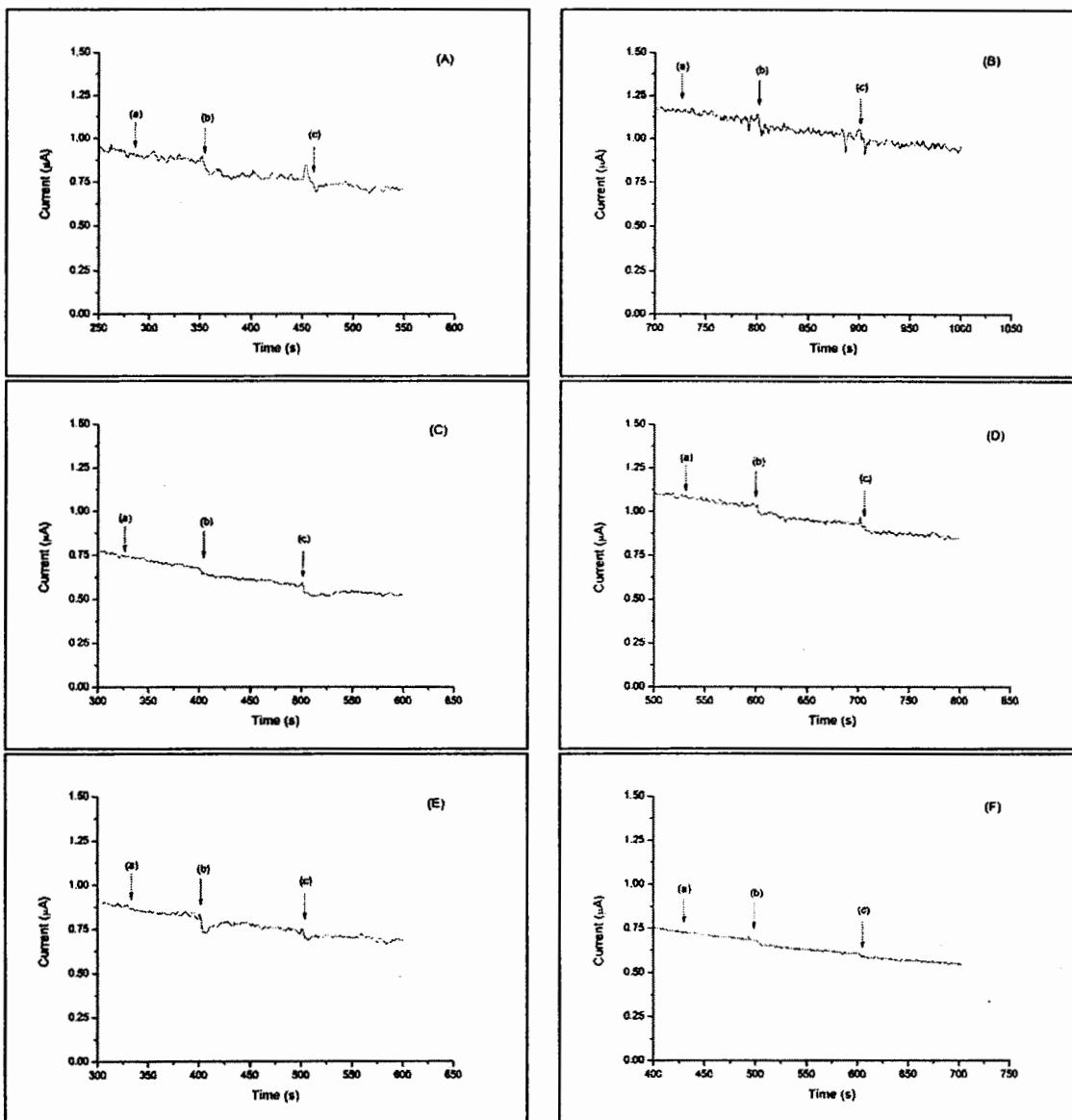
จากข้อมูลรูปที่ ข-1.2 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยังด้วยการโบฟูแรน โดยใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.2

ตารางที่ ข-1.2 ร้อยละของการยับยังด้วยการโบฟูแรนและระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชเม็กับกลูตราล็ดไฮเดรต โดยใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครงแอมเพอร์เมทรี

ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชเม็กับกลูตราล็ดไฮเดรต (min)	ร้อยละของการยับยัง (%) ^a (Mean \pm SD); (n=3)
0	14.55 \pm 0.38
5	14.01 \pm 0.54
10	15.29 \pm 0.14
15	14.54 \pm 0.01
20	13.83 \pm 0.04
30	13.95 \pm 1.02

^aร้อยละของการยับยัง = (กระแสพื้นหลัง - กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-1.3 การศึกษาปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน



รูปที่ ข-1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยมีปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสท์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟາเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไข้วาเอนไซม์กับ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ศักย์กระดุน +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายน้ำโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายน้ำเบลงค์, (c) สารละลายน้ำโรบฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากข้อมูลรูปที่ ข-1.3 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยังด้วยการโรบฟูแรน โดยใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสท์ที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟາเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.3

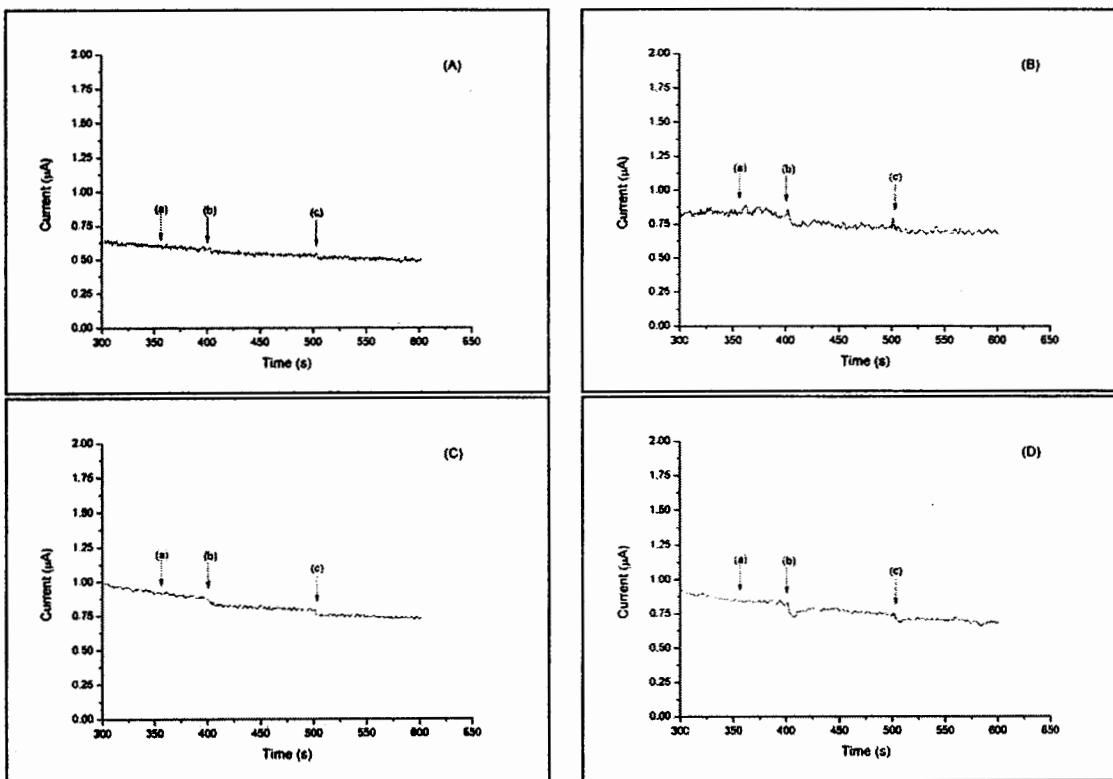
ตารางที่ ข-1.3 ร้อยละของการยับยั้งด้วยคาร์บอฟูเรนและปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน โดยใช้ข้าไฟฟ้า คาร์บอนเพสท์ริงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพромิตรี

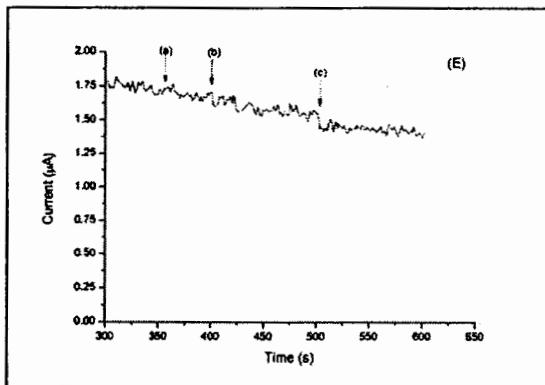
ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน (% w/v) ^b	ร้อยละของการยับยั้ง (%) ^a (Mean \pm SD); (n=3)
0	7.92 \pm 2.28
2	8.07 \pm 4.68
4	8.17 \pm 2.67
6	8.21 \pm 0.32
8	8.99 \pm 0.34
10	7.96 \pm 1.73

