



โครงการวิจัยเรื่อง
การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์โดยใช้
อนุภาคนาโนทอง
(Hydrogen peroxide Sensor Fabrication using
Gold nanoparticles)

ผู้วิจัย

ดร.ศิริวรรณ ตัญญา
นายพงษ์นรินทร์ ชุมแสง
นางสาวสุภาวดี ปาธานานนท์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

พฤษภาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์โดยใช้อนุภาคนาโนทอง สำเร็จลุล่วง
ได้ด้วยดี ทีมผู้วิจัยขอขอบคุณ สภากิจแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่สนับสนุนปัจจัยต่างๆในการดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณนายพลากร ตุ่มเสื่อ นางสาวพรรณวษา เนตรหาญ และนางสาววิธญา ปรีธปริง
นักศึกษานิเทศศาสตร์และเทคโนโลยีสื่อสารมวลชน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ช่วยในการ
ดำเนินงานและรวบรวมข้อมูลงานวิจัยส่วนหนึ่ง นอกจากนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้
เครื่องมือห้วยความเร็วสูง และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความ
อนุเคราะห์น้ำกลั่นบริสุทธิ์สูง

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการ และผู้สนับสนุนงานวิจัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำจนทำให้
งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

มิถุนายน 2554



คำนำ

การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์โดยใช้อนุภาคนาโนทอง เป็นโครงการวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำยาข้อมสีผมและน้ำยาล้างแผล โดยเทคนิคไบโอเซนเซอร์และใช้อนุภาคนาโนทองเพื่อเพิ่มความไววิเคราะห์ เมื่อได้ระบบและสภาวะการทดลองที่เหมาะสม สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นองค์ประกอบ เพื่อควบคุมมาตรฐานการผลิตภัณฑ์ของสินค้าน้ำยาข้อมสีผมและน้ำยาล้างแผล และนอกจากนี้ยังสามารถนำระบบและขั้นตอนในการสร้างเซนเซอร์ ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารอื่นๆได้โดยเปลี่ยนวัสดุชีวภาพ

ทีมผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ทั้งในด้านการศึกษาและอุตสาหกรรม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆต่อไป

ผู้วิจัย

มิถุนายน 2554



บทคัดย่อ

การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ โดยใช้อนุภาคนาโนทอง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานที่ทำจากไส้ดินสอดะชนิด 6H และทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยวิธีดักจับ ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองโดยเทคนิคสเปกโทรสโกปีและเทคนิคภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดทะลุผ่าน พบว่าได้อนุภาคนาโนทองขนาด 4.38 ± 0.66 nm เมื่อได้อนุภาคนาโนทองแล้ว นำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ HRP โดยขั้นแรกเกาะติดบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยไคโตซาน จากนั้นตรึงอนุภาคนาโนทองบนไคโตซาน และตามด้วยเอนไซม์ HRP เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการใช้อนุภาคนาโนทองกับไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง พบว่าการใช้อนุภาคนาโนทองให้ค่ากระแสไฟฟ้ามากกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้อนุภาคนาโนทองเพิ่มความไววิเคราะห์สำหรับสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ต่อไป

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอดะ เพื่อวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยศึกษาผลของการกระตุ้น ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน หาสภาวะที่เหมาะสมของการเกาะติด ไคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน ศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทองที่เหมาะสม โดยเทคนิค Layer-by-Layer ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP ที่เหมาะสม ศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ศึกษา pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และศึกษาการทวนสอบวิธีโดยศึกษาความเที่ยง ความแม่นยำ ช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดในการตรวจพบ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณและความเสถียร ภายได้สภาวะที่เหมาะสมนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคไบโอเซนเซอร์เทียบกับวิธีไทเทรต พบว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้สถิติแบบ Wilcoxon signed rank test

คำสำคัญ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไบโอเซนเซอร์ อนุภาคนาโนทอง

ABSTRACT

The hydrogen peroxide sensor was fabricated using gold nanoparticles for hydrogen peroxide determination. Firstly, 6H of pencil lead was used as working electrode. The gold nanoparticles were then synthesized via reduction reaction and were characterized with spectrophotometry and transmission electron microscope. The particle size of gold nanoparticles was 4.38 ± 0.66 nm. After that, gold nanoparticles were applied to immobilize HRP on chitosan modified electrode surface. The signals obtained from using gold nanoparticles and without gold nanoparticles were compared. The result found that with gold nanoparticles provided higher current signal than without gold nanoparticles. Therefore, gold nanoparticles were selected to enhance sensitivity of hydrogen peroxide sensor.

Next, the optimizations for pencil lead electrode fabrication were studied such as activation effect, deposition of chitosan on working electrode surface, the number of HRP and gold nanoparticles layers on electrode surface with layer-by-layer technique, concentration of HRP, applied potential and pH of phosphate buffer. The validation method was also studied including precision, accuracy linearity, limit of detection, limit of quantitation and stability. Finally, hydrogen peroxide sensor was evaluated to analyze hydrogen peroxide concentration in real samples under optimized conditions. The results obtained from hydrogen peroxide sensor are good relatively to titration method at significant level of 95% by using Wilcoxon signed rank test.

Keyword Hydrogen peroxide Biosensor Gold nanoparticles

สารบัญ

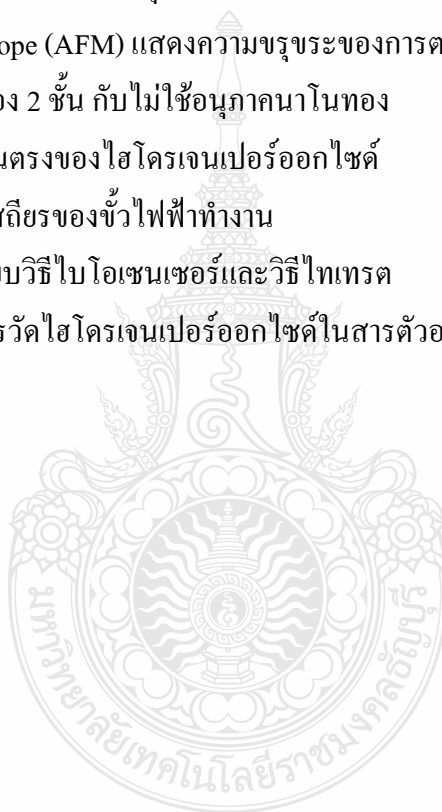
เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ป
คำนำ	ค
บทคัดย่อ	ง
สารบัญ	น
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญของที่มาและปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เทคนิคไบโอเซนเซอร์	3
2.2 เทคนิคแอมเพโรเมตรี	4
2.3 ความไววิเคราะห์	5
2.4 อนุภาคนาโนทอง	7
2.5 น้ำยาย้อมสีผสมและน้ำยาล้างแผล	7
2.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	9
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 สารเคมี	10
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	10
3.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง	11
3.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้าทำงานจากขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอ	11
3.5 การเลือกขั้วไฟฟ้าทำงาน	13
3.6 ศึกษาผลของอนุภาคนาโนทองในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	13
3.7 ศึกษาผลของการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน	14
3.8 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเกาะติดโคโดซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน	14
3.9 ศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทองที่เหมาะสม	14
3.10 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP ที่เหมาะสม	15

เรื่อง	หน้า
3.11 หาสภาวะที่เหมาะสมในระบบแอมเพอโรเมตริก	15
3.12 การศึกษาการทวนสอบวิธี	15
3.13 เปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรต	17
3.14 วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง	17
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง	18
4.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าทำงานจากขั้วไฟฟ้าสัณดิน	20
4.3 การเลือกขั้วไฟฟ้าทำงาน	21
4.4 ศึกษาผลของอนุภาคนาโนทองในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	23
4.5 ศึกษาผลของการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน	24
4.6 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเคาะติด โคลิโดซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน	25
4.7 ศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer	27
4.8 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP	29
4.9 หาสภาวะที่เหมาะสมในระบบแอมเพอโรเมตริกสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	30
4.10 เปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น กับไม่ใช่อนุภาคนาโนทอง	32
4.11 การทวนสอบวิธี	33
4.12 เปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรต	37
4.13 วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใน ตัวอย่างน้ำยาล้างมือและน้ำยาล้างแผล	38
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	46

สารบัญรูป

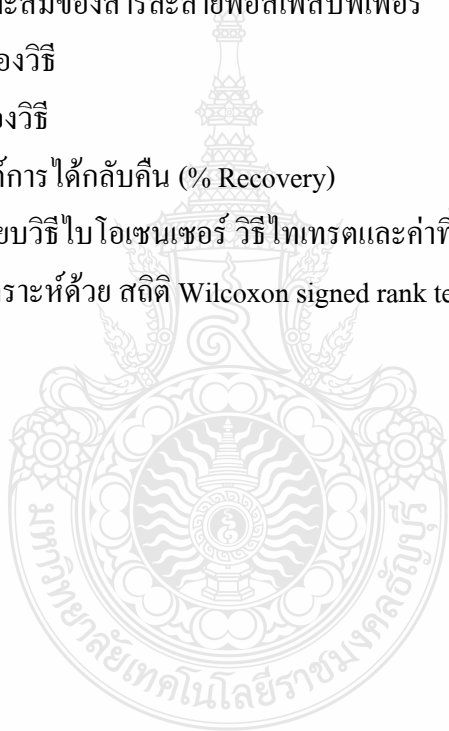
รูปที่	หน้า
2.1 แสดงหลักการของไบโอเซนเซอร์	4
2.2 สัญญาณของเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรีในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์	5
2.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดทะลุผ่าน (Transmission electron microscopy) ของอนุภาคนาโนทอง	6
4.1 สารละลายอนุภาคนาโนทอง	18
4.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองโดยเทคนิค Spectrophotometry	19
4.3 Transmission Electron Microscope(TEM) แสดงขนาดอนุภาคนาโนทอง	19
4.4 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนทอง (n=200)	20
4.5 ขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอ	20
4.6 เกณฑ์การพิจารณาขั้วไฟฟ้าทำงาน	21
4.7 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้า 6H ในสารละลาย โพแทสเซียมเฟอริก ไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์/วินาที จำนวน 3 รอบ	22
4.8 สัญญาณแอมเพอร์โรเมตรี (a) Au/HRP/Cs-electrode (b) HRP/Glu/Cs-electrode ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.20 โวลต์ และเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μ L	24
4.9 สัญญาณแอมเพอร์โรเมตรี (a) กระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า (b) ไม่กระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าเติม 0.5mM H ₂ O ₂ 50 μ L ให้ศักย์ -0.20 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH =7) ที่มี Methylene blue	25
4.10 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอที่มีการเกาะติดของไคโตซานโดยให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 V. ในสารละลายโพแทสเซียมเฟอริก ไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์/วินาที จำนวน 3 รอบ	26

รูปที่	หน้า
4.11 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคโรซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน	27
4.12 ผลศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer	28
4.13 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP	29
4.14 ผลศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	30
4.15 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	31
4.16 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง กับตรึงเอนไซม์ HRP) โดยไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง	32
4.17 Atomic force microscope (AFM) แสดงความขรุขระของการตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น กับไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง	33
4.18 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	36
4.19 แสดงการศึกษาความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงาน	37
4.20 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรต	38
4.21 กราฟมาตรฐานของการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารตัวอย่าง	38



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 เปรียบเทียบกระแสแอโนดิกและกระแสแคโทดิก ของขั้วไฟฟ้า	21
4.2 แสดงค่าอัตราส่วนระหว่าง กระแสแอโนดิกและ กระแสแคโทดิก ของขั้วไฟฟ้า 6H	23
4.3 ผลของการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน	26
4.4 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน	27
4.5 ผลศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer	28
4.6 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP	29
4.7 ผลศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	30
4.8 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์	31
4.9 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธี	34
4.10 ผลศึกษาการทวนซ้ำของวิธี	34
4.11 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)	35
4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์ วิธีไทเทรตและค่าที่ระบุในฉลาก	39
4.13 การทดสอบผลการวิเคราะห์ด้วย สถิติ Wilcoxon signed rank test	39



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหาและที่มา

ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เป็นสารสำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ในการฟอกย้อมสี ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ทำความสะอาด และอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันนี้ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ได้ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ย้อมสีผม ใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์ดัดผมและยืดผม และใช้ผสมเพื่อเป็น oxidizer กับผลิตภัณฑ์ย้อมผมชนิดถาวร hydrogen peroxide เป็นสารที่ถูกควบคุมปริมาณการใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อ และปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางตามราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 162 ง ลงวันที่ 9 ตุลาคม 2551 อัตราส่วนสูงสุดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเท่ากับ 12% ถ้าร่างกายได้รับสารไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากกว่าปริมาณที่กำหนดไว้จะทำให้เกิดการแพ้ ระคายเคืองในบริเวณที่สัมผัสกับสาร ถ้าเข้าตาอาจจะทำให้ตาบอดได้ ในปี 1998 นักวิชาการซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัย California, San Francisco ได้ตั้งข้อสงสัยจากการทำการทดลองในคนที่ใช้ยาย้อมผมจำนวน 2,544 คน หลังจากการศึกษาแปรผลการศึกษากับสัตว์ทดลองทางด้านระบาดวิทยา สรุปได้ว่ามีความเชื่อมโยงกับในเรื่องของการเกิด non-Hodgkin's lymphoma (มะเร็งต่อมน้ำเหลือง) กับยาย้อมผม ซึ่งตีพิมพ์ในวารสาร American Journal of Public Health ในเดือนธันวาคม 1998

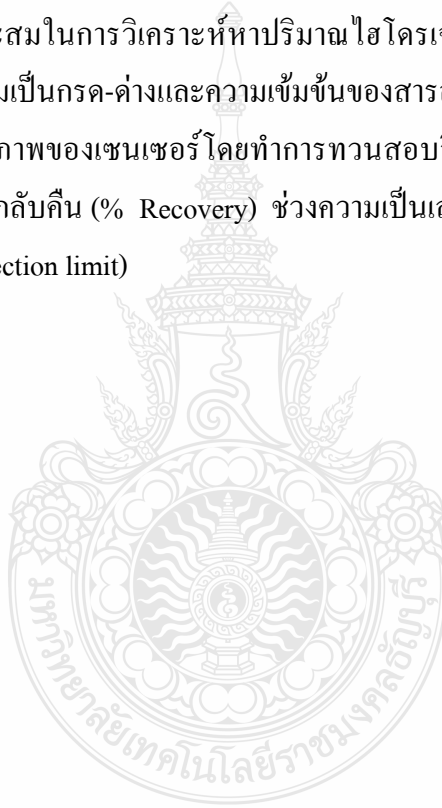
ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์จึงมีความจำเป็น วิธีทั่วไปที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ คือ Spectrophotometric (Masuoka et al., 1996), Fluorometric (Sakuragawa et al., 1998) Liquid chromatography (Oszwa et al., 2000) และ Chemiluminescence (Lu et al., 2009) แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีข้อด้อยเช่น ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีผลของสารรบกวนต่างๆ สารเคมีที่ใช้มีราคาสูงและมีความเป็นพิษ (Xiao et al., 1999) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เพื่อให้ได้ตัวตรวจวัดที่ให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว และมีความถูกต้องสูงด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์และเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนทอง

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง
- 2.2 เพื่อตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนอนุภาคนาโนทอง
- 2.3 เพื่อสร้างไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เซนเซอร์
- 2.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์โดยใช้เซนเซอร์ที่สร้างขึ้น

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 3.1 สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิครีดักชันโดยใช้สารละลาย Chloroauric acid เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์
- 3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเคลือบผิวของขั้วไฟฟ้าด้วยสารละลายพอลิเมอร์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า เช่น ความเข้มข้นและความเป็นกรด-เบสของสารละลายพอลิเมอร์ ความหนาของพอลิเมอร์ที่เคลือบและอัตราการเร็ว (Scan rate) ที่ในการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization)
- 3.3 ตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคการดูดซับทางกายภาพ
- 3.4 ตรวจสอบเอนไซม์ Horseradish peroxidase สภาวะตรึงบนอนุภาคนาโนทองด้วยสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์
- 3.5 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ โดยใช้เซนเซอร์ที่สร้างขึ้น เช่น ความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์
- 3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของเซนเซอร์โดยทำการทวนสอบวิธี (Validation method) เช่น หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) และขีดจำกัดการตรวจวัด (Detection limit)



บทที่ 2

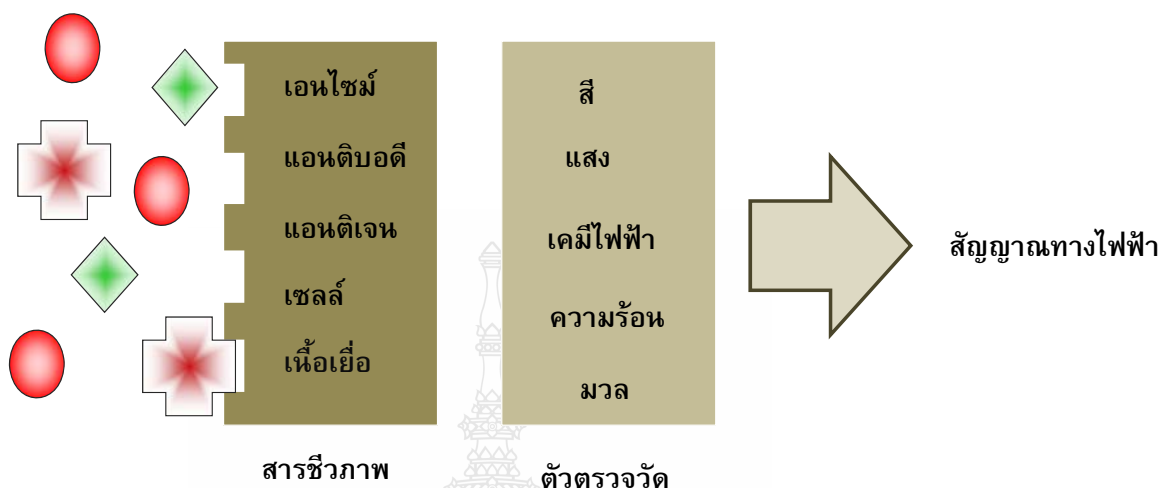
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์ย้อมสีผสม คัดผมและยัดผมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เป็นส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ถูกควบคุมปริมาณการใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อ และปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางตามราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 162 ง ลงวันที่ 9 ตุลาคม 2551 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ มีหลายวิธีเช่น Spectrophotometric (Masuoka et al., 1996), Fluorometric (Sakuragawa et al., 1998) Liquid chromatography (Oszwa et al., 2000) และ Chemiluminescence (Lu et al., 2009) แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัด เช่น ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีผลของสารรบกวนต่างๆ สารเคมีที่ใช้มีราคาสูงและมีความเป็นพิษ (Xiao et al., 1999) เทคนิคไบโอเซนเซอร์ (biosensor) เป็นวิธีวิเคราะห์หนึ่งที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ ที่ให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว และมีความถูกต้องสูงด้วยและเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนทอง เพื่อนำมาสร้างเป็นไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์

2.1 เทคนิคไบโอเซนเซอร์ (Eggins, 1996)

