

การประดิษฐ์อิเล็กทรอนิกส์โทดพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับวัดไนตริกออกไซด์ใน
ระบบไหลเวียนเลือดขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อ



นางสาวนุชนาถ พรชัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE FABRICATION OF SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODES FOR NITRIC OXIDE
DETECTION IN TISSUE MICROCIRCULATION



Miss Nuchanard Pornchai

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences Program in Biomedical Engineering
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การประดิษฐ์อิเล็กทรอนิกส์โทรดพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับวัด
ไนตริกออกไซด์ในระบบไหลเวียนเลือดขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อ

โดย

นางสาวนุชนาถ พรชัย

สาขาวิชา

วิศวกรรมชีวเวช


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์

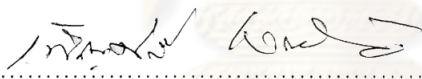
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

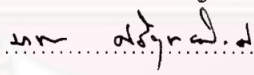
รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

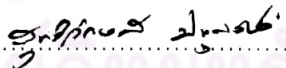
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


.....  คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบุรณ์)

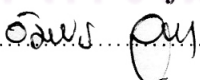
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

.....  กรรมการ
(Hideyuki Niimi, Ph.D.)

.....  กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล)

นุชนาถ พรชัย : การประดิษฐ์อิเล็กโทรดพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับวัดไนตริกออกไซด์ในระบบไหลเวียนเลือดขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อ. (The Fabrication of Screen-printed Carbon Electrodes for Nitric Oxide Detection in Tissue Microcirculation) อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.สุทธิ
 ลักษณะ ปทุมราช, 86 หน้า.

วิทยานิพนธ์นี้นำเสนอการประดิษฐ์อิเล็กโทรดคาร์บอนด้วยวิธีพิมพ์สกรีนสำหรับตรวจวัดไนตริกออกไซด์ โดยได้ประดิษฐ์อิเล็กโทรดคาร์บอนและปรับสภาพพื้นผิวของอิเล็กโทรดด้วยของนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน เพื่อให้มีความไวและความจำเพาะในการวัดไนตริกออกไซด์สูงขึ้น เมื่อทดสอบอิเล็กโทรดในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีแอมเปโรเมตริกที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ ด้วยสารละลายมาตรฐานไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ในช่วงความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ พบว่า อิเล็กโทรดสามารถตอบสนองกับสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ที่ใช้ในการสร้างไนตริกออกไซด์ได้เมื่อเพิ่มขีสที่มีนในปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบของที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ มีการตอบสนองต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ได้ดีที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.94 และเมื่อนำอิเล็กโทรดชนิดนี้มาเคลือบด้วยนาฟิออนและทดสอบด้วยสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์และไซเตียมไนไตรท์ พบว่าอิเล็กโทรดสามารถลดการตอบสนองต่อสารรบกวนอันได้แก่ ไซเตียมไนไตรท์ลงมากกว่า 30 % แต่ก็ลดการตอบสนองต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ลงเช่นกัน สุดท้ายทดสอบอิเล็กโทรดโดยนำมาวัดไนตริกออกไซด์ในหนูปกติและหนูเบาหวาน จากผลการทดลองจะพบว่าอิเล็กโทรดสามารถวัดไนตริกออกไซด์ได้ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน โดยอิเล็กโทรดเคลือบของชนิดที่ดัดแปลงผิวด้วยนาฟิออน ให้ผลดีที่สุดสำหรับใช้วัดไนตริกออกไซด์ในสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช.....
 ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต นุชนาถ พรชัย
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.สุทธิ ศรียุทธศักดิ์

4989115220 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS : NITRIC OXIDE / ELECTROCHEMICAL SENSORS / SCREEN-PRINTED
CARBON ELECTRODES

NUCHANARD PORNCHAI : THE FABRICATION OF SCREEN-PRINTED
CARBON ELECTRODES FOR NITRIC OXIDE DETECTION IN TISSUE
MICROCIRCULATION. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.MANA
SRIYUDTHSAK,D. ENG, THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.PROF.SUTHILUK
PATUMRAJ, Ph.D., 86 pp.

This thesis presents fabrication of screen printed carbon electrodes for nitric oxide detection. Carbon electrodes and gold-coated carbon electrodes were fabricated. The electrode surfaces were modified with tetrasulfonated nickel phthalocyanine (NiTSPc) and nafion to improve sensitivity and selectivity for nitric oxide detection. To evaluate the performance of these electrodes, in vitro experiments using amperometric measurement method at 0.7 V with 10^{-7} to 10^{-3} M sodium nitroprusside (SNP) standard solution were performed. The results showed that the electrodes would respond to SNP only when cystaemine was added to the solution. In addition, the results indicated that the gold-coated carbon electrodes modified with NiTSPc offers the best response to SNP (coefficient of determination at 0.94). Moreover, the electrode modified with nafion could reduce the interference substance such as sodium nitrite for 30%. However, the sensitivity to SNP of the electrodes also decreased. Finally, the electrodes were tested in vivo. These included carbon electrodes, gold-coated carbon electrodes, carbon electrodes modified with NiTSPc, and gold-coated carbon electrodes modified with NiTSPc. All of these electrodes were coated with nafion. The experiments were conducted both in normal rats and experimental diabetic rats (DM). The experiments showed that gold-coated carbon electrode modified with nafion is the best in vivo nitric oxide detector for both groups.

Field of Study : Biomedical Engineering Student's Signature Nuchanard Pornchai

Academic Year : 2009 Advisor's Signature Mana Sijudthakh

Co-Advisor's Signature Suthiluk Patumraj

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ได้ให้คำแนะนำความรู้ ทฤษฎีในเรื่องไบโอเซนเซอร์ รวมถึงการประดิษฐ์อิเล็กทรอนิกส์และการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองกับข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้คำแนะนำความรู้เกี่ยวกับหลอดเลือด และเทคนิคการวัดไนตริกออกไซด์ในสัตว์ทดลองกับข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดังนี้ รศ.ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ รศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช Dr.Hideyuki Niimi และผศ.ดร อัมพร จาริยะพงศ์สกุล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำที่มีประโยชน์

ขอขอบคุณ นางสาวณัฐชญา วงศ์เอกอินทร์ นิสิตปริญญาโท จากภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในส่วนของการศึกษาในสัตว์ทดลองจนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องในห้องปฏิบัติการไบโออิเล็กทรอนิกส์ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจ และคอยเกื้อหนุนข้าพเจ้าในด้านต่างๆ จนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดบุคคลที่ข้าพเจ้าไม่ได้กล่าวถึง และได้มีส่วนร่วมในงานวิจัยของข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอขอบคุณบุคคลเหล่านั้นไว้ ณ ที่นี้ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	6
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	6
1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน.....	6
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....	6
2 หลักการและทฤษฎีพื้นฐาน.....	7
2.1 ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide).....	7
2.2 ไบโอดีเซนเซอร์.....	9
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	13
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	15
3.3 การทดลอง.....	15
3.4 วิธีการทดสอบในห้องปฏิบัติการ.....	18
3.5 การทดลองอิเล็กทรอนิกส์ในห้องปฏิบัติการ.....	19
3.6 การทดสอบอิเล็กทรอนิกส์ขึ้นแต่ละชนิดในสัปดาห์ทดลอง.....	20
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล.....	24
4.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ.....	24
4.2 การทดลองอิเล็กทรอนิกส์ในสัตว์ทดลอง.....	47
5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	52
5.1 สรุปผล.....	52
5.2 ปัญหาและข้อเสนอแนะ.....	53
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	86



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตารางการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ ความไวในการวัด ความจำเพาะ และการวัดได้ในเวลาจริง	2
4.1	ตารางความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าความไวในการวัดของอิเล็กโทรดคาร์บอน ต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	26
4.2	ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของกระแสตอบสนองที่เกิดขึ้นที่ อิเล็กโทรดต่อสารละลายชนิดต่างๆ.....	33
4.3	ตารางความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอิเล็กโทรดกับค่าความไวในการวัดของอิเล็กโทรด คาร์บอนต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์.....	46
4.4	ตารางค่าการตอบสนองต่อแอสิติลโคลีนของกลุ่มหนูปกติและหนูเบาหวาน เมื่อใช้ อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออน.....	49
4.5	ตารางความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มหนูปกติกับหนูเบาหวาน เพอร์เซ็นต์การ เปลี่ยนแปลงของไนตริกออกไซด์โดยใช้สารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซีน และอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออนต่อการหยุดสารละลาย แอสิติลโคลีน.....	50
4.6	ตารางแสดงผลการทดลองในสัตว์ทดลอง (หนูปกติและหนูเบาหวาน) โดยใช้ อิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้นทั้ง 4 ชนิด ปริมาณไนตริกออกไซด์จะถูกบันทึกหลังการ หยุดแอสิติลโคลีน (ความเข้มข้น 10^{-5} M) 5 นาที	51

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กลไกกระตุ้นการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์.....	7
2.2	เซลล์เอนโดทีเลียล.....	8
2.3	ระบบวัดแบบแอมเปโรเมตริกเซนเซอร์.....	10
2.4	สัญญาณการกระตุ้นไซคลิกโวลแทมเมตรี.....	12
2.5	ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับศักย์ไฟฟ้าของขั้วอิเล็กโทรด เมื่ออยู่ในสารละลาย.....	12
3.1	แผนผังการดำเนินงาน.....	16
3.2	รูปแบบของอิเล็กโทรดพิมพ์สกรีนคาร์บอน.....	17
3.3	วิธีการวัดสารละลายกับเครื่องโพเทนทิโอสแตต.....	19
3.4	การวางอิเล็กโทรดทดสอบเพื่อหาปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เนื้อเยื่อปลาได้หนู... ..	21
3.5	การตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลาย.....	22
4.1	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์....	25
4.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เวลา 20 40 60 และ 80 วินาที.....	25
4.3	อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง.....	27
4.4	ค่าเฉลี่ยของศักย์ไฟฟ้าการเคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดกรณีละ 3 ตัว.....	27
4.5	ค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อใช้ อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ในการวัดสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	28
4.6	ลักษณะของพื้นผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	29
4.7	การตอบสนองของผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายเครบสรีงเจอร์ โดย วิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.....	30
4.8	การตอบสนองของผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง(ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -4.2 โวลต์)สารละลายเครบสรีงเจอร์ โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.....	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.9	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายแคโรทีนและ สารละลายโซเดียมไนโตรพรีซไซด์.....	32
4.10	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรีซไซด์ เมื่อมีสารละลายซีสทีมีน.....	33
4.11	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรีซไซด์ เมื่อมีสารละลายซีสทีมีน.....	34
4.12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียม ไนโตรพรีซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอน.....	35
4.13	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายโซเดียมไน โตรพรีซไซด์.....	36
4.14	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตร พรีซไซด์ของอิเล็กโทรดเคลือบทอง.....	36
4.15	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ต่อ สารละลาย.....	37
4.16	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตร พรีซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์.....	38
4.17	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟิออนต่อสารละลาย โซเดียมไนโตรพรีซไซด์.....	39
4.18	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตร พรีซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟิออน.....	39
4.19	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และ นาฟิออนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรีซไซด์.....	40
4.20	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตร พรีซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน.....	41
4.21	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนาฟิออนต่อ สารละลายโซเดียมไนโตรพรีซไซด์.....	42

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.22	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตรพรัชไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนาฟิออน.....	42
4.23	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนิเกิลฟทาไลโซยานาइटต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัชไซด์.....	43
4.24	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตรพรัชไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนิเกิลฟทาไลโซยานาइट...	44
4.25	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนาฟิออนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัชไซด์.....	45
4.26	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไนโตรพรัชไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองเมื่อเพิ่มนิเกิลฟทาไลโซยานาइटและนาฟิออน.....	45
4.27	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายแอสิติลโคลิโนกับนอร์เอพิเนพรีนในหนูปกติ.....	48
4.28	การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายแอสิติลโคลิโนกับนอร์เอพิเนพรีนในหนูเบาหวาน.....	48

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนโดทีเลียมเซลล์ เป็นเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่สามารถสร้างสารที่มีหน้าที่ควบคุมการขยายหลอดเลือด (vasodilatation) ได้ เรียกว่าสารนี้ว่า endothelium-derived relaxing factor (EDRF) ซึ่งต่อมาพบว่าสารนี้คือ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ไนตริกออกไซด์เป็นก๊าซโมเลกุลขนาดเล็กที่มีบทบาทในการทำงานของเซลล์ร่างกาย และมีความสำคัญอย่างมากในทางการแพทย์ซึ่งมีผลต่อระบบไหลเวียนเลือดและ หัวใจ ระบบประสาท ระบบภูมิคุ้มกัน และมีหน้าที่มากมายในภาวะปกติ โดยเฉพาะการส่งสัญญาณภายในเซลล์และการขยายตัวของหลอดเลือด ซึ่งพบว่าหากเกิดภาวะก๊าซไนตริกออกไซด์ไม่สมดุลจะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคความดันเลือดสูง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ หลอดเลือดสมองตีบ และโรคติดเชื้อแบคทีเรียขั้นรุนแรง [1,2] ส่วนโรคเบาหวานเกิดจากร่างกายตอบสนองต่ออินซูลินลดลง ซึ่งมีผลทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น และทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือด หรือเซลล์เอนโดทีเลียม (Endothelial cell) เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งส่งผลให้เซลล์เอนโดทีเลียมไม่สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ เพื่อรักษาสมดุลของหลอดเลือดได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่มักพบว่าทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนของหัวใจ และหลอดเลือดที่เป็นผลมาจากการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียม เซลล์ (Endothelial cell) ทำให้มีการสร้างก๊าซไนตริกออกไซด์ลดลง ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือด มีเลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ได้น้อยลง และนำไปสู่โรคแทรกซ้อนของหัวใจ ตา และไต เป็นต้น อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า ไนตริกออกไซด์ ไม่สามารถทำให้เกิด vasodilation ในหนูที่เป็น Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) เชื่อกันว่าเป็นเพราะ advanced glycosylation end products (AGE) ยับยั้งการสร้างของไนตริกออกไซด์ พบว่ามีสาเหตุหลายประการที่ทำให้ร่างกายไม่สามารถสร้าง และหลังไนตริกออกไซด์ และทำงานได้ตามปกติ ได้แก่ มีการทำลายของเซลล์เอนโดทีเลียม มีการรบกวนการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และมีการเพิ่มการทำลายของไนตริกออกไซด์ [3,4]

ดังนั้นจากความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาดังกล่าว จึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อตรวจวัดไนตริกออกไซด์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสิ่งมีชีวิต

ในปัจจุบันการตรวจวัดระดับไนตริกออกไซด์สามารถทำได้หลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 1.1 อันได้แก่ การวัดโดยใช้เคมีลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence) เทคนิคอีพาร์ (electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry) การวิเคราะห์ทางสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometric assays) และ วิธีของกรีสส์ (Griess method) เป็นต้น แม้ว่าวิธีเหล่านี้สามารถให้ความไวและความจำเพาะในการวัดที่สูง อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ไม่สามารถทำการวัดได้ในเวลาจริง (real time) อีกทั้งเครื่องมือวัดมีราคาและค่าใช้จ่ายในการวัดแต่ละครั้งสูง วิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่งคือ วิธีการวัดทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical technique) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวัดได้โดยตรงในสัตว์ทดลอง เนื่องจากสามารถทำให้หัวที่ใช้วัดมีขนาดเล็ก และสามารถทำการวัดได้ในเวลาจริง [2,5]

ตารางที่ 1.1 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ด้วยวิธีการต่างๆ ในด้านความไวในการวัด ความจำเพาะ และการวัดได้ในเวลาจริง

วิธีทดสอบ	ความไวในการวัด (Sensitivity)	ความจำเพาะ (Selectivity)	วัดได้ในเวลาจริง (Realtime)
Chemiluminescence	สูง	สูง	ไม่ได้
EPR	สูง	สูง	ไม่ได้
Griess method	สูง	สูง	ไม่ได้
Spectrophotometric assays	สูง	สูง	ไม่ได้
Electrochemical technique	ปานกลาง	ปานกลาง	ได้

รายงานวิจัยที่เกี่ยวกับการวัดไนตริกออกไซด์โดยวิธีการวัดทางไฟฟ้าเคมีที่น่าสนใจมีดังต่อไปนี้

F.Lantoine และคณะ [6] พัฒนาอิเล็กโทรดโดยการเพิ่มสารนิเกิลพอร์ไฟลิน (nickel Porphyrin) เพื่อเพิ่มความไวในการวัด และใช้นาฟิออน เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ อิเล็กโทรดที่ใช้เป็นแบบเข็มผลิตจากคาร์บอนไฟเบอร์ โดยวัดในสารละลายมาตรฐานไนตริกออกไซด์แบบไม่มีออกซิเจน (anaerobic) และมีออกซิเจน (aerobic) ผลการทดลองที่ได้พบว่า สามารถวัดไนตริกออกไซด์แบบไม่มีออกซิเจนได้ในช่วงความเข้มข้น 15 นาโนโมลาร์ ถึง 140 นาโนโมลาร์ และมีความไวในการวัด เท่ากับ 0.2 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ในขณะที่การวัดไนตริกออกไซด์แบบมีออกซิเจน ได้ช่วงความเข้มข้น 1.5 นาโนโมลาร์ ถึง 32 นาโนโมลาร์ และมีความไวในการวัด เท่ากับ 5.90 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้กับการประยุกต์ใช้อิเล็กโทรดสำหรับวัดไนตริกออกไซด์ในสิ่งมีชีวิต