^a ร้อยละของการยับยั้ง = (กระแสพื้นหลัง – กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

^b ร้อยละของปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมินในสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส = (ปริมาณโบวีนเซรัมอัลบูมิน/สารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส)*100

หมวดที่ ข-1.4 การศึกษาปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต





รูปที่ ข-1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้ปริมาณไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต เข้มข้น 1300, 2600, 3850, 5000 และ 6300 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสท์ที่รึงด้วย เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว้ก่อนใช้เมมbrane กลุ่มตัวอย่าง ไอล์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเซรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักย์กระตุ้น +0.75 โวลต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลรงค์, (c) สารละลายการ์โบฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

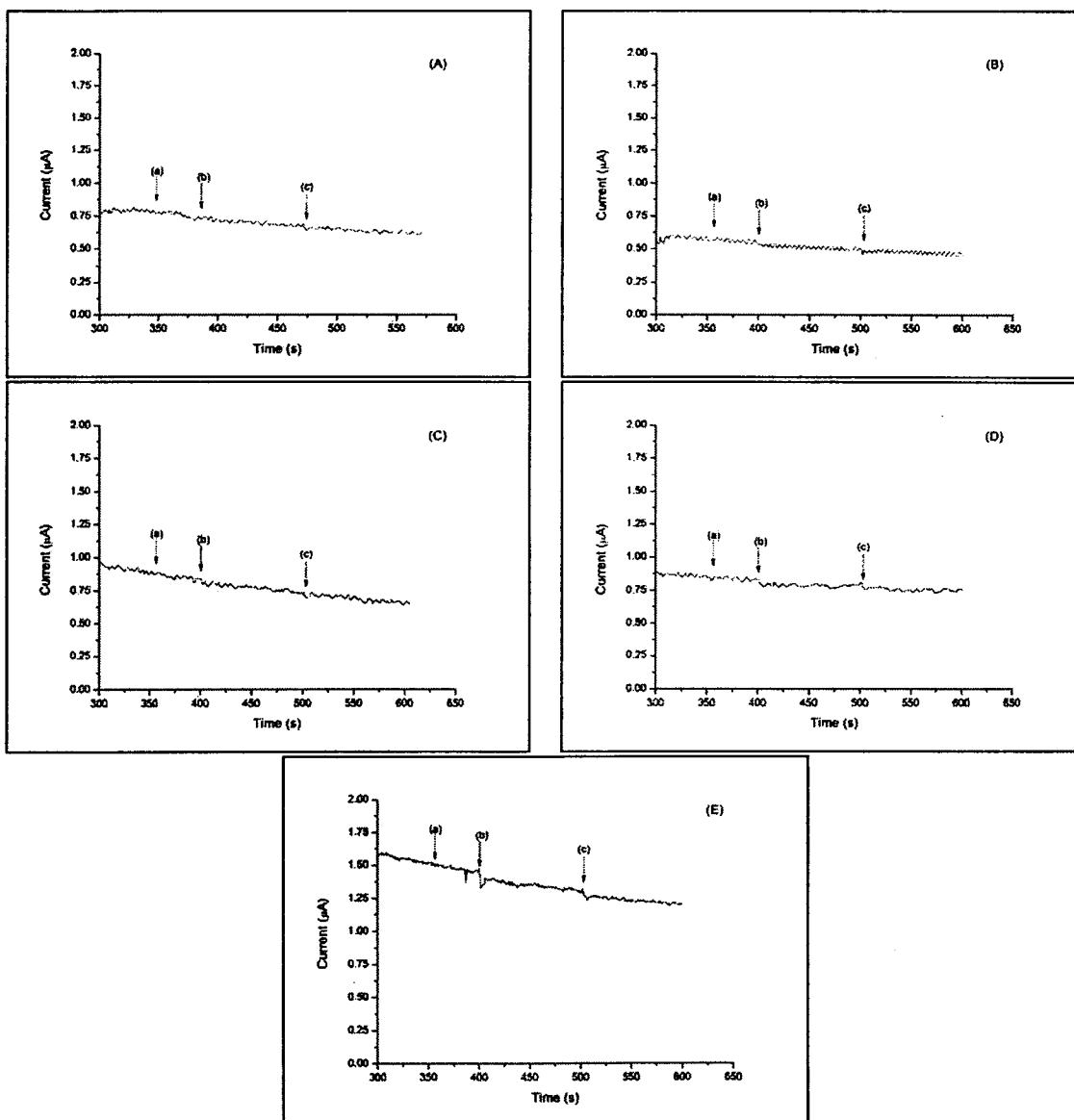
จากข้อมูลรูปที่ ข-1.4 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งด้วยการ์โบฟูแรน โดยใช้ ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสท์ที่รึงด้วยเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.4

ตารางที่ ข-1.4 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการ์โบฟูแรนและปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต โดยใช้ ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสท์ที่รึงด้วยเอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคໂຄโนແອມເໂຮມທີ່

ปริมาณของไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต (mg.L ⁻¹)	ร้อยละของการยับยั้ง (%) ^a (Mean ± SD); (n=3)
1300	7.99 ± 1.58
2600	7.99 ± 1.22
3850	8.29 ± 0.63
5000	8.99 ± 0.34
6250	8.50 ± 0.39

^aร้อยละของการยับยั้ง = (กระแสพื้นหลัง - กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-1.5 การศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์



รูปที่ ข-1.5 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ระยะเวลาในการเชื่อมไขว่อนไชม์กับ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวีนเชรัมอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ศักยกรรมตุ้น $+0.75$ โวลต์ โดย (a) สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลรงค์, (c) สารละลายคาร์ボฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

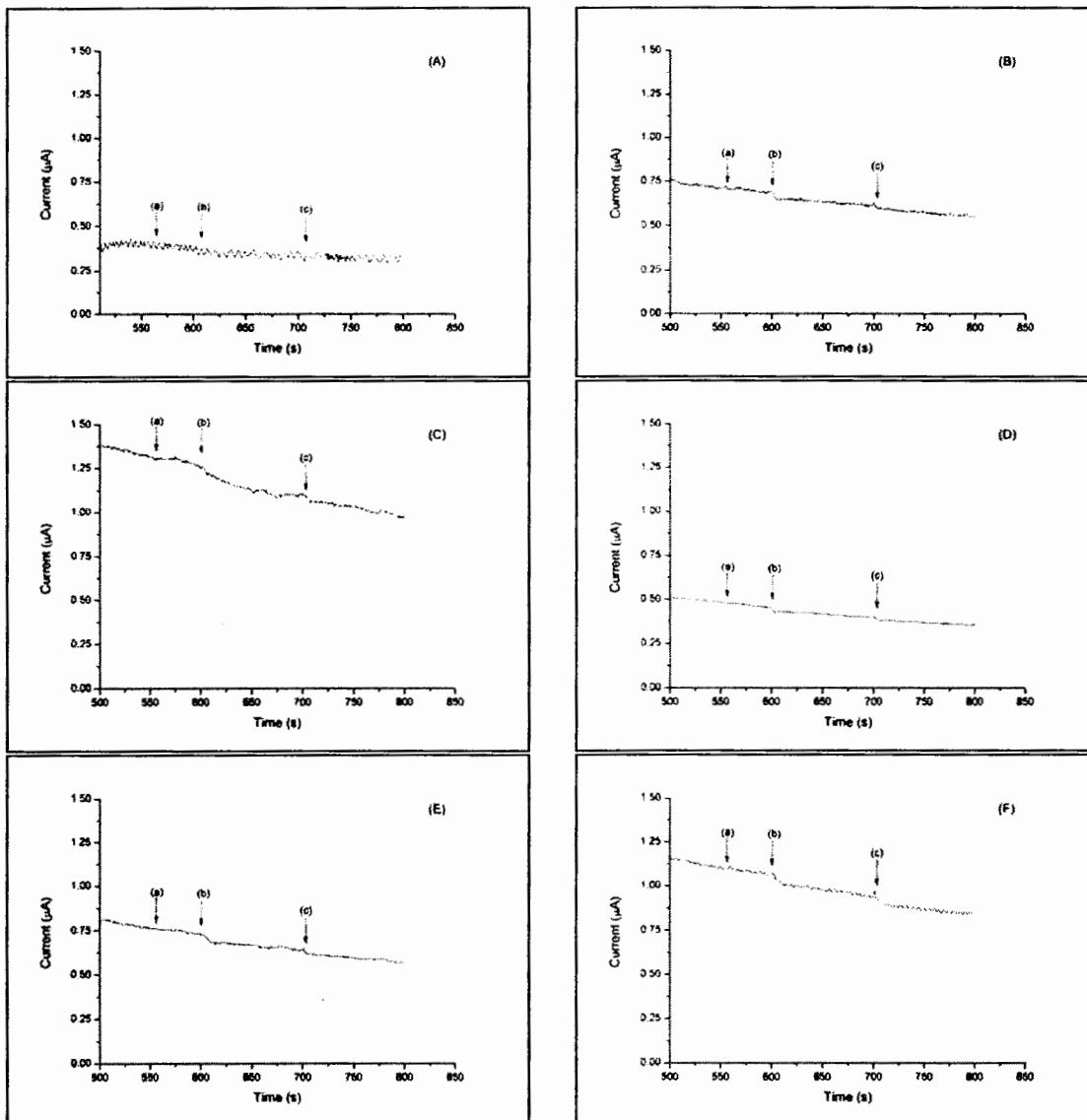
จากข้อมูลรูปที่ ข-1.5 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยังด้วยการโบวีน โดยใช้ข้าไฟฟ้าคาร์บอนเพสที่ตรึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.5