ปัจจุบันมีการนำสารชีวโมเลกุลหรือสารทางชีวภาพไปติดเข้ากับตัวตรวจวัดหรือทรานสดิวเซอร์ (transducer) ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างได้ในเวลารวดเร็วและความจำเพาะเจาะจง เครื่องมือวัดนี้เรียกว่าไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือส่วนของสารชีวภาพและส่วนของทรานสดิวเซอร์หรือตัววัดสัญญาณ วัสดุชีวภาพต้องมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวัดตัวอย่างของสารชีวภาพ เช่น เอนไซม์ จุลินทรีย์ เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ แอนติเจน แอนติบอดี เป็นต้น เมื่อสารชีวภาพทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวัด จะทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์หรือสัญญาณที่สามารถถูกตรวจวัดได้ด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์มีหลายชนิดเช่น ตัวตรวจวัดทางแสง (Jeon et al., 2010; Liu et al., 2010) ทางความร้อน (Harborn et al., 1997; Bataillard et al., 1993) ทางมวล (Lazerges et al., 2006; Chen et al., 2010) และทางเคมีไฟฟ้า (Jin et al., 2011; Wang et al., 2011; Song et al., 2001) ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้ามีข้อเด่นหลายข้อเช่น ให้ค่าการตอบสนองรวดเร็ว ถูกต้องและให้ความไววิเคราะห์ (sensitivity) สูง ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเป็นอุปกรณ์ทางไฟฟ้า อิเล็กทรอนิกส์ทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณทางเคมี ฟิสิกส์ หรือชีวเคมี (สัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวัดวิเคราะห์) ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้านี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ

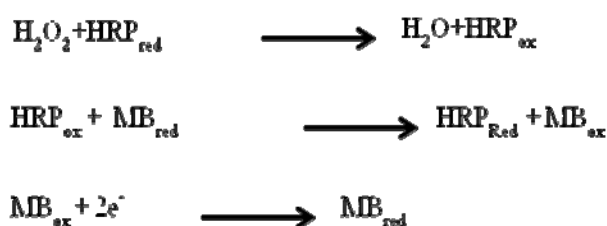
ปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สัญญาณดังกล่าวนี้ถูกส่งต่อไปยังเครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์เช่น นำไปขยาย เก็บ และแสดงผลดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงหลักการของไบโอเซนเซอร์

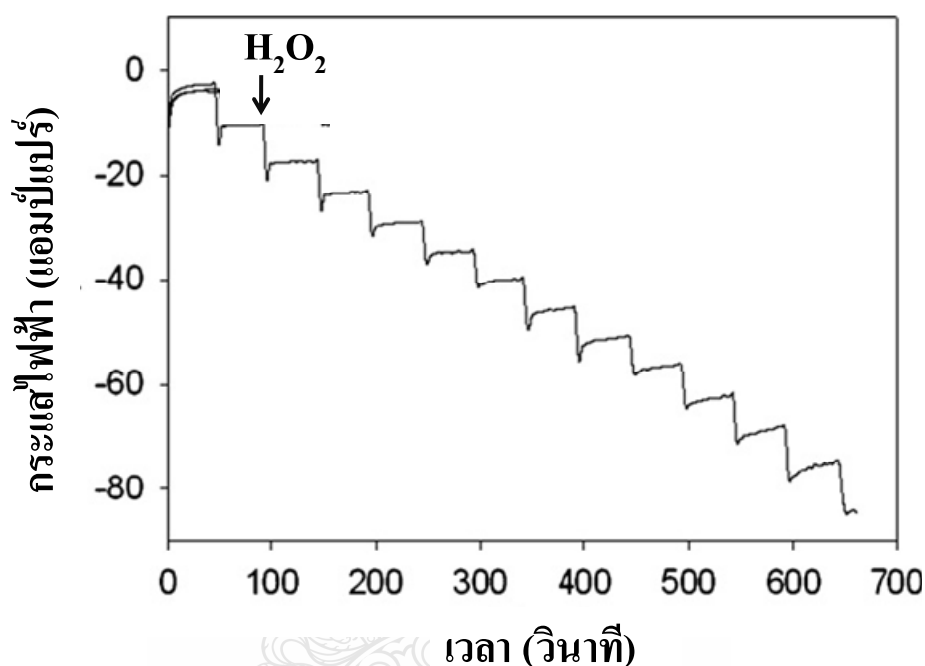
2.2 เทคนิคแอมเพโรเมตรี (amperometric)

เทคนิคแอมเพโรเมตรี เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้หลักการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า หลักการทำงานของเทคนิคแอมเพโรเมตรี เป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าใช้งานเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน และวัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทำให้ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์เทคนิคกล่าวร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยทำการตรึงวัสดุชีวภาพบนขั้วไฟฟ้า วัสดุชีวภาพจะเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนอิเล็กตรอนในสารละลาย และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังขั้วไฟฟ้าทำงาน (Tong et al., 2007; Ma et al., 2009; Kafi et al., 2008) ดังปฏิกิริยา



จากปฏิกิริยามีการให้และรับอิเล็กตรอน จึงทำให้ได้กระแสไฟฟ้าเกิดขึ้น ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ลักษณะของสัญญาณที่ได้เป็นดังรูปที่

2.2



รูปที่ 2.2 สัญญาณของเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรีในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์

2.3 ความไววิเคราะห์

ความไววิเคราะห์เป็นคุณสมบัติของวิธีที่แสดงถึงความสามารถในการตรวจวัดสารที่วิเคราะห์ใน 2 ลักษณะ คือ ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ ได้แก่ ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) และความสามารถในการแยกสารที่วิเคราะห์ที่มีปริมาณแตกต่างกันน้อยๆ

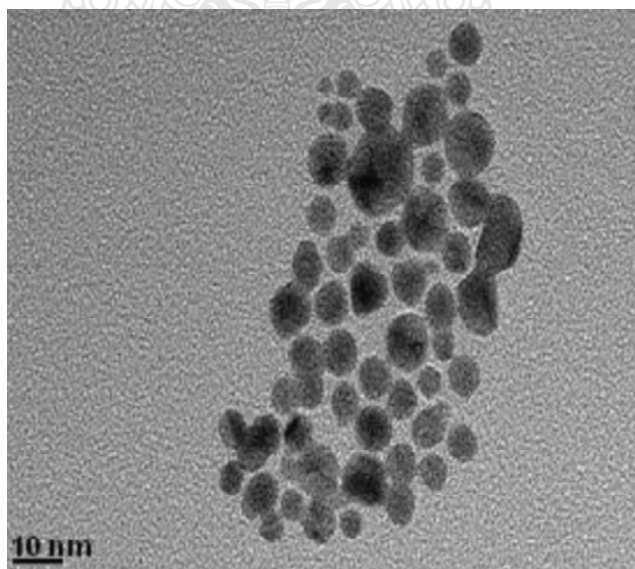
การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และวัดปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน สภาพไวของวิธี ได้จากความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน เป็นอัตราส่วนของการเปลี่ยนสัญญาณ (X) เทียบกับการเปลี่ยนปริมาณสารหรือความเข้มข้น (C) แสดงด้วยสมการ

$$S = \frac{\partial X}{\partial C} = \frac{\Delta X}{\Delta C}$$

จากที่กล่าวมาจนถึงแม้ว่าเทคนิคไบโอเซนเซอร์มีข้อดีเช่นมีความจำเพาะเจาะจง และมีความถูกต้องสูง แต่บางครั้งจะพบปัญหา คือ การวิเคราะห์สารบางอย่างจะต้องวัดในปริมาณน้อยมากๆ เพราะสารดังกล่าวมีปริมาณน้อยในตัวอย่างและมีความสำคัญสูง เช่น การวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็ง วิธีวิเคราะห์จะต้องมีความไววิเคราะห์สูงในระดับ ส่วนในพันส่วน (part per thousand ; ppt) เพื่อจะบ่งบอกว่าผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งหรือไม่ ดังนั้นความไววิเคราะห์เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากต่อวิธีวิเคราะห์ ในโครงการนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์ให้มีความไววิเคราะห์สูงโดยใช้การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นกรณีศึกษา ซึ่งใช้เอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) เป็นวัสดุชีวภาพและตัวตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตริก การเพิ่มความไววิเคราะห์ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ สามารถทำได้โดยเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้มากขึ้น เพื่อเร่งปฏิกิริยาทำให้สามารถวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณน้อยๆได้ ในปัจจุบันได้มีการนำอนุภาคนาโนทองมาใช้ร่วมในเทคนิคไบโอเซนเซอร์เพื่อเพิ่มความไววิเคราะห์

2.4 อนุภาคนาโนทอง (Gold particles)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองของสาร สารหนึ่งให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 100 นาโนเมตรจะทำให้เกิดคุณสมบัติใหม่ๆหรือเพิ่มระดับความสามารถจากเดิม เช่น อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์เงิน แพลทินัม หรือทอง รูปที่ 2.3 แสดงอนุภาคนาโนทอง ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยารีดักชันของ chloroauric acid และใช้ sodium citrate เป็นตัวรีดิวซ์ ได้ขนาดอนุภาคนาโนทอง 8 ± 2 นาโนเมตร (Li et al., 2009)



รูปที่ 2.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดทะลุผ่าน (Transmission electron microscopy) ของอนุภาคนาโนทอง (ที่มา: Li et al., 2009)

ได้มีการนำอนุภาคนาโนทองไปใช้ในไบโอเซนเซอร์มากกว่าอนุภาคของสารอื่นๆ ทั้งนี้เพราะอนุภาคนาโนทองมีข้อดีหลายข้อเช่น เป็นโลหะที่เฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นพิษต่อวัสดุชีวภาพ และสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน NH_2 , CN และ SH สามารถเกาะบนทองได้ด้วยตัวเอง (self assemble) ด้วยพันธะโคเวเลนต์บนอนุภาคนาโนทอง ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรง จึงนิยมนำอนุภาคนาโนมาใช้ในไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดชีวภาพ (โปรตีนมีหมู่อะมิโนเป็นองค์ประกอบหลัก) ไว้บนผิวของอนุภาคนาโนทองด้วยพันธะโคเวเลนต์ การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนในไบโอเซนเซอร์ทำให้ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะอนุภาคนาโนมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเด่น ได้แก่ เพิ่มพื้นที่ผิว มีสมบัติในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ร่วมกับโปรตีน เช่นเอนไซม์ เพราะทองจะไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน (Protein activity) (Manso et al., 2008; Liu et al., 2008; Lan et al., 2008) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เซนเซอร์ให้มีความไววิเคราะห์สูง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารต่างๆ ได้ในความเข้มข้นต่ำและมีความถูกต้องสูงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำยาข้อมผมและน้ำยาล้างผม

2.5 น้ำยาย้อมสีผมและน้ำยาล้างผม (http://webdb.dmsc.moph.go.th/cosmetic/content1.asp?info_id=14)

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์สำหรับย้อมสีผมจำหน่ายหลายประเภท เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และมักใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจทำให้เป็นอันตรายต่อสุขภาพ หากขาดความระมัดระวังในการใช้ ดังนั้น ผู้บริโภคควรได้รับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับข้อควรระวังในการใช้ เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการย้อมผม ผลิตภัณฑ์ย้อมผมชนิดถาวรนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เป็นส่วนผสมของสารที่จะทำให้เกิดสีในตัวกลางที่เหมาะสม ซึ่งมักเป็นครีมหรือโลชั่น

ส่วนที่ 2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สารที่ทำให้เกิดสีเป็นสีย้อมออกซิเดชันในยาย้อมผมชนิดถาวรมักทำให้เกิดปัญหาใหญ่คือการระคายเคืองต่อผิวหนัง หรืออาการแพ้และการเป็นพิษต่อระบบภายในร่างกาย พาราฟีนีลีนไดอะมีนเป็นสารสำคัญของสีย้อมออกซิเดชัน ซึ่งนิยมใช้กันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งยาย้อมผมชนิดถาวรที่ผลิตภายในประเทศ สารนี้ทำให้เกิดอาการแพ้และทำให้เกิดอาการทางผิวหนัง เพราะเหตุนี้หลายประเทศได้เสนอกฎหมายหรือระเบียบเพื่อให้ผู้ใช้ทำแพทช์เทสต์ (Patch test) ก่อนย้อมผม และกำหนดปริมาณที่ใช้ในสูตรตำรับ ได้มีรายงานการวิจัยในทศวรรษ 1980 จำนวนมาก รายงานความเป็นพิษของสีย้อมออกซิเดชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พาราฟีนีลีนไดอะมีน เกลือ และอนุพันธ์ของสารนี้ เป็นสารก่อกลายพันธุ์ และทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง เช่น ในปี 1986 จากการศึกษาของ วรณี โรจนโพธิ์ โดยให้ยาย้อมผมชนิดออกซิเดชันที่มีวางขายตามท้องตลาดในประเทศไทย ซึ่งมีพาราฟีนีลีนไดอะมีนเป็นส่วนผสม โดยผสมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 20-30 นาที ก่อนการทดลองทาผิวหนังและฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูทดลอง ผลปรากฏว่าทั้งการทาและการฉีดเข้าใต้ผิวหนังทำให้หนูทดลองตัวเมียเกิดก้อนเนื้อชนิดร้ายแรง และชนิด

ไม่ร้ายแรงที่กระเพาะปัสสาวะและเนื้อเยื่ออ่อน ส่วนการทาและฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนุทลงตัวผู้ ไม่ทำให้เกิดก้อนเนื้อที่ต่อน้ำมันและที่เนื้อเยื่ออ่อน แต่ทำให้เกิดก้อนเนื้อที่ตับ ไต ต่อมไทรอยด์ และกระเพาะปัสสาวะบ้างในบางตัว การทดลองบางแห่งพบว่าสีย้อมผสมประเภทสีย้อมออกซิเดชัน ทำให้เกิดมะเร็ง สัตว์ดังกล่าวที่เป็นอันตรายมากได้แก่ 4-เมททอกซี-เมตา-ฟีนีลีนไดอะมีนหรือที่เรียกกันว่า 2,4-ไดอะมีโนอะนิโซลและเกลือซัลเฟตของสารนี้ ซึ่งตามข้อกำหนดของ Code of Federal Regulations ของประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ฉลากย้อมผสมถ้ามีสารดังกล่าวต้องมีคำเตือนดังนี้ "มีส่วนผสมซึ่งสามารถซึมเข้าสู่ผิวหนังผู้ใช้ และทดสอบแล้วพบว่าป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง"

ต่อมาในทศวรรษที่ 1990 คณะกรรมการวิทยาศาสตร์ด้านเครื่องสำอางของประชาคมยุโรป ได้ศึกษาเรื่องซึ่งเป็นความจำเป็นทั่วไปสำหรับการประเมินความเป็นพิษของย้อมผสมดังต่อไปนี้

1. ความเป็นพิษเฉียบพลัน
2. ความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (ทดลองนาน 28 วัน หรือ 90 วัน โดยให้ทางปาก)
3. ความเป็นพิษเรื้อรัง และการเกิดมะเร็ง
4. อาการระคายเคืองของผิวหนัง หรือเนื้อเยื่ออ่อน และการแพ้
5. การดูดซึม การเผาผลาญในร่างกาย และการออกฤทธิ์
6. การกลายพันธุ์ ทดสอบทั้งในร่างกายสัตว์ทดลองและในหลอดทดลอง
7. การศึกษาการก่อวิรูปและการสืบพันธุ์

แม้ว่าในการศึกษาดังกล่าวบางเรื่องของส่วนผสมย้อมผสมชนิดออกซิเดชัน ที่ไม่ได้ถูกล้างออก แต่ปล่อยทิ้งไว้บนผิวหนังสัตว์ทดลองเป็นการสัมผัสกับความเข้มข้นมาก ไม่สอดคล้องต่อสภาวะการใช้ตามปกติ อย่างไรก็ตามก็ตีผลปรากฏว่าไม่พบการเป็นพิษต่อระบบภายในร่างกายและการเกิดมะเร็งแต่อย่างใด เป็นที่น่าสังเกตได้ว่าการพบการเกิดมะเร็งที่เคยถูกนำมาวิจารณ์ซ้ำแล้วซ้ำอีกนั้น ทั้งหมดเกิดจากสีย้อมออกซิเดชันชนิดที่ถูกห้ามใช้ นอกจากนี้คำรับที่เขย่นมาใช้ทดลองไม่สอดคล้องกับย้อมผสมที่ใช้กันในปัจจุบัน

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำย้อมสีผสม เป็นสารใช้ฟอกสีผสมและฆ่าเชื้อโรค โดยปกติจะสลายตัวไปเองอย่างช้า ๆ ให้น้ำและออกซิเจนเกิดขึ้น ดังสมการ แสงสว่างและความร้อนจะช่วยเร่งให้เกิดการสลายตัวเร็วขึ้น ดังนั้นจึงต้องเก็บไว้ในที่มืด หรือในภาชนะสีน้ำตาลเข้ม และในที่เย็น



น้ำย้อมสีผสม (Developer) หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีลักษณะเป็นครีมหรือของเหลวใส ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้ขนาด 6% เพราะหากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่า 6% จะทำให้ผมแห้ง อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองที่หนังศีรษะ แต่ถ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น้อยกว่า 6% ก็จะไม่สามารถออกซิไดซ์สีอย่างมีประสิทธิภาพ

น้ำยาล้างแผล ยาที่ใช้สำหรับทำความสะอาดแผลหรือบาดแผลที่ผิวหนังในเบื้องต้น มีส่วนประกอบหลักเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ชนิดความเข้มข้น 3% มีสมบัติฆ่าเชื้อโรคแบคทีเรีย

2.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่ไม่อยู่ตัว สามารถสลายตัวให้ออกซิเจนกับน้ำ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คล้ายโอโซน (O_3) มากในบางกรณีเช่นใช้เป็นตัวแทนฟอกขาวสีฆ่าแบคทีเรีย สลายตัวให้ออกซิเจน ได้เหมือนกับน้ำ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพดังนี้

ชื่อเรียกอื่น	Hydrogen dioxide; hydroperoxide; Albone; Hioxyl.
CAS No.	7722-84-1
สูตรโมเลกุล	H_2O_2
น้ำหนักโมเลกุล	34.02
จุดเดือด	152 องศาเซลเซียส
คุณสมบัติ	ของเหลวที่ไม่คงตัว ไม่มีสี มีรสขม มักทำอยู่ในรูปสารละลายในน้ำ ความเข้มข้น 3-90 %
การใช้ที่ผิดกฎหมาย	เป็นตัว oxidizing ในขั้นตอนการผลิต โคเคน
การใช้ที่ถูกกฎหมาย	สารละลายเข้มข้น 90 % ใช้ขับเคลื่อนจรวด (rocket propulsion) สารฟอกสีในอาหาร เป็นตัว oxidizer เป็นสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคที่ผิวหนัง ใช้ในทางเภสัชกรรม ทำน้ำยาบ้วนปาก น้ำยาฆ่าเชื้อ (sanitary lotion)
กฎหมายควบคุม	จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 1 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535
บทลงโทษ	ผู้ใดผลิต นำเข้า ส่งออกหรือมีไว้ในครอบครองซึ่งวัตถุอันตรายชนิดที่ 1 ไม่ปฏิบัติตามประกาศของรัฐมนตรีผู้รับผิดชอบ ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ
หน่วยงานที่รับผิดชอบ	กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