M.Pontie และคณะ [7] พัฒนาอิเล็กโทรดแบบเข็มที่ผลิตจากคาร์บอนไฟเบอร์ (carbon fiber) โดยศึกษาและเปรียบเทียบวิธีที่ใช้เคลือบอิเล็กโทรด 2 วิธี คือ วิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry) และ วิธีอิเล็กโทรไลซิสแบบควบคุมศักย์ไฟฟ้า (controlled potential electrolysis) โดยการเคลือบผิวอิเล็กโทรดด้วยเตตราซัลโฟเนต นิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ (NITSPc) และนาฟิออน จากนั้นนำอิเล็กโทรดมาวัดในสารละลายไนตริกออกไซด์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถตรวจวัดไนตริกออกไซด์ได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 20 ถึง 200 นาโนโมลาร์ และการเคลือบอิเล็กโทรดด้วยนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี มีความไวในการวัดไนตริกออกไซด์ เท่ากับ 11.3 ± 0.2 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ซึ่งดีกว่าการเคลือบอิเล็กโทรดด้วย วิธีอิเล็กโทรไลซิสแบบควบคุมศักย์ไฟฟ้า ซึ่งได้ค่าความไวในการวัด เท่ากับ 6.6 ± 0.1 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์

N.Pereira-Rodrigues และคณะ [8] ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี (electrochemical formation) ของเตตราซัลโฟเนตนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ ที่เคลือบอยู่บนอิเล็กโทรดขนาดเล็กที่ทำจากแผ่นแพลตินัม (bulk Pt disk microelectrodes) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 50 ไมโครเมตร เทียบกับการใช้แผ่นแพลตินัมแบบฟิล์มบาง (thin-film Pt microdisk) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร เพื่อวัดสารละลายไนตริกออกไซด์ จากผลการทดลองพบว่าการใช้อิเล็กโทรดทั้ง 2 ชนิดสามารถวัดค่าไนตริกออกไซด์ได้โดยมีความไวในการวัดเท่ากับ 23.6 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมต่อไปในรายละเอียด

J.Katrlík และ P.Zalesakova [9] ได้ทดสอบอิเล็กโทรดแบบเข็มที่ผลิตจากคาร์บอนไฟเบอร์ ที่นำมาเคลือบด้วยนาฟิออนและเยื่อเซลลูโลส เพื่อนำมาวัดไนตริกออกไซด์ในตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในระดับห้องปฏิบัติการ โดยได้วัดไนตริกออกไซด์จากเซลล์เอ็นโดทีเลียมของหลอดเลือดขนาดใหญ่ของหนู ผลการทดลองพบว่า อิเล็กโทรดคาร์บอนไฟเบอร์สามารถตรวจวัดไนตริกออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดได้ 1 ไมโครโมลาร์ และการเคลือบด้วยนาฟิออนและเยื่อเซลลูโลส

สามารถกันสารรบกวนจากไนโตรที่ใต้แต่ไม่สามารถกันได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามอิเล็กโทรดสามารถวัดไนโตรที่ออกไซด์จากเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดใหญ่ของหนูได้

N.R. Ferreira และคณะ [10] พัฒนาอิเล็กโทรดแบบเข็มที่ผลิตจากคาร์บอนไฟเบอร์ เพื่อเพิ่มความไวในการวัดไนโตรที่ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำระดับนาโนโมลาร์และเพิ่มความจำเพาะเจาะจงด้วยนาฟิออน โดยใช้ ฟีนิลินไดเอมีน (o-phenylenediamine) เพื่อป้องกันสารรบกวนในการวัดเนื้อเยื่อสมองของหนูบริเวณฮิปโปแคมปอล (hippocampal) และเป็นพื้นที่สำหรับการวัดไนโตรที่ออกไซด์ ผลการทดลองที่ได้พบว่า การดัดแปลงผิวหน้าของอิเล็กโทรดคาร์บอนไฟเบอร์ทำให้ได้ค่าความไวในการวัด เท่ากับ 954 ± 217 พิโคแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดไนโตรที่ออกไซด์ เท่ากับ 6 ± 2 นาโนโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดดังกล่าวสามารถใช้ทดลองวัดสัญญาณไนโตรที่ออกไซด์ในชิ้นส่วนของสมองหนูได้

S.Miserere และคณะ [11] ได้ทำการพัฒนาอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode) ที่ผลิตจากหมึกคาร์บอน โดยศึกษาชนิดของสารเคมีที่แตกต่างกัน 2 ชนิด (PEG polymer; Brij72®, Brij700®) เพื่อเพิ่มความเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต (biocompatibility) บนผิวอิเล็กโทรดคาร์บอน และเพิ่มประสิทธิภาพความไวในการวัด (sensitivity) ด้วยเตตราซัลโฟเนตนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ (NiTSPc) และเพิ่มความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยนาฟิออน จากนั้นนำอิเล็กโทรดที่พัฒนาไปวัดในสารละลายไนโตรที่ออกไซด์ด้วยวิธีโครโนแอมเปโรเมตริก (chronoamperometric measurements) ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบด้วยนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน สามารถตรวจวัดไนโตรที่ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.2 ไมโครโมลาร์ และมีความไวในการวัด เท่ากับ 103.3 นาโนแอมแปร์ต่อไมโครโมลาร์ ส่วนการเพิ่มความเข้ากันได้กับเซลล์สิ่งมีชีวิตบนพื้นผิวอิเล็กโทรด อิเล็กโทรดที่เคลือบด้วย NiTSPc/Nafion/Brij72® มีความเข้ากันกับเซลล์สิ่งมีชีวิตดีกว่าอิเล็กโทรดที่เคลือบด้วย NiTSPc/Nafion/Brij700®

จากรายงานต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น จึงอาจกล่าวได้ว่าวิธีการวัดทางไฟฟ้าเคมีเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการวัดไนโตรที่ออกไซด์ โดยพบว่านิยมใช้อิเล็กโทรด 3 ชนิด คือ อิเล็กโทรดแบบไมโครที่ทำจากแพลตินัม อิเล็กโทรดแบบเข็มที่ทำจากเส้นคาร์บอนไฟเบอร์ และอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนที่ทำจากหมึกคาร์บอน โดยอิเล็กโทรดแบบเข็มที่ทำจากคาร์บอนไฟเบอร์หรืออิเล็กโทรดแบบแผ่นแพลตินัมนั้น มีข้อดีคือ อิเล็กโทรดมีขนาดเล็ก พื้นที่สัมผัสรอบทุกทิศทาง แต่มีราคาสูง ส่วนอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนมีข้อดีคือ เป็นอิเล็กโทรดที่สามารถผลิตรูปแบบเดียวกันได้ในปริมาณมาก และสามารถออกแบบในรูปแบบต่างๆ ได้ตามความเหมาะสมกับสิ่งที่เราจะวัด อีกทั้งยังมีราคาต่ำ อย่างไรก็ตามอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนแม้จะมีราคาถูกและ

ผลิตได้ง่าย แต่ประสิทธิภาพในการวัดไนตริกออกไซด์ไม่สูงนัก เพื่อพัฒนาอิเล็กโทรดคาร์บอนให้มีประสิทธิภาพในการวัดดีขึ้นและมีความเสถียรเพิ่มขึ้น จึงมีการนำอิเล็กโทรดคาร์บอนมาเคลือบทองด้วยวิธีการทางไฟฟ้า เนื่องจากทองมีคุณสมบัติที่ดีใกล้เคียงแพลตินัมเมื่อนำมาผลิตอิเล็กโทรด นอกจากนั้นยังมีตัวอย่างงานวิจัยรายงานว่า การเคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดสารไฮโปแซนทีนในเนื้อไก่ได้ [12] และอีกงานวิจัยหนึ่งเป็นการหาปริมาณธาตุพลวงในตัวอย่างน้ำทะเลและยาโดยใช้อิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนคาร์บอนเคลือบทองเช่นกัน [13] ดังนั้นอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนที่ทำจากหมึกคาร์บอนและเคลือบด้วยทองจึงเป็นอิเล็กโทรดที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดได้ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และราคาไม่สูง เหมาะแก่การนำมาศึกษาในการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ เพราะไนตริกออกไซด์ในสิ่งมีชีวิตอยู่ในความเข้มข้นระดับนาโมโมลาร์ถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ต่ำ ซึ่งหากนำอิเล็กโทรดคาร์บอนที่เคลือบทองมาวัด อาจจะทำให้ความไวในการวัดดีขึ้น เนื่องจากพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรดเพิ่มขึ้น และพบว่ายังไม่มีรายงานใดที่นำอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองมาตรวจวัดไนตริกออกไซด์

ด้วยเหตุนี้การเคลือบทองอิเล็กโทรดคาร์บอนในการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ อาจจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของอิเล็กโทรดในการวัดไนตริกออกไซด์ให้ดีขึ้นได้

นอกจากนี้การนำเทคนิคการวัดทางไฟฟ้าเคมีมาใช้ในการวัดนั้น จะเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดไนตริกออกไซด์ให้สูงขึ้นโดยการเพิ่มความไว และการเพิ่มความจำเพาะในการวัด (selectivity) ให้กับอิเล็กโทรด โดยสารที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดไนตริกออกไซด์ คือนาฟิออนเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการวัด และสารกลุ่มฟทาโลไซยาไนด์ (Phthalocyanine) เช่นเตตราซัลโฟเนตนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ (tetrasulfonated nickel phthalocyanine ; (NiTSPc)) เพื่อเพิ่มความไวในการวัด

วิทยานิพนธ์นี้มีจุดมุ่งหมายที่จะประดิษฐ์อิเล็กโทรด และศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองของอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนที่มีการเตรียมผิวที่แตกต่างกัน ในการวัดไนตริกออกไซด์ในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง กล่าวคือ เตรียมอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนคาร์บอน และอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่เคลือบทอง เพื่อเพิ่มความจำเพาะและความไวในการวัดต่อไนตริกออกไซด์ จึงทดลองทำการเคลือบอิเล็กโทรดทั้ง 2 แบบด้วยนาฟิออนและเตตราซัลโฟเนตนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ตามลำดับ โดยในเบื้องต้นจะทำการทดสอบการวัดในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ก่อนที่จะนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ในระบบไหลเวียนเลือดของสัตว์ทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประดิษฐ์อิเล็กทรอนิกส์และศึกษาความไวในการตอบสนองต่อการวัดไนตริกออกไซด์ในห้องปฏิบัติการของอิเล็กทรอนิกส์ชนิดต่างๆ คือ อิเล็กทรอนิกส์ที่ทำจากคาร์บอนด้วยวิธีพิมพ์สกรีน และที่ดัดแปลงผิวด้วยทอง นาฟิออน และเตตราซัลโฟเนตนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอิเล็กทรอนิกส์ข้างต้นในการวัดไนตริกออกไซด์ในระบบไหลเวียนเลือดของสัตว์ทดลอง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ประดิษฐ์และพัฒนาอิเล็กทรอนิกส์ด้วยวิธีพิมพ์สกรีนคาร์บอนให้มีความไวและความจำเพาะสูงต่อการวัดไนตริกออกไซด์ที่เนื้อเยื่อ

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การประดิษฐ์อิเล็กทรอนิกส์
2. การเตรียมอิเล็กทรอนิกส์
3. การดัดแปลงพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์
4. การทดลองอิเล็กทรอนิกส์ที่ประดิษฐ์ในห้องปฏิบัติการ
5. การทดลองอิเล็กทรอนิกส์ที่ประดิษฐ์เพื่อใช้ในสัตว์ทดลอง
6. วิเคราะห์สรุปผลที่ได้จากการวัดไนตริกออกไซด์จากสารละลายมาตรฐานไซเดียมไนโตรพรัสไซด์และเยื่อบุลำไส้หนูด้วยอิเล็กทรอนิกส์ที่ประดิษฐ์ขึ้น

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

สามารถนำอิเล็กทรอนิกส์ที่ประดิษฐ์ขึ้นไปพัฒนาวิธีการวัดไนตริกออกไซด์ให้สามารถนำไปใช้ได้ตามห้องปฏิบัติการ

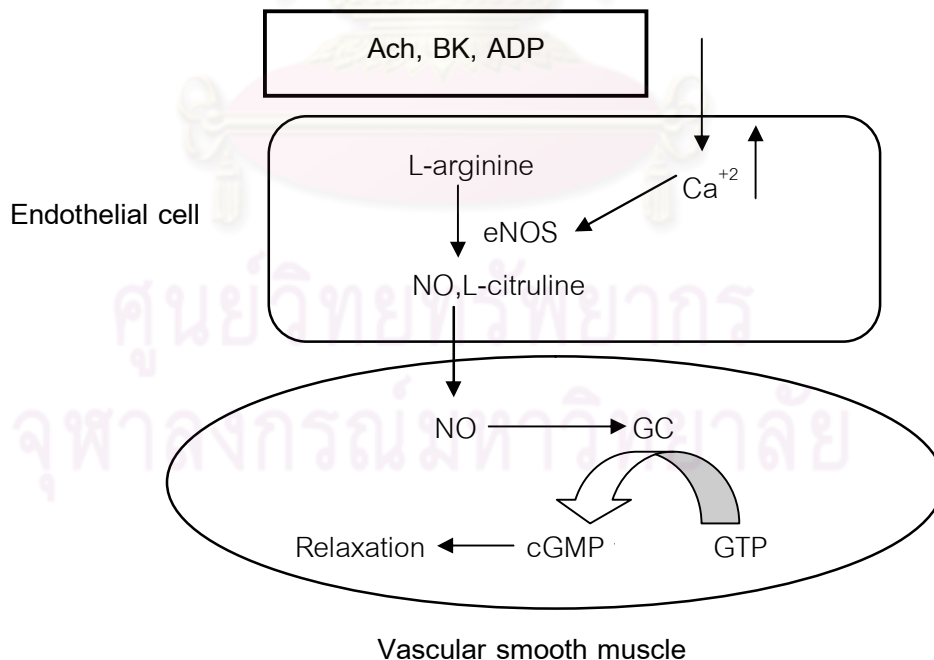
บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีพื้นฐาน

เนื้อหาในบทนี้จะกล่าวถึงหลักการและทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้งาน อิเล็กโทรด ซึ่งเป็นตัวตรวจวัดไนตริกออกไซด์ โดยส่วนแรกจะกล่าวถึง กลไกการสร้างและการออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ ส่วนที่สองจะกล่าวถึง หลักการทำงาน และทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับเซนเซอร์แบบไฟฟ้าเคมี (Electrochemical biosensors)

2.1 ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide)

ไนตริกออกไซด์ (NO) หรือ endothelium-derived relaxing factor (EDRF) หลังจากเซลล์เอนโดทีเลียมมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยาย สารตั้งต้นของไนตริกออกไซด์ คือ อาร์จินีน (L-arginine) โดยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase (NOS)) จะเปลี่ยนอาร์จินีน เป็นไนตริกออกไซด์ และซิทรูลีน (L-citrulline) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ไนตริกออกไซด์ซินเทส มี 3 ชนิด (isoforms) ชนิดที่พบในเซลล์เอนโดทีเลียม คือ ไนตริกออกไซด์ซินเทส ซึ่งเป็นแบบที่ 3 (NOS III) สารที่กระตุ้นให้เอนโดทีเลียมสร้างไนตริกออกไซด์ ได้แก่ แอซิติลโคลีน (acetylcholine) แบดดีไคนิน (bradykinin) ฮีสตามีน (histamine) และ ซับสแตนที (substance P)

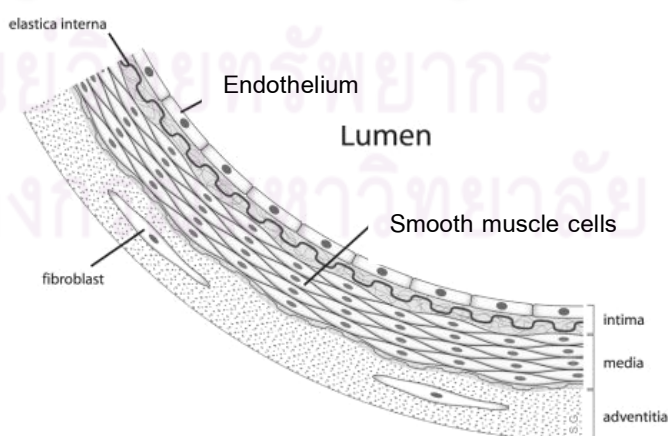


รูปที่ 2.1 กลไกกระตุ้นการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ [14]