ตารางที่ ข-1.5 ร้อยละของการยับยังด้วยคาร์บอฟูรานและ pH ของสารละลายน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้ชิ่วไฟฟ้าかるบนเพสทีติงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโคลโนแอมเพอโรเมทรี

pH ของสารละลายน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ร้อยละของการยับยัง (%) ^a (Mean ± SD); (n=3)
7.0	9.49 ± 0.71
7.5	10.14 ± 0.84
8.0	10.16 ± 0.09
8.5	10.71 ± 0.31
9.0	8.32 ± 1.83

^aร้อยละของการยับยัง = (กระแสพื้นหลัง – กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-1.6 การศึกษาศักย์กระแสที่เหมาะสม



รูปที่ ข-1.6 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้ศักย์กระแสที่ $+0.600$, $+0.700$, $+0.725$, $+0.750$, $+0.775$ และ $+0.800$ โวลต์ ตามลำดับ ใช้ข้าไฟฟ้าcarbonเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ระยะเวลาในการเชื่อมไข้ว่อนไชม์กับ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของใบวีนเชร์ร์มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายน้ำโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายน้ำแอลกอฮอล์, (c) สารละลายน้ำโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

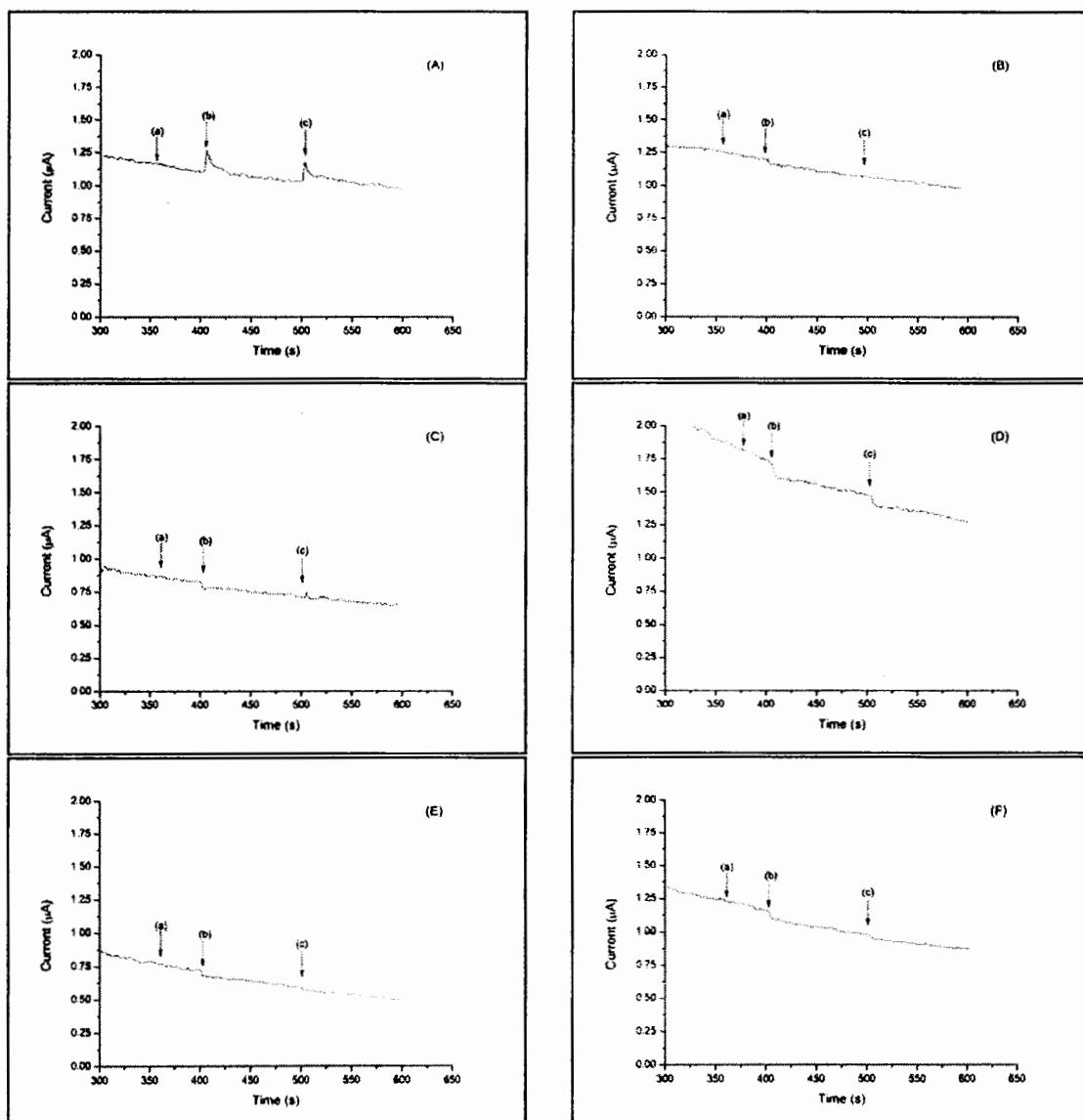
จากข้อมูลรูปที่ ข-1.6 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งด้วยการใบฟูแรน โดยใช้ข้าไฟฟ้าcarbonเพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.6

ตารางที่ ข-1.6 ร้อยละของการยับยั้งด้วยการใบฟูแรนและศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม โดยใช้ข้าวไฟฟ้าcarbон เพสที่ตึงด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโตรเมทรี

ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสม (V vs Ag/AgCl)	ร้อยละของการยับยั้ง (%) ^a (Mean \pm SD); (n=3)
+0.600	7.56 \pm 0.96
+0.700	10.04 \pm 0.17
+0.725	13.30 \pm 0.66
+0.750	14.96 \pm 0.64
+0.775	10.26 \pm 0.56
+0.800	9.64 \pm 0.27

^aร้อยละของการยับยั้ง = (กระแสพื้นหลัง – กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-1.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม



รูปที่ ข-1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกระแสและเวลา โดยใช้อุณหภูมิระบบในการวิเคราะห์ 20, 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้ชี้ไฟฟ้าcarbonเพสที่ตระหง่านไชเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1.2 ยูนิตต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ระยะเวลาในการเชื่อมไขว่อนไชเมอร์กับ กลูตารัลดีไฮด์ 10 นาที ปริมาณของโบวินเชร์มอัลบูมิน ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 โดย (a) สารละลายไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟต 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร, (b) สารละลายแบลังค์, (c) สารละลายคาร์บอฟูแรน 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากข้อมูลรูปที่ ข-1.7 สามารถนำข้อมูลมาคำนวณหาร้อยละของการยับยังด้วยการ์บอฟูแรน โดยใช้ชี้ไฟฟ้าcarbonเพสที่ตระหง่านไชเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ข้อมูลดังตารางที่ ข-1.7

ตารางที่ ข-1.7 ร้อยละของการยับยังด้วยการ์บอฟูแรนและอุณหภูมิ โดยใช้ชี้ไฟฟ้าcarbonเพสที่ตระหง่านไชเมอร์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาด้วยเทคนิคโครโนแอมเพромิตร