1. Sodium borohydride (NaBH_4 , SIGMA-ALDICH)
2. Gold (III) Chloride hydrate (HAuCl_4 , SIGMA-ALDICH)
3. Trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, VWR International)
4. ฟองอะลูมินา ขนาด $0.5\ \mu\text{m}$
5. Chitosan Oligosaccharide Lactate; Cs ($\text{C}_{99}\text{H}_{1000}\text{O}_{1000}$, SIGMA-ALDICH)
6. Acetic Acid (CH_3COOH , Analytical reagent, J.T.Baker)
7. Hydrogenperoxide (H_2O_2 , Analytical reagent, SIGMA-ALDICH)
8. Horseradish from peroxidase (HRP; SIGMA-ALDICH)
9. Sodium Acetate (trihydrate) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Laboratory reagent, LOBA CHEMIE)
10. Di-sodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4 , Analytical reagent, Ajax Finechem)
11. Sodium dihydrogen orthophosphate (NaH_2PO_4 , Analytical reagent, Ajax Finechem)
12. Sodium Chloride (NaCl , Analytical reagent, Ajax Finechem)
13. Potassium Ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Analytical reagent, Ajax Finechem)
14. Potassium Chloride (KCl , Analytical reagent, Ajax Finechem)
15. Glutaraldehyde ($\text{HCO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$, Fluka)
16. Sodium hydroxide (NaOH , Analytical reagent, Ajax Finechem)
17. กาวนำไฟฟ้า (Conductive Epoxy part A, Conductive Epoxy part B: USA)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก 1 เครื่อง พร้อม Magnetic bar ขนาด 3 เซนติเมตร
2. Micro pipet ขนาด $100\ \mu\text{L}$, $1,000\ \mu\text{L}$ และ $5000\ \mu\text{L}$
3. อะลูมิเนียมฟอย
4. ไม้ดินสอ ยี่ห้อ STAEDTLER ประเทศเยอรมัน ชนิด HB 2B 1H 2H 3H 4H 5H และ 6H เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร
5. กระดาษทราย แบบหยาบ และแบบละเอียด
6. เข็มเจาะรูไม้ดินสอ
7. ฉนวนหุ้มขั้วไฟฟ้า (ท่อพลาสติก)

8. เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า (663 VA Stand Ω Metrohm swiss made)

- ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode): ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอ
- ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode): ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์
- ขั้วไฟฟ้าช่วย (Auxillary electrode): ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม

9. เครื่องเขย้าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง; Elma, ประเทศเยอรมัน

10. เครื่องวัดกรดด่าง (pH meter) DENVER INSTRUMENT

11. Transmission Electron Microscope(TEM) : JEOL รุ่น JEM-2010

12. Atomic Force Microscope (AFM) : SEIKO รุ่น SPA 400

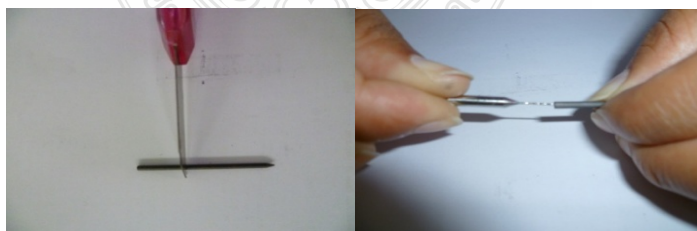
3.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ผสมสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) ความเข้มข้น 125 mM ปริมาตร 1200 μL และสารละลาย Gold (III) Chloride hydrate (HAuCl_4) ความเข้มข้น 0.3 mM ปริมาตร 153 μL ลงในสารละลายไตรโซเดียมซิเตรด ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ความเข้มข้น 0.38 mM ปริมาตร 500 mL คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$

3.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้าทำงานจากขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอ

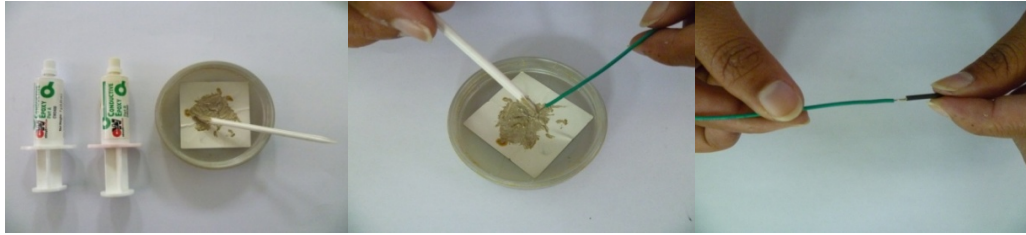
เตรียมขั้วไฟฟ้าทำงานจากไส้ดินสอ 5 ชนิด คือ HB 2B 1H 2H 3H 4H 5H และ 6H ดังต่อไปนี้

3.4.1 ตัดไส้ดินสอแต่ละชนิดให้ได้ความยาว 2 เซนติเมตร แล้วเจาะรูไส้ดินสอให้ลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร

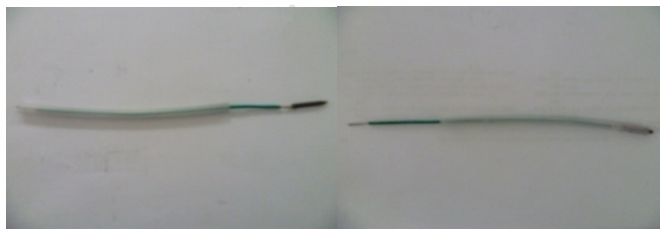


3.4.2 ตัดท่อพลาสติกยาว 10 เซนติเมตร และตัดลวดนำไฟฟ้ายาว 20 เซนติเมตร

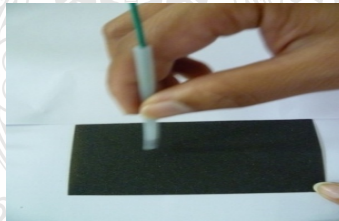
3.4.3 เชื่อมต่อลวดนำไฟฟ้า (ข้อ 2.4.2) กับไส้ดินสอ (ข้อ 2.4.1) ด้วยกาวนำไฟฟ้า แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อให้ลวดนำไฟฟ้ากับไส้ดินสอติดกัน



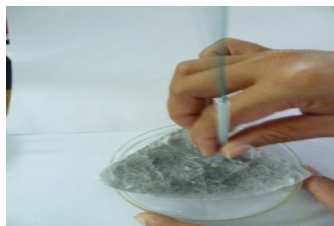
3.4.4 นำไส้ดินสอด่ที่มีลวดนำไฟฟ้าติดอยู่ (ข้อ 2.4.3) ไปใส่ในท่อพลาสติก (ข้อ 2.4.2) เพื่อใช้เป็น
ฉนวนหุ้มไฟฟ้า



3.4.5 นำขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด่ที่ได้มาขัดกับกระดาษทรายทั้งแบบหยาบ และแบบละเอียดตามลำดับ
เพื่อปรับผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าเรียบ



3.4.6 ขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด่ที่ได้ด้วยผงอะลูมินา ขนาด $0.5\ \mu\text{m}$ เพื่อให้ผิวหน้าของ
ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด่เรียบ และกำจัดรอยที่เกิดจากการขัดด้วยกระดาษทราย



- 3.4.7 นำขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอ (ข้อ 2.4.6) ไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าสารด้วยความถี่สูง เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดผงอะลูมินาที่เกาะอยู่ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอ
- 3.4.8 ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำกลั่น จึงได้ขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอพร้อมที่จะใช้งานต่อไป

3.5 การเลือกขั้วไฟฟ้าทำงาน

จัดชุดอุปกรณ์เซลล์เคมีไฟฟ้าซึ่งประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าช่วย ขั้วไฟฟ้าทำงานใส่ดินสอชนิดต่างๆ (HB 2B 1H 2H 3H 4H 5H และ 6H) โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์/วินาที จำนวน 3 รอบ วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นของกระแสแอโนดิก และแคโทดิกของขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละชนิด

3.6 ศึกษาผลของอนุภาคนาโนทองในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

3.6.1 ตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ด้วยอนุภาคนาโนทอง

จุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานในสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 % w/v pH 5 และให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที แก่ระบบ เพื่อทำให้ไคโตซานเกาะติดบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้ไปจุ่มในสารละลายอนุภาคนาโนทอง ปริมาตร 1 mL เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างส่วนที่เหลืออกด้วยน้ำกลั่น แล้วนำขั้วไฟฟ้าไปจุ่มในสารละลายเอนไซม์ HRP ความเข้มข้น 5.0 mg/mL เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในแต่ละขั้นตอนของการตรึงจะตรวจสอบการเกาะติดของไคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงานใส่ดินสอด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry) โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ ใช้อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์/วินาที จำนวน 3 รอบ วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้แต่ละขั้นตอน เมื่อได้ขั้วไฟฟ้าทำงานแล้วนำขั้วไฟฟ้างดลงจุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 Methylene blue ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ และเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μ L แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้

3.6.2 ตรึงเอนไซม์ HRP โดยไม่ใช่อนุภาคนาโนทอง

เกาะติดไคโตซานบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงานใส่ดินสอ โดยใช้สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 %w/v pH 5 ให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 โวลต์ นาน 3 นาที จากนั้นจุ่มขั้วไฟฟ้าในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5%v/v เวลา 20 นาที ต่อไปตรึงเอนไซม์ HRP ความเข้มข้น 5.0 mg/mL นาน 12 ชั่วโมง ในแต่ละขั้นตอนของการตรึงจะตรวจสอบเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี นำขั้วไฟฟ้าที่ได้จุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์

และเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μL วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

3.7 ศึกษาผลของการกระตุ้น (Activation) ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน

3.7.1 กระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า

ศึกษาผลของการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ด้วยการให้ศักย์ไฟฟ้า +1.8 โวลต์ โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 M pH 4.8 ปริมาตร 10 mL ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.02 M จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้า +1.8 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที นำขั้วไฟฟ้าที่ได้ไปตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง ขั้นตอนตามการทดลองข้อ 2.6.1 จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าทำงานจุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ และเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μL แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้

3.7.2 ไม่กระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า

ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 3.7.1 ยกเว้นขั้นตอนการให้ศักย์ไฟฟ้า +1.8 โวลต์

3.8 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเกาะติด (deposition) โคลโคซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

3.8.1 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคลโคซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่ +1.2 +1.5 และ +3.0 โวลต์ โดยนำขั้วไฟฟ้าจุ่มในสารละลายโคลโคซาน และให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทำงานที่ศักย์ไฟฟ้าต่าง ๆ ดังกล่าว เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบการเกาะของโคลโคซานโดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี เปรียบเทียบค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริโกลูตินิกของขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอที่ใช้ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

3.8.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคลโคซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ศึกษาเวลาที่ 1 3 5 10 และ 15 นาที โดยนำขั้วไฟฟ้าจุ่มในสารละลายโคลโคซาน และให้ศักย์ไฟฟ้าที่ +1.5 โวลต์ (ได้จากผลการทดลองข้อ 3.8.1) เป็นเวลาต่างๆ จากนั้นตรึงอนุภาคนาโนทองและเอนไซม์ HRP วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5mM ปริมาตร 50 μL

3.9 ศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทองที่เหมาะสม โดยเทคนิค Layer-by-Layer

ทำการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า (ตามการทดลอง ข้อ 3.7.1) และทำการเกาะติดโคลโคซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน (ตามการทดลอง ข้อ 3.8) จากนั้นตรึงอนุภาคนาโนทองบนขั้วไฟฟ้าทำงานโดยจุ่มในสารละลายอนุภาคนาโนทอง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วตามด้วยตรึงเอนไซม์ HRP บนอนุภาคนาโนทองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนนี้จะได้ขั้วไฟฟ้าทำงาน 1 ชั้น (HRP/Au/Cs-electrode) จากนั้นจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานในสารละลายอนุภาคนาโนทองและตามด้วยสารละลายเอนไซม์จะได้ขั้วไฟฟ้าที่มี 2 ชั้น

(HRP/Au/HRP/Au/Cs-electrode) ต่อไปในขั้นที่ 3 4 6 และ 8 ทำการทดลองเหมือนกับขั้นที่ 2 ขั้วไฟฟ้าที่ได้นำไปจุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.20 โวลต์ และเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μ L แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

3.10 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP ที่เหมาะสม

ศึกษาเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 3 5 7 และ 9 mg/mL โดยตรึงเอนไซม์ HRP ที่ความเข้มข้นต่างๆ บนอนุภาคนาโนทองจำนวน 2 ชั้นบนขั้วไฟฟ้าทำงาน(ได้จากข้อ 3.9) ขั้นตอนต่อไปจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานที่ได้ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ความเข้มข้น 0.1 M เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μ L ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.20 โวลต์ และวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

3.11 หาสภาวะที่เหมาะสมในระบบแอมเพอโรเมตริกสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.11.1 ศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน

เตรียมขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยอนุภาคนาโนทองและเอนไซม์ HRP 2 ชั้น โดยศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.10 -0.15 -0.20 -0.25 -0.30 และ -0.35 โวลต์ เพื่อวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระบบแอมเพอโรเมตริก โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μ L และวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตอบสนองของเอนไซม์ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

3.11.2 ศึกษา pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ศึกษาผลของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยอนุภาคนาโนทองและเอนไซม์ HRP 2 ชั้น จุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μ L แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้

3.12 การศึกษาการทวนสอบวิธี (Validation method)

3.12.1 ศึกษาความเที่ยงของวิธี (Precision)

3.12.1.1 ศึกษาการทำซ้ำของการวัด (Repeatability)

ใช้ขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วเดียวในสำหรับการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มี ความเข้มข้น 0.5 mM จำนวน 7 ครั้ง โดยวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในแต่ละครั้งและนำค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation ; RSD) ที่ได้จากการทำซ้ำ

3.12.1.2 ศึกษาการทวนซ้ำของวิธี (Reproducibility)

วัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM โดยใช้ขั้วไฟฟ้า 7 ขั้ว วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ของขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละขั้ว และคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.12.2 ศึกษาความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

ศึกษาความแม่นยำของวิธีโดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 10 30 และ 50 mM ลงในตัวอย่างน้ำยาล้างแผล และน้ำยาข้อมสีกม วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากก่อนและหลังเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

3.12.3 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity Range)

วัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.05 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.1 1.3 1.5 และ 1.7 mM วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองและนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้น

3.12.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection)

ทำการวัด blank ของสารตัวอย่าง จำนวน 12 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ

3.12.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)

ทำการวัด blank ของสารตัวอย่าง จำนวน 12 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ

3.12.6 ศึกษาความเสถียร (Stability)

3.13.6.1 Working stability

ใช้ขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอที่ตรึงเอนไซม์ HRP และอนุภาคนาโนทองจำนวน 2 ชั้น ในการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ในแต่ละวัน วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในแต่ละวันและเปรียบเทียบค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในวันแรกกับวันสุดท้าย

3.13.6.2 Storage stability

วัดค่าการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอที่ตรึงเอนไซม์ HRP และอนุภาคนาโนทองจำนวน 2 ชั้นต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ในครั้งแรกและเก็บขั้วไฟฟ้านี้แช่ไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 4⁰ C เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นวัดค่ากระแสไฟฟ้าอีกครั้งและนำค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในครั้งแรก

3.13 เปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรต

เปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.20 0.30 0.40 0.50 0.60 0.70 และ 0.80 mM ที่ได้จากวิธีไบโอเซนเซอร์กับวิธีไทเทรต โดยใช้สถิติ Regression line

3.14 วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง

3.14.1 วิธีไบโอเซนเซอร์

สร้างกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 0.7 และ 0.9 mM จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำยาข้อมสัณและน้ำยาล้างแผล จำนวน 6 ตัวอย่าง กรณีที่ตัวอย่างขุ่น จะทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 ก่อน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำผลที่ได้ไปนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธีไทเทรต ทดสอบความแตกต่างของสองวิธีด้วยสถิติ Wilcoxon signed rank test

3.14.2 วิธีการไทเทรต

เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจาง จากนั้นปิเปตตัวอย่างมา 10 mL ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟต เดิมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมไอไดค์ 0.4 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปิดด้วยกระดาษพิก้าหรือจุกปิด ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟต จนกระทั่งสีน้ำตาลจางลงเป็นสีเหลืองจาง แล้วเติมอินดิเคเตอร์น้ำแป้งลงไป 2 มิลลิลิตร จะเกิดสีน้ำเงินเข้มของของน้ำแป้งกับไอโอดีน ไทเทรตต่อจนถึงจุดยุติ คือ จุดที่สีน้ำเงินหายไป บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟต ที่ใช้เพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง

บทที่ 4

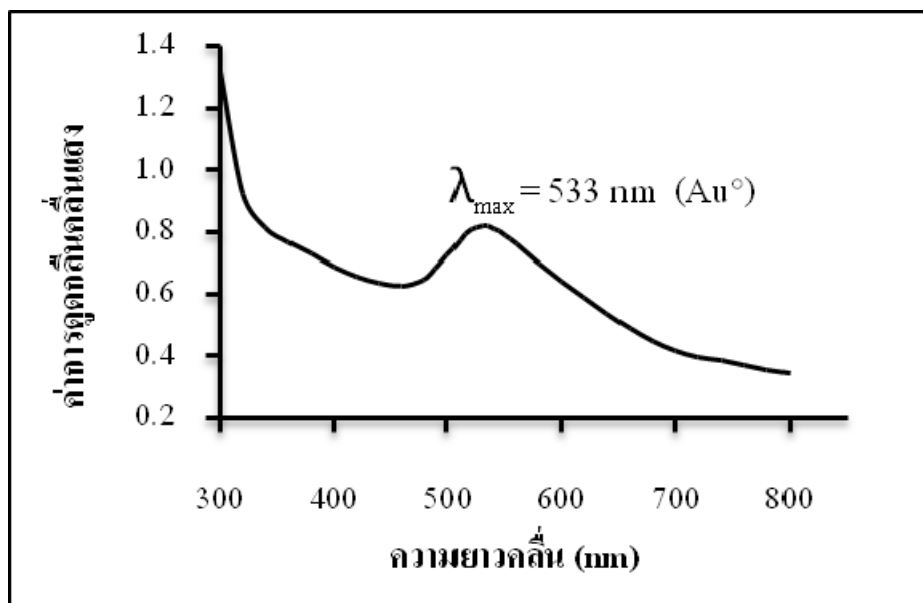
ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

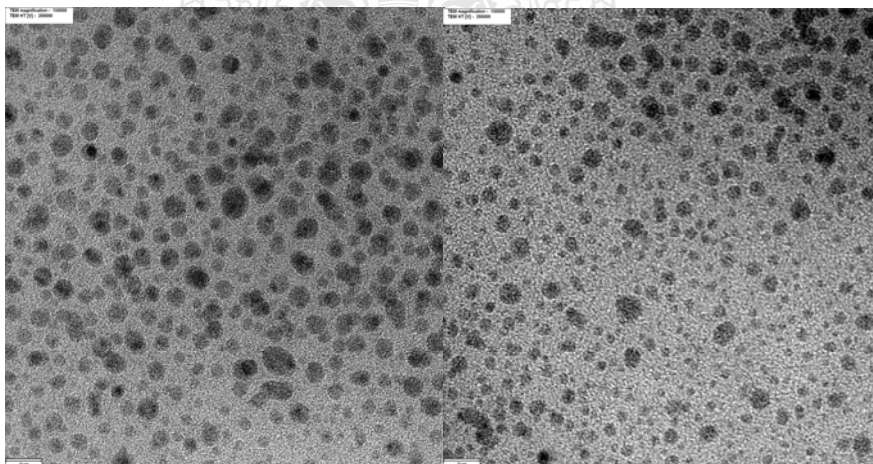
สังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง จากสารละลาย Gold (III) Chloride hydrate โดยใช้สารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ และ ไตรโซเดียมซิเตรด เป็นตัวรีดิวส์ โดยรีดิวส์ Au^{3+} ให้กลายเป็น Au^0 หรืออนุภาคนาโนทอง จะได้สารละลายที่มีสีม่วงแดงมีลักษณะเป็นสารแขวนลอยค้ ดังรูปที่ 4.1 จากการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองโดยเทคนิค Spectrophotometry พบว่าให้ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 533 nm แสดงว่าในสารละลายมีอนุภาคนาโนทอง ดังรูปที่ 4.2