ไนตริกออกไซด์มีบทบาทในร่างกายนมาก ในภาวะปกติเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดจะหลั่งไนตริกออกไซด์ปริมาณหนึ่งอยู่เสมอ ซึ่งทราบได้จากการให้สารยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในสัตว์ทดลอง แล้วทำให้ความดันเลือดแดงของสัตว์เพิ่มสูงขึ้น รวมถึงยาบางชนิดที่ใช้ขยายหลอดเลือดหัวใจเป็นสารที่ให้นิตริกออกไซด์ในคนที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจ การที่หลอดเลือดหัวใจเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) อย่างรวดเร็วหลังผ่าตัดนั้น เชื่อกันว่าเป็นเพราะเซลล์เอนโดทีเลียมได้รับอันตราย จนไม่สามารถหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ตามปกติ หลอดเลือดจึงตีบตัว และมีการกระตุ้นกลไกที่ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง นอกจากนี้จะมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแล้ว ไนตริกออกไซด์ยังมีฤทธิ์อีกหลายประการ เช่น เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (vascular remodeling และ angiogenesis) อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในบางตำแหน่งของสมอง และเกี่ยวกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น [4,14]

2.1.2 เอนโดทีเลียมและสารหลังจากเอนโดทีเลียม

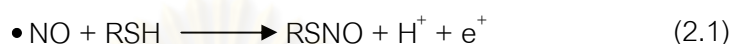
เอนโดทีเลียมเป็นเซลล์ชั้นเดียวเรียงตัวอยู่ด้านในสุดของหลอดเลือด (รูปที่ 2.2) นอกจากทำหน้าที่บุภายในผนังหลอดเลือดและส่งสารเข้าออก ยังมีหน้าที่หลั่งสารที่ออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (vasodilator) และสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว (vasoconstriction) ซึ่งปกติจะทำงานสมดุลกัน ทำให้หลอดเลือดไม่ตีบหรือขยายจนเกินไป ถ้าสมดุลนี้เสียไปอาจเกิดโรคได้ เช่น ถ้ามีสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวมากกว่าสารขยายหลอดเลือดจะทำให้หลอดเลือดตีบและความดันสูงขึ้นได้ เป็นต้น ตัวอย่างสารที่หลังจากเอนโดทีเลียม ได้แก่ prostacyclin, thromboxane A_2 , nitric oxide, endothelin และ EDHF เป็นต้น [4]



รูปที่ 2.2 เอนโดทีเลียม [15]

2.1.3 สารประกอบไทออล (Thiol)

สารประกอบไทออล เป็นส่วนประกอบที่ทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ และพบว่าร่างกายมีสารที่อยู่ในกลุ่มไทออลมากมาย ไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยาไทออล (RSH) ได้ nitrosothiols (RSNO) [4] ดังสมการที่ 2.1 ซึ่งทำให้เกิดอิเล็กตรอนในระบบ ทำให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้



2.2 ไบโอสเซนเซอร์

ไบโอสเซนเซอร์ เป็นเทคนิคการตรวจสอบสารโดยวัดสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างสารตัวอย่างกับสารชีวโมเลกุล (biological element) โดยใช้ทรานสดิวเซอร์ทำหน้าที่แปลงปริมาณสารตัวอย่างเป็นปริมาณทางไฟฟ้า หลักการทำงานของ ไบโอสเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนของสารชีวภาพและทรานสดิวเซอร์ สารชีวภาพ ได้แก่ เอนไซม์ แอนติบอดี รีเซปเตอร์ กรดนิวคลีอิก เซลล์และเนื้อเยื่อ จะถูกนำมาใช้ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับสารตัวอย่าง โดยอาจเป็นปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือปฏิกิริยาทางฟิสิกส์ก็ได้ ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือฟิสิกส์ ส่วนของทรานสดิวเซอร์ที่มีสารชีวภาพประกบติดอยู่จะทำหน้าที่แปลงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นให้เป็นปริมาณทางไฟฟ้าที่สามารถวัดได้ในเชิงปริมาณ ทรานสดิวเซอร์สามารถแบ่งออกได้ตามลักษณะการวัด เช่น ทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical) ทางแสง (optical) ทางอุณหภูมิ (calorimetric/thermometric) และทางมวล (piezoelectric) เป็นต้น [16,17]

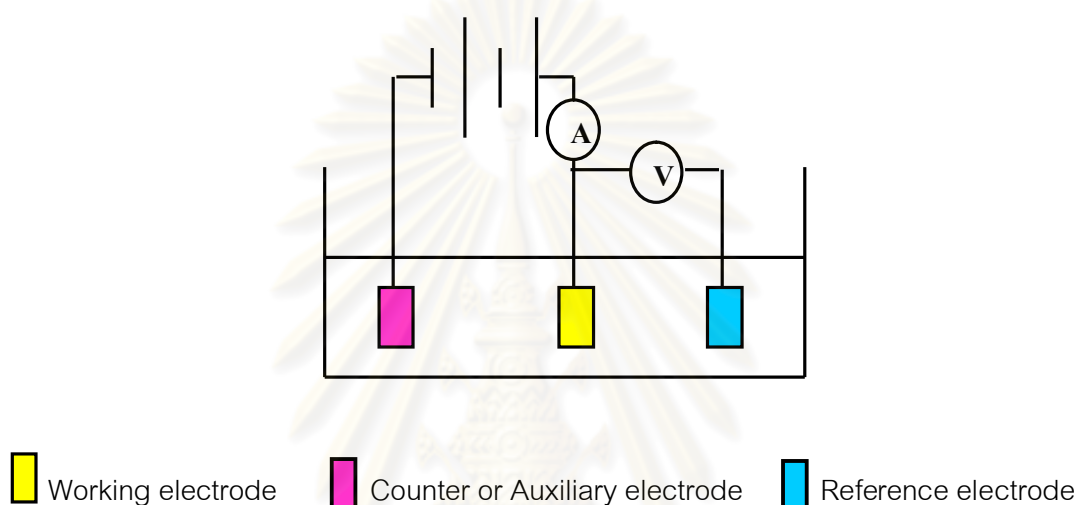
2.2.1 เซนเซอร์แบบไฟฟ้าเคมี (Electrochemical biosensors)

หลักการพื้นฐานของเซนเซอร์แบบไฟฟ้าเคมีเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างขั้วอิเล็กโทรดกับสารตัวอย่างที่จะทำการวัด เซนเซอร์แบบไฟฟ้าเคมีที่สำคัญ คือ โปเทนทิโอเมตริกเซนเซอร์และแอมเปอร์โรเมตริกเซนเซอร์

2.2.1.1 โปเทนทิโอเมตริกเซนเซอร์ (Potentiometric sensors) เซนเซอร์หรือทรานสดิวเซอร์แบบนี้จะทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าหรือแรงดันไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในการทำปฏิกิริยาที่ส่วนของรีเซปเตอร์ ซึ่งเซนเซอร์นี้เป็นการวัดศักย์ไฟฟ้าที่จุดสมดุลซึ่งไม่มีกระแสไฟฟ้าไหล ดังนั้นระบบวัดแบบนี้จะมีอิมพีแดนซ์ที่สูงเพื่อไม่ให้กระแสไหลในระบบ

2.2.1.2 แอมเปอร์โรเมตริกเซนเซอร์ (Amperometric sensors) ที่ทำการวัดการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นออกมาในรูปของกระแสไฟฟ้า และนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่าง

ความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ หลักการของการวัดและสัญญาณที่วัดได้จากแอมแปอโรเมตริกเซนเซอร์นั้นตั้งอยู่บนพื้นฐานการเกิดปฏิกิริยาระหว่างขั้วอิเล็กโทรดกับสารละลายตัวอย่างที่สัมผัสกัน ระบบวัดแบบแอมแปอโรเมตริกนี้โดยทั่วไปจะประกอบด้วยอิเล็กโทรด 3 อัน คือ อิเล็กโทรดทำงานหรืออิเล็กโทรดที่ขี้บอก (working electrode (WE)), อิเล็กโทรดร่วม (counter electrode (CE)) ที่ใช้วัดกระแสไฟฟ้าที่ไหลในวงจร และอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) อิเล็กโทรดอ้างอิงนี้มีไว้เพื่อใช้ในการรักษาค่าศักย์ไฟฟ้าของขั้วอิเล็กโทรดทำงานให้มีค่าคงที่ตลอดเวลาในระหว่างที่ทำการวัด [16,17] แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ระบบวัดแบบแอมแปอโรเมตริกเซนเซอร์ [16]

2.2.2 หลักการทำงานแอมแปอโรเมตริกเซนเซอร์

หลักการวัดสารตัวอย่างแบบแอมแปอโรเมตริก จะมีความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประจุไฟฟ้ากับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เกี่ยวข้องซึ่งเป็นไปตามกฎของฟาราเดย์ ดังนั้นถ้าทราบจำนวนประจุไฟฟ้าของสารตัวอย่างก็สามารถบอกความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้เช่นกัน และค่าของกระแสไฟฟ้าที่ไหลในระบบที่มีหน้าสัมผัสขั้วโลหะกับสารตัวอย่าง [16] แสดงได้ดังสมการที่ 2.2

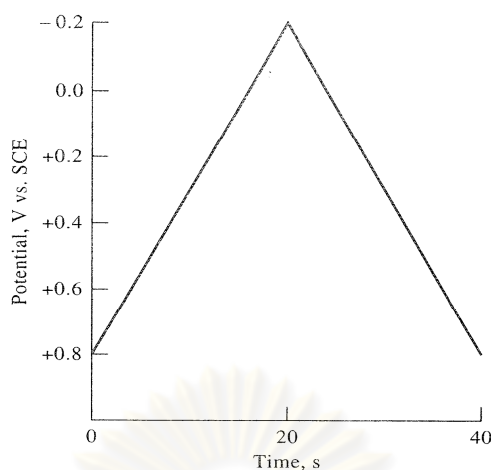
$$i = nFAk_0 \{C_0(0,t)\exp[-\alpha nF(E-E_0)/RT] - C_r(0,t)\exp[(1-\alpha)nF(E-E_0)/RT]\} \quad (2.2)$$

- เมื่อ n คือ จำนวนประจุของสารตัวอย่าง
 F คือ ค่าคงที่ฟาราเดย์
 A คือ พื้นที่ผิวของอิเล็กโทรดทำงาน
 k_0 คือ ค่าคงที่อัตรา (rate constant)
 α คือ ความสมมาตรระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสองข้าง
 R คือ ค่าคงที่ของก๊าซ
 $C_0(0,t)$ คือ ความเข้มข้นของสารในรูปออกซิไดซ์ที่ผิวอิเล็กโทรดที่เวลา t
 $C_r(0,t)$ คือ ความเข้มข้นของสารในรูปรีดิวซ์ที่ผิวอิเล็กโทรดที่เวลา t
 E คือ ศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโทรดทำงาน
 E_0 คือ ศักย์ไฟฟ้าสมดุล
 T คือ อุณหภูมิ [K]

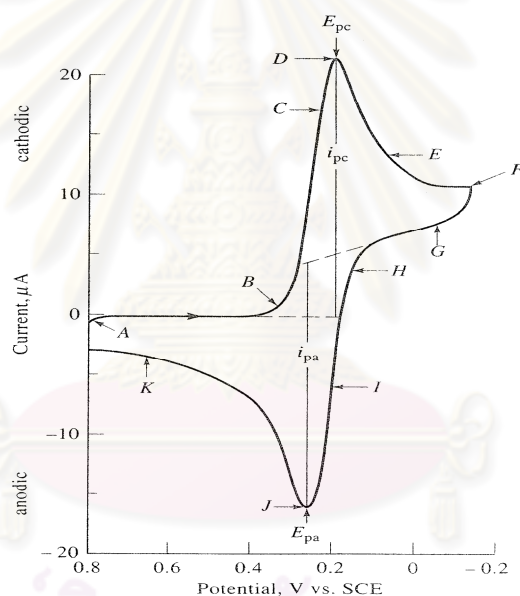
จากความสัมพันธ์ในสมการที่ 2.2 จะสามารถอธิบายได้ว่า กระแสไฟฟ้าของสารตัวอย่าง จะมีค่าสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับพื้นที่อิเล็กโทรด และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในสารละลายเข้าสู่ผิวหน้าอิเล็กโทรด และความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างสารตัวอย่างกับขั้วอิเล็กโทรด

2.2.3 ไชคลิกโวลแทมเมทรี(Cyclic voltammetry)

ไชคลิกโวลแทมเมทรี เป็นกลไกของปฏิกิริยาและอัตราเร็วในขบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชัน ซึ่งมีการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าในสารละลายโดยป้อนศักย์ไฟฟ้าให้เป็นรูปคลื่นสามเหลี่ยม คือ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นจนถึงมากที่สุด จากนั้นค่อยๆ ลดลงด้วยอัตราเร็วเท่ากันจึงมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ตัวอย่างนี้เป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ขั้วอิเล็กโทรดเป็นเส้นตรงจาก +0.8 โวลต์ ถึง -0.15 โวลต์ ซึ่งสแกนตั้งแต่จุดเริ่มต้น +0.8 โวลต์ อัตราการสแกนอยู่ที่ 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ณ ตำแหน่งที่ ศักย์ไฟฟ้าเฉพาะค่าหนึ่งจะเกิดกระแสไฟฟ้าจากปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันสูงสุด ซึ่งจะมีลักษณะเป็นพีคและเมื่อลดศักย์ไฟฟ้ากระแสจะค่อยๆ ลดลง อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาการผันกลับได้ (รูปที่ 2.5) [18]



รูปที่ 2.4 สัญญาณการกระตุ้นไซคลิกโวลแทมเมตรี [18]



รูปที่ 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้ากับศักย์ไฟฟ้าของขั้วอิเล็กโทรดเมื่ออยู่ในสารละลาย [18]

จากความสัมพันธ์ในรูปที่ 2.5 จะเห็นว่าการป้อนศักย์ไฟฟ้าให้แก่อิเล็กโทรดจึงเป็นการกำหนดให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนขึ้น ซึ่งสามารถนำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้มาใช้ในการประเมินความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ โดยทั่วไปถ้าให้อิเล็กโทรดมีค่าศักย์ไฟฟ้าบวกสูงกว่าศักย์ของสารตัวอย่าง อิเล็กโทรดจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนหรือเรียกว่า ขั้วแอโนด และหากค่าศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโทรดต่ำกว่าศักย์ของสารตัวอย่าง อิเล็กโทรดจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับสารละลายหรือเรียกว่า ขั้วแคโทด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในบทนี้จะกล่าวถึงรายละเอียดของวัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง อันได้แก่ สารละลายมาตรฐานต่างๆ การประดิษฐ์และเตรียมอิเล็กโทรดที่ใช้ในการวัด รวมถึงขั้นตอนการทดลอง ตั้งแต่วิธีการวัดสารละลายมาตรฐาน ไปจนถึงการวัดไนตริกออกไซด์ในหนู

3.1 วัสดุ และสารเคมี

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีดังต่อไปนี้

3.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์เครบส์ริงเจอร์ (Krebs-Ringer); pH=7.4 ใช้เป็นสารละลายหลักในการทดลองทั้งในการวัดแบบภายนอกหลอดทดลอง (in vitro) และแบบภายในสัตว์ทดลอง (in vivo) รายละเอียดการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก

3.1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium nitroprusside; SNP, Sigma-Aldrich Co., USA) ซึ่งเป็นสารที่ให้ไนตริกออกไซด์ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์เครบส์ริงเจอร์

3.1.3 สารละลายซิสทีมีน (Cysteamine hydrochloride, Sigma-Aldrich Co, USA) ใช้เป็นสารร่วมกับสารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ในการเกิดไนตริกออกไซด์ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์เครบส์ริงเจอร์

3.1.4 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (35% Hydrogen peroxide ; Sigma-Aldrich Co, USA) ใช้เป็นสารละลายสำหรับการทดสอบการตอบสนองของอิเล็กโทรด เตรียมที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 20% และ 35% ในน้ำปราศจากไอออน

3.1.5 เตตราซัลโฟเนต นิกเกิลฟทาโลไซยาไนด์ (Tetrasulfonated nickel phthalocyanine ; NiTSPc, Sigma-Aldrich Co., USA) ใช้เป็นตัวเพิ่มความไวในการวัดไนตริกออกไซด์ให้กับอิเล็กโทรด

3.1.6 นาฟิออน (Nafion, Sigma-Aldrich Co, USA) ใช้เป็นตัวเพิ่มความจำเพาะในการวัดไนตริกออกไซด์ให้กับอิเล็กโทรด

3.1.7 คลอโรอูริก แอซิด (Chloroauric acid (HAuCl_4)) เป็นสารละลายกรดทองใช้ในการเตรียมชั้นทองบนพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์คาร์บอน

3.1.8 แอซิติลโคลีน (Acetylcholine (Ach) ,Sigma-Aldrich Co, USA) ใช้ในการกระตุ้นไนตริกออกไซด์จากเอนโดทีเลียมเซลล์ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์

3.1.9 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) ใช้ในการทำความสะอาดผิวหน้าอิเล็กทรอนิกส์ให้เสถียรขึ้นก่อนการเคลือบสารต่างๆ บนผิวอิเล็กทรอนิกส์ เตรียมที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน

3.1.10 นอร์เอพิเนฟริน (Norepinephrine (NE) ,Sigma-Aldrich Co, USA) ใช้หยุดการหดตัวของหลอดเลือด โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์

3.1.11 หมึกคาร์บอน (Screen printing ink) ใช้พิมพ์สกรีนบนแผ่นพีวีซี

3.1.12 เอทานอล (95% Ethanol ; Absolute Ethanol) ใช้ทำความสะอาดพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์

3.1.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ใช้เป็นสารตัวทำลายของนิเกิลฟทาไลโซยานาइटเตรียมที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน

3.1.14 ฟลูออเรสเซิน ไอโซไทยานาइट เดตสเตรน (FITC-dextran ; Fluorescein isothiocyanate labeled dextran) (Sigma-Aldrich Co, USA) เป็นสารเรืองแสงใช้ในการติดตามการไหลของเลือดในหลอดเลือดเพื่อหาตำแหน่งก่อนการวางอิเล็กทรอนิกส์

3.1.15 สเตรปโตไซซิน (Streptozocin (STZ) ,Sigma-Aldrich Co, USA) เป็นสารที่ใช้ในการชักนำหนูให้เป็นโรคเบาหวาน โดย STZ มีฤทธิ์ทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 แผ่นพีวีซีหนา 0.2 มม. ใช้ทำแผ่นอิเล็กโทรด

3.2.2 เครื่องพิมพ์สกรีนพื้นเรียบ รุ่น T-600F ใช้สกรีนหมึกคาร์บอนลงบนแผ่นพีวีซี

3.2.3 เครื่องโพเทนทีโอสแตต ใช้สำหรับวัดปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี

3.2.4 ออโตปิเปต ปริมาตร 0-200 ไมโครลิตร .