อุณหภูมิ (°C)	ร้อยละของการยับยัง (%) ^a (Mean ± SD); (n=3)
20	5.80 ± 1.94
25	8.09 ± 0.81
30	10.11 ± 1.19
35	11.56 ± 1.33
37	13.31 ± 0.87
40	11.60 ± 1.35

^aร้อยละของการยับยัง = (กระแสพื้นหลัง – กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-2 ศึกษาประเมินการทำงานของใบโอะเซนเซอร์

หมวดที่ ข-2.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์การ์บอฟูแรน

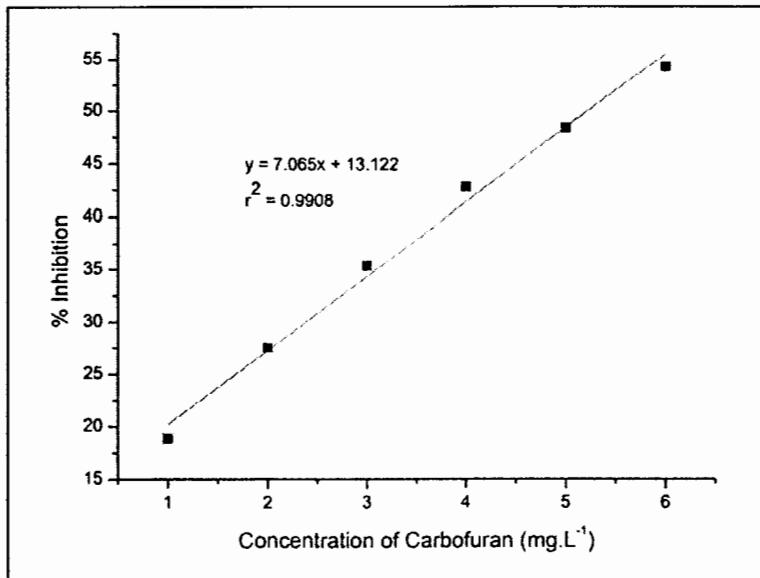
ตารางที่ ข-2.1 ร้อยละการยับยังและความเข้มข้นของการ์บอฟูแรน ช่วง 2.98 ถึง 30.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของการ์บอฟูแรน (mg.L ⁻¹)	ร้อยละการยับยังเฉลี่ย (%) ^a (Mean±SD)
1	18.06 ± 2.65
2	26.43 ± 3.70
3	34.34 ± 3.44
4	42.04 ± 2.61
5	48.02 ± 1.18
6	54.35 ± 0.22

^aร้อยละของการยับยัง = (กระแสพื้นหลัง – กระแสที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา)/กระแสพื้นหลัง*100

หมวดที่ ข-2.2 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

จากตารางที่ ข-2.1 นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาขีดจำกัดในการตรวจพบปริมาณการโบฟูเรน ดังรูป ข-2.1



รูปที่ ข-2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของสารโบฟูเรน ตั้งแต่ 1 ถึง 6 มิลลิกรัม ตอลิตร ตรวจวัดด้วยคาร์บอนเพสท์ริงด้วยสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟაเตส

จากรูปที่ ข-2.1 และตารางที่ ข-2.1 สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบปริมาณการโบฟูเรน ดังนี้

วิธีการคำนวณ

$$\text{จาก } \text{Detection limit} = \frac{3SD}{\text{Slope}}$$

จากรูปที่ ข-2.1 ให้ค่าความชัน (Slope) = 7.07 (%. $\text{mg}^{-1}.\text{L}$)

จากตารางที่ ข-2.1 ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของร้อยละการยับยั้ง ที่ความ

$$\text{เข้มข้น } 1 \text{ mg.L}^{-1} = 2.65$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า Detection limit} &= \frac{3 \times 2.65 (\%)}{7.07 (\%.\text{mg}^{-1}.\text{L})} \\ &= 1.12 \text{ mg.L}^{-1} \end{aligned}$$

ดังนั้น ขีดจำกัดในการตรวจพบปริมาณการโบฟูเรน เท่ากับ 1.12 mg.L^{-1}

หมวดที่ ข-2.3 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ

จากรูปที่ ข-2.1 และตารางที่ ข-2.1 สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณการโบฟูเรน ดังนี้

วิธีการคำนวณ

$$\text{จาก } \text{Quantification limit} = \frac{10SD}{\text{Slope}}$$

จากรูปที่ ข-2.1 ให้ค่าความชัน (Slope) = 7.07 (%. $\text{mg}^{-1}.\text{L}$)

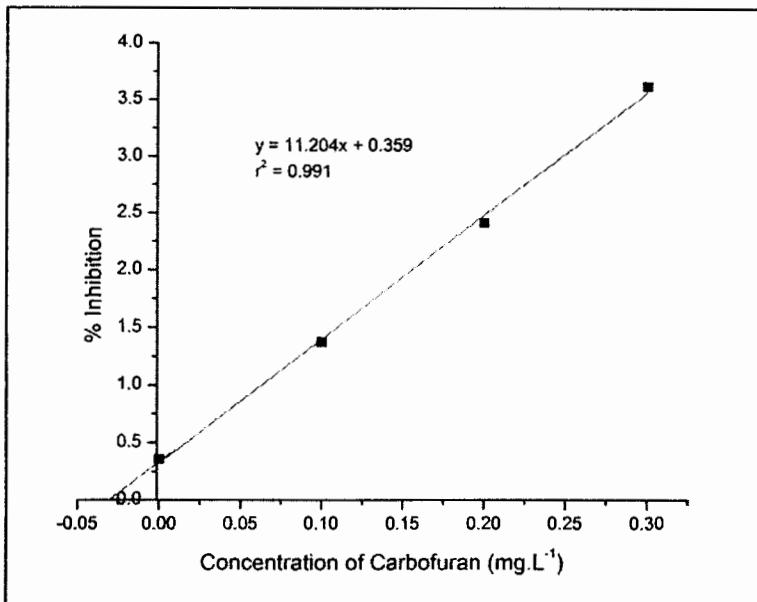
จากตารางที่ ข-2.1 ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของร้อยละการยับยั้ง ที่ความเข้มข้น 1 mg.L^{-1} = 2.65

$$\begin{aligned}\text{แทนค่า Quantification limit} &= \frac{10 \times 2.65 (\%)}{7.07 (\%. \text{mg}^{-1}. \text{L})} \\ &= 3.75 \text{ mg.L}^{-1}\end{aligned}$$

ดังนั้น ขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณสารบีฟูแรน เท่ากับ 3.75 mg.L^{-1}

หมวดที่ ข-2.4 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารบีฟูแรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ

หมวดที่ ข-2.4.1 วิเคราะห์ปริมาณสารบีฟูแรนในข้าวหอมมะลิ # 4



รูปที่ ข-2.2 ความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งกับปริมาณสารบีฟูแรน 0 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

ตารางที่ ข-2.2 ร้อยละการยับยั้งและปริมาณสารบีฟูแรนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารบีฟูแรน (mg.L^{-1})	ร้อยละการยับยั้งที่ได้จากการยับยั้งด้วยสารบีฟูแรน (%)
0.0	0.36
0.1	1.33
0.2	2.39
0.3	3.70

จากข้อมูลตารางที่ ข-2.2 และรูปที่ ข-2.2 สามารถคำนวณหาปริมาณสารบีฟูแรนในข้าวหอมมะลิ # 4 แสดงการคำนวณ ดังนี้

แสดงตัวอย่างวิธีการคำนวณ

จากสมการเส้นตรง

$$y = 11.20x + 0.36$$

$$r^2 = 0.991$$

แทนค่า

$$y = 0$$

$$0 = 11.20x + 0.36$$

จะได้

$$x = 0.032 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นปริมาณคาร์บอฟูรานที่มีอยู่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร มีปริมาณ 0.032 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปีเปตจากสารสกัดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร