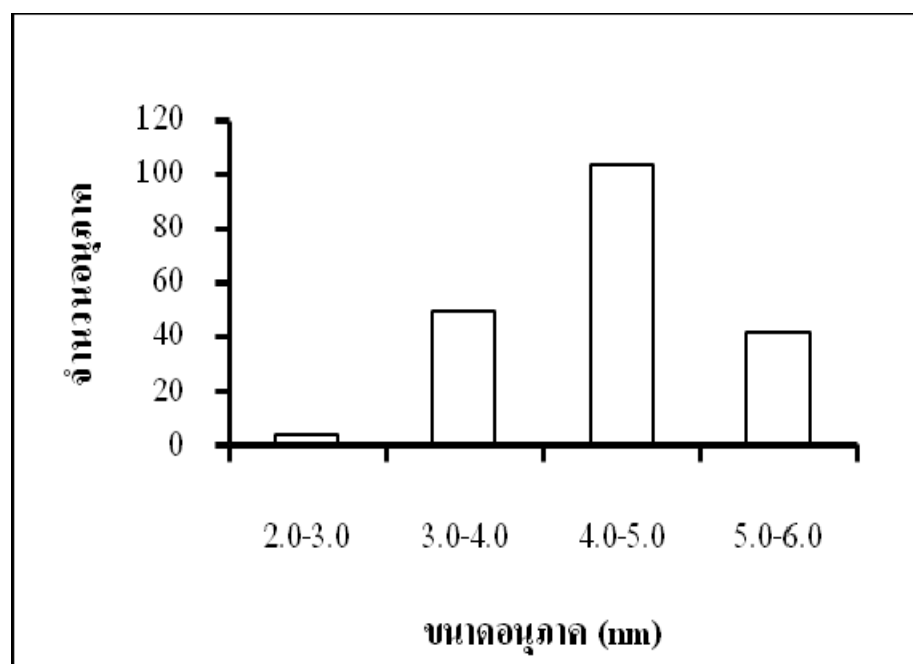
รูปที่ 4.1 สารละลายอนุภาคนาโนทอง



รูปที่ 4.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองโดยเทคนิค Spectrophotometry



รูปที่ 4.3 Transmission Electron Microscope(TEM) แสดงขนาดอนุภาคนาโนทอง



รูปที่ 4.4 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนทอง (n=200)

จากรูปที่ 4.3 แสดงขนาดของอนุภาคนาโนทองที่ตรวจสอบด้วย Transmission Electron Microscope พบว่าอนุภาคนาโนทองมีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดโดยเฉลี่ย 4.38 ± 0.66 nm (n=200) และมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนทอง ดังรูปที่ 4.4

4.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าทำงานจากขั้วไฟฟ้าไส้ดิน

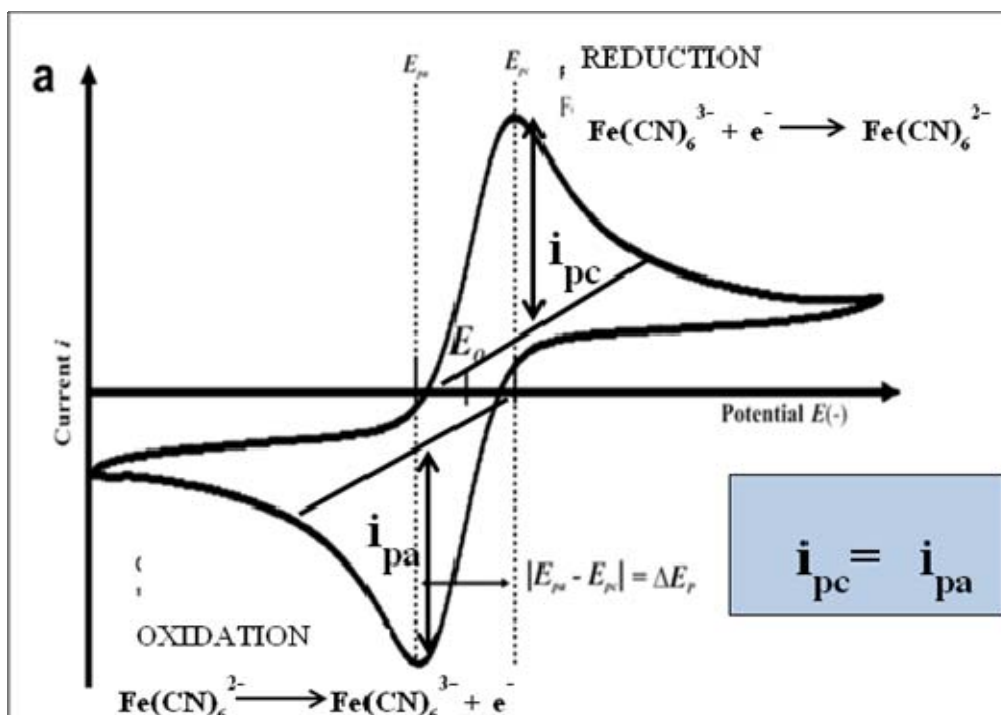
ใช้ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอ ชนิดต่างๆ ได้แก่ HB 2B 1H 2H 3H 4H 5H และ 6H ที่สร้างขึ้นเพื่อใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน มีลักษณะดังรูปที่ 4.5



รูป 4.5 ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอ

4.3 การเลือกขั้วไฟฟ้าทำงาน

การพิจารณาขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าที่ดีจะให้กระแสแอโนดิกและแคโทดิกเท่ากัน แสดงว่าการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ได้สมบูรณ์ (รูป 4.6)

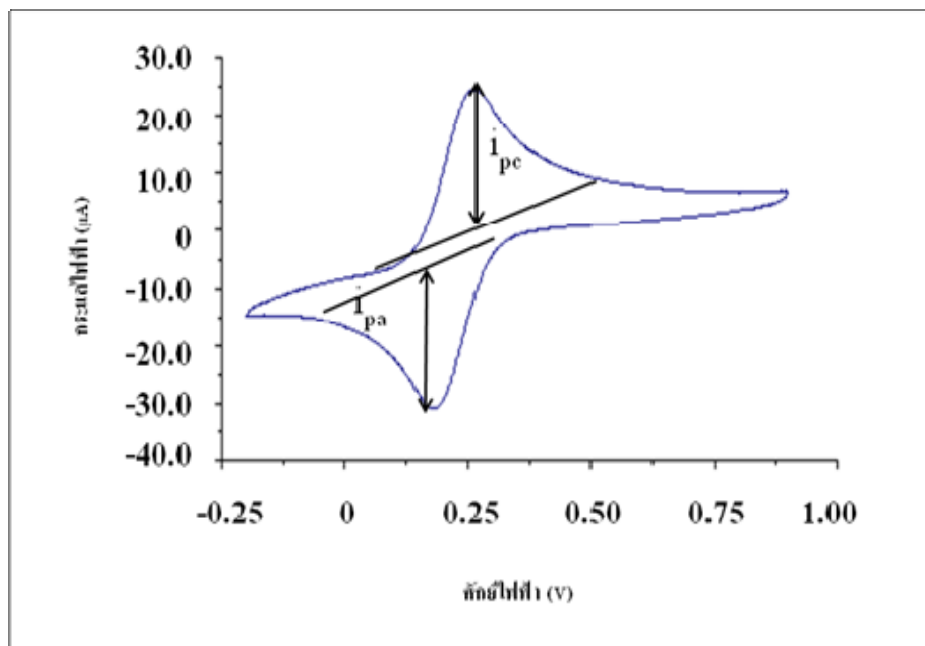


รูปที่ 4.6 เกณฑ์การพิจารณาขั้วไฟฟ้าทำงาน

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบกระแสแอโนดิกและกระแสแคโทดิก ของขั้วไฟฟ้า 2B HB 1H 2H 3H 4H 5H และ 6H

ขั้วไฟฟ้า	$i_{pa} (\mu\text{A})$	$i_{pc} (\mu\text{A})$	$i_{pa}/i_{pc} (\mu\text{A})$
2B	85.3	38.3	2.2
HB	60.2	0.57	105
1H	16	0	-
2H	9.31	1.4	6.6
3H	25.2	0	-
4H	26	35.5	0.7
5H	20	17.3	1.2
6H	25.7	28	0.9

จากตารางที่ 4.1 แสดงอัตราส่วนระหว่างค่า กระแสแอโนดิกและ กระแสแคโทดิก ของขั้วไฟฟ้า 2B HB 1H 2H 3H 4H 5H และ 6H พบว่าขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอชนิด 6H ให้ค่า $i_{pa}/i_{pc}(\mu A)$ เข้าใกล้ 1 มาก ที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอชนิด 6H เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน และแสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอ 6H ดังรูปที่ 4.7 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XRD พบว่า 6H มีปริมาณคาร์บอนมากที่สุด จึงทำให้ขั้วไฟฟ้า 6H มีสมบัตินำไฟฟ้าได้ดีที่สุด



รูปที่ 4.7 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้า 6H ในสารละลาย โพแทสเซียมเฟอริก ไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์/วินาที จำนวน 3 รอบ

ศึกษาการทำซ้ำของขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอ 6H จำนวน 10 ขั้ว ผลการทดลองเป็น ดังตารางที่ 4.2 พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.1 แสดงว่ามีการทำซ้ำของขั้วไฟฟ้าได้ดี

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าอัตราส่วนระหว่าง กระแสแอโนดิกและ กระแสแคโทดิก ของขั้วไฟฟ้า 6H (n=10)

ขั้วไฟฟ้า	$i_{pa} (\mu A)$	$i_{pc} (\mu A)$	$i_{pa}/i_{pc} (\mu A)$
6H-1	25.7	28	0.92
6H-2	30.8	25.7	1.2
6H-3	28.5	23.2	1.23
6H-4	33.9	26.3	1.29
6H-5	29.9	24.4	1.23
6H-6	33.9	26.3	1.29
6H-7	28	24.5	1.14
6H-8	35.1	29.8	1.18
6H-9	35	29.9	1.17
6H-10	30.8	25.6	1.2
Mean $\pm$ SD = 1.18 $\pm$ 0.10 (1.08-1.28)			

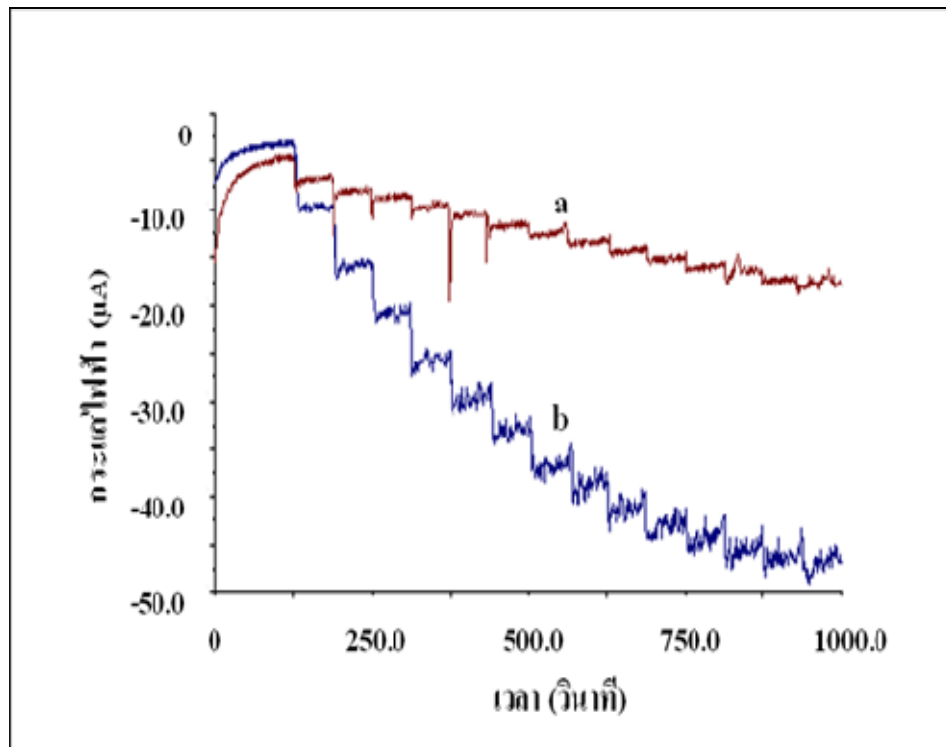
4.4 ศึกษาผลของอนุภาคนาโนทองในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4.4.1 ตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง

การตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้อนุภาคนาโนทอง บนผิวของขั้วไฟฟ้าทำงานนั้นทำได้โดยนำขั้วไฟฟ้าทำงานที่ผ่านการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าและเกาะติดด้วยโกลด์นาโนท่อนำไปจุ่มในสารละลายอนุภาคนาโนทอง และเอนไซม์ HRP ตามลำดับ เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น เป็นดังรูป 4.8 (a)

4.4.2 ตรึงเอนไซม์ HRP โดยไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง

การตรึงเอนไซม์ HRP โดยไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง บนผิวของขั้วไฟฟ้าทำงานนั้นทำได้โดยนำขั้วไฟฟ้าทำงานที่ผ่านการกระตุ้นผิวหน้าจุ่มลงในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ แล้วจุ่มในสารละลายเอนไซม์ HRP เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น เป็นดังรูปที่ 4.8 (b)

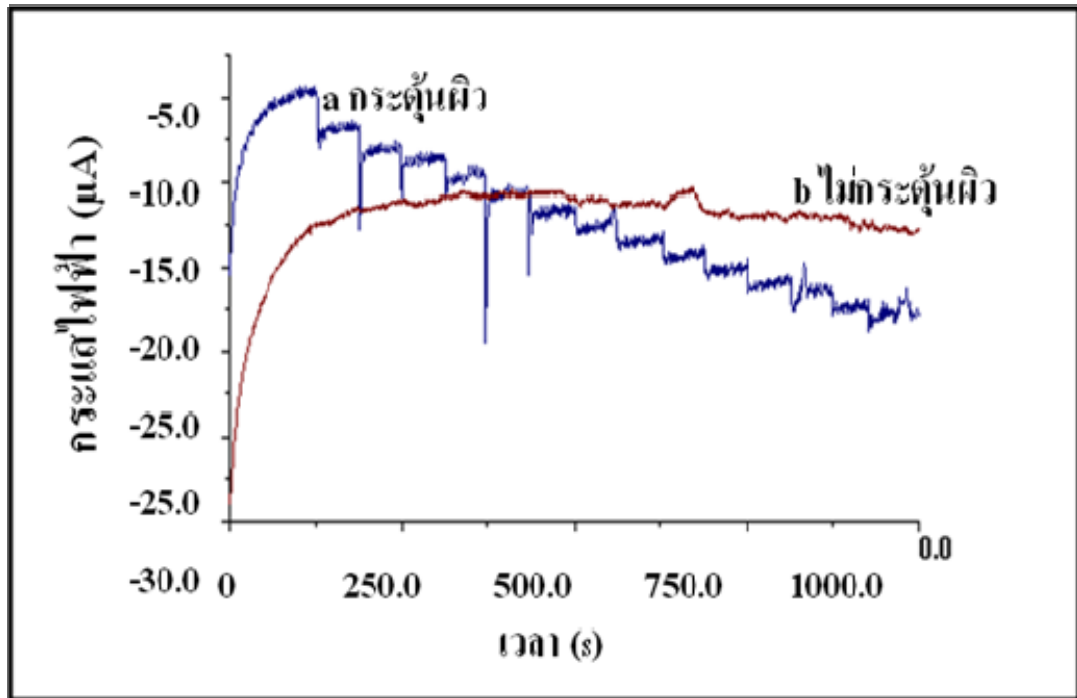


รูปที่ 4.8 สัญญาณแอมเพโรเมตริก (a) Au/HRP/Cs-electrode (b) HRP/Glu/Cs-electrode ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 6.0 ให้ศักย์ไฟฟ้า -0.20 โวลต์ และเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 50 μL

จากรูปที่ 4.8 เปรียบเทียบสัญญาณแอมเพโรเมตริก ระหว่างตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง (a) และ ตรึงเอนไซม์ HRP โดยไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง (b) การใช้อนุภาคนาโนทองให้ค่ากระแสไฟฟ้ามากกว่าไม่มีอนุภาคนาโนทอง ดังนั้นจึงเลือกใช้อนุภาคนาโนทองเพื่อตรึงเอนไซม์ HRP ในการทดลองต่อไป

4.5 ศึกษาผลของการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน

รูปที่ 4.9 แสดงผลการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า พบว่าการกระตุ้นผิวหน้าจะทำให้มีค่ากระแสไฟฟ้ามากกว่าไม่มีการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า เพราะกระบวนการกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าเป็นการเพิ่มรูพรุนของผิวขั้วไฟฟ้า เพื่อให้โคโคซานเกาะบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้ดี



รูปที่ 4.9 สัญญาณแอมเพอโรเมตริก (a) กระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า (b) ไม่กระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า
เดิม 0.5mM H_2O_2 50 μL ให้ศักย์ -0.20 โวลต์ ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (pH =7) ที่มี Methylene blue

4.6 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเกาะติด โคลโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

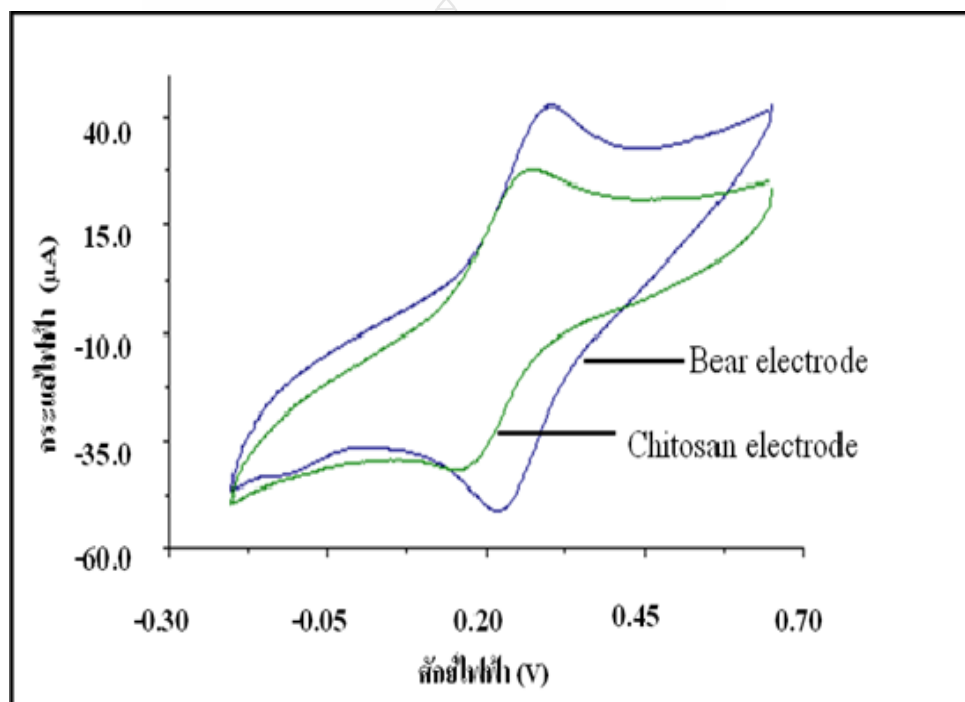
การศึกษาเวลาในการเกาะติดของโคลโตซาน โดยวิธี Electrochemical deposition ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีการสะสม analyte ที่ผิวของขั้วไฟฟ้าทำงาน ในสารละลายที่มีการคนเป็นเวลาระยะหนึ่ง (แน่นอน) เมื่อให้ ศักย์ไฟฟ้าเข้าไปที่ขั้วไฟฟ้าทำงาน จะทำให้สารละลายโคลโตซานที่มี pH=5 มี pH เพิ่มขึ้นจนมากกว่า pI ของโคลโตซาน (pI=6.3) ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ละลายจึงทำให้โคลโตซานเกาะติดบนขั้วไฟฟ้าทำงานได้