3.2.5 Plexiglas chamber ใช้เป็นที่วางเยื่อบุล้าใ้หนู

3.2.6 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด

3.2.7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope ; SEM))

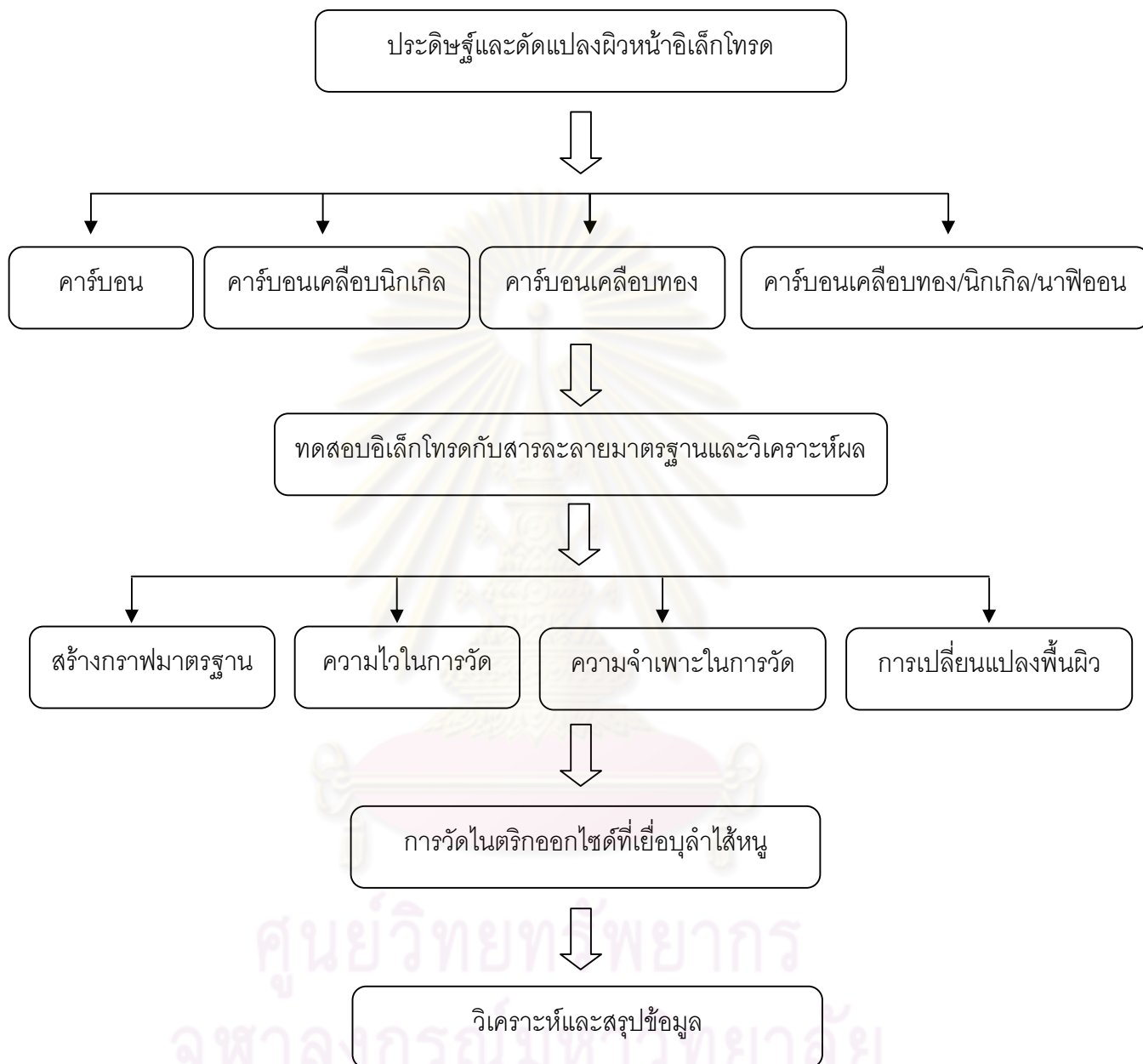
ใช้ดูพื้นผิวอิเล็กโทรดเคลือบทอง

3.2.8 เครื่องอุลตราโซนิก ใช้ทำความสะอาดผิวหน้าอิเล็กโทรดก่อนทำการทดลอง

3.3 การทดลอง

ขั้นตอนการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังแสดงในแผนผังรูปที่ 3.1 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ในระดับห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง

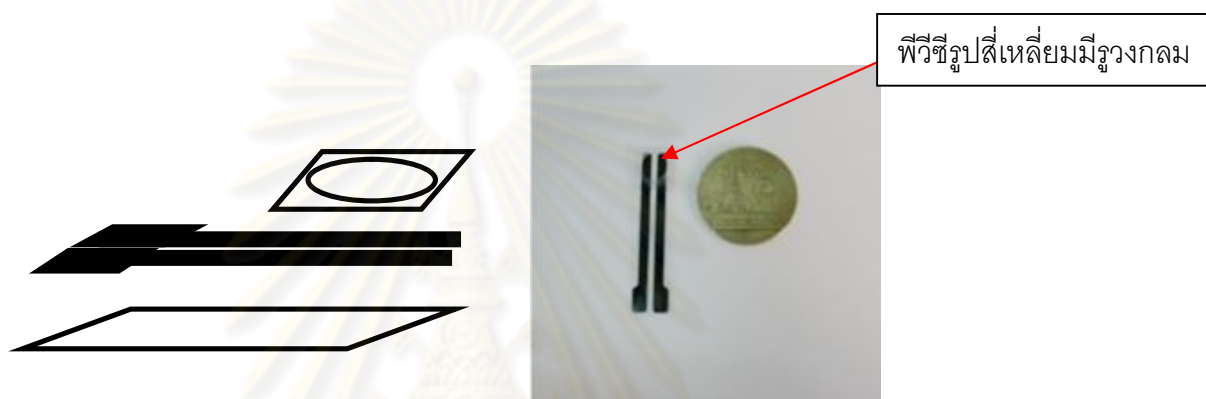
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงาน

3.3.1 การประดิษฐ์อิเล็กโทรด

อิเล็กโทรดที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะดังนี้ อิเล็กโทรด ประกอบด้วย 2 ขั้วไฟฟ้า คือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าวร่วม ประดิษฐ์โดยการพิมพ์สกรีนหมึกคาร์บอน (screen printing ink) ลงบนแผ่นพีวีซีหนา 0.2 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องพิมพ์สกรีนพื้นเรียบ รุ่น T-600F อิเล็กโทรดมีความกว้าง 0.7 เซนติเมตร ยาว 3.3 เซนติเมตร โดยมีลายเส้นอิเล็กโทรดกว้าง 2 มิลลิเมตร เพื่อควบคุมพื้นที่ของอิเล็กโทรดในขณะทำการวัดจึงเตรียมแผ่นพีวีซีสี่เหลี่ยมที่มีรูวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 3.2 สำหรับการทดสอบอิเล็กโทรดในสิ่งมีชีวิตจะไม่มีแผ่นพีวีซีสี่เหลี่ยมนี้



รูปที่ 3.2 รูปแบบของอิเล็กโทรดพิมพ์สกรีนคาร์บอน

3.3.2 การเตรียมอิเล็กโทรด

ทำการประดิษฐ์อิเล็กโทรด 2 แบบ คือ อิเล็กโทรดคาร์บอน (CPE) และ อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง (Au-CPE) ก่อนทำการทดลองอิเล็กโทรดคาร์บอนทุกครั้งควรทำความสะอาดพื้นผิวอิเล็กโทรดด้วยเอทานอลโดยใช้เครื่องอุลตราโซนิก เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้แห้งด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ในการเตรียมอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองจะเตรียมโดยขั้นแรกหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบทองด้วยวิธีป้อนศักย์ไฟฟ้าชั่วพลให้กับอิเล็กโทรด รายละเอียดทดสอบแสดงในหัวข้อ 3.5.1.2

3.3.3 การดัดแปลงพื้นผิวอิเล็กโทรด

การดัดแปลงพื้นผิวอิเล็กโทรดมี 2 แบบ คือ การเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์เพื่อเพิ่มความไวในการวัด และการเคลือบนาฟิออนเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจง ชั้นแรกควรเตรียมผิวหน้าอิเล็กโทรดให้เสถียรขึ้นโดยการใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี สแกนศักย์ไฟฟ้า -0.15 โวลต์ ถึง 1.3 โวลต์ (อัตราการสแกน (scan rate) 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที) เป็นเวลา 10 นาที [19] จากนั้นจึงนำไปเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์และนาฟิออน

3.3.3.1 การเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์ ทำโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี ใช้นิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ทำในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์ สแกนศักย์ไฟฟ้า 0.0-1.2 โวลต์ (อัตราการสแกนเท่ากับ 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที) เป็นเวลา 20 นาที [7] และทดสอบการเคลือบโดยให้ศักย์ไฟฟ้าก่อนและหลังการเคลือบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เครบส์ริงเจอร์ โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี สแกนศักย์ไฟฟ้า -1.2 โวลต์ ถึง 1.2 โวลต์ (อัตราการสแกนเท่ากับ 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที) เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.2 การเคลือบนาฟิออน ทำโดยหยด 5 เปอร์เซ็นต์ นาฟิออน ในแอลกอฮอล์ลงบนอิเล็กโทรด จำนวน 1 ครั้ง แล้วปล่อยให้แห้ง 5 นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส [20]

3.4 วิธีการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

ในการวัดสารละลาย นำอิเล็กโทรดมาใส่ที่ใส่อิเล็กโทรดและนำเครื่องโพเทนทิออสต์ต่อเชื่อมต่อกับสายที่ใส่อิเล็กโทรด แสดงดังรูปที่ 3.3 จากนั้นตั้งค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ (ใช้ตามรายงานวิจัยของ M.Pontie et al. และ F.Bedioui et al. ซึ่งเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัดไนตริกออกไซด์ [7,21] และปรับอัตราการขยายกระแสที่ 10^5 , 10^6 และ 10^7 เท่า ตามความเหมาะสมกับสิ่งที่จะวัด



รูปที่ 3.3 วิธีการวัดสารละลายกับเครื่องโพเทนทีโอสแตด

3.5 การทดลองอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ในห้องปฏิบัติการ

3.5.1 การทดสอบด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ทดสอบอิเล็กโทรดด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะใช้อิเล็กโทรดสองแบบ คือ อิเล็กโทรดคาร์บอน และอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง

3.5.1.1 การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนโดยเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 35 เปอร์เซ็นต์ วัด 3 ครั้งแต่ละความเข้มข้นโดยใช้หลักการแอมเปโรเมตริก เพื่อดูการตอบสนองของสารละลายต่อผิวอิเล็กโทรด และสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

3.5.1.2 การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองมีวัตถุประสงค์เพื่อหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบทอง ด้วยวิธีป้อนศักย์ไฟฟ้าชั่วพล ตั้งแต่ 0, -1.0, -2.0, -3.4, -4.2 และ -5.0 โวลต์ ครั้งละ 15 นาที ใช้กรดทองปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำการทดลองอิเล็กโทรดกรณีละ 3 ตัว [12] และทดสอบอิเล็กโทรดเคลือบทองด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.33 เปอร์เซ็นต์ ทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง เพื่อดูว่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมมีค่าเท่าไร จากนั้นนำอิเล็กโทรดเคลือบทองมาส่งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อดูความแตกต่างของพื้นผิวแต่ละค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เคลือบ จากนั้นทดสอบการเคลือบโดยให้ศักย์ไฟฟ้าก่อนและหลังการเคลือบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เครบส์ริงเจอร์ โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี สแกนศักย์ไฟฟ้า -1.2 โวลต์ ถึง 1.2 โวลต์ (อัตราการสแกนเท่ากับ 100 มิลลิโวลต์ต่อวินาที) เป็นเวลา 10 นาที

3.5.2 การทดสอบด้วยสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์

ทดสอบอิเล็กโทรดด้วยสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์จะใช้อิเล็กโทรด 4 แบบ คือ อิเล็กโทรดคาร์บอน อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์ และอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและนิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์ วัดด้วยหลักการแอมเปอโรเมตริก โดยใช้สารละลายมาตรฐานไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ ที่มีความเข้มข้นในระดับต่างกัน (10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์)

3.5.2.1 ทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอน กับสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ โดยไม่มีสารละลายซิสทีมิน แต่ละความเข้มข้นวัด 3 ครั้ง

3.5.2.2 ทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนกับสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ ที่ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ และ 10^{-2} โมลาร์ เมื่อมีสารละลายซิสทีมินซึ่งเป็นสารกลุ่มไทออลที่ถูกใช้เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ โดยเตรียมสารละลายซิสเตมิน ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ วัด 3 ครั้งเช่นกัน

3.5.2.3 ทดสอบอิเล็กโทรดทั้ง 4 แบบ กับสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ เมื่อมีสารละลายซิสทีมิน แต่ละความเข้มข้นวัด 3 ครั้ง

3.5.3 การทดสอบด้วยสารละลายไซเตียมไนไตรท์

ทำการทดสอบอิเล็กโทรดแบบคาร์บอนเคลือบทองที่นิเกิลฟทาโลไฮยาไนด์ และเคลือบนาฟิออน และทดสอบความจำเพาะเจาะจงการตรวจ (Selectivity) ของอิเล็กโทรดเพื่อดูการรบกวนจากสารอื่นโดยเตรียมสารละลายไซเตียมไนไตรท์ ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ แล้วจึงทำการวิเคราะห์เทียบผลการตอบสนองต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ กับ ไซเตียมไนไตรท์

3.6 การทดสอบอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้นแต่ละชนิดในสัตว์ทดลอง

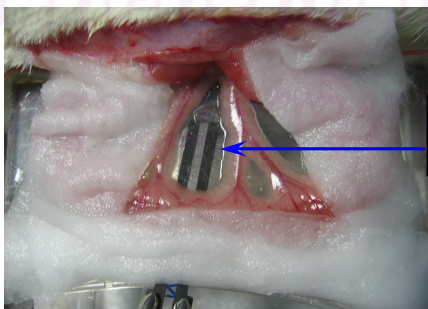
การทดลองในสัตว์ทดลอง การศึกษานี้ใช้หนูทดลองในกลุ่มเดียวกับงานวิจัยของนางสาว ศิรดา รัชชีสันติวานนท์ นิสิตปริญญาเอก จากภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่รับรอง 16/52) จำนวนหนูที่ทดลองทั้งหมด 20 ตัว แบ่งออกเป็น หนูปกติ 11 ตัว และหนูเป็นโรคเบาหวาน 9 ตัว พันธุ์ Sprague-Dawley rats น้ำหนัก 200-300 กรัม