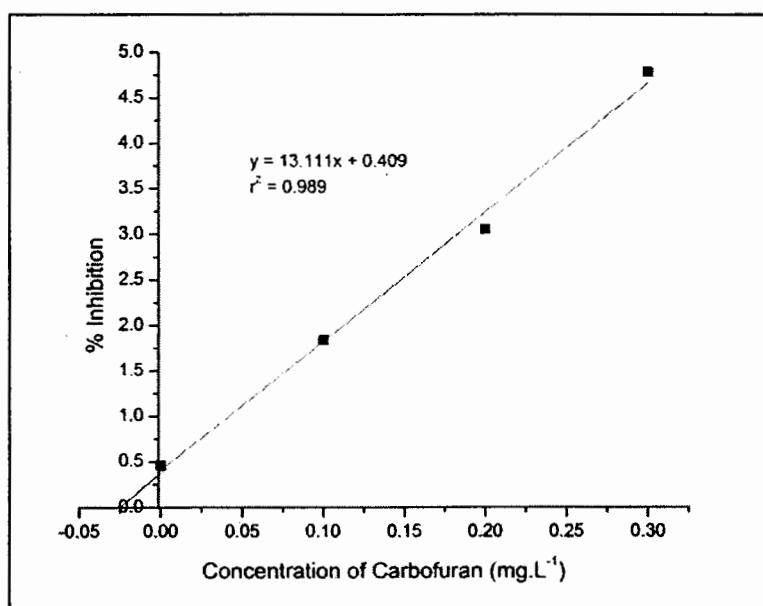
จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(32 \mu\text{g.L}^{-1})(5.0 \text{ mL}) = C_2 \times (0.1 \text{ mL})$$

$$C_2 = 1.6 \text{ mg.L}^{-1}$$

ดังนั้นในข้าวห้อมมะลิ # 4 มีปริมาณคาร์บอฟูรานที่วิเคราะห์ได้ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

หมวดที่ ข-2.4.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูรานในข้าวห้อมมะลิ # 5



รูปที่ ข-2.3 ความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งกับปริมาณคาร์บอฟูราน 0 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

ตารางที่ ข-2.3 ร้อยละการยับยั้งและปริมาณคาร์บอฟูเรนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของคาร์บอฟูเรน (mg.L ⁻¹)	ร้อยละการยับยั้งที่ได้จากการยับยั้ง ด้วยคาร์บอฟูเรน (%)
0.0	0.46
0.1	1.84
0.2	3.05
0.3	4.78

จากข้อมูลตารางที่ ข-2.3 และรูปที่ ข-2.3 สามารถคำนวณหาปริมาณคาร์บอฟูเรนในข้าวหอมมะลิ # 5 แสดงการคำนวณ ดังนี้

แสดงตัวอย่างวิธีการคำนวณ

$$\text{จากสมการเส้นตรง} \quad y = 13.11x + 0.41 \quad r^2 = 0.989$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = 0$$

$$0 = 13.11x + 0.41$$

$$\text{จะได้} \quad x = 0.031 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นปริมาณคาร์บอฟูเรนที่มีอยู่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร มีปริมาณ 0.031 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปีเปตจากสารสกัดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร

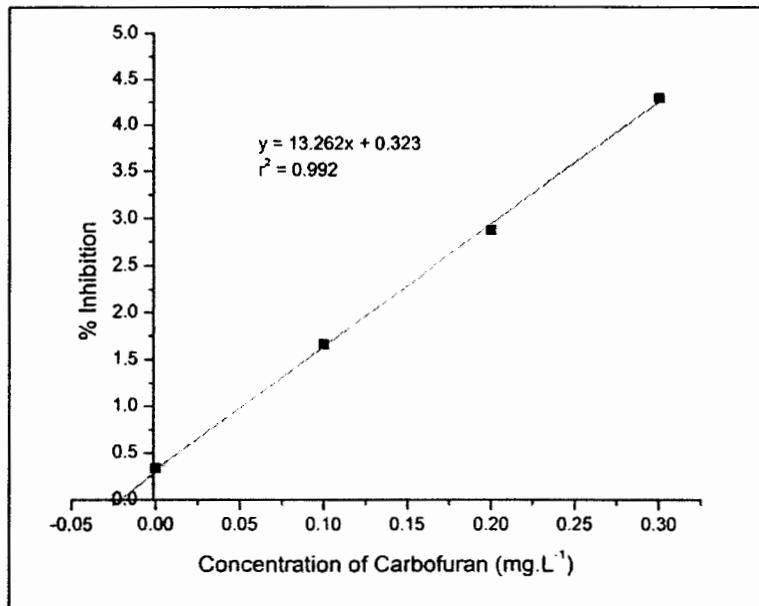
$$\text{จาก} \quad C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(31 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1})(5.0 \text{ mL}) = C_2 \times (0.1 \text{ mL})$$

$$C_2 = 1.55 \text{ mg.L}^{-1}$$

ดังนั้นในข้าวหอมมะลิ # 5 มีปริมาณคาร์บอฟูเรนที่วิเคราะห์ได้ 1.55 มิลลิกรัมต่อลิตร

หมวดที่ ข-2.4.3 วิเคราะห์ปริมาณการโบฟูแรนในข้าวหอมมะลิ # 6



รูปที่ ข-2.4 ความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งกับปริมาณการโบฟูแรน 0 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง

ตารางที่ ข-2.4 ร้อยละการยับยั้งและปริมาณการโบฟูแรนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของการโบฟูแรน (mg.L⁻¹)	ร้อยละการยับยั้งที่ได้จากการยับยั้งด้วยสารโบฟูแรน (%)
0.0	0.31
0.1	1.70
0.2	2.88
0.3	4.30

จากข้อมูลตารางที่ ข-2.4 และรูปที่ ข-2.4 สามารถคำนวณหาปริมาณการโบฟูแรนในข้าวหอมมะลิ # 6 แสดงการคำนวณ ดังนี้

แสดงตัวอย่างวิธีการคำนวณ

$$\text{จากสมการเส้นตรง } y = 13.26x + 0.32 \quad r^2 = 0.992$$

$$\text{แทนค่า } y = 0$$

$$0 = 13.26x + 0.32$$

$$\text{จะได้ } x = 0.024 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นปริมาณการโบฟูแรนที่มีอยู่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร มีปริมาณ 0.024 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปีเปตจากสารสกัดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร

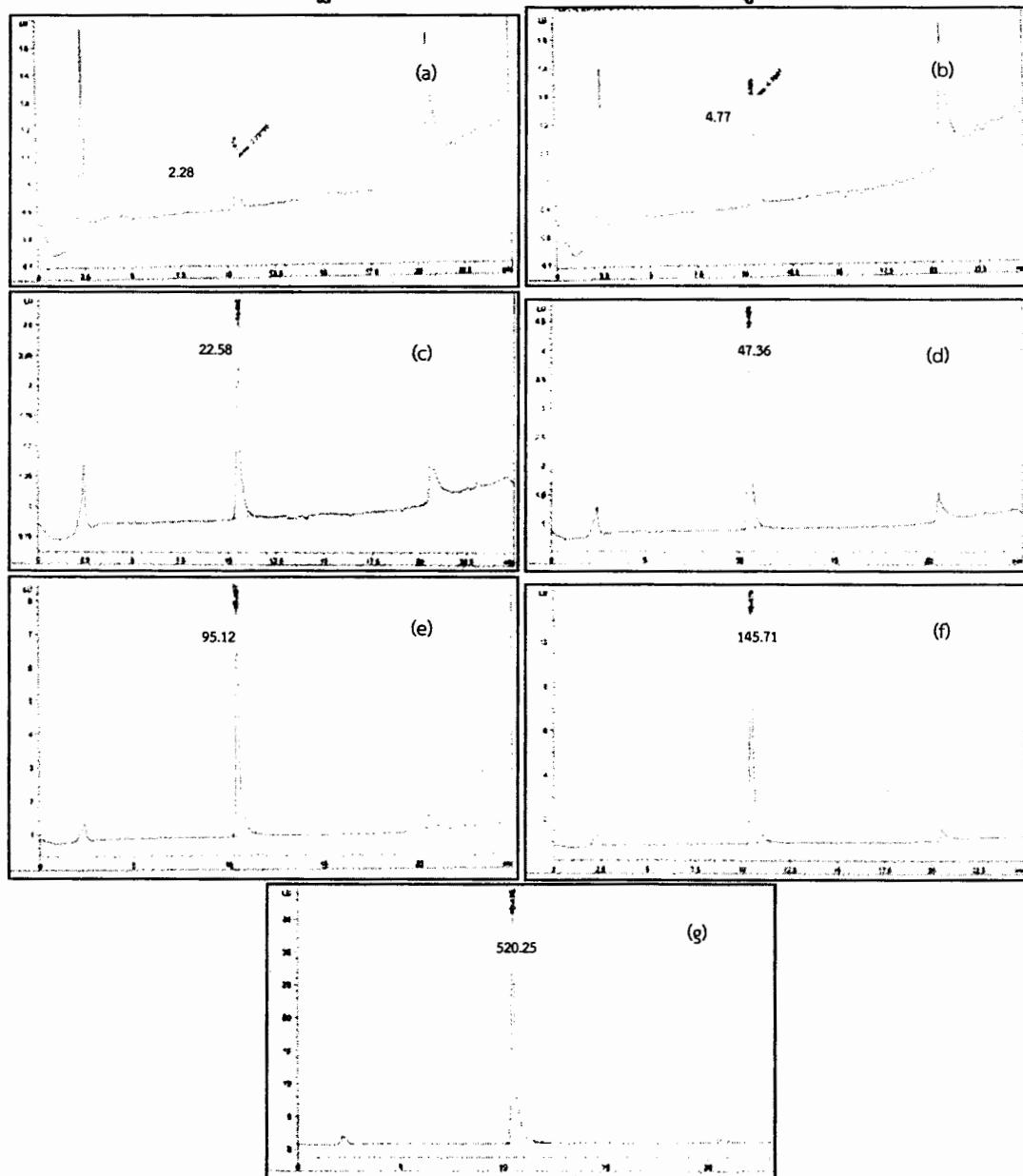
$$\begin{aligned} \text{จาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (24 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1})(5.0 \text{ mL}) &= C_2 \times (0.1 \text{ mL}) \end{aligned}$$