4.6.1 ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคลโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ศึกษาให้ศักย์ไฟฟ้าที่ +1.2 +1.5 และ +3.0 โวลต์ ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่า ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +1.5 โวลต์ โคลโตซาน สามารถเกาะติดบนขั้วไฟฟ้าทำงานได้ดี เพราะค่ากระแสแอโนดิกและกระแสแคโทดิกลดลง แสดงว่ามีโคลโตซานไปเกาะทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนลดลง ดังรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.3 ผลของการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดไคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ศักย์ไฟฟ้า (V)	ผลการทดลอง
+1.2	ไคโตซานไม่เกาะติดบนขั้วไฟฟ้าทำงาน
+3.0	เกิดฟองอากาศ
+1.5	ไคโตซานสามารถเกาะติดบนขั้วไฟฟ้าทำงานได้



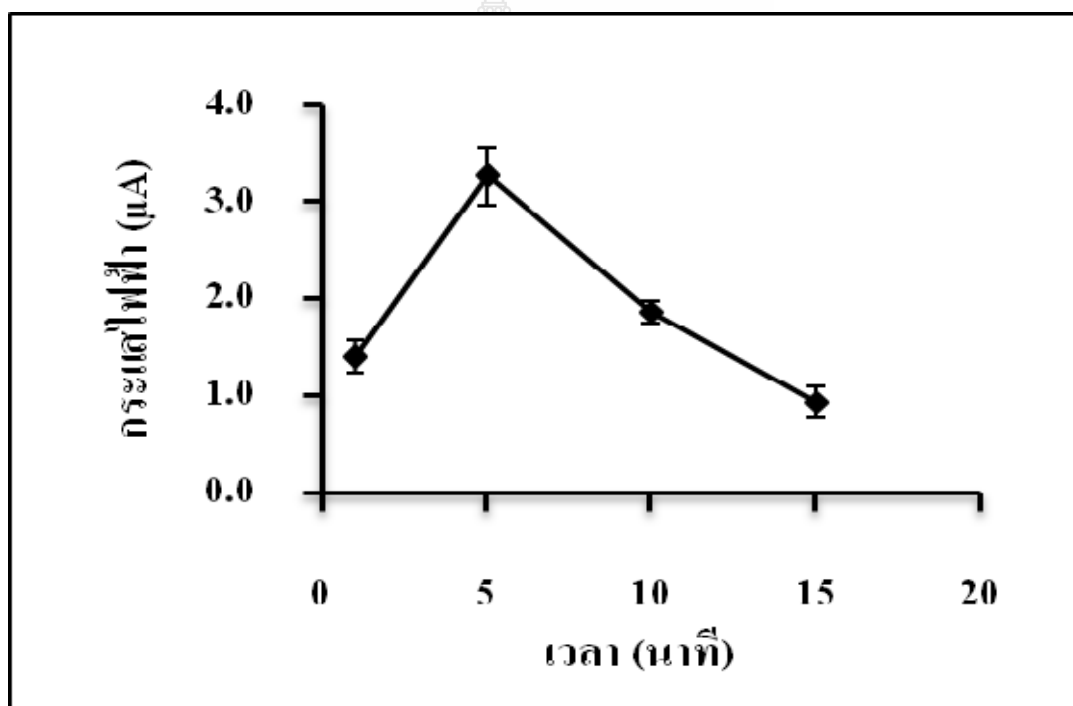
รูปที่ 4.10 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าได้นินสอที่มีการเกาะติดของไคโตซานโดยให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 V. ในสารละลายโพแทสเซียมเพอริกซายาไนต์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราสแกน 50 มิลลิโวลต์/วินาที จำนวน 3 รอบ

4.6.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดไคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ศึกษาเวลาที่ 1 5 10 และ 15 นาที ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.11 เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดไคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน พบว่าที่เวลา 5 นาที จะมีค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด จึงเลือกทำการเกาะติดไคโตซานโดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ +1.5 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

เวลา (นาทื)	กระแสไฟฟ้า (μA)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	5	10		
1	1.2	1.5	1.5	1.4	0.17
5	3.6	3.2	3	3.3	0.31
10	1.8	1.8	2	1.9	0.12
15	0.8	0.9	1.1	0.9	0.15



รูปที่ 4.11 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกาะติดโคโตซานบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

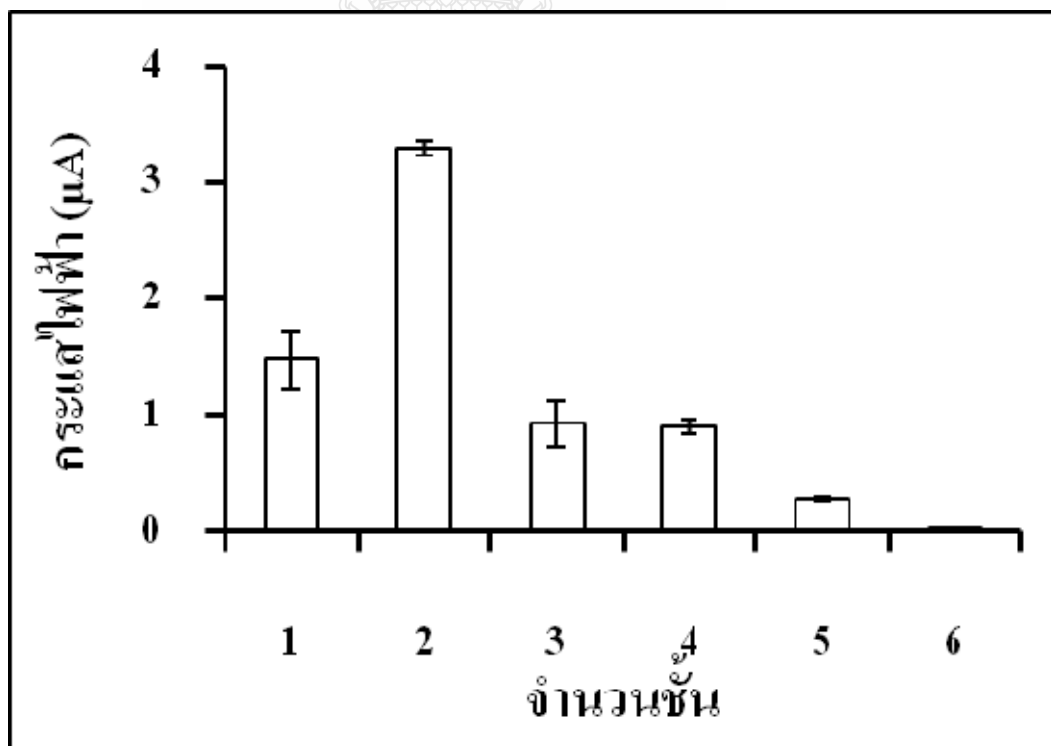
4.7 ศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer

จากการศึกษาจำนวนชั้นของการตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer พบว่าเมื่อจำนวนชั้นเพิ่มขึ้น ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ก็เพิ่มขึ้นด้วย เพราะมีปริมาณเอนไซม์ HRP และอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้น และที่จำนวน 2 ชั้น ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด เมื่อจำนวนชั้นมากกว่า 2 ชั้น (3 4

6 และ 8) ค่ากระแสไฟฟ้าลดลง ทั้งนี้เพราะเมื่อจำนวนชั้นเพิ่มมากขึ้นจะทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารละลายไปยังผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้น้อยลง ดังนั้นจำนวนชั้นเท่ากับ 2 จึงเหมาะสมที่สุด ดังรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.5 ผลศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer

จำนวนชั้น	กระแสไฟฟ้า (μA)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	1.5	1.3	1.6	1.47	0.15
2	3.3	3.6	3.1	3.33	0.25
3	0.9	1	0.9	0.93	0.06
4	1.1	0.7	0.9	0.90	0.20
6	0.3	0.3	0.2	0.27	0.06
8	0.06	0.04	0.02	0.04	0.02



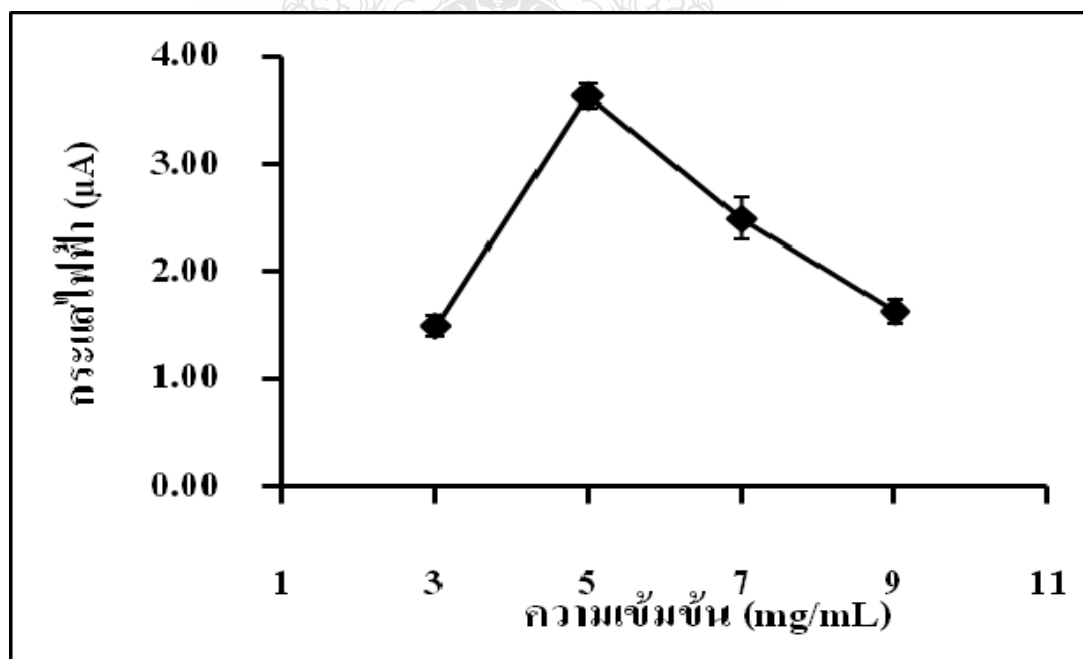
รูปที่ 4.12 ผลศึกษาจำนวนชั้นของการตรึง HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยเทคนิค Layer-by-Layer

4.8 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP

จากตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.13 แสดงผลการศึกษาของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP ที่เหมาะสมในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระบบแอมเพโรเมตรี จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของเอนไซม์นี้ พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 mg/mL จะให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด เมื่อความเข้มข้นมากขึ้น ค่ากระแสไฟฟ้าจะลดลง เพราะเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะมีการจับซึ่งมีผลทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างสารละลายกับผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงานลดลง

ตารางที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP

ความเข้มข้น (mg/ml)	กระแสไฟฟ้า (μ A)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
3	1.6	1.5	1.4	1.50	0.10
5	3.7	3.7	3.5	3.63	0.12
7	2.7	2.3	2.5	2.50	0.20
9	1.5	1.7	1.7	1.63	0.12



รูปที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP

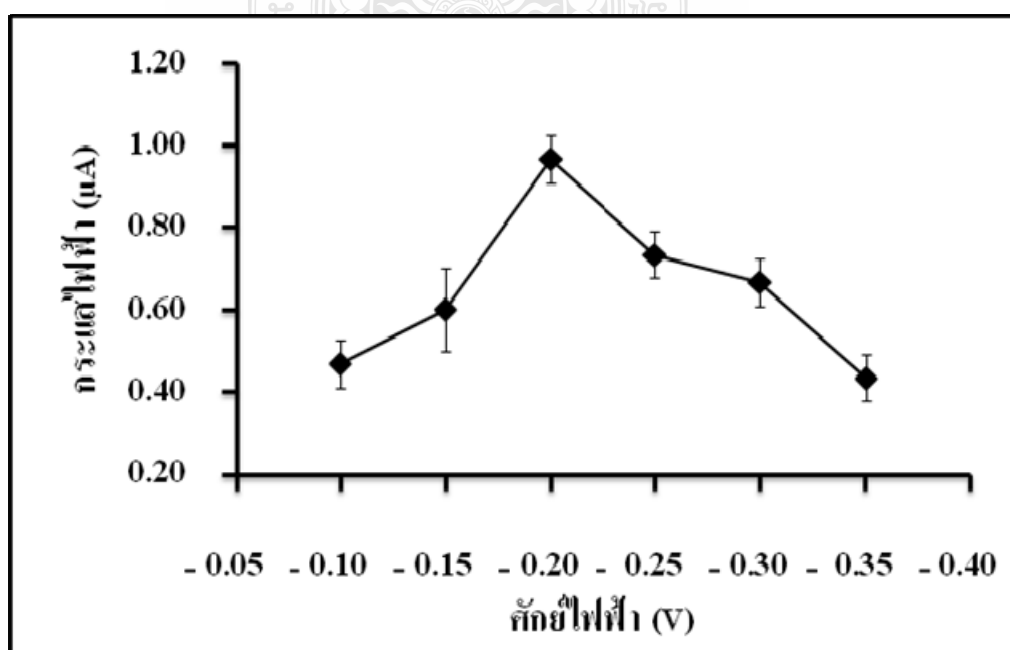
4.9 หาสภาวะที่เหมาะสมในระบบแอมเพอโรเมตริกสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4.9.1 ศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน

จากตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.14 แสดงผลการศึกษาให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระบบแอมเพอโรเมตริก พบว่าที่ -0.20 โวลต์ จะให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด เพราะเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์ HRP

ตารางที่ 4.7 ผลศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ศักย์ไฟฟ้า (V)	กระแสไฟฟ้า (μA)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
-0.10	0.4	0.5	0.5	0.47	0.06
-0.15	0.7	0.6	0.5	0.60	0.10
-0.20	1.0	0.9	1.0	0.97	0.06
-0.25	0.7	0.8	0.7	0.73	0.06
-0.30	0.7	0.7	0.6	0.67	0.06
-0.35	0.4	0.5	0.4	0.43	0.06



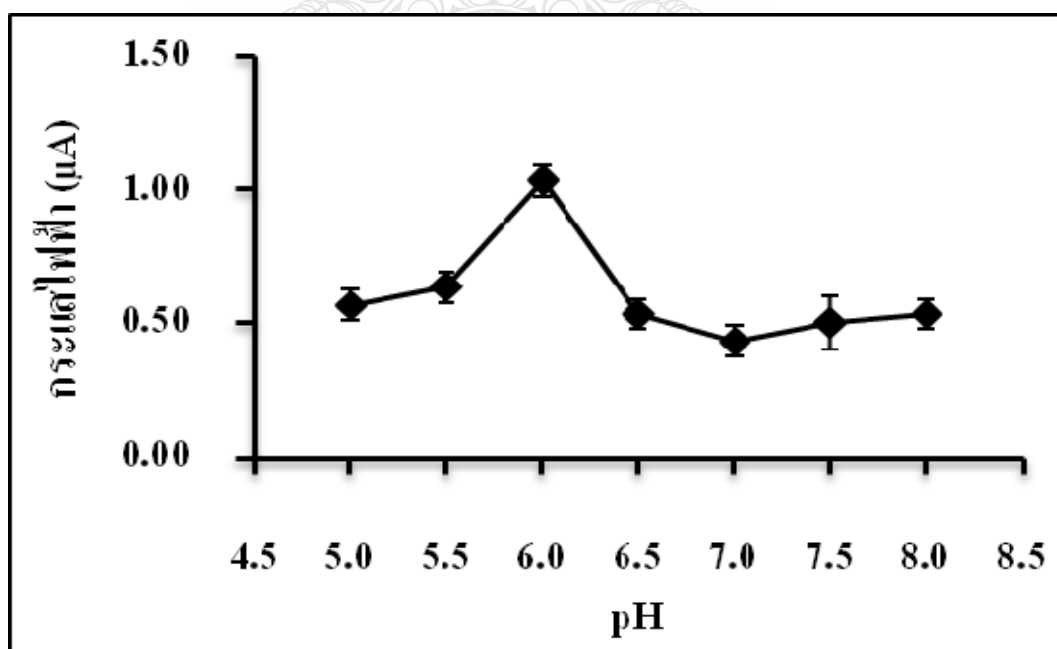
รูปที่ 4.14 ผลศึกษาการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4.9.2 ศึกษา pH ของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์

แสดงผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.15 จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าและค่า pH พบว่า ที่ pH ของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เท่ากับ 6.0 จะให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด

ตารางที่ 4.8 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์

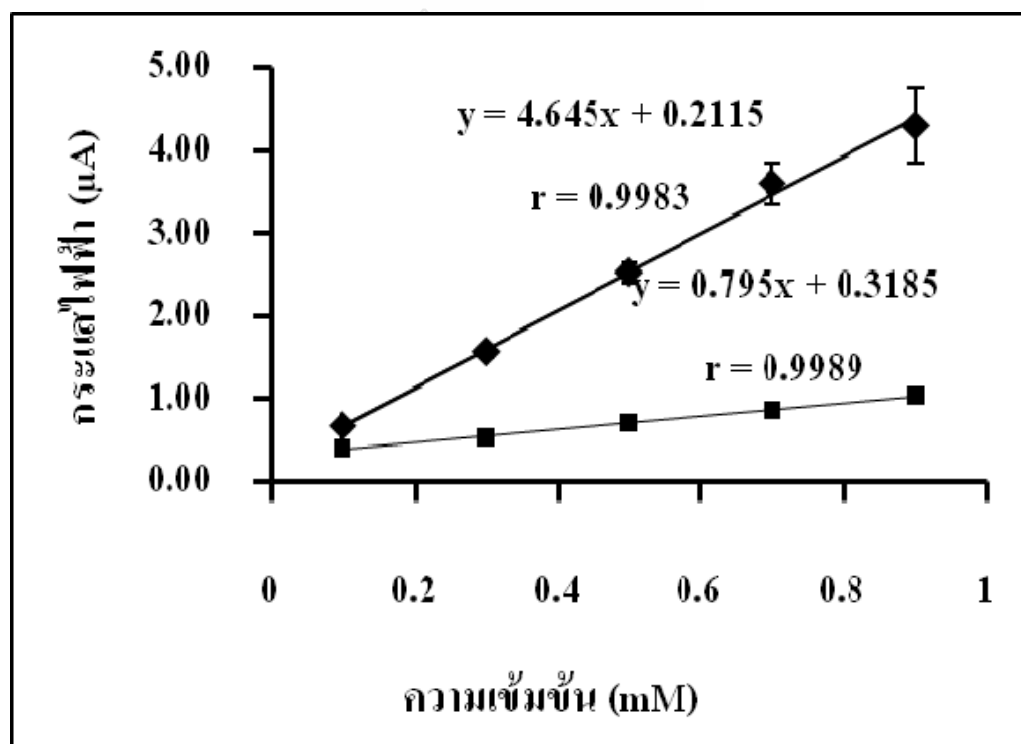
pH	กระแสไฟฟ้า (μA)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
5.0	0.6	0.5	0.6	0.57	0.06
5.5	0.7	0.6	0.6	0.63	0.06
6.0	1.1	1	1	1.03	0.06
6.5	0.6	0.5	0.5	0.53	0.06
7.0	0.4	0.5	0.4	0.43	0.06
7.5	0.6	0.4	0.5	0.50	0.10
8.0	0.5	0.6	0.5	0.53	0.06