ขั้นตอนดำเนินการทดลอง

3.6.1 ทำให้หนูเป็นโรคเบาหวานโดยการฉีดสารสเตรปโตโซซิน (streptozotolin; STZ) ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว(หน่วยกิโลกรัม) [50 mg/kg.bw] ทางหลอดเลือดดำ ซึ่งเตรียมสารสเตรปโตโซซิน ดังนี้ หลังจากอดอาหารหนูเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จึงทำการฉีดสารละลายสเตรปโตโซซินซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรทที่มีพีเอช (pH) เท่ากับ 4.5 ทางหลอดเลือดดำที่หางหนู

เกณฑ์การพิจารณาการเป็นโรคเบาหวานใช้การกำหนดค่าน้ำตาลในเลือดที่สูงกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร [mg/dl] ในเวลา 48 ชั่วโมงภายหลังจากการฉีดสารสเตรปโตโซซินโดยใช้เครื่องวัดระดับน้ำตาล (glucometer) ; Advance Glucometer, Boehring Mannheim, Germany)

3.6.2 ทำให้หนูหมดสติด้วยการฉีดยาสลบ (pentobarbital sodium) เข้าทางเนื้อเยื่อที่บุช่องท้อง (interaperitoneal ; ip.) ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว [mg/kg.bw] จากนั้นเปิดหลอดลมสอดท่อเพื่อเปิดทางเดินหายใจ ต่อมาเปิดช่องท้องหนูบน Plexiglas chamber และหยดสารละลายบัฟเฟอร์แครบสริงเจอร์ pH 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาความสมดุลของเยื่อบุลำไส้ และก่อนวางอิเล็กโทรดควรตรวจดูหลอดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการฉีดฟลูออเรสซิน ไอโซไทยานด์ เดตสแตรอน ว่าหลอดเลือดที่ไหลเวียนได้ดีอยู่ตำแหน่งใด ซึ่งเป็นการไหลแบบอาร์เตอริโอ (arteriole) จากนั้นนำอิเล็กโทรดมาวางใต้เยื่อบุลำไส้หนูบริเวณที่เลือกหลอดเลือดได้ เพื่อตรวจวัดไนตริกออกไซด์ระดับพื้นฐาน (baseline) แสดงดังรูปที่ 3.4



บริเวณเนื้อเยื่อที่ทำการวัดไนตริกออกไซด์

รูปที่ 3.4 การวางอิเล็กโทรดทดสอบเพื่อหาปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เนื้อเยื่อบุลำไส้หนู

3.6.3 ทดสอบประสิทธิภาพของอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้น ทั้ง 4 แบบ

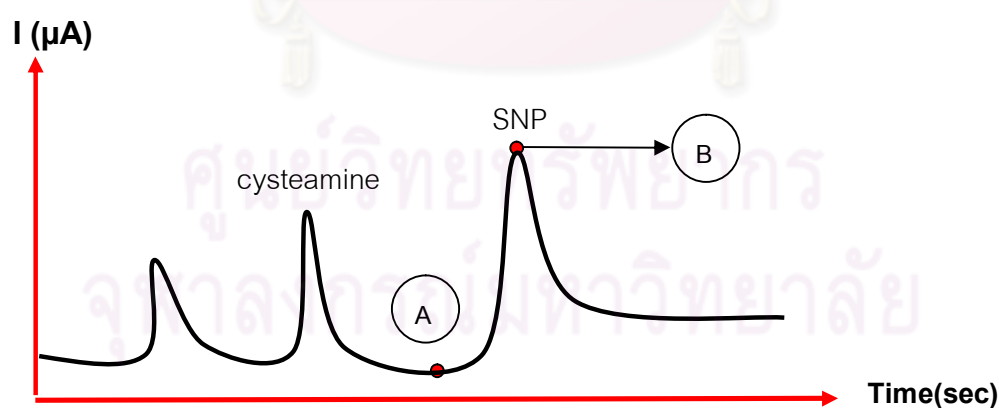
ได้แก่ อิเล็กโทรดคาร์บอน,เคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์, เคลือบทอง, เคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ อิเล็กโทรดทั้ง 4 แบบ ต้องเคลือบด้วยนาฟิออน เพื่อลดสารรบกวนในระบบการวัดจากหนู จากนั้นนำอิเล็กโทรดวางใต้เยื่อลำไส้หนูปกติและหนูเบาหวาน (8 สัปดาห์หลังจากฉีด STZ ให้เป็นเบาหวาน) และหยดสารละลายบัฟเฟอร์ Krebs-Ringer เฮกซอนอร์เอพินเฟริน ที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อดูการหดตัวของหลอดเลือด และหยดแอซิติลโคลีน ที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์จากเอนโดทีเลียมเซลล์ บันทึกและสังเกตการตอบสนองเมื่อหลังหยดแอซิติลโคลีน 5 นาที

3.7 วิเคราะห์ข้อมูล

3.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ในการประมวลผลข้อมูลจากการวัดสารใดๆ เพื่อนำไปใช้สร้างกราฟมาตรฐานนั้น จะนำข้อมูลผลการทดลองการตอบสนองมาวิเคราะห์โดยนำค่ากระแสไฟฟ้าที่จุดสูงสุด หรือพีคของการตอบสนองลบด้วยค่ากระแสไฟฟ้าพื้นหลัง (base line) เพื่อลดความผิดพลาดของข้อมูลอันเนื่องมาจากค่ากระแสพื้นหลังของสารละลายไม่เท่ากัน ดังนั้นวิธีประมวลผลข้อมูลนี้จะใช้กับการทดสอบอิเล็กโทรดทุกชนิด ดังตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณ



รูปที่ 3.5 การตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลาย

จากกราฟด้านบน นำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเตอามีนไนโตรพรัสไซด์กับค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ คำนวณค่ากระแสที่วัดได้ด้วยค่ากระแสที่จุด B ลบด้วยค่ากระแสไฟฟ้าที่จุด A โดย

จุด A แทนค่ากระแสไฟฟ้าพื้นหลัง ได้จากค่ากระแสที่คงที่แล้วหลังการตอบสนองของสารละลายซิสทีมีน

จุด B แทนค่ากระแสไฟฟ้าที่จุดสูงสุด ได้จากค่าพีคของการตอบสนองของสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไซด์

3.7.2 จากการทดลองข้อ 3.6.3 จะทราบว่าอิเล็กโทรดแบบใดมีการตอบสนองที่ดีที่สุด และนำค่าการตอบสนองหลังการกระตุ้นด้วยแอซิติลโคลีน มาคำนวณการเปลี่ยนแปลงของไนตริกออกไซด์ที่ได้จากหนูเบาหวานเปรียบเทียบกับหนูปกติ โดยทำการเปรียบเทียบการวัดจากอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้นเทียบกับผลการทดลองที่วัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยใช้สารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซีน (DAFs:Diaminofluorescein) [22] หลักการทำงานของสารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซีน (DAFs:Diaminofluorescein) [22] แสดงไว้ในภาคผนวก ข



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

ในบทนี้จะกล่าวถึงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล โดยแบ่งเนื้อหาออกเป็นสองส่วนหลัก ได้แก่ การทดสอบในห้องปฏิบัติการ และการทดสอบในสัตว์ทดลอง

4.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

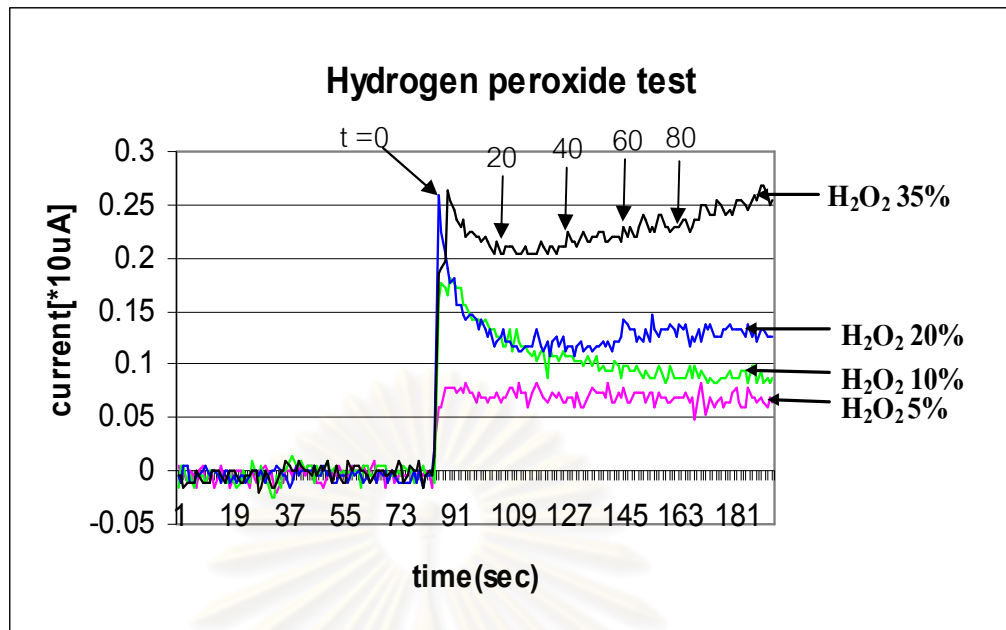
การทดสอบอิเล็กทรอนิกส์ในห้องปฏิบัติการ แบ่งออกเป็นสามส่วนหลัก คือ การทดสอบวัสดุสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรพรีซโซด์ และสารละลายโซเดียมไนเตรท โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของอิเล็กทรอนิกส์ในการวัดสารละลายชนิดต่างๆ รวมถึงสารมาตรฐานที่เหนี่ยวนำให้เกิดไนตริกออกไซด์ก่อนที่จะนำอิเล็กทรอนิกส์ไปทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป

4.1.1 การตอบสนองต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

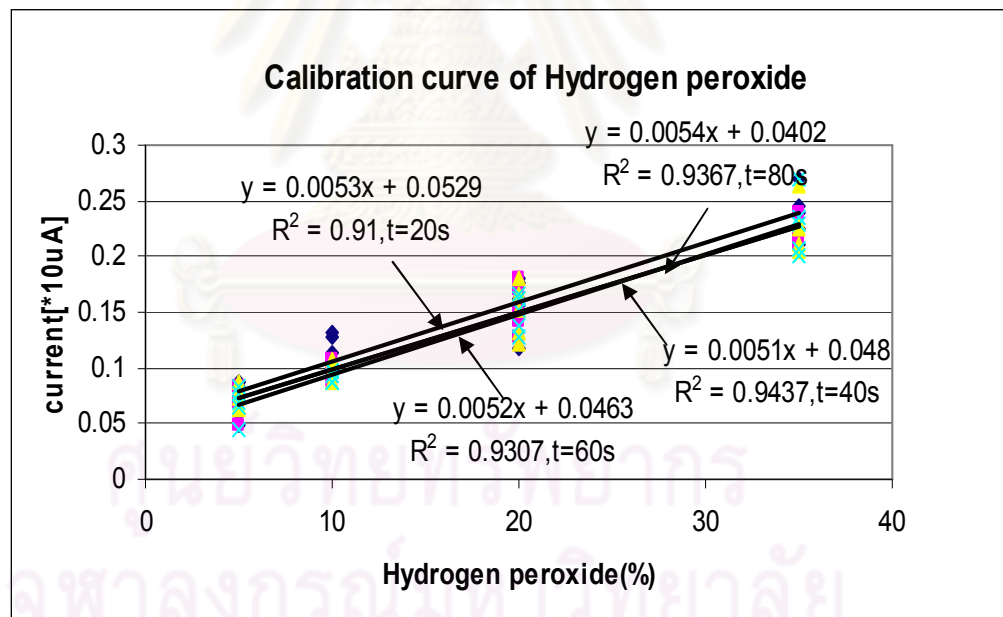
ในส่วนนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ การทดสอบการตอบสนองของอิเล็กทรอนิกส์ต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้อิเล็กทรอนิกส์ 2 แบบ ได้แก่ อิเล็กทรอนิกส์คาร์บอน และอิเล็กทรอนิกส์เคลือบทอง

4.1.1.1 การตอบสนองของอิเล็กทรอนิกส์คาร์บอนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบการตอบสนองของอิเล็กทรอนิกส์คาร์บอนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 10 20 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ รูปที่ 4.2 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าของอิเล็กทรอนิกส์ที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ เวลาต่างๆ ซึ่งตารางที่ 1 แสดงค่าความไวและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของการวัดที่เวลา 20 40 60 และ 80 วินาที จากตารางไม่พบความแตกต่างของทั้งความไวในการวัด และความเป็นเชิงเส้นของค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ที่ได้จากการวัดที่เวลาต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่จะเก็บค่าข้อมูลที่ 40 วินาที เนื่องจากเป็นช่วงหลังการหยุดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เสถียร และเวลาไม่มากเกินไปในการเก็บค่าข้อมูล



รูปที่ 4.1 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เวลา 20, 40 และ 80 วินาที

ตารางที่ 4.1 : ตารางความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าความไวในการวัดของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

เวลา(วินาที)	ค่าความไวในการวัดต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2)
20	$0.0053X+0.0529$	0.910
40	$0.0051X+0.048$	0.9437
60	$0.0052X+0.0463$	0.9307
80	$0.0054X+0.0402$	0.9367

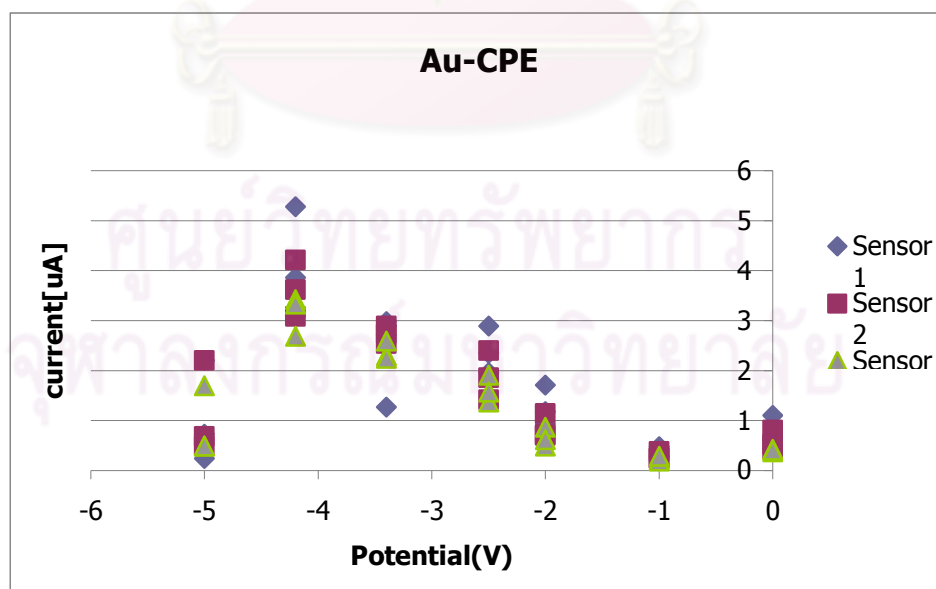
4.1.1.2 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดที่ศักย์ไฟฟ้าต่างกัน 6 ค่า คือ 0.0, -1.0, -2.0, -3.4, -4.2 และ -5.0 โวลต์ โดยทำการทดสอบการตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.33 เปอร์เซ็นต์ และใช้อิเล็กโทรดกรณีละ 3 ตัว รูปที่ 4.3 แสดงผิวหน้าของอิเล็กโทรดคาร์บอนที่เคลือบทองจะเห็นว่าทองติดอยู่ที่ผิวอิเล็กโทรดเพียงด้านเดียว ที่ถูกใช้เป็นขั้วอิเล็กโทรดทำงาน

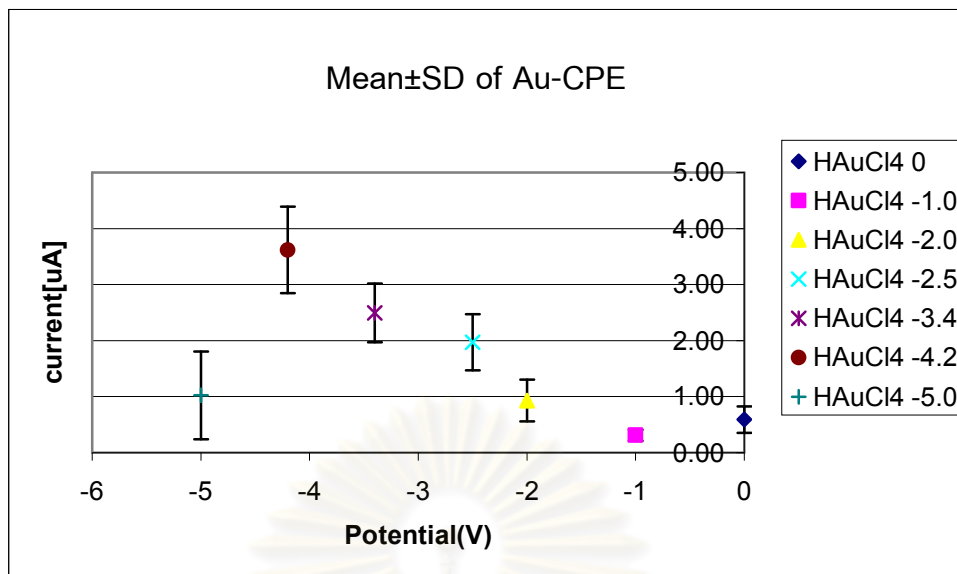


รูปที่ 4.3 อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 จากผลการทดลองพบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการเคลือบทองบนอิเล็กโทรดคาร์บอนที่ให้การตอบสนองต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ -4.2 โวลต์ รูปที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่เคลือบทองที่ศักย์ไฟฟ้า -4.2 โวลต์ มีค่าสูงสุดคือประมาณ 3.62 ไมโครแอมแปร์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.40 ไมโครแอมแปร์ และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน เท่ากับ 10.99 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่เคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนได้ดีที่สุด คือ -4.2 โวลต์ เนื่องจากการตอบสนองที่ดีกว่าค่าศักย์ไฟฟ้าอื่นๆ อย่างไรก็ตามพบว่าค่าที่วัดได้มีค่าความแปรปรวนค่อนข้างสูง รายละเอียดผลการทดสอบแสดงในภาคผนวก ค