$$C_2 = 1.2 \text{ mg.L}^{-1}$$

ดังนั้นในข้าวหอมมะลิ # 6 มีปริมาณสารใบฟูแรนที่วิเคราะห์ได้ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

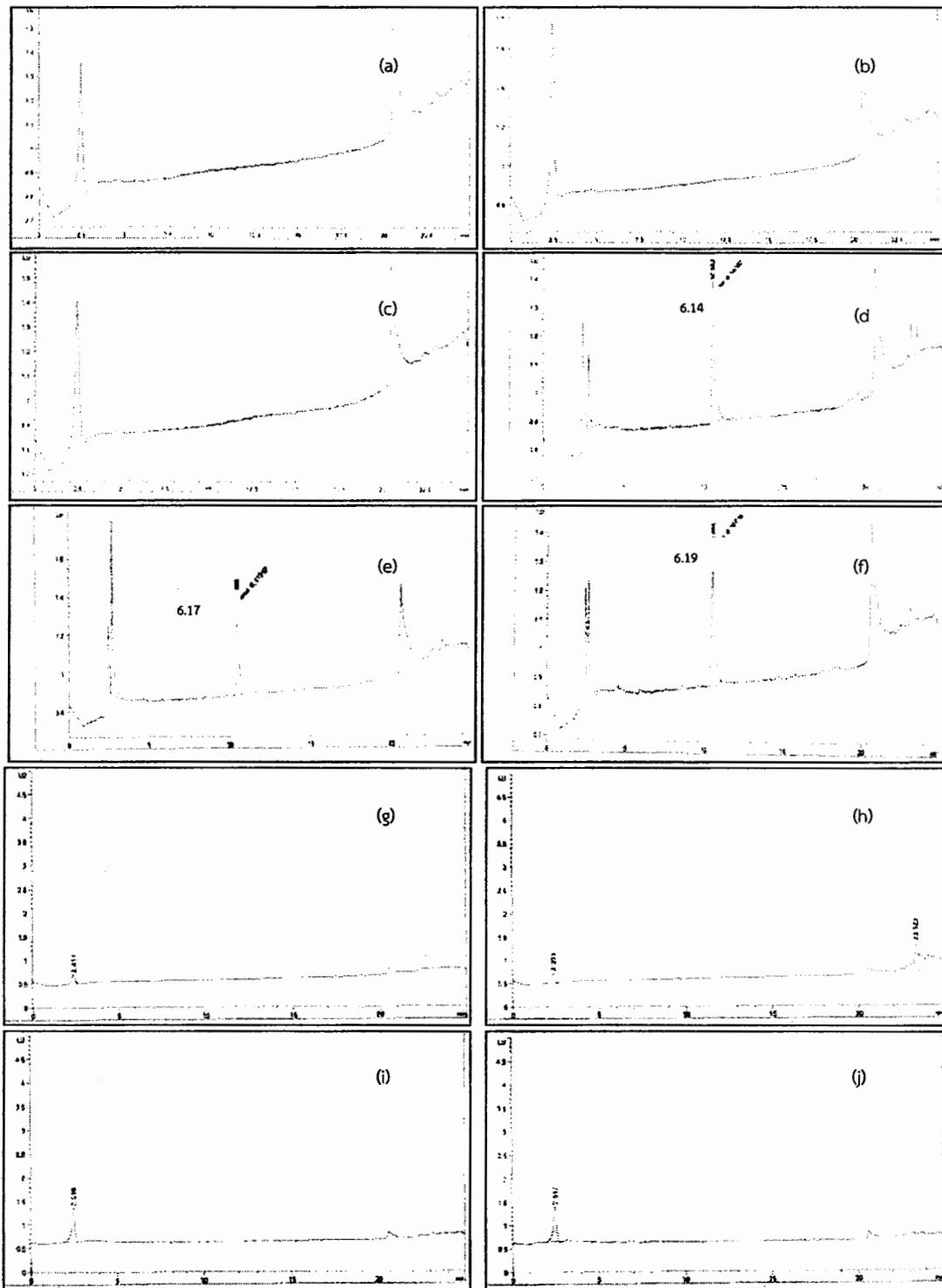
หมวดที่ ข-3 การหาปริมาณสารใบฟูแรนด้วยเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง และเทคนิคการวัดสี

หมวดที่ 3.1 เทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง

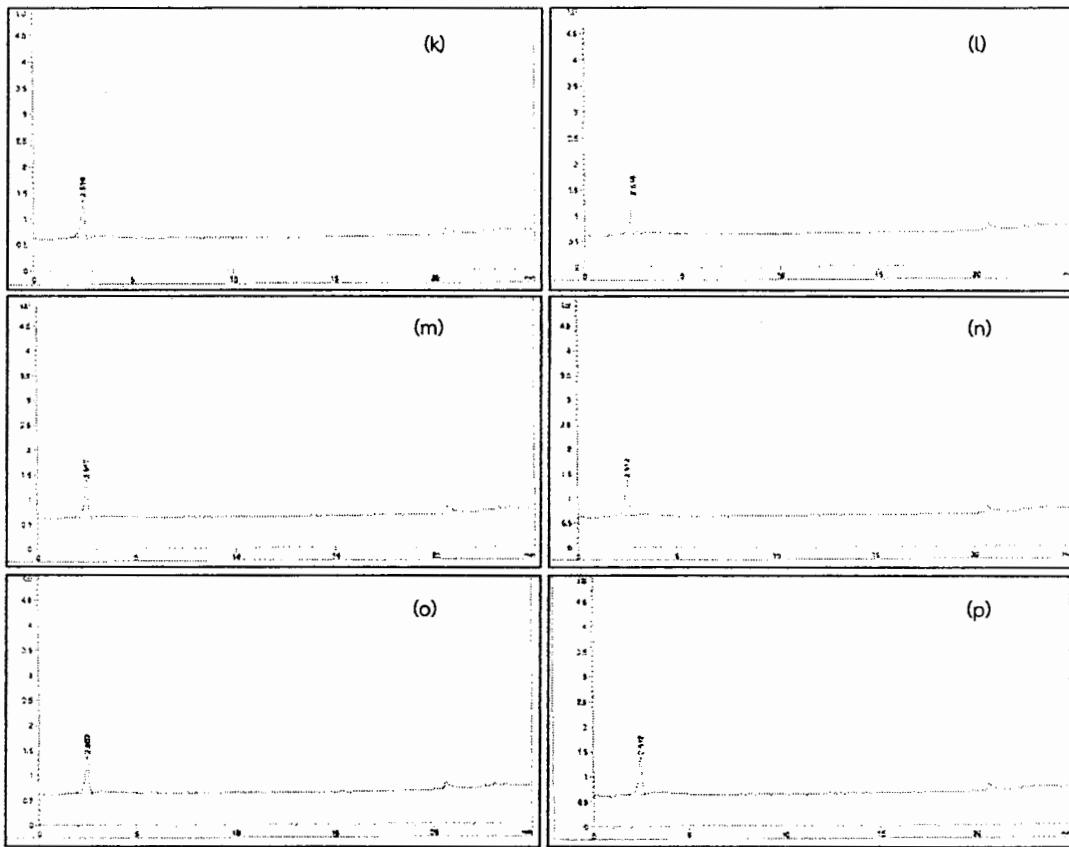


รูปที่ ข-3.1 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารมาตรฐานสารใบฟูแรน : (a) 0.5, (b) 1.0, (c) 5.0, (d) 10.0, (e) 20.0, (f) 30.0 และ (g) 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดจากข้าวหอมมะลิ ได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ ข-3.2