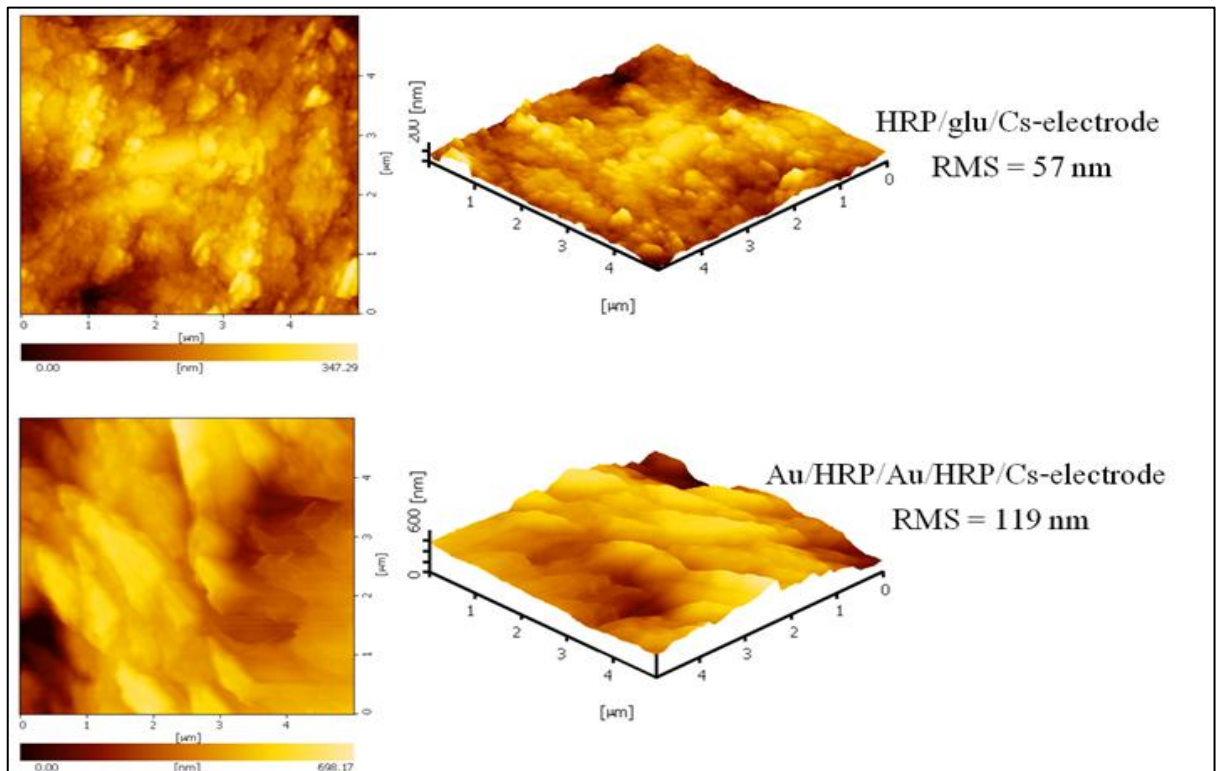
รูปที่ 4.15 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์

4.10 เปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น กับไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง

จากรูปที่ 4.16 แสดงกราฟมาตรฐานของการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น กับตรึงเอนไซม์ HRP โดยไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง พบว่าเมื่อใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น จะมีความไววิเคราะห์ มากกว่าไม่ใช้อนุภาคนาโนทองถึง 6 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองสามารถช่วยเพิ่มความไววิเคราะห์ของระบบแอมเพโรเมตริก ไบโอเซนเซอร์ได้ดี เพราะอนุภาคนาโนทองช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้มีปริมาณเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้ามากขึ้นและอนุภาคนาโนทองยังช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี ทำให้ได้ค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง



รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยอนุภาคนาโนทอง กับตรึงเอนไซม์ HRP) โดยไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง



รูปที่ 4.17 Atomic force microscope (AFM) แสดงความขรุขระของการตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้ อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น กับไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง

จากรูปที่ 4.17 แสดงความขรุขระของการตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น กับ ไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง พบว่าการใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้นให้ค่า RMS (บ่งบอกความขรุขระ) มากกว่าไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง แสดงว่าการใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้นทำให้มีปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น

4.11 การทวนสอบวิธี

4.11.1 ความเที่ยงของวิธี

4.11.1.1 ศึกษาการทำซ้ำของวิธี

ใช้ขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วเดียว ในการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM จำนวน 7 ครั้ง โดยวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในแต่ละครั้งและนำค่ากระแสที่ได้ในแต่ละไปคำนวณหา ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 4 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยเกณฑ์ปกติที่ความเข้มข้นของสาร 10 ppm %RSD ต้องน้อยกว่า 7 ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธี

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (μA)
1	1.84
2	1.75
3	1.86
4	1.77
5	1.68
6	1.64
7	1.77
%RSD=4 (n=7)	

4.11.1.2 ศึกษาการทวนซ้ำของวิธี

วัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.5 mM โดยใช้ขั้วไฟฟ้า 7 ขั้ว วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ของขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละขั้ว และคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 6 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยเกณฑ์ปกติที่ความเข้มข้นของสาร 10 ppm %RSD ต้องน้อยกว่า 7 ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ผลศึกษาการทวนซ้ำของวิธี

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (μA)
1	0.92
2	0.85
3	0.91
4	0.77
5	0.86
6	0.88
7	0.84
%RSD= 6 (n=7)	

4.11.2 ความแม่นยำของวิธี

ผลการทดลองพบว่าให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน อยู่ในช่วง 80-104 % ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังตารางที่ 3.11

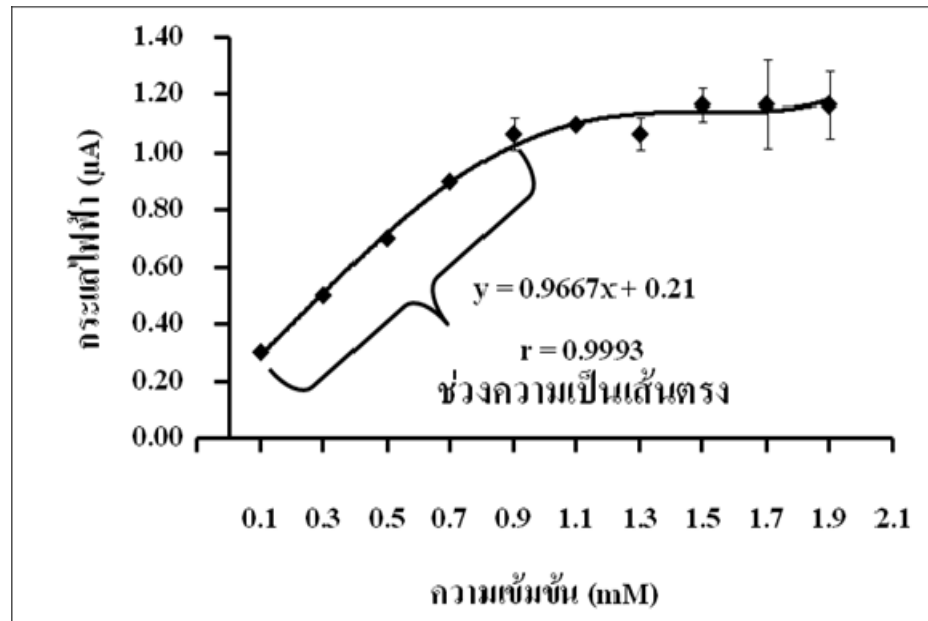
ตารางที่ 4.11 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mM)	%recovery	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	10	104	0.01
	30	81	0.04
	50	80	0.03
2	10	83	0.02
	30	80	0.02
	50	82	0.04

$$\%recovery = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน} - \text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน}} \times 100$$

4.11.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง

วัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.05 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.1 1.3 1.5 และ 1.7 mM วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองและนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้น พบว่าในช่วงความเป็นเส้นตรง ที่ความเข้มข้น 0.1-0.9 mM มีค่าสหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9993 และมีความไววิเคราะห์ 0.9667 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4.11.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ

ทำการวัด blank ของสารตัวอย่าง จำนวน 12 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบได้มีค่าที่ต่ำเท่ากับ 0.04 mM

$$\begin{aligned}
 \text{LOD} &= \text{mean} + 3\text{SD}_{\text{blank}} \\
 &= 0.01 + 3(0.01) \\
 &= 0.04 \text{ mM}
 \end{aligned}$$

4.11.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

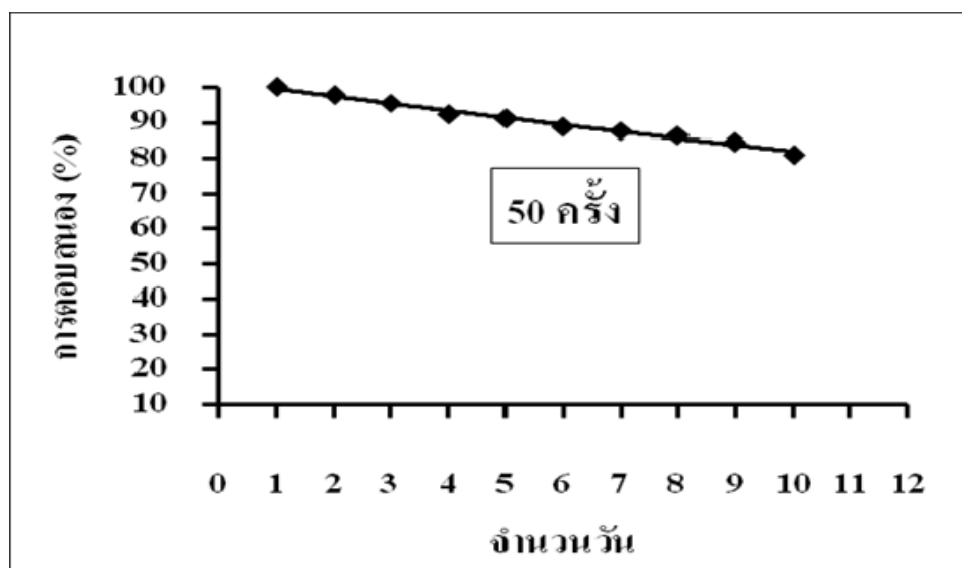
ทำการวัด blank ของสารตัวอย่าง จำนวน 12 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณหาค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณได้เท่ากับ 0.1 mM

$$\begin{aligned}
 \text{LOQ} &= \text{mean} + 10\text{SD}_{\text{blank}} \\
 &= 0.01 + 10(0.01) \\
 &= 0.10 \text{ mM}
 \end{aligned}$$

4.11.6 ศึกษาความเสถียร

4.11.6.1 Working stability

จากรูปที่ 4.19 เป็นการศึกษาค่าความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในแต่ละวันและเปรียบเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในวันแรกกับวันสุดท้าย แสดงให้เห็นว่าค่าการตอบสนองลดลงเหลือ 80 % โดยวิเคราะห์ได้ถึง 10 วัน จำนวน 50 ครั้ง



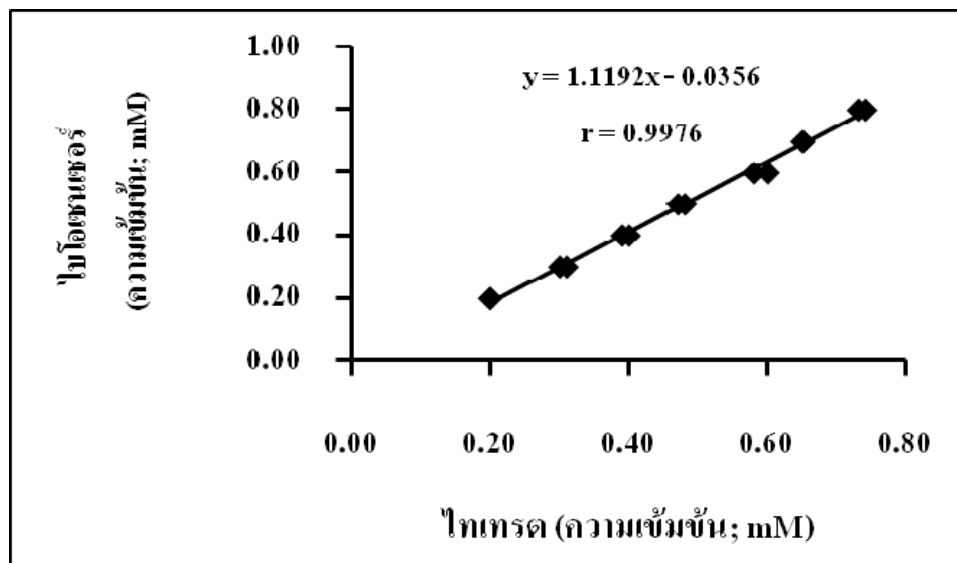
รูปที่ 4.19 แสดงการศึกษาค่าความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงาน

4.11.6.2 Storage stability

จากการทดลองพบว่า ในการค่าการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอที่ตรึงเอนไซม์ HRP และอนุภาคนาโนทองจำนวน 2 ชั้น ในครั้งแรกได้ค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ 0.64 μA และเก็บขั้วไฟฟ้านี้แช่ไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นวัดค่ากระแสไฟฟ้าอีกครั้งได้เท่ากับ 0.59 μA แสดงให้เห็นว่าค่าการตอบสนองลดลงเหลือ 90% หรือลดลงเพียง 10% เท่านั้น ดังนั้นขั้วไฟฟ้าทำงานจึงมีความเสถียรสูง

4.12 เปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรต

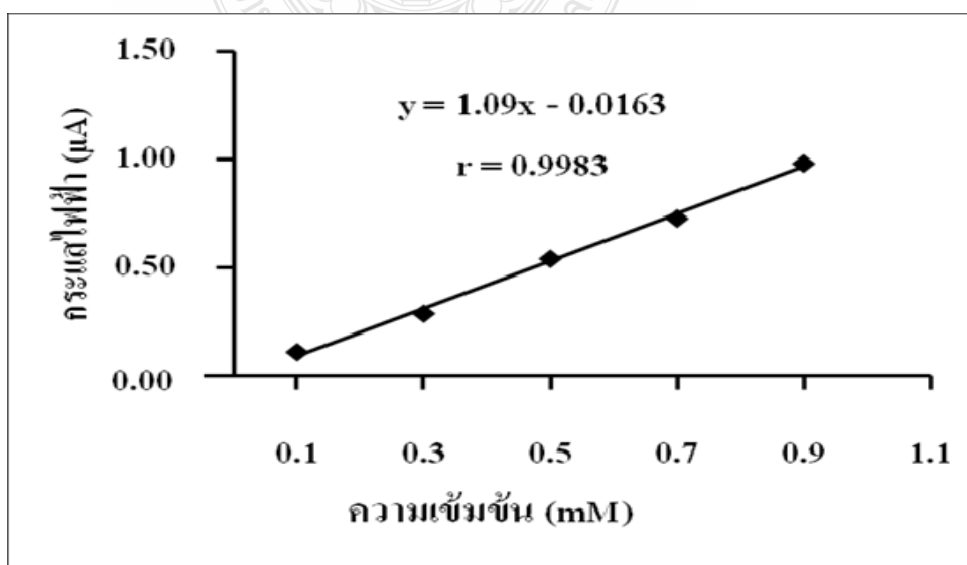
จากรูปที่ 4.20 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรต โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทดสอบผลที่ได้ด้วยวิธี Regression line พบว่าให้ค่าสหสัมพันธ์ 0.9976 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.9950 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.20 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไอโอดีนเซอรและวิธีไทเทรต

4.13 วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำยาล้างแผลและน้ำยาล้างแผล

จากการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำยาล้างแผลและน้ำยาล้างแผล นั้น ในทุกๆตัวอย่างจะสร้างกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 0.7 และ 0.9 mM ดังรูปที่ 4.21 จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นที่วัดได้มีค่าที่ใกล้เคียงกับวิธีไทเทรต และใกล้เคียงกับค่าที่ระบุไว้ในฉลากของสารตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารตัวอย่าง

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์ วิธีไทเทรตและค่าที่ระบุในฉลาก

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (%w/v)		
	ไบโอเซนเซอร์	ไทเทรต	ฉลากสารตัวอย่าง
1	5.9	5.7	6.0
2	2.9	2.6	3.0
3	3.1	2.9	3.0
4	4.7	4.3	6.0
5	8.7	8.9	9.0
6	10.1	10.6	12.0

ตารางที่ 4.13 การทดสอบผลการวิเคราะห์ด้วย สถิติ Wilcoxon signed rank test

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (%w/v)		ความแตกต่างของสองวิธี	ช่วง
	ไบโอเซนเซอร์	ไทเทรต		
1	5.9	5.7	0.2	-1
2	2.9	2.6	0.3	2
3	3.1	2.9	0.2	3
4	4.7	4.3	0.4	4
5	8.7	8.9	-0.2	-5
6	10.1	10.6	-0.4	6
ผลรวมทางลบ				6
ผลรวมทางบวก				15
ที่เปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่น 95% $P=2$ (critical values)				

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีไบโอเซนเซอร์และวิธีไทเทรตมาทดสอบความแตกต่างของสองวิธี ด้วยสถิติ Wilcoxon signed rank test ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.13 พบว่าค่าที่คำนวณได้ (ใช้ค่าต่ำสุด) มีค่ามากกว่าค่าที่ได้จากตาราง (ค่าจากตารางเท่ากับ 2) จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้สร้างไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์และเพิ่มความไววิเคราะห์ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ด้วยอนุภาคนาโนทอง ซึ่งใช้เอนไซม์ HRP เป็นเอนไซม์เพื่อเร่งปฏิกิริยา เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ แก่ระบบแอมเพอโรเมตริก จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์เกิดขึ้นที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน จากนั้นวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น และทำการการเพิ่มความไววิเคราะห์โดยใช้อนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค Layer-by-layer

ขั้นตอนแรกเป็นการสร้างขั้วไฟฟ้าทำงานจากไส้ดินสอดสีชนิดต่างๆ พบว่าไส้ดินสอดสี 6H เหมาะสมที่จะใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานมากที่สุด ขั้นตอนต่อไปเป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยวิธีรีดักชัน พบว่า ได้อนุภาคนาโนทองขนาด 4.38 ± 0.66 nm เมื่อได้อนุภาคนาโนทองแล้ว นำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ HRP โดยขั้นแรกเกาะติดบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยไคโตซาน จากนั้นตรึงอนุภาคนาโนทองบนไคโตซาน และตามด้วยเอนไซม์ HRP เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการใช้อนุภาคนาโนทองกับไม่ใช้อนุภาคนาโนทอง พบว่าการใช้อนุภาคนาโนทองให้ค่ากระแสไฟฟ้ามากกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้อนุภาคนาโนทองเพิ่มความไววิเคราะห์ต่อไป