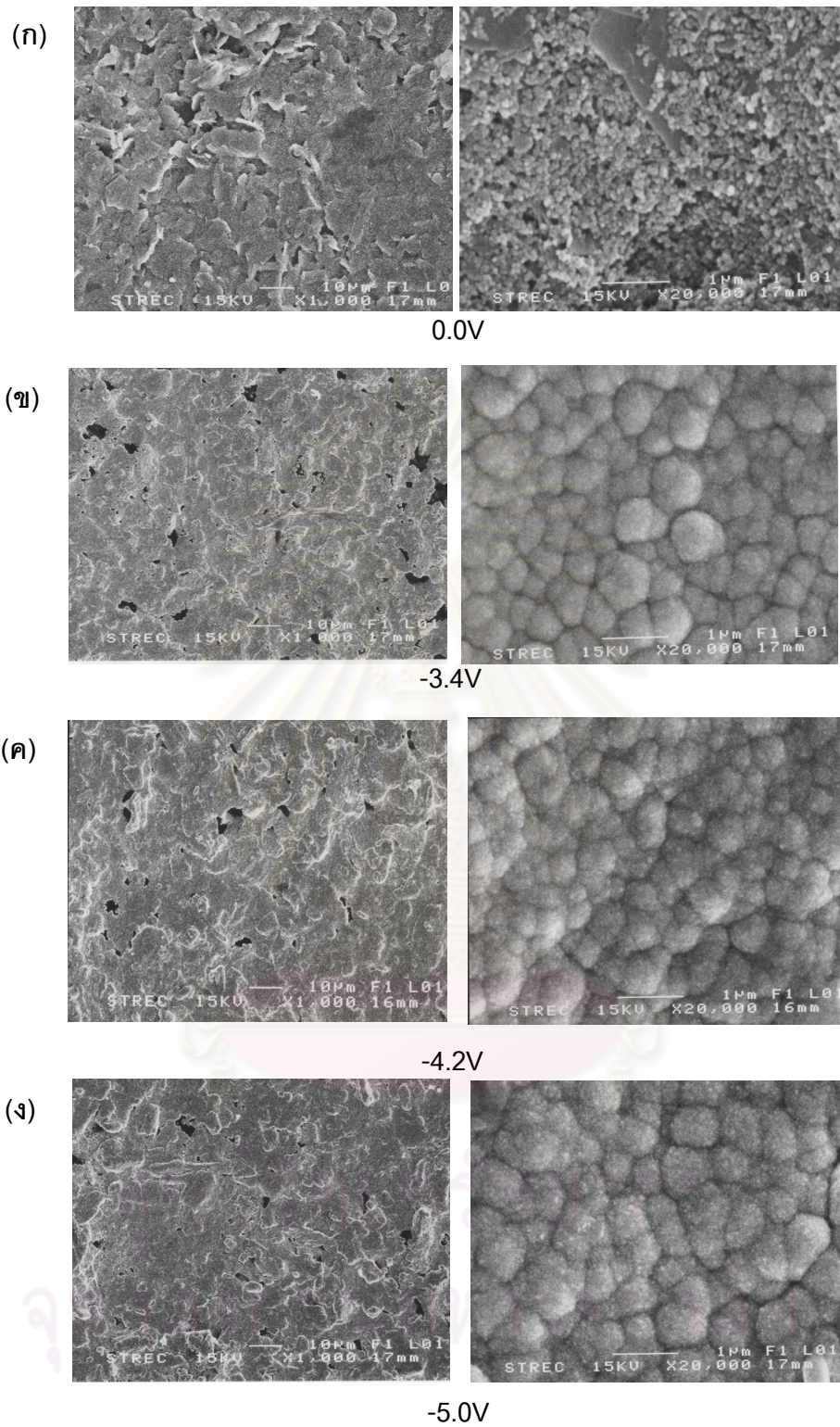


รูปที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของศักย์ไฟฟ้าการเคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดกรณีละ 3 ตัว



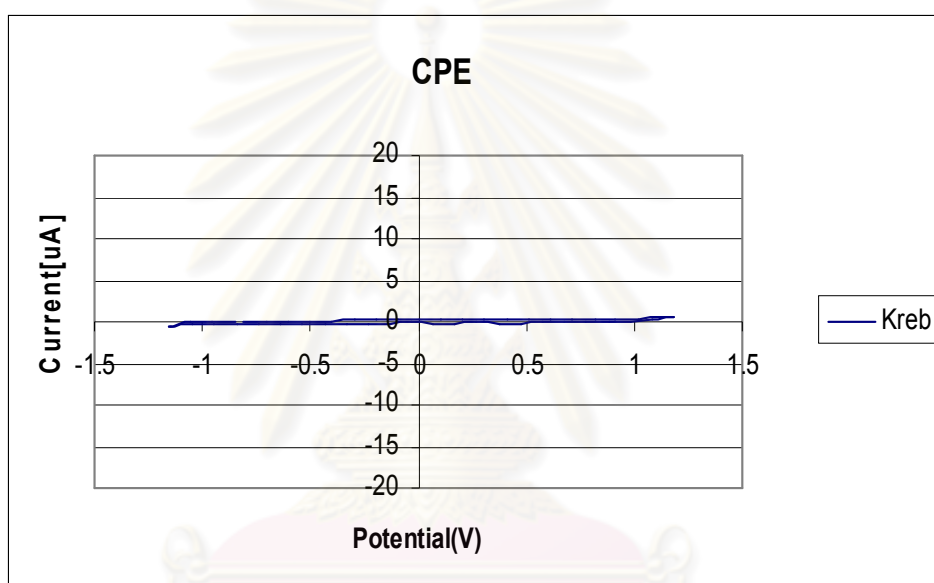
รูปที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อใช้อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ในการวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เมื่อนำอิเล็กโทรดเคลือบทองมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อดูความแตกต่างของพื้นผิวแต่ละค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เคลือบทอง ได้แก่ 0.0, -3.4, -4.2 และ -5.0 โวลต์ พบว่าพื้นผิวอิเล็กโทรดที่ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 0.0 โวลต์ จะแตกต่างกว่าพื้นผิวอื่นๆ โดยมีลักษณะพื้นผิวเป็นอนุภาคนาขนาดเล็ก ที่กระจายโดยมีช่องว่างอยู่มากและไม่ได้เชื่อมติดกันดังปรากฏในอิเล็กโทรดอื่น ช่องว่างระหว่างอนุภาคนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของอิเล็กโทรดนี้ไม่ดีเมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดอื่นๆ แสดงดังรูป 4.6 (ก) รูปส่วนลักษณะพื้นผิวอิเล็กโทรดเคลือบทองที่ค่าศักย์ไฟฟ้า -3.4, -4.2 และ -5.0 โวลต์ จะเห็นว่าพื้นผิวมีลักษณะเป็นเม็ดกลมเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นจึงทำให้พื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นเหตุที่ทำให้ได้ค่าการตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามไม่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างพื้นผิวของอิเล็กโทรดจากค่าศักย์ไฟฟ้าทั้งสามค่านี้ได้ (รูป 4.6 (ข), (ค) และ (ง)) แม้ว่าจากการวัดการตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของอิเล็กโทรดที่เคลือบทองที่ศักย์ไฟฟ้า -4.2 โวลต์ จะได้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด (รูปที่ 4.4 และ 4.5)



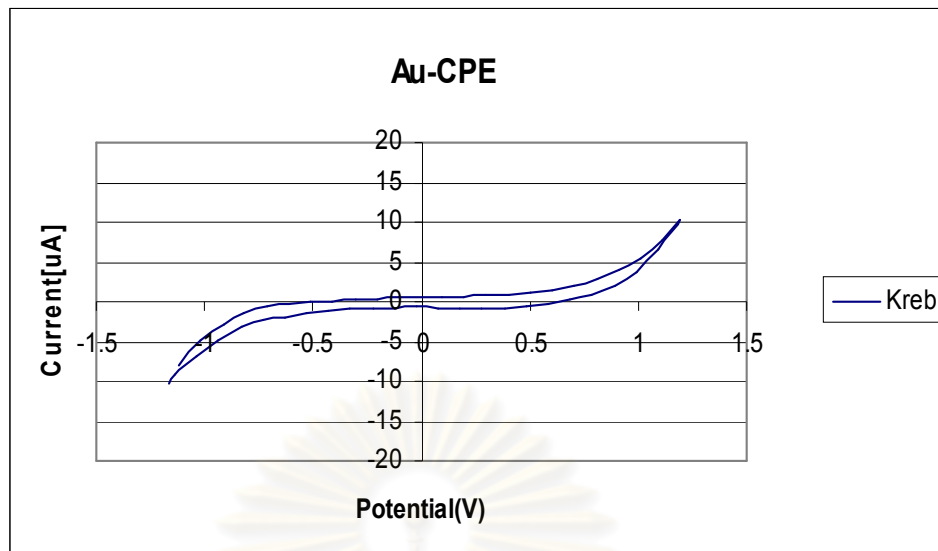
รูปที่ 4.6 ลักษณะของพื้นผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองสองดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ภาพทางซ้ายกำลังขยาย $\times 1000$ เท่า และทางขวากำลังขยาย $\times 20,000$ เท่า ที่เคลือบทองที่ศักย์ไฟฟ้า (ก) 0 V (ข) -3.4 V (ค) -4.2 V (ง) -5.0 V

จากการศึกษาเปรียบเทียบการวัดไซคลิกโวลแทมโมแกรมของอิเล็กโทรดก่อนและหลังการเคลือบทองลงบนอิเล็กโทรดคาร์บอน (ที่ค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -4.2 โวลต์) ในสารละลายบัฟเฟอร์ Krebs เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวและการรับส่งอิเล็กตรอนของอิเล็กโทรด ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 จากผลการทดลองที่ได้ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างวงไซคลิกโวลแทมเมทรีจะเห็นว่า วงไซคลิกโวลแทมเมทรีของอิเล็กโทรดคาร์บอนเล็กกว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง หรืออาจกล่าวได้ว่าอิเล็กโทรดที่เคลือบทองนั้นจะสามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนได้มากกว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนที่ไม่ได้เคลือบทอง ทำให้ได้กระแสไฟฟ้าที่สูงกว่า กล่าวอีกนัยหนึ่งคืออิเล็กโทรดที่เคลือบทองให้สภาพความนำไฟฟ้าที่ดีกว่า



รูปที่ 4.7 การตอบสนองของผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลาย Krebs โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี

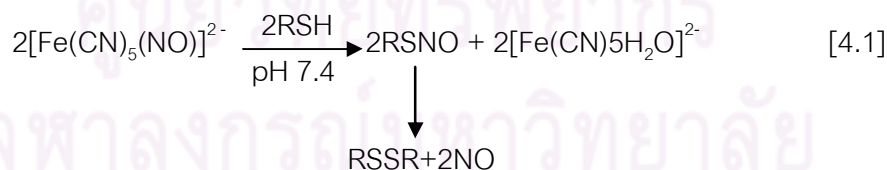
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 การตอบสนองของขั้วอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง(ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -4.2 โวลต์) สารละลายแควบสริงเจอร์ โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี

4.1.2 การทดสอบกับสารละลายไซเดียมไนโตรพรัชไซด์

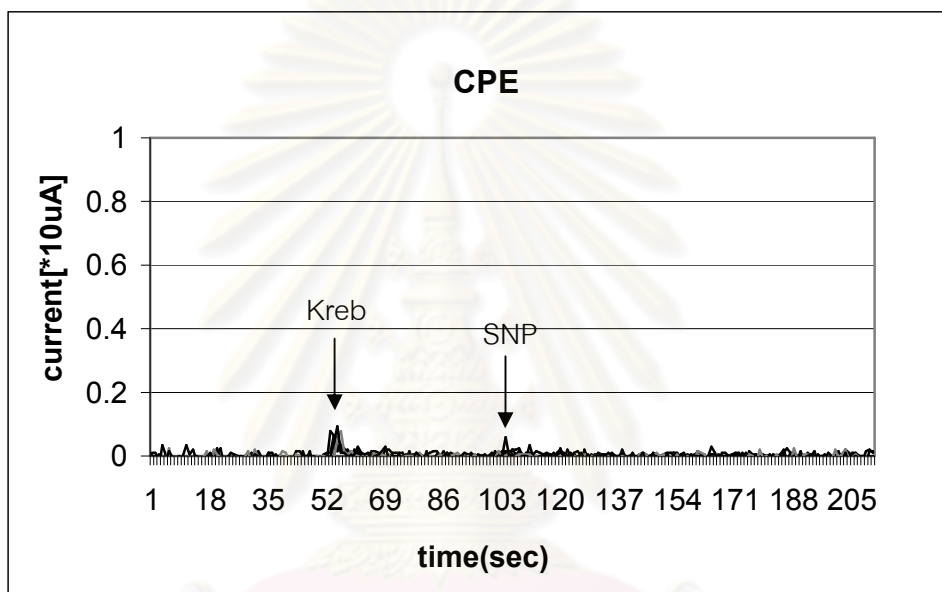
ในส่วนนี้แบ่งออกเป็นสี่ส่วนหลัก คือ การทดสอบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนไม่เพิ่มสารละลายซิสเตมิน, การเพิ่มสารละลายซิสทีมิน, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง และการดัดแปลงพื้นผิวอิเล็กโทรดโดยเพิ่มนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ และนาฟิออนการวัดการตอบสนองนั้นจะใช้สารละลายมาตรฐานไซเดียมไนโตรพรัชไซด์เป็นตัวแทนของไนตริกออกไซด์ โดยการอิงสมการเคมีที่ 4.1 [23] จากสมการจะเห็นได้ว่า ไซเดียมไนโตรพรัชไซด์ 1 โมเลกุล สามารถให้ไนตริกออกไซด์ได้ 1 โมเลกุล



ดังนั้นการวัดสารละลายไซเดียมไนโตรพรัชไซด์จึงอาจจะกล่าวได้ว่าเป็นการวัดไนตริกออกไซด์ได้ โดยใช้สมมติฐานว่าการเกิดปฏิกิริยาในระบบนั้นเป็นแบบสมมูลแบบ และมีสารประกอบไทออกอลอยู่ในระบบอย่างเพียงพอ

4.1.2.1 การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนเมื่อไม่มีสารละลายซิสทีมีน

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของอิเล็กโทรดในการวัดไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากสารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-2} โมลาร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.9 จากผลการทดลองที่ได้พบว่า การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายบัฟเฟอร์เครปส์ริงเจอร์ และสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ จะมีการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าต่ำมาก หรืออิเล็กโทรดยังไม่ตอบสนองต่อทั้งสารละลายเครปส์ริงเจอร์และสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ยังไม่สามารถแตกตัวให้ไนตริกออกไซด์ได้

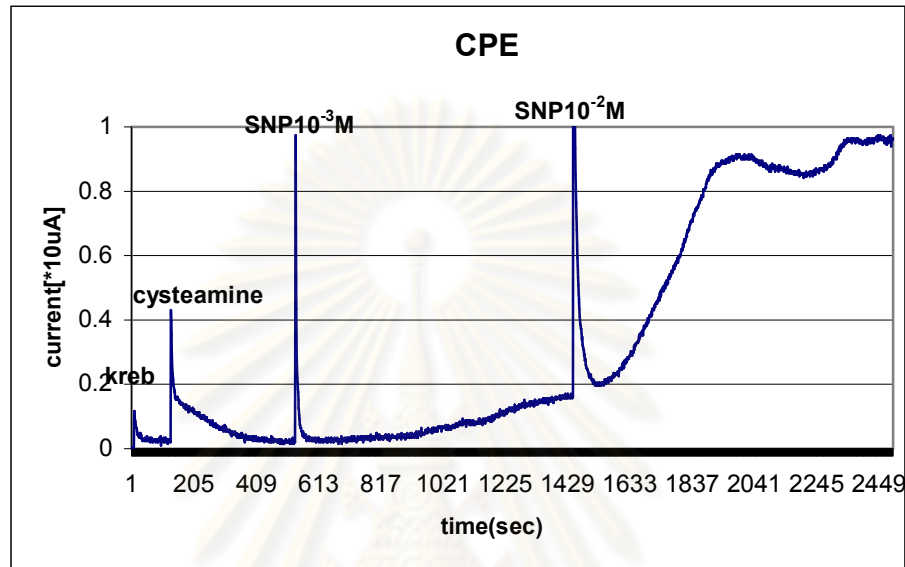


รูปที่ 4.9 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายเครปส์ริงเจอร์และสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์