รูปที่ ข-3.2 โปรแกรมของกราฟวิเคราะห์สารสกัดจากข้าวหอมมะลิ (a) ข้าวหอมมะลิ # 1, (b) ข้าวหอมมะลิ # 2, (c) ข้าวหอมมะลิ # 3, (d) ข้าวหอมมะลิ # 4, (e) ข้าวหอมมะลิ # 5, (f) ข้าวหอมมะลิ # 6, (g) ข้าวหอมมะลิ # 7, (h) ข้าวหอมมะลิ # 8, (i) ข้าวหอมมะลิ # 9 และ (j) ข้าวหอมมะลิ # 10



รูปที่ ข-3.2 (ต่อ) โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารสกัดจากข้าวหอมมะลิ (k) ข้าวหอมมะลิ # 11, (l) ข้าวหอมมะลิ # 12, (m) ข้าวหอมมะลิ # 13, (n) ข้าวหอมมะลิ # 14, (o) ข้าวหอมมะลิ # 15 และ (p) ข้าวหอมมะลิ # 16

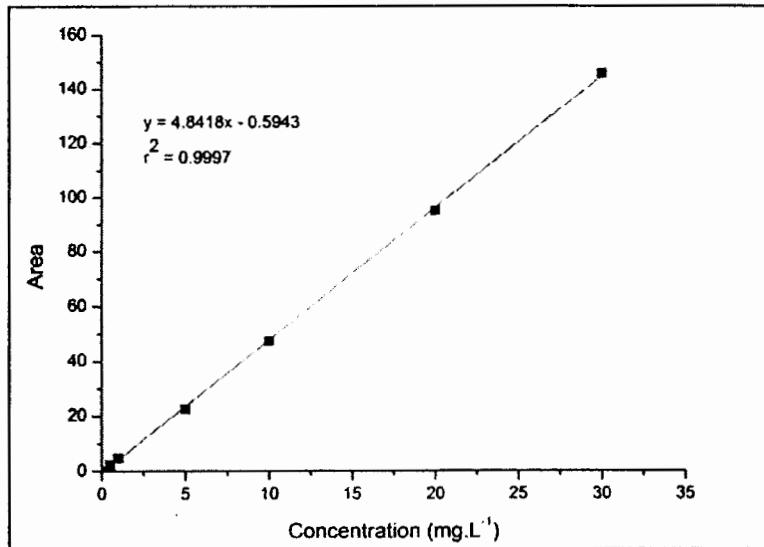
ตารางที่ ข-3.1 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานการใบฟูแรน จากเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สารมาตรฐานการใบฟูแรน (mg L^{-1})	พื้นที่พีค (Peak area)
0.5	2.28
1.0	4.77
5.0	22.58
10.0	47.36
20.0	95.12
30.0	145.71
100.0	520.25
ข้าวหอมมะลิ # 1	ND.
ข้าวหอมมะลิ # 2	ND.

สารมาตรฐานคาร์บอฟูเรน (mg.L ⁻¹)	พื้นที่พีค (Peak area)
ข้าวห้อมมะลิ # 3	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 4	6.14
ข้าวห้อมมะลิ # 5	6.17
ข้าวห้อมมะลิ # 6	6.19
ข้าวห้อมมะลิ # 7	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 8	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 9	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 10	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 11	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 12	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 13	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 14	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 15	ND.
ข้าวห้อมมะลิ # 16	ND.

ND. = non detection

จากตารางนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้



รูปที่ ข-3.3 ความสัมพันธ์ของพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของการใบฟูเรน

ตารางที่ ข-3.2 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากข้าวหอมมะลิที่ทำการเติมปริมาณคาร์บอฟูแรน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจากเทคนิคมาตรฐานໂຄຣມາໂຕກຣາຟของเหลวสมรรถนะสูง

สารสกัดจากข้าวหอมมะลิ	ปริมาณคาร์บอฟูแรน (mg.L^{-1})
ข้าวหอมมะลิ # 4	1.39
ข้าวหอมมะลิ # 5	1.40
ข้าวหอมมะลิ # 6	1.40

หมวดที่ ข-4 เปรียบเทียบร้อยละการยับยั้ง habromycin ด้วยใบโอลเซนเชอร์ที่พัฒนาขึ้นกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคมาตรฐานໂຄຣມາໂຕກຣາຟของเหลวสมรรถนะสูง

จากการวิเคราะห์ habromycin ด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่าง ได้นำค่าปริมาณคาร์บอฟูแรนที่วิเคราะห์ได้ ตั้งตารางที่ ข-3.1 ถึง ข-3.3 เปรียบเทียบกับปริมาณคาร์บอฟูแรนที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคมาตรฐานໂຄຣມາໂຕກຣາຟของเหลวสมรรถนะสูง ด้วยสถิติ t-test

หมวดที่ ข-4.1 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูแรนในข้าวหอมมะลิ # 4

ตารางที่ ข-4.1 ปริมาณคาร์บอฟูแรนที่วิเคราะห์ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยใบโอลเซนเชอร์ที่พัฒนาขึ้น

ครั้งที่	ปริมาณคาร์บอฟูแรน (mg.L^{-1})
1	1.60
2	1.45
3	1.52
\bar{x}	1.52
SD	0.08

วิธีการคำนวณ

ค่าจริงของปริมาณคาร์บอฟูแรนที่ได้จากเทคนิคมาตรฐานໂຄຣມາໂຕກຣາຟของเหลวสมรรถนะสูงเท่ากับ 1.39

$$\text{จากสมการ } t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{S} \sqrt{N}$$

$$\text{แทนค่า } t = \frac{|1.52 - 1.39|}{0.08} \sqrt{3}$$

$$t = 2.81$$

เมื่อได้ค่า $t_{\text{calculated}}$ เท่ากับ 2.81 นำมาเปรียบเทียบกับ $t_{\text{tabulated}}$ มีค่าเท่ากับ 4.30 ที่ degree of freedom = 2 ระดับความเชื่อมั่น 95% พบร่วมกันว่า $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า $t_{\text{tabulated}}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีใบโอลเซนเชอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมวดที่ ข-4.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูเรนในข้าวหอมมะลิ # 5

ตารางที่ ข-4.2 ปริมาณคาร์บอฟูเรนที่วิเคราะห์ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยใบโอลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

ครั้งที่	ปริมาณคาร์บอฟูเรน (mg.L^{-1})
1	1.54
2	1.56
3	1.20
\bar{x}	1.43
SD	0.20

วิธีการคำนวณ

ค่าจริงของปริมาณคาร์บอฟูเรนที่ได้จากการทดสอบโดยใช้เทคนิคมาตรฐานโครงการพืชของหลวงสมรรถนะสูง เท่ากับ 1.40

จากสมการ $t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\frac{s}{\sqrt{N}}}$

แทนค่า $t = \frac{|1.43 - 1.40|}{\frac{0.20}{\sqrt{3}}}$

$$t = 0.26$$

เมื่อได้ค่า $t_{\text{calculated}}$ เท่ากับ 0.26 นำมาเปรียบเทียบกับ $t_{\text{tabulated}}$ มีค่าเท่ากับ 4.30 ที่ degree of freedom = 2 ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า $t_{\text{tabulated}}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีใบโอลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมวดที่ ข-4.3 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอฟูเรนในข้าวหอมมะลิ # 6

ตารางที่ ข-4.3 ปริมาณคาร์บอฟูเรนที่วิเคราะห์ในตัวอย่างข้าวหอมมะลิด้วยใบโอลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

ครั้งที่	ปริมาณคาร์บอฟูเรน (mg.L^{-1})
1	1.79
2	1.22
3	1.71
\bar{x}	1.57
SD	0.31

วิธีการคำนวณ

ค่าจริงของปริมาณค่าวิบพูแรนที่ได้จากเทคนิคมาตรฐานโคลมาตอกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เท่ากับ

1.40

$$\text{จากสมการ} \quad t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{N}$$

$$\text{แทนค่า} \quad t = \frac{|1.57 - 1.40|}{0.31} \sqrt{3}$$

$$t = 0.95$$

เมื่อได้ค่า $t_{\text{calculated}}$ เท่ากับ 0.95 นำมาเปรียบเทียบกับ $t_{\text{tabulated}}$ มีค่าเท่ากับ 4.30 ที่ degree of freedom = 2 ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า $t_{\text{tabulated}}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีใบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวก ค