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด เพื่อวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ กระตุ้นผิวหน้าขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอดที่ +1.8 โวลต์ เวลา 5 นาที เกาะติดไคโตซานบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าโดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ +1.5 โวลต์ เป็นเวลา 5 นาที แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อนุภาคนาโนทอง 2 ชั้น ในการตรึงเอนไซม์ HRP โดยใช้ HRP ความเข้มข้น 5 mg/mL

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบแอมเพอโรเมตริก พบว่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่ให้กับขั้วไฟฟ้าทำงาน คือ -0.2 โวลต์ และ pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดคือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6

ศึกษาการทวนสอบประสิทธิภาพของวิธี วิธีไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาเป็นวิธีที่มีความเที่ยงสูง ($\%RSD \leq 6$) และความแม่นยำสูง (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน อยู่ในช่วง 80-104) มีช่วงความเป็นเส้นตรงจาก 0.1 ถึง 0.9 mM โดยค่าสหสัมพันธ์เป็น 0.9993 ความไววิเคราะห์ 0.9667 mv/mM มีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.04 mM ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ คือ 0.1 mM ความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงานไส้ดินสอดที่ตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ไว้ พบว่าสามารถตรวจหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ถึง 50 ครั้ง โดยที่ยังมีค่าการตอบสนองของเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) เหลือมากกว่า 80 % และสามารถเก็บขั้วไฟฟ้าไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ได้เป็นเวลา 1 เดือน โดยที่ยังมีค่าการตอบสนองของเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) เหลือมากกว่า 90 % แสดงว่าขั้วไฟฟ้าทำงานมีความเสถียรสูง และศึกษาผลการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธี

ไบโอเซนเซอร์เทียบกับวิธีไทเทรต ผลการทดลองพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยทดสอบด้วยวิธี Regression line

เมื่อได้ระบบและสภาวะการทดลองที่เหมาะสม เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้นูกลีนาโนทอง 2 ชั้น กับไม่ใช้นูกลีนาโนทอง การใช้นูกลีนาโนทองสามารถเพิ่มความไววิเคราะห์ได้ถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับไม่ใช้นูกลีนาโนทอง ซึ่งยืนยันได้ด้วยผลการทดสอบด้วยเทคนิค Atomic force microscope

สุดท้ายนำไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เซนเซอร์มาวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคไบโอเซนเซอร์เทียบกับวิธีไทเทรต พบว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้สถิติแบบ Wilcoxon signed rank test

จึงสรุปได้ว่าไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพสูงสำหรับวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำยาข้อมสัณและน้ำยาล้างแผล

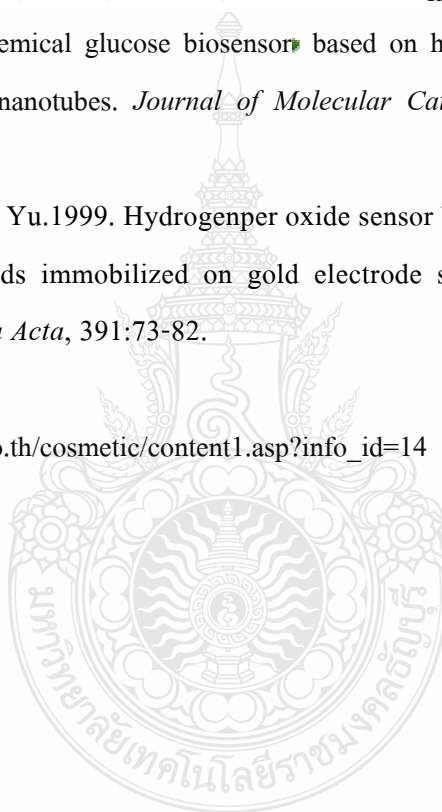


เอกสารอ้างอิง

- Bataillard P., Steffgen E., Haemmerli S., Manz A. and Widmer H.M. 1993. An integrated silicon thermopile as biosensor for the thermal monitoring of glucose, urea and penicillin. *Biosensors and Bioelectronics*, 8: 89-98.
- Eggins, B.R. (1996). Biosensor: on Introduction. New York: John Wiley & Son. 1-30.
- Harborn U., Xie B., Venkatesh R. and Danielsson B. Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 267: 225-237.
- Jeon B. J., Kim M.H. and Pyun J.C. 2011. Application of a functionalized parylene film as a linker layer of SPR biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 154: 89-95.
- Jin W., Yang G., Wu L., Wang Q., Shao H., Qin A., Yu B., Li D. and Cai B. 2011. Detecting 5-morpholino-3-amino-2-oxazolidone residue in food with label-free electrochemical impedimetric immunosensor. *Food Control*, 22: 1609-1616.
- Kafi A.K.M., Lee D.Y., Choi W.S. and Kwon Y.S. 2008. Fabrication and electrochemical characterization of HRP-lipid Langmuir-Blodgett film and its application as an H₂O₂ biosensor. *Thin Solid Films*, 516: 3641-3645.
- Lan D., Li B. and Zhang Z. 2008. Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 934-938.
- Lazerges M., Perrot H., Zeghib N., Antoine E. and Compere C. 2006. In situ QCM DNA-biosensor probe modification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120: 329-337.
- Li, M., Huang, S., Zhu, P., Kong, L., Peng, B. and Gao, H. (2009). A novel DNA biosensor based on ssDNA/Cyt c/l-Cys/GNPs/Chits/GCE. *Electrochim. Acta*. 54: 2284-2289.

- Liu C., Cui D. and Li H. 2010. A hard–soft microfluidic-based biosensor flow cell for SPR imaging application. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 255-261.
- Liu X., Niu W., Li H., Han S., Hu L. and Xu G. 2008. Glucose biosensor based on gold nanoparticle – catalyzed luminol electrochemiluminescence on a three-dimensional sol–gel network. *Electrochemistry Communications*, 10: 1250-1253.
- Ma L., Yuan R., Chai Y. and Chen S. 2009. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA–silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56: 215-220.
- Manso J., Mena M., Luz, Y.S.P. and Pingarrón J. M., 2008. Bionzyme amperometric biosensor using gold nanoparticle-modified electrodes for the determination of inulin in foods. *Analytical Biochemistry*, 375: 345-353.
- Masuoka N., Wakimoto M., Ubuka T., Nakano T. 1996. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide: catalase activity and rates of hydrogen peroxide removal by erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 254: 101-112.
- Oszwa S., Lipka R., Jarosz M. 2000. Sensitive reversed-phase liquid chromatographic determination of hydrogen peroxide and glucose based on ternary vanadium(V)-hydrogen peroxide-2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol system. *Analytica Chimica Acta*, 421: 35-43.
- Qiang C., We T., Dingzhong W., Xiaojie W., Na L. and Feng L. Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 575-579.
- Sakuragawa A., Taniai T., Okutani T. 1998. Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. *Analytica Chimica Acta*, 374: 191-200.

- Song K.M., Cho M., Jo H., Min K., Jeon S.H., Kim T., Han M.S., Ku J.K. and Ban C. 2011. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. *Analytical Biochemistry*, 415: 175-181.
- Tong Z., Yuan R., Chai Y., Xie Y. and Chen S. 2007. A novel and simple biomolecules immobilization method: Electro-deposition ZrO_2 doped with HRP for fabrication of hydrogen peroxide biosensor. *Journal of Biotechnology*, 128: 567-575.
- Wang Y., Yuan R., Chaia Y., Li W., Zhuo Y., Yuan Y. and Jingjing L. 2011. Direct electron transfer: Electrochemical glucose biosensor based on hollow Pt nanosphere functionalized multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71: 146-151.
- Xiao Y., Ju H.X., Chen H. Yu.1999. Hydrogenper oxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Analytica Chimica Acta*, 391:73-82.
- http://webdb.dmsc.moph.go.th/cosmetic/content1.asp?info_id=14



ภาคผนวก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

แบบ ว-1ค

(ฉบับปรับปรุงปี พ.ศ. 2551)

แบบเสนอโครงการวิจัย (research project)

ประกอบเอกสารของงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ตามมติคณะรัฐมนตรี

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์โดยใช้อนุภาคนาโนทอง

(ภาษาอังกฤษ) ... Hydrogen peroxide Sensor Fabrication using

Gold nanoparticles

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) (กรณีเป็น โครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย)

(ภาษาอังกฤษ)

ส่วน ก : ลักษณะโครงการวิจัย

☒ โครงการวิจัยใหม่

☐ โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา....ปี ปีนี้เป็นปีที่.... รหัสโครงการวิจัย.....

I ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผน พัฒนา เศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) (กรณีระบุความสอดคล้อง เพียง 1 ยุทธศาสตร์ ที่มีความสอดคล้องมากที่สุด โดยโปรดดูรายละเอียดในผนวก 2) ยุทธศาสตร์ ...ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและยั่งยืน.....

- ระบุความสำคัญกับเรื่องที่สอดคล้องมากที่สุด ในยุทธศาสตร์นั้น ๆ (โปรดดู รายละเอียดในผนวก 2)

การปรับโครงสร้างการผลิตเพื่อเพิ่มผลิตภาพ และคุณค่าของสินค้าและ บริการบนฐานความรู้และความเป็นไทย

II ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ. 2551-2553) (กรณีระบุความสอดคล้องเพียง 1 ยุทธศาสตร์ 1 กลยุทธ์ และ 1 แผนงานวิจัย ที่มีความสอดคล้องมากที่สุด โดยโปรดดูรายละเอียดในผนวก 3)

- ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 3 การสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนา

ทางวิทยาการและทรัพยากรบุคคล

- กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 พัฒนานวัตกรรมและองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์ ทางสังคมศาสตร์ และการพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ในวิทยาการต่างๆ
- แผนงานวิจัยที่ 1.1 การวิจัยและพัฒนานวัตกรรมสิ่งประดิษฐ์และองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ วัสดุศาสตร์ เทคโนโลยีสารสนเทศและสื่อสาร นาโนเทคโนโลยี วิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข สัตว์ทดลองและวิธีการอื่นเพื่อทดแทนการใช้สัตว์ เทคโนโลยีด้านอวกาศยุทธโศภรณ์

III ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับกลุ่มเรื่องที่ควรวิจัยเร่งด่วนตามนโยบาย

และยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ. 2551-2553) (โปรดดูรายละเอียดในผนวก 3)

- กลุ่มเรื่องเทคโนโลยีใหม่และเทคโนโลยีที่สำคัญเพื่ออุตสาหกรรม

IV ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับนโยบายรัฐบาล (กรณีระบุความสอดคล้องเพียง 1

หัวข้อที่มีความสอดคล้องมากที่สุด โดยโปรดดูรายละเอียดในผนวก 4)

นโยบายเร่งด่วนที่จะเริ่มดำเนินการในปีแรก : เรื่อง 1.1 การสร้างความเชื่อมั่นและกระตุ้นเศรษฐกิจในภาพรวม เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นแก่ภาคประชาชนและเอกชนในการลงทุนและการบริโภค

- นโยบายระยะการบริหารราชการ 4 ปี ของรัฐบาล : นโยบายวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี การวิจัย และนวัตกรรม

ส่วน ข : องค์ประกอบในการจัดทำโครงการวิจัย

1. ผู้รับผิดชอบ [คณะผู้วิจัย บทบาทของนักวิจัยแต่ละคนในการทำวิจัย และสัดส่วนที่ทำ การวิจัย (%)] และหน่วยงาน ประกอบด้วย หน่วยงานหลักและหน่วยงานสนับสนุน

ที่ปรึกษาโครงการ

ผศ. ดร. นิตยา ใจวัฒนา

(ให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับการตรึงวัสดุชีวภาพ)

หัวหน้าโครงการ

ดร. ศิริวรรณ ดีภู

สัดส่วนที่ทำวิจัย 70 %

(ตรึงวัสดุชีวภาพ สร้างเซนเซอร์)

ผู้วิจัยหลัก

นาย พงษ์นรินทร์ ชุมแสง

สัดส่วนที่ทำวิจัย 25%

(สังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง)

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวสุภาวดี ปาทยานานนท์ สัดส่วนที่ทำวิจัย 5%
(ให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับเอนไซม์)

ผู้สนับสนุนงานวิจัย

ไม่มี

หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย

- คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ต.คลองหก อ.ธัญบุรี จ.
ปทุมธานี 12110 โทรศัพท์ 02-549-3404

2. ประเภทของการวิจัย (ผนวก 5)

การพัฒนาทดลอง (Experimental development)

3. สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย (ผนวก 5)

สาขาวิชาการของสภาวิจัย	สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช
กลุ่มวิชา	เคมีวิเคราะห์

4. คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

อนุภาคนาโนทอง, เซนเซอร์, เอนไซม์ Horseradish peroxidase, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
Gold nanoparticles, sensor, Horseradish peroxidase, hydrogen peroxide

5. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เป็นสารสำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ในการฟอกย้อมสี ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ทำความสะอาด และอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันนี้ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ได้ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์โกรกผม ใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์ดัดผมและยืดผม และใช้ผสมเพื่อเป็น oxidizer กับผลิตภัณฑ์ย้อมผม ชนิดถาวร hydrogen peroxide เป็นสารที่ถูกควบคุมปริมาณการใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อ และปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางตามราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 162 ง ลงวันที่ 9 ตุลาคม 2551 อัตราส่วนสูงสุดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเท่ากับ 12% ถ้าร่างกายได้รับสารไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากกว่าปริมาณที่กำหนดไว้จะทำให้เกิดการแพ้ ระคายเคืองในบริเวณที่สัมผัสกับสาร ถ้าเข้าตาอาจจะทำให้ตาบอดได้ ในปี 1998 นักวิชาการซึ่งเป็น

นักวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัย California, San Francisco ได้ตั้งข้อสงสัยจากการทำการทดลองในคนที่ใช้ยาคุมกำเนิดจำนวน 2,544 คน หลังจากการศึกษาแปรผลการศึกษากับสัตว์ทดลองทางด้านระบาดวิทยา สรุปได้ว่ามีความเชื่อมโยงกับในเรื่องของการเกิด non-Hodgkin's lymphoma (มะเร็งต่อมน้ำเหลือง) กับยาคุมกำเนิด ซึ่งตีพิมพ์ในวารสาร American Journal of Public Health ในเดือนธันวาคม 1998

ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์จึงมีความจำเป็น วิธีทั่วไปที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ คือ Spectrophotometric (Masuoka et al., 1996), Fluorometric (Sakuragawa et al., 1998) Liquid chromatography (Oszwa et al., 2000) และ Chemiluminescence (Lu et al., 2009) แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีข้อด้อยเช่น ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีผลของสารรบกวนต่างๆ สารเคมีที่ใช้มีราคาสูงและมีความเป็นพิษ (Xiao et al., 1999) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เพื่อให้ได้ตัวตรวจวัดที่ให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว และมีความถูกต้องสูง

6. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 6.1 เพื่อสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง
- 6.2 เพื่อตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนอนุภาคนาโนทอง
- 6.3 เพื่อสร้างไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เซนเซอร์
- 6.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์โดยใช้เซนเซอร์ที่สร้างขึ้น

1. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 7.1 สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิครีดักชันโดยใช้สารละลาย Chloroauric acid เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์
- 7.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเคลือบผิวของขั้วไฟฟ้าด้วยสารละลายพอลิเมอร์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า เช่น ความเข้มข้นและความเป็นกรด-เบสของสารละลายพอลิเมอร์ ความหนาของพอลิเมอร์ที่เคลือบและอัตราความเร็ว (Scan rate) ที่ในการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization)
- 7.3 ตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคการดูดซับทางกายภาพ
- 7.4 ตรวจสอบเอนไซม์ Horseradish peroxidase สภาวะตรึงบนอนุภาคนาโนทองด้วยสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์
- 7.5 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ โดยใช้เซนเซอร์ที่สร้างขึ้น เช่น ความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

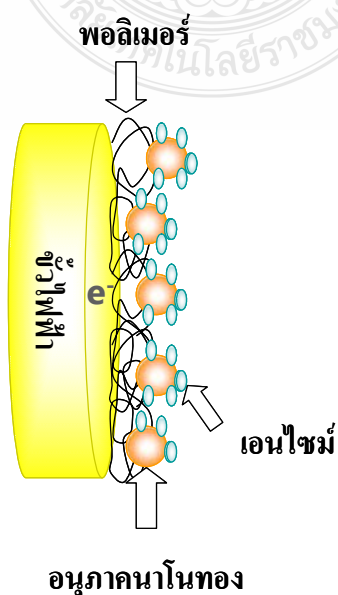
7.6 ทดสอบประสิทธิภาพของเซนเซอร์โดยทำการทวนสอบวิธี (Validation method) เช่น หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) และขีดจำกัดการตรวจวัด (Detection limit)

8. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปัจจุบันอนุภาคนาโนทองได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางเคมีวิเคราะห์ ทั้งนี้เพราะอนุภาคนาโนทองมีสมบัติเด่นหลายประการเช่น มีพื้นที่ผิวมาก ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต และที่สำคัญสามารถช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างโปรตีนกับผิวขั้วไฟฟ้าได้ดี (Song et al., 2010) ด้วยข้อดีดังกล่าวจึงทำให้อนุภาคนาโนทองได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในด้านวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า นอกจากนี้ข้อดีนี้แล้วอนุภาคนาโนทองยังมีสมบัติอีกอย่างคือ สารที่มีหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ของ อะมิโน ($-NH_2$), ซัลเฟอร์ ($-SH$) และไซยาไนด์ ($-CN$) สามารถเกาะบนผิวของอนุภาคนาโนทองได้ด้วย high affinity (Song et al., 2010) จึงทำให้อนุภาคนาโนทองสามารถใช้ได้กับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ได้ เช่น ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA (Li et al., 2008), สารบ่งชี้มะเร็ง (Xu et al., 2008) และสารปราบศัตรูพืชและสัตว์ (Du et al., 2007) เป็นต้น

หลักการของเทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็น อาศัยการทำงานของสารชีวภาพ เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์ หรือ ดีเอ็นเอ ทำหน้าที่ในการตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการตรวจวัด และสามารถตรวจวัดสารที่ต้องการตรวจวัดได้ด้วยตัวตรวจวัด (Detector) เช่น ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเซนเซอร์ที่ใช้หลักการทางเคมีไฟฟ้า โดยจะทำการตรึงวัสดุชีวภาพ เช่น เอนไซม์ ไว้บนผิวของอนุภาคนาโนทองโดยใช้หมู่อะมิโนของโปรตีนดูดซับบนผิวทองได้โดยตรง ทำการเชื่อมอนุภาคนาโนทองที่มีโปรตีนเกาะอยู่กับผิวของขั้วไฟฟ้าด้วยสายโซ่ของพอลิเมอร์ ดังรูปที่ 1