4.1.2.2 การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนเมื่อมีสารละลายซิสทีมีน

การทดลองนี้เป็นการทดสอบสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์อย่างเดี่ยวเพื่อทดสอบว่าเมื่อมีสารละลายซิสทีมีน จะทำให้สารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์แตกตัวเป็นไนตริกออกไซด์ได้ดังสมการที่ (4.1) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.10 จากผลการทดลองพบว่า การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายบัฟเฟอร์เครปส์ริงเจอร์ และสารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ที่ความเข้มข้น 10^{-7} และ 10^{-3} โมลาร์ มีค่าอยู่บ้าง และเมื่อมีสารละลายซิสทีมีนจะทำให้เห็นการตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ชัดเจนขึ้นตารางที่ 2 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดที่ตอบสนองต่อโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ที่ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ เมื่อไม่มีและมีซิสทีมีน ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยของการตอบสนอง

เท่ากับ 0.17 ไมโครแอมแปร์ และ 1.53 ไมโครแอมแปร์ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าสารละลายซิสทีมีนมีความสำคัญต่อการทำงานของสารละลายไซเตียมในโตรพรซ์ไซด์ เนื่องจากมีรายงานว่าสารละลายซิสทีมีนมีหมู่อิสระของซัลไฟด์ ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นทำให้สารละลายไซเตียมในโตรพรซ์ไซด์ เกิดการแตกตัวให้ไนตริกออกไซด์ได้ดีขึ้น [23]



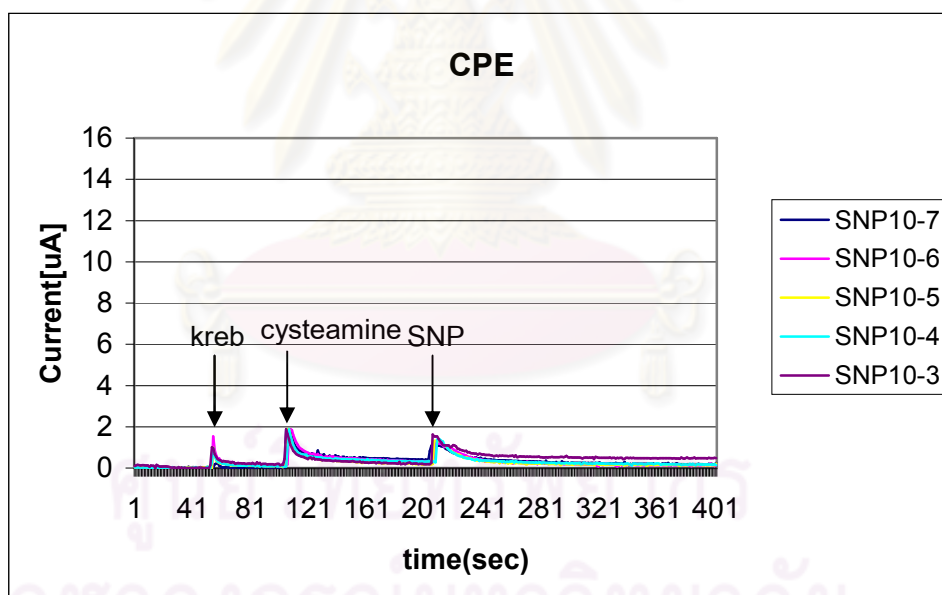
รูปที่ 4.10 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายไซเตียมในโตรพรซ์ไซด์ เมื่อมีสารละลายซิสทีมีน

ตารางที่ 4.2 : ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของกระแสตอบสนองที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรดต่อสารละลายชนิดต่างๆ

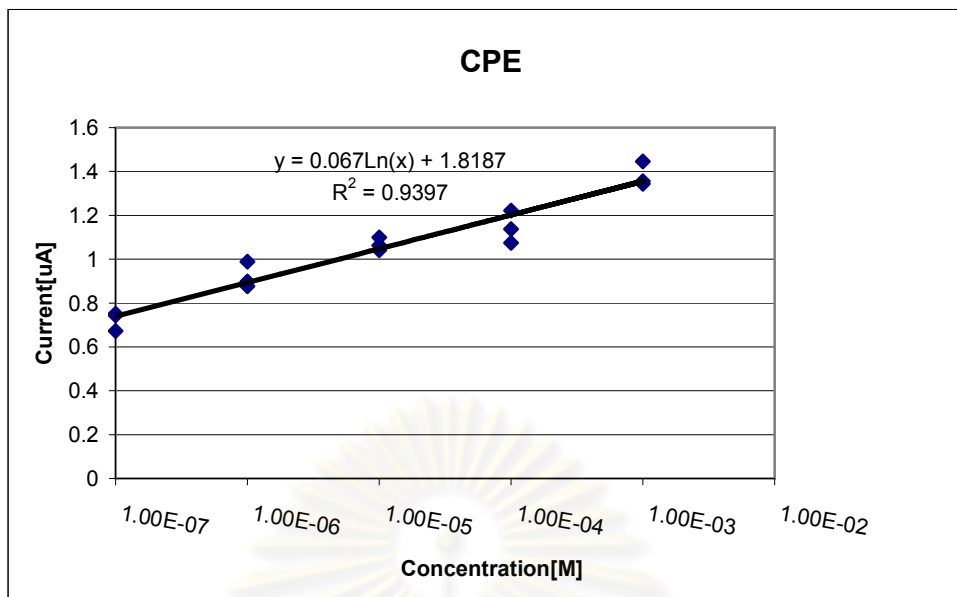
	Kreb	Cysteamine	SNP w/o cysteamine	SNP with cysteamine
\bar{X}	0.16 μA	0.34 μA	0.17 μA	1.53 μA
SD	0.02 μA	0 μA	0.21 μA	0.02 μA
CV(%)	17.3	0	125	1.9

\bar{X} : ค่าเฉลี่ย, SD: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, CV: สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน, ค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลายแต่ละชนิด ทำโดยหยดสารละลายบนอิเล็กโทรดซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของกระแสที่ได้

จากการทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนกับสารละลายไซโตจีนไนโตรพรัซไซด์เมื่อมีสารละลายซิสทีมีนจะเห็นว่าอิเล็กโทรดมีการตอบสนองมากขึ้น จึงได้นำอิเล็กโทรดคาร์บอนมาทดสอบกับสารละลายไซโตจีนไนโตรพรัซไซด์ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.11 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไซโตจีนไนโตรพรัซไซด์สูงขึ้นการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้แสดงไว้กราฟรูปที่ 4.12 จะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซโตจีนไนโตรพรัซไซด์กับกระแสไฟฟ้า จะมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.067 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด (ทุกๆ 10 เท่าที่ค่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้น) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดลีนใจ เท่ากับ 0.9397 แสดงให้เห็นว่าค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้นตามความเข้มข้น



รูปที่ 4.11 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายไซโตจีนไนโตรพรัซไซด์เมื่อมีสารละลายซิสทีมีน

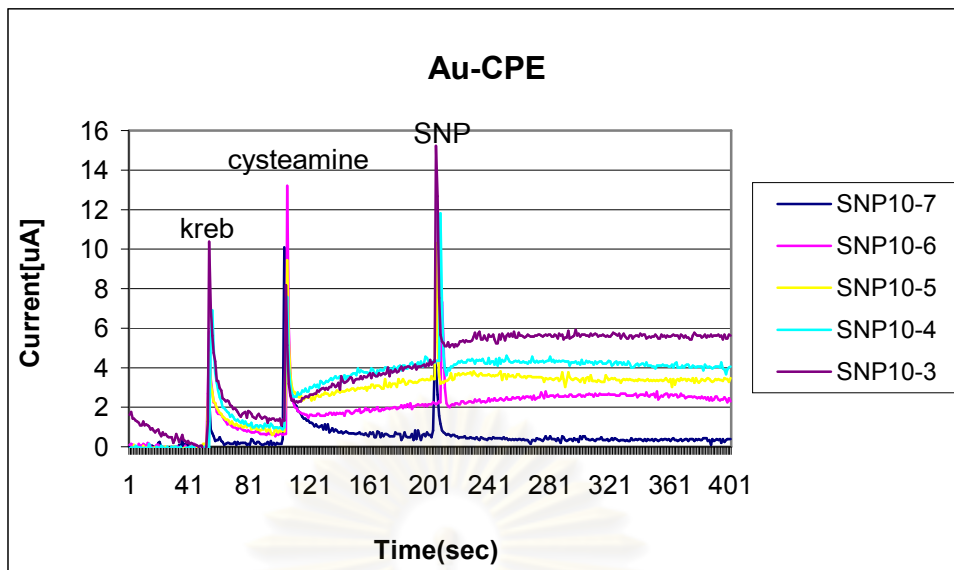


รูปที่ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอน

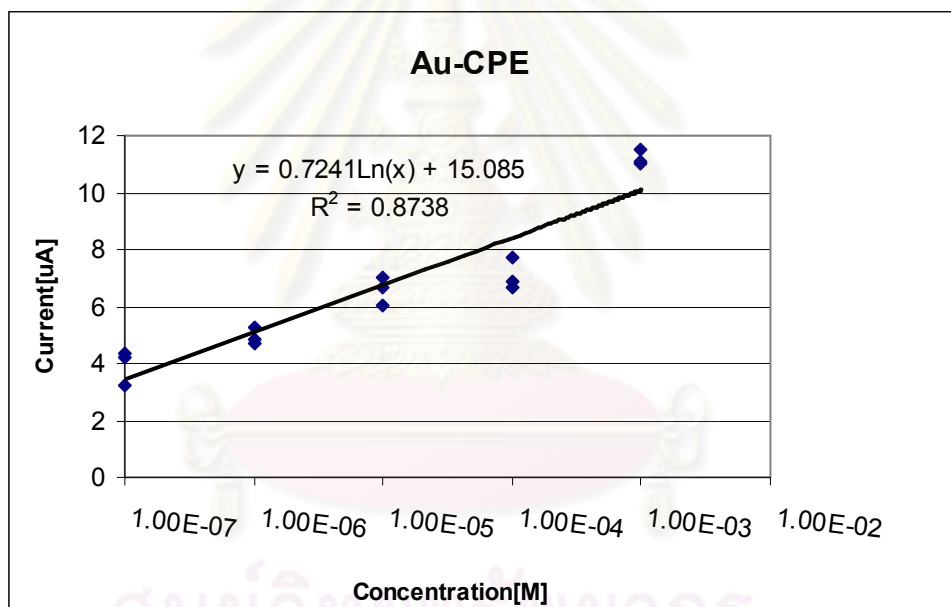
4.1.2.3 การทดสอบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองในการวัดไนตริกออกไซด์จากสารละลายมาตรฐานไซเดียมไนโตรพรีซไซด์ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.13 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไซด์สูงขึ้นการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้แสดงไว้กราฟรูปที่ 4.14 จะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไซด์กับกระแสไฟฟ้าจะมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.7241 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.8738 แสดงให้เห็นว่าค่าการนำไฟฟ้ามีค่าสูงขึ้นกว่า 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดคาร์บอนที่ไม่ได้เคลือบทอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัชไซด์



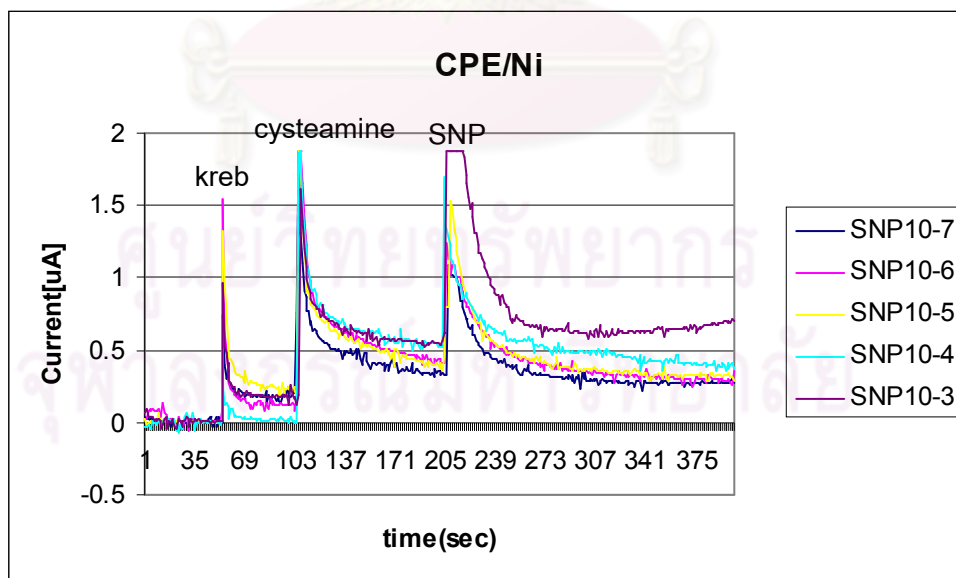
รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเตียมไนโตรพรัชไซด์ของอิเล็กโทรดเคลือบทอง

4.1.2.4 การทดสอบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนและคาร์บอนเคลือบทองเมื่อมีนิเกิลฟทาโลไฮยาไนต์ และนาฟิออน

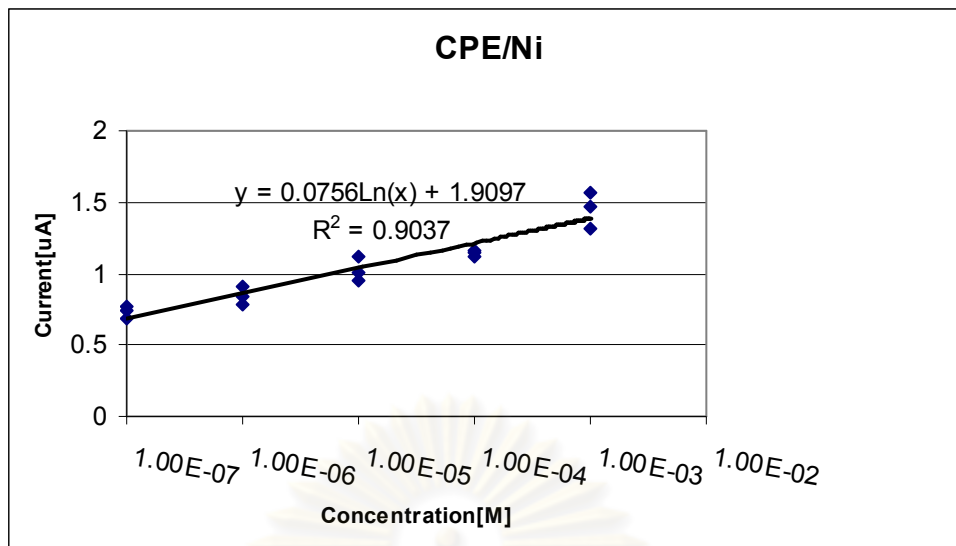
ในส่วนการทดลองนี้แบ่งออกเป็นสองส่วนหลัก คือ การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนต์ และทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนและคาร์บอนเคลือบทองที่เพิ่มนาฟิออน ในการทดลองทั้งสองส่วนนี้ทดลองด้วยสารละลายไฮเดียมไนโตรพรัซไซด์ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์

4.1.2.4.1 การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนต์

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบอิเล็กโทรดเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนต์ว่าสามารถเพิ่มความไวในการวัดไนตริกออกไซด์ให้กับอิเล็กโทรดได้หรือไม่ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.15 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮเดียมไนโตรพรัซไซด์สูงขึ้นการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ กราฟรูปที่ 4.16 จะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไฮเดียมไนโตรพรัซไซด์กับกระแสไฟฟ้า จะมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.0756 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.9037 หรือกล่าวคือการตอบสนองมีค่าสูงขึ้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนที่ไม่ได้เคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนต์



รูปที่ 4.15 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไฮยาไนต์ต่อสารละลายไฮเดียมไนโตรพรัซไซด์