ประวัติและผลงานผู้วิจัย

1. ชื่อ – นามสกุlnาย/นาง/นางสาว อัญชลี สำเกา
2. เลขประจำตัวประชาชน -
3. ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. เลขที่ประจำตัวແໜ່ງ 423 ສັນກົດຄະນະວິທະຍາສາດຖ້ວນ ບຣຈຸເມື່ອ 1 ພຸດຍການ 2540
5. ເຮັດວຽກ ຕິດຕາມຄວາມຮັບຮັດຂອງລາຍການ ຢົມຮະຍະເວລາປົງຕິດຕາມຈົດປັດຈຸບັນ 18 ປີ 11 ເດືອນ
6. ຄຸນວຸພີ (ເຮັດວຽກສູງສຸດລົງໄປ)

ระดับปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่สำเร็จ	สถาบันที่สำเร็จการศึกษา
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	เคมี	พ.ศ. 2550	University of Graz, Austria
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เคมีวิเคราะห์	พ.ศ. 2544	มหาวิทยาลัยมหิดล
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เคมี	พ.ศ. 2539	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

7. ผลงานทางวิชาการ

7.1 บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1. A. Veseli, M. Vasjari, T. Arbneshi, A. Hajrizi, L. Švorc, A. Samphao and K. Kalcher (2016) Electrochemical determination of histamine in fish sauce using heterogeneous carbon electrodes modified with rhenium (IV) oxide, *Sens. Actuators B-Chem.* 228, 774-781.
2. A. Samphao, P. Butmee, J. Jitcharoen, L. Svorc, G. Raber and K. Kalcher (2015) Flow-injection amperometric determination of glucose using a biosensor based on immobilization of glucose oxidase onto Au seeds decorated on core Fe₃O₄ nanoparticles, *Talanta*, 142, 35-42.
3. A. Samphao, K. Kunpatee, S. Prayoonpokarach, J. Wittayakun, L. Svorc, D.M. Stankovic, K. Zagar, M. Ceh, K. Kalcher (2015) An ethanol biosensor based on simple immobilization of alcohol dehydrogenase on Fe₃O₄@Au nanoparticles, *Electroanalysis*, 27, 1-10.
4. D.M. Stankovic, A. Samphao, D. Kuzmanavic and K. Kalcher (2015) Novel electroanalytical method for the determination of andrographolide from Andrographis paniculata extract and urine samples, *Microchem. J.*, 122, 16-1
5. L. Svorc, K. Cinkova, A. Samphao, D. M. Stankovic, E. Mehmeti and K. Kalcher (2015) Voltammetric determination of harmaline in natural food products using boron-doped diamond electrode, *J. Electroanalytical Chem.*, 744, 37–44.
6. A. Samphao, P. Suebsanoh, Y. Wongsa, B. Pekec, J. Jitchareon and K. Kalcher (2013). Alkaline Phosphatase Inhibition-Based Amperometric Biosensor for the Detection of Carbofuran. *Int. J. Electrochem.* (8) 3254 – 3264

7. A. Samphao, H. Rerkchai, J. Jitchaoen, D. Nacapricha and K. Kalcher (2012). Indirect Determination of Mercury by Inhibition of Glucose Oxidase Immobilized on a Carbon Paste. *Int. J. Electrochem.* (7) 1001-1010

7.2 บทความวิจัยที่นำเสนอในการประชุมวิชาการ (Conference/Abstract/Proceedings)

1. P. Butmee, S. Prasertsri, S. Pimmongkol, K. Kalcher and A. Samphao (2016) “A Biosensor for the determination of ammonium ion in concentrated latex samples using flow-injection amperometric system based on alanine dehydrogenase immobilized onto $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanoparticle”, Pure and Applied Chemistry International Conference, 9-11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand.
2. O. Onwatee, P. Butmee, C. Pukahuta, K. Kalcher, A. Samphao (2015) “Monitoring of Ethanol during wine Fermentation by an Ethanol Biosensor”, Pure and Applied Chemistry International Conference, 21-23th January 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok. Thailand.
3. P. Butmee, C. Pukahuta, K. Kalcher, A. Samphao (2014) “Glucose Amperometric Biosensor based on Flow Injection Analysis”, Pure and Applied Chemistry International Conference, 8-10th January 2014, Centara Hotel and Convention Centre, Khon Kaen, Thailand.
4. A. Samphao, W. Phadungkit, D. Nakapricha and K. Kalcher “ Indirect method of bienzymatic biosensor for the determination of mercury and carbofuran ” Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2011), 5-7th January 2011, Bangkok, Thailand.

7.3 ตำรา/หนังสือ

1. A. Samphao and K. Kalcher, *Electrochemical Sensor: Practical Approaches*: L.M. Moretto and K. Kalcher (Eds), Environment

7.4 ทุนวิจัยที่ได้รับ

1. โครงการวิจัย “มัลติเอนไซม์ใบโอลิโนเจนเชอร์เพื่อตรวจหาสารกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนัก” แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกอ.) ปีงบประมาณ 2553-2555 สถานะ หัวหน้าโครงการ
2. โครงการวิจัย “การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักด้วยมัลติเอนไซม์ ในโอลิโนเจนในระบบการวิเคราะห์ของการไฟล์” แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2554-2555 สถานะ หัวหน้าโครงการ
3. โครงการวิจัย “ปรับปรุงใบโอลิโนเจนเชอร์ด้วยโลหะออกไซด์และทองอนุภาคนาโนสำหรับติดตามการทำงาน และกลูโคสในขบวนการหมักไวน์” แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาณ 2556-2557 สถานะ หัวหน้าโครงการ

4. โครงการวิจัย “การพัฒนาเอมโมเนียใบโซเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณเอมโมเนียในน้ำยางขัน” แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกอ.) ปีงบประมาณ 2558-2559 สถานะ หัวหน้าโครงการ

5. โครงการวิจัย “วิเคราะห์การปนเปื้อนคาร์บอฟูเรนในตัวอย่างข้าวหอมมะลิตด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอ้อมของอัล คาลินฟอสฟາเตสใบโซเซอร์” แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2558-2559 สถานะ หัวหน้าโครงการ

6. การพัฒนาเซนเซอร์เคมีไฟฟ้าด้วยโลหะออกไซด์ขนาดนาโนและกราฟีนเพื่อประยุกต์สำหรับการตรวจวัดแบบต่อเนื่องทางเคมีไฟฟ้าของ คาร์บาริล คาร์บอฟูเรน และเฟโนบูคาร์บในตัวอย่างพืชผัก แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2560 สถานะ กำลังยื่นเสนอขอ

7.5 ผลงานอื่นๆ ไม่มี

ภาคผนวก ง

ผลลัพธ์ที่ได้

ผลงาน	ด้านนิติวัสดุความสำเร็จ
1. เทคโนโลยีใหม่	นำแอมเพอโรเมทริกไปโอลเซนเซอร์ไปใช้ให้เกิดประโยชน์
2. องค์ความรู้ใหม่	การวิเคราะห์สารบีฟูเคนด้วยแอมเพอโรเมทริกไปโอลเซนเซอร์
3. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	สถาบันการศึกษาต่างๆ และสำนักงานการเกษตร
4. การผลิตนักศึกษา	ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาตรีจำนวน 1 คน คือ นางสาวชิดกมล ทูลคำรักษ์
5. การตีพิมพ์ผลงาน	คาดว่าจะตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารนานาชาติ 1 ชิ้น Amperometric carbofuran biosensor for the determination of carbofuran in Thai Jasmin rice samples, Analytical Methods
6. เพย์แพร่งานวิชาการ	เข้าร่วมประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 ครั้ง คาดว่าจะเข้าร่วมงานประชุม PACCON 2017 ที่ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

ผลลัพธ์ที่ได้

ผลงาน	ด้านตัววัดความสำเร็จ
1. เทคโนโลยีใหม่	นำแอมเพอโรเมทริกไปโอลเซนเซอร์ไปใช้ให้เกิดประโยชน์
2. องค์ความรู้ใหม่	การวิเคราะห์สารบีฟูแรนด้วยแอมเพอโรเมทริก ไปโอลเซนเซอร์
3. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	สถาบันการศึกษาต่างๆ และสำนักงานการเกษตร
4. การผลิตนักศึกษา	ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาตรีจำนวน 1 คน คือ นางสาวชิดกมล ทุลคำรักษ์
5. การตีพิมพ์ผลงาน	คาดว่าจะตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารนานาชาติ 1 ชิ้น Amperometric carbofuran biosensor for the determination of carbofuran in Thai Jasmin rice samples, Analytical Methods
6. เผยแพร่งานวิชาการ	เข้าร่วมประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 ครั้ง คาดว่าจะเข้าร่วมงานประชุม PACCON 2017 ที่ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