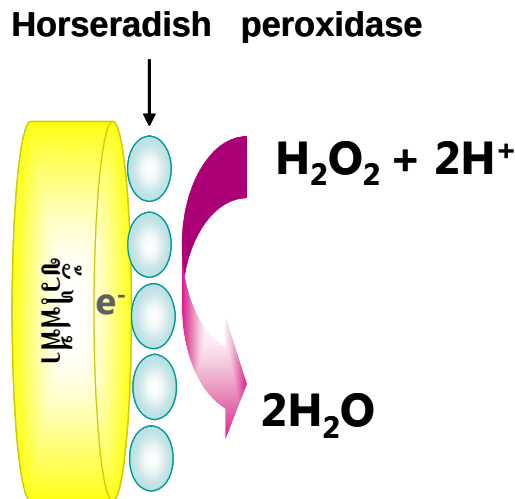
รูปที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเซนเซอร์

9. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) เป็นวิธีที่มีประโยชน์อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์สารประเภทต่างๆ ทั้งในการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานยา การวิเคราะห์ทางคลินิก การวิเคราะห์ทางอุตสาหกรรม การวิเคราะห์สารจากสิ่งแวดล้อม และการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในสาขาอื่นๆ เทคนิคแอมเพอโรเมตรี (Amperometry detection) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้หลักการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า หลักการทำงานของเทคนิค แอมเพอโรเมตรี เป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าใช้งานเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน และวัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทำให้ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์เทคนิคกล่าวร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยทำการตรึงวัสดุชีวภาพบนขั้วไฟฟ้า วัสดุชีวภาพจะเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนอิเล็กตรอนในสารละลาย และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังขั้วไฟฟ้าทำงาน ดังนั้นในกระบวนการเกิดปฏิกิริยาจะต้องใช้สารที่ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer) ซึ่งเรียกว่า Mediator สารเคมีที่ทำหน้าที่เป็น Mediator เช่น 1, 1'-dimethylferrocinium (Luong et al., 1994), Ferrocene (Schuhmann 1995), cobalt(II)phthalocyanine-cobalt(II)tetraphenylporphyrin pentamer (Ozoemena et al., 2006) แต่พบว่าสารเคมีดังกล่าวจะไปทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลทำให้การทำงานของเอนไซม์เสื่อมสภาพลง (Yi et al., 2000)

อนุภาคทอง (Gold particles) เป็นวัสดุชนิดหนึ่งที่มีสมบัติในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ร่วมกับโปรตีน เช่นเอนไซม์ เพราะทองจะไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน (Protein activity) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เซนเซอร์ให้มีความไววิเคราะห์สูง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารต่างๆ ได้ในความเข้มข้นต่ำและมีความถูกต้อง

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ โดยการใช้หลักการทางเคมีไฟฟ้า ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี (Amperometry detection) หลักการทำงานของเทคนิค แอมเพอโรเมตรี เป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้ากับขั้วไฟฟ้าใช้งานเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน และวัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้จะทำการตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนขั้วไฟฟ้าทำงาน ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงกระบวนการเกิดปฏิกิริยาบนขั้วไฟฟ้า โดยใช้เอนไซม์ Horseradish peroxidase

เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมกับขั้วไฟฟ้าทำงาน ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ผิวหน้า ผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้กระแสไฟฟ้า ในกระบวนการเกิดปฏิกิริยาจำเป็นต้องมีตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับขั้วไฟฟ้า ซึ่งเรียกว่า Mediator เช่น 1, 1'-dimethylferricinium (Luong et al., 1994), Ferrocene (Schuhmann 1995), cobalt(II)phthalocyanine–cobalt(II)tetraphenylporphyrin pentamer (Ozoemena et al., 2006) แต่สารที่ใช้นี้มี ความเป็นพิษต่อเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลทำให้การทำงานของเอนไซม์เสื่อมสภาพลง (Yi et al., 2000) อนุภาคทอง (Gold particles) เป็นวัสดุชนิดหนึ่งที่มีสมบัติในการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ร่วมกับโปรตีนเช่นเอนไซม์ เพราะทองจะไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน (Protein activity) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ให้มีความไววิเคราะห์สูง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารต่างๆ ได้ในความเข้มข้นต่ำและมีความถูกต้อง โดยทำการตรึงเอนไซม์ไว้บนอนุภาคทอง เชื่อมอนุภาคทองขนาดนาโนเมตรกับผิวของขั้วไฟฟ้าด้วยสารพอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางเคมีไฟฟ้า

ผู้รับผิดชอบ

ดร. ศิริวรรณ สุวรรณสะอาด
นาย พงษ์นรินทร์ ชุมแสง
นางสาวสุภาวดี ปาทรานานนท์

งานที่รับผิดชอบ

สร้างและตรวจสอบประสิทธิภาพเซนเซอร์
สังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง
ตรึงวัสดุชีวภาพบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

10. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Du D., Chen S. , Cai J., Zhang A. 2007. Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel for amperometric detection of organophosphorous insecticide. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 130–134.
- Li N., Zhao H., Yuana R. Peng K. , Chai Y. 2008. An amperometric immunosensor with a DNA polyion complex membrane/gold nanoparticles-backbone for antibody immobilization. *Electrochimica Acta*, 54: 235–241.
- Lu S., Song J., Campbell-Palmer L. 2009. A modified chemiluminescence method for hydrogen peroxide determination in apple fruit tissues *Scientia Horticulturae*, 120: 336–341.
- Luong J.H.T. , Masson C., Brown R.S., Male K.B. and Nguyen A.-L. 1994. Monitoring the activity of glucose oxidase during the cultivation of *Aspergillus niger* using novel amperometric sensor with 1, 1'-dimethylferrocenium as a mediator. *Biosensors and Bioelectronics*, 9 : 577–584.
- Masuoka N., Wakimoto M., Ubuka T., Nakano T. 1996. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide: catalase activity and rates of hydrogen peroxide removal by erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 254: 101–112.
- Oszwa S., Lipka R., Jarosz M. 2000. Sensitive reversed-phase liquid chromatographic determination of hydrogen peroxide and glucose based on ternary vanadium(V)-hydrogen peroxide-2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol system. *Analytica Chimica Acta*, 421: 35–43.
- Ozoemena K. I., Nyokong T. 2006. Novel amperometric glucose biosensor based on an ether-linked cobalt(II) phthalocyanine-cobalt(II) tetraphenylporphyrin pentamer as a redox mediator. *Electrochimica Acta*, 51: 5131–5136.
- Sakuragawa A., Taniai T., Okutani T. 1998. Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. *Analytica Chimica Acta*, 374: 191–200.
- Schuhmann W. 1995. Electron-transfer pathways in amperometric biosensors. Ferrocene-modified enzymes entrapped in conducting-polymer layers. *Biosensors and Bioelectronics*, 10: 181–193.
- Song Z., Yuan R., Chai Y., Yin B., Fu .P., Wang J. 2010. Multilayer structured amperometric immunosensor based on gold nanoparticles and Prussian blue nanoparticles/nanocomposite functionalized interface. *Electrochimica Acta*, 55: 1778–1784.

- Xiao Y., Ju H.X., Chen H. Yu.1999. Hydrogenper oxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Analytica Chimica Acta*, 391:73-82.
- Xu Y.Y., Bian C., Chen S., Xia S. 2006. Amicro electronic technology based amperometric immunosensor for –fetoprotein using mixed self-assembled monolayers and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 561: 48–54.
- Yi X., Xian J. H., and Yuan C. H. 2000. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on a Colloid/Cysteamine-Modified Gold Electrode. *Analytical Biochemistry*, 278: 22–28.

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - 11.1 ได้ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ที่มีความไววิเคราะห์สูง
 - 11.2 เผยแพร่งานวิจัยในวารสารต่างๆในประเทศและหรือต่างประเทศ
12. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ต.คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

สถาบันการศึกษาต่าง ๆ

อุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้เซนเซอร์ในด้านต่างๆ
13. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีการดำเนินการวิจัย

 - 13.1 สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคการรีดักชันด้วย สารเคมี เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กที่สุด
 - 13.2 ตรวจสอบ (Characterization) อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy)
 - 13.3 วัดขนาดของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Scanning electron microscopy (SEM) และ/หรือ Zeta potential
 - 13.4 ตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค Self-assemble adsorption
 - 13.5 ตรวจสอบเอนไซม์ Horseradish peroxidase สภาวะตรึงบนอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค FT-IR
 - 13.6 วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ โดยใช้เซนเซอร์ที่สร้างขึ้น

13.7 ศึกษาอายุการใช้งานของเซนเซอร์

13.8 ทดสอบประสิทธิภาพของเซนเซอร์โดยทำการทวนสอบวิธี (Validation method) เช่น หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) และขีดจำกัดการตรวจวัด (Detection limit)

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ต.คลองหก
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110 โทรศัพท์ 0 2549 3404



14 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

การดำเนินงานวิจัย	ระยะเวลา (เดือน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. การเตรียมวัสดุ / สารเคมี / อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยและค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	$\longleftrightarrow$											
2. สังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง		$\longleftrightarrow$										
3. ตรวจสอบ (Characterization) อนุภาคนาโนทอง		$\longleftrightarrow$										
4. วัดขนาดของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์		$\longleftrightarrow$										
5. ตรึงเอนไซม์ Horseradish peroxidase บนอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค Self- assemble adsorption			$\longleftrightarrow$									
6. ตรวจสอบเอนไซม์ Horseradish peroxidaseสภาวะตรึงบนอนุภาคนาโนทอง						$\longleftrightarrow$						
7. วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ โดยใช้เซนเซอร์ที่สร้างขึ้น							$\longleftrightarrow$					
8. ศึกษาอายุการใช้งานของเซนเซอร์								$\longleftrightarrow$				
9. ทดสอบประสิทธิภาพของเซนเซอร์ โดยทำการทวนสอบวิธี เช่น หาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด									$\longleftrightarrow$			
10. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย											$\longleftrightarrow$	

15 ปัจจัยที่เอื้อต่อการวิจัย (อุปกรณ์การวิจัย, โครงสร้างพื้นฐาน ฯลฯ) ระบุเฉพาะปัจจัยที่ต้องการเพิ่มเติม

15.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

15.1.1 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ

15.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

15.1.3 เครื่องเคมีไฟฟ้า

15.1.4 เครื่องสเปกโทรสโกปี

15.1.5 ตู้อบ

15.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ต้องการเพิ่มเติม

15.2.1 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ

15.2.2 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมนาโนทอง

15.2.3 เอนไซม์



16 งบประมาณของโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน
1. งบบุคลากร	
ค่าตอบแทนนักวิจัย	14,700
2. งบดำเนินงาน	
2.1 ค่าตอบแทน ใช้สอยและวัสดุ	
2.1.1 ค่าตอบแทน เช่น ค่าอาหารทำการนอกเวลา	-
ค่าตอบแทนผู้ปฏิบัติงานให้ราชการ ค่าเบี้ยประชุมกรรมการ	
2.1.2 ค่าใช้สอย เช่น	
1) ค่าซ่อมแซมครุภัณฑ์	5,000
2) ค่าจ้างเหมาบริการ	
- ค่าทดสอบตัวอย่างโดย TEM (2 ตัวอย่าง อัตรา	4,000
ตัวอย่างละ 2,000 บาท)	
3) ค่าใช้สอยอื่น ๆ	
- ค่าใช้จ่ายในการนำเสนอผลงานวิชาการ การจด	5,000
สิทธิบัตร และการตีพิมพ์ในวารสารทั้งในและต่างประเทศ	
- ค่าจัดทำรูปเล่มรายงาน ค่าถ่ายเอกสาร	4,000
2.1.3 ค่าวัสดุ เช่น	
1) วัสดุสำนักงาน	5,450
2) วัสดุอื่น ๆ	
- สารเคมี สารมาตรฐานต่าง ๆ	50,000
- เอนไซม์	40,000
- อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ	11,000
2.2 ค่าสาธารณูปโภค เช่น	
ค่าไฟฟ้า ค่าน้ำประปา ค่าโทรศัพท์ ค่าไปรษณีย์	7,850
โทรเลข ค่าบริการด้านสื่อสารและโทรคมนาคม	
3. งบลงทุน	
รวมงบประมาณที่เสนอขอ	147,000

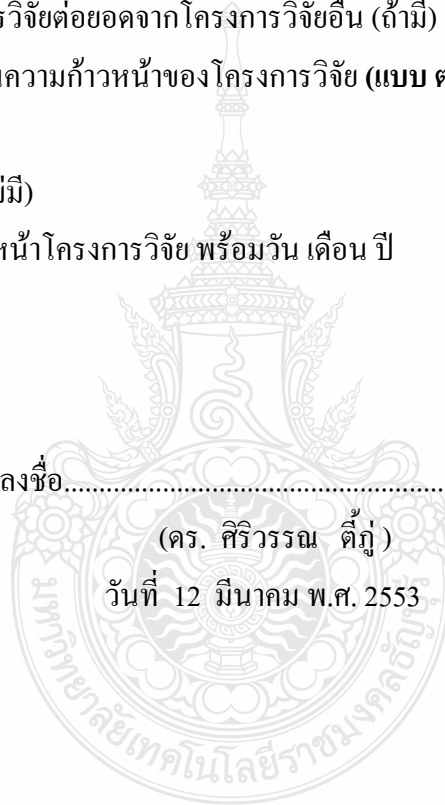
หมายเหตุ * ค่าใช้จ่ายทั้งหมดขอตัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการ

- 17 ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ
- 17.1 ได้อนุภาคนาโนทองเพื่อใช้ในการสร้างเซนเซอร์
 - 17.2 ได้ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ เซนเซอร์ที่มีความไววิเคราะห์สูง
 - 17.3 ได้วิธีที่สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างเซนเซอร์ชนิดอื่นๆ
- 18 โครงการวิจัยต่อเนื่องปีที่ 2 ขึ้นไป
- 18.1 คำรับรองจากหัวหน้าโครงการวิจัยว่าโครงการวิจัยได้รับการจัดสรรงบประมาณจริงใน
ปีงบประมาณที่ผ่านมา
 - 18.2 ระบุว่าโครงการวิจัยนี้อยู่ระหว่างเสนอขอของบประมาณจากแหล่งเงินทุนอื่น หรือ
เป็นการวิจัยต่อยอดจากโครงการวิจัยอื่น (ถ้ามี)
 - 18.3 รายงานความก้าวหน้าของโครงการวิจัย (แบบ ต-1ข/ค)
- 19 คำชี้แจงอื่นๆ (ไม่มี)
- 20 ลงลายมือชื่อ หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมวัน เดือน ปี

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการวิจัย

(ดร. ศิริวรรณ ตี๋ภู)

วันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2553



Publications

Siriwan Suwansa-ard, Proespichaya Kanatharana, Punnee Asawatreratanakul,

Chusak Limsakul, Booncharoen Wongkittisuksa, Panote Thavarungkul. 2005.

Semi disposable reactor biosensors for detecting carbamate pesticides in water. *Biosensors and Bioelectronics*. **21**: 445-454.

Siriwan Suwansa-ard, Yun Xiang, Ralph Bash, Panote Thavarungkul, Proespichaya

Kanatharana, Joseph Wang. 2008. Prussian Blue Dispersed Sphere Catalytic Labels for Amplified Electronic Detection of DNA. *Electroanalysis*. **20(3)**: 308-312.

Siriwan Suwansa-ard, Proespichaya Kanatharana, Punnee Asawatreratanakul,

BooncharoenWongkittisuksa, Chusak Limsakul, Panote Thavarungkul. 2009.

Comparison of surface plasmon resonance and capacitive immunosensors for cancer antigen 125 detection in human serum sample. *Biosensor and Bioelectronic*. In press.

Presentations

Oral presentations

1. **Siriwan Suwansa-ard**, Yun Xiang, Ralph Bash, Panote Thavarungkul,

Proespichaya Kanatharana, Joseph Wang. 2008. Prussian-Blue Dispersed Polymeric Sphere Catalytic Labels for Amplification of DNA Detection, RGJ-Ph.D Congree IX. Jomtein Plam Beach Pattaya, Chonburi. 4th-6th April, 2008.

Poster presentations

1. Suchera Loyprasert, **Siriwan Suwansa-ard**, Supaporn Dawan, Proespichaya

Kanatharana, Panote Thavarungkul. 2008. Nanoparticles-Enhanced Capacitive Detection of Affinity Binding. 1st Regional Electrochemistry Meeting of South-East Asia REMSEA, National University of Singapore, 5th – 7th August, 2008.

2. **Siriwan Suwansa-ard**, Proespichaya Kanatharana,Punnee Asawatreratanakul,

Panote Thavarungkul. 2009. Label-free surface plasmon resonance immunosensor for human serum albumin detection. Pure and Applied Chemistry International Conference PACCON 2009, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand. 14th-16th January, 2009.

3. **Siriwan Suwansa-ard**, Proespichaya Kanatharana, Punnee Asawatreratanakul,

Panote Thavarungkul. 2009. Label-free surface plasmon resonance immunosensor for cancer antigen 125 detection in human serum samples. The International Congress for Innovation in Chemistry PERCH-CIC Congress VI., Jomtein Plam Beach Hotel & Resort, Pattaya, Thailand. 3rd-6th May, 2009.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละเท่าใด (ไม่มี)

2. ผู้วิจัยหลัก

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย พงษ์นรินทร์ ชุมแสง
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Phongnarin Chumsaeng
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 7097 00051 27 5
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ต.คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ 02-549-3529 โทรสาร 02-549-3526 E-mail address p_chumsaeng@hotmail.com
- ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	วุฒิกการศึกษา	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2551	M.Sc.	Applied Analytical and Inorganic Chemistry program	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2548	Graduate Diploma	Teaching sciences	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2547	B.Sc.	Chemistry	มหาวิทยาลัยศิลปากร	ไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิกการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Design and synthesis catalyst for polymerization of cyclic esters
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ
ทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อการวิจัย
- 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย
-
- 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
-
- 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

Publications

1) Khamphree Phomphrai, **Phongnarin Chumsaeng**, Samran Prabpai, Palangpon Kongsaree, Preeyanuch Sangtrirutnugul and Manat Pohmakotr: Reverse Orders of Reactivities in the Polymerization of Cyclic Esters using N_2O_2 Aluminium Alkoxide Complexes, *Dalton Trans.*, in press

Proceedings

1) **Phongnarin Chumsaeng** "Synthesis of aluminum alkoxide complexes for ring-opening polymerization of cyclic esters", "10th National Graduate Research Conference" , September 2008, Bangkok, Thailand

- 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการ
วิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละเท่าใด
(ไม่มี)

3. ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวสุภาวดี ปาทานานนท์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Supawadee Pathatananone
6. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 4002 00072 961
7. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
8. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ต.คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ 02-549-3529 โทรสาร 02-549-3526 E-mail address jikkalo_03042526@hotmail.com
9. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2552	M.Sc.	Biochemistry program	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2549	Graduate Science	Biochemistry program	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Biotechnology and Bio-control
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อการวิจัย
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย
-
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
 - 7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

Publications

Supawadee Pata, Sakda Daduang, Jisnuson Svasti and Sompong Thammasirirak. 2007. Isolation of lysozyme like protein from crocodile leukocyte extracts (*Crocodylus siamensis*). **KMITL Science and Technology Journal**. S1 (7), 70-85.

การแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. typhi* และ *S. epidermidis* จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย

PURIFICATION ANTIMICROBIAL PEPTIDE WHICH SHOWS ACTIVITY TO *S. TYPHI* AND *S. EPIDERMIDIS* FROM CROCODILE (*CROCODYLUS SIAMENSIS*) WHITE BLOOD CELL EXTRACTS.

สุภาวดี ปาทาน¹, ศักดา ดาดวง¹, จิณณสุร สวัสดิวัตน์², สมปอง ธรรมศิริรักษ์^{1*}

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการ

-