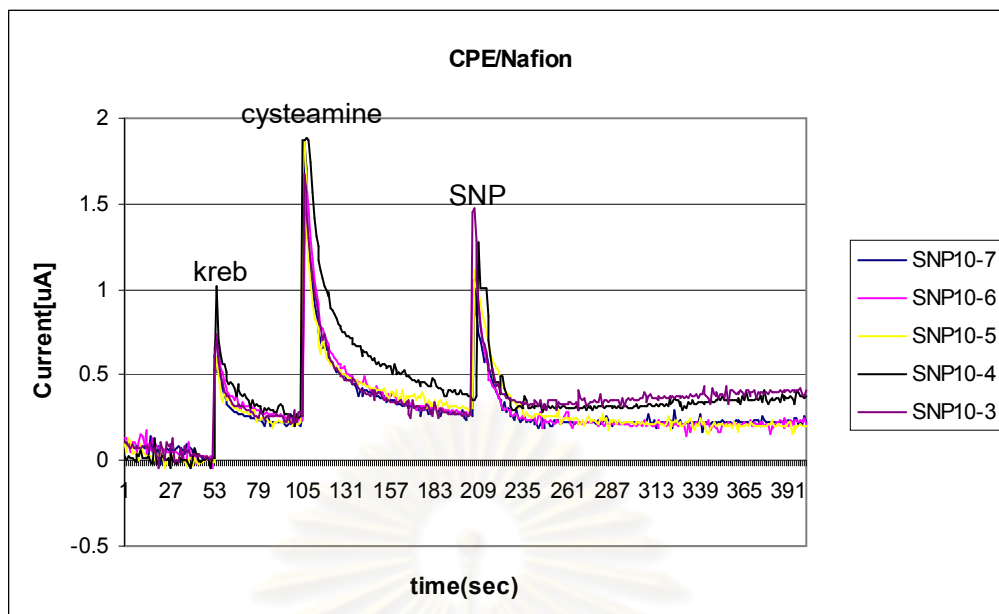


รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์

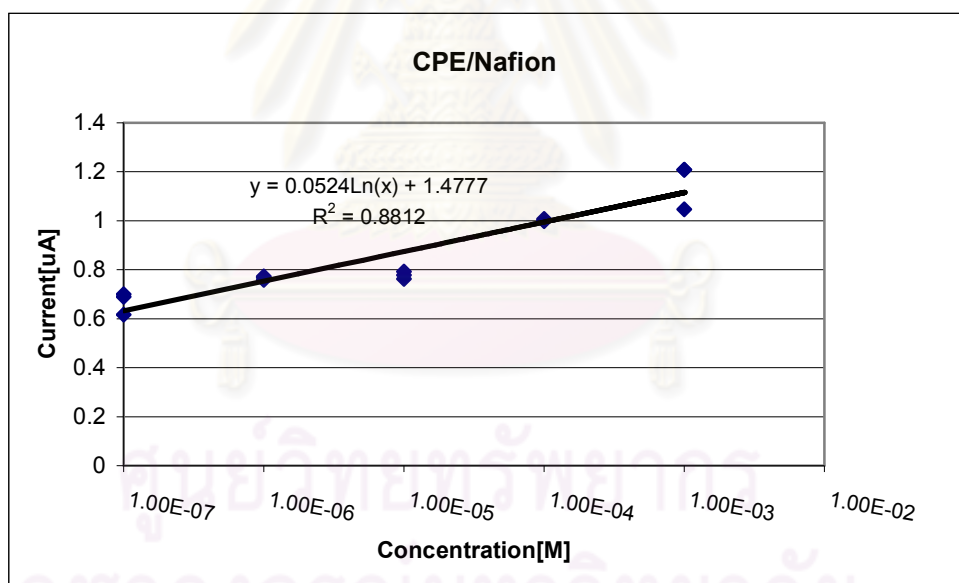
4.1.2.4.2 การทดสอบอิเล็กโทรดคาร์บอนและคาร์บอนเคลือบทองที่เพิ่มนาฟิออน

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบอิเล็กโทรดที่เคลือบนาฟิออนว่าสามารถเพิ่มความจำเพาะในการวัดไนตริกออกไซด์ให้กับอิเล็กโทรดได้หรือไม่ อิเล็กโทรดที่ทดสอบมี 3 แบบ ได้แก่ อิเล็กโทรดคาร์บอน, คาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ และคาร์บอนเคลือบทอง

ผลการทดลองของอิเล็กโทรดคาร์บอนแสดงดังรูปที่ 4.17 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์สูงขึ้นการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.18 จะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์กับกระแสไฟฟ้า จะมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.0524 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.8812 กล่าวคือการเคลือบชั้นนาฟิออนจะทำให้การตอบสนองลดลงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองอิเล็กโทรดคาร์บอน ที่ไม่ได้เคลือบนาฟิออน

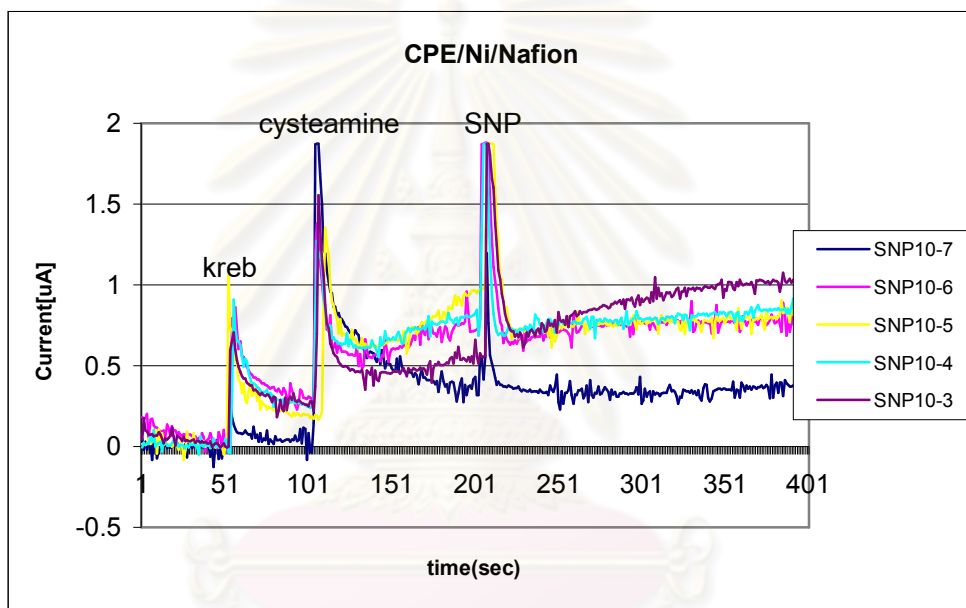


รูปที่ 4.17 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟิออนต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์



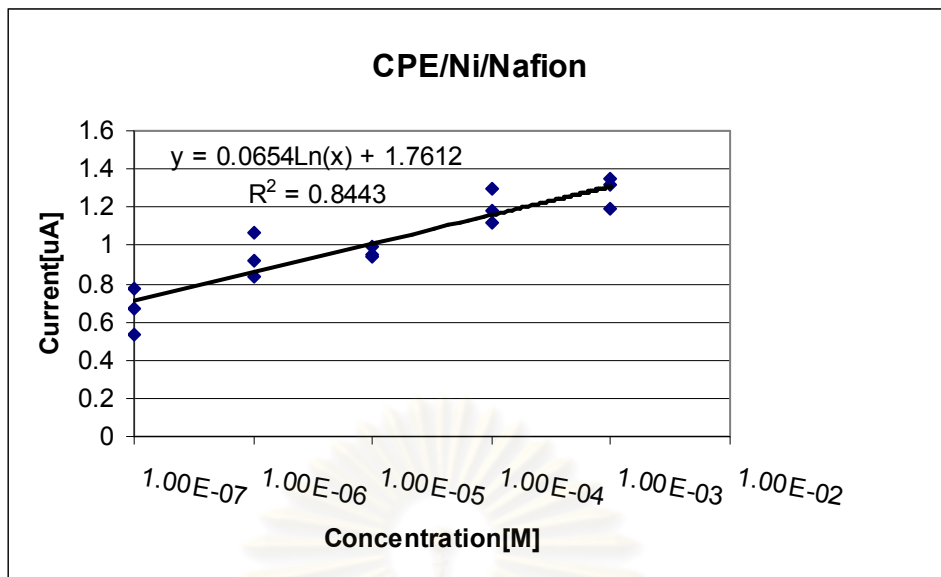
รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟิออน

ผลการทดลองกรณีอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน แสดงดังรูปที่ 4.19 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์สูงขึ้นการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้แสดงไว้กราฟรูปที่ 4.20 จะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์กับกระแสไฟฟ้าจะมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.0654 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดค และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.8443 กล่าวคือการเคลือบชั้นนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออนทั้ง 2 ชนิดจะให้ผลการตอบสนองที่ใกล้เคียงกับอิเล็กโทรดคาร์บอนที่ไม่มีการเคลือบชั้นใดๆ หรืออีกนัยหนึ่งการเพิ่มความไวในการวัดโดยชั้นนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์นั้นถูกกลดทอนให้ต่ำลงโดยชั้นนาฟิออน



รูปที่ 4.19 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออนต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์

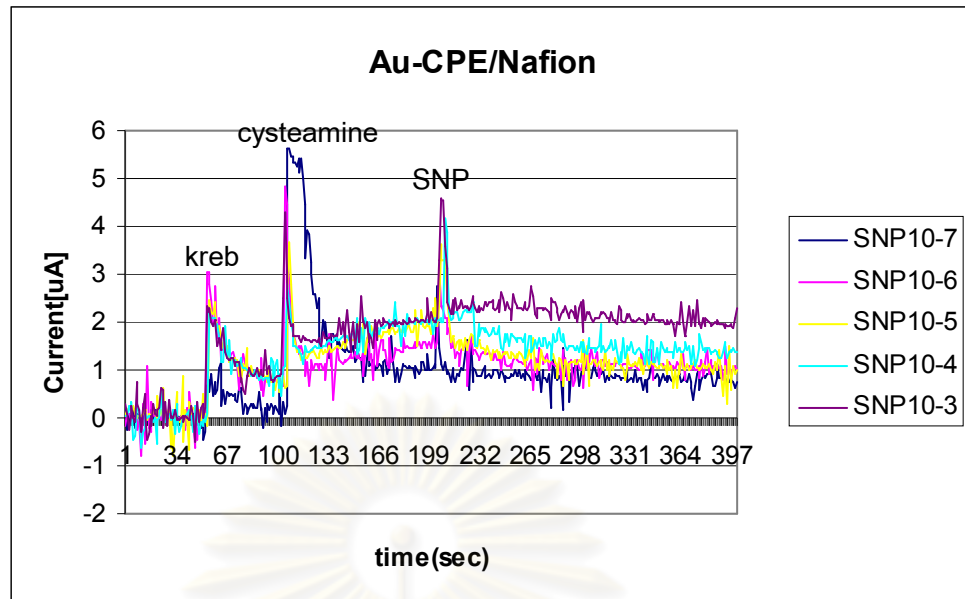
ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



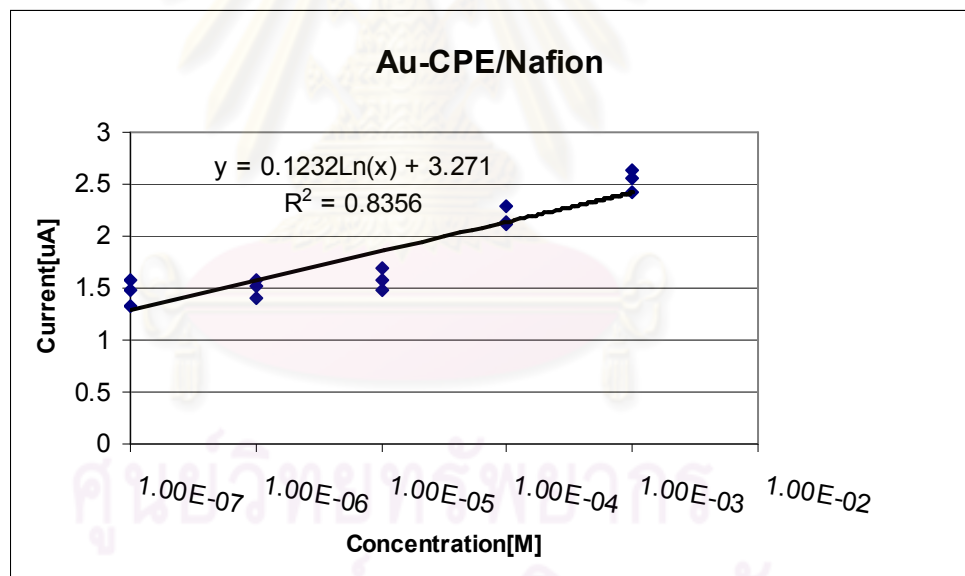
รูปที่ 4.20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไนด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยานด์และนาฟิออน

ผลการทดลองกรณีอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและนาฟิออนที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.21 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไนด์สูงขึ้นการตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.22 จะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนโตรพรีซไนด์กับกระแสไฟฟ้า มีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.1232 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดค และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.8356 แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเคลือบนาฟิออนจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าลดลงประมาณ 6 เท่า เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลระหว่างผลการทดลองอิเล็กโทรดเคลือบทองที่ไม่ได้เคลือบนาฟิออน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนาฟิออนต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์

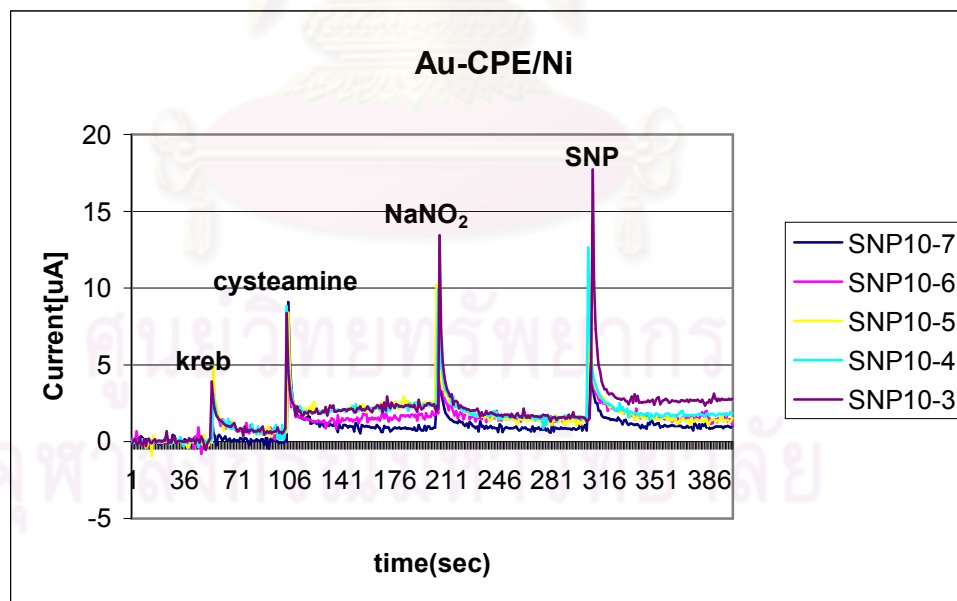


รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนาฟิออน

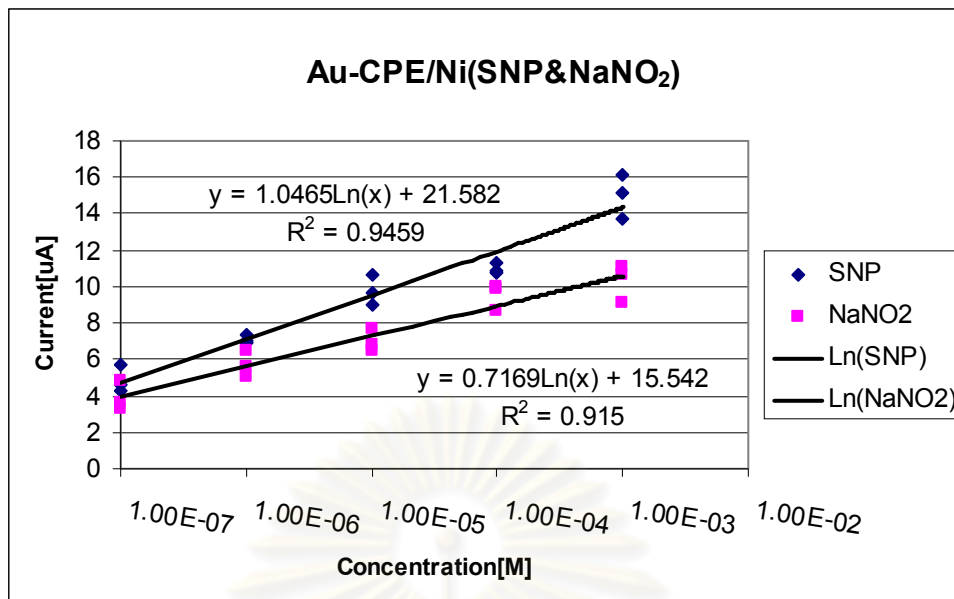
4.1.3 การทดสอบความจำเพาะของอิเล็กโทรดโดยใช้สารละลายไซเดียมไนไตรท์

การทดสอบความจำเพาะของอิเล็กโทรดทำโดยการวัดการตอบสนองต่อสารละลายไซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์และสารละลายไซเดียมไนไตรพรีซิด์ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ อิเล็กโทรดที่ใช้ทดสอบ คือ อิเล็กโทรดเคลือบทองที่มีชั้นนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ และเคลือบทองที่มีชั้นนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน

จากผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.23 พบว่าการทดสอบกับอิเล็กโทรดเคลือบทองที่มีชั้นนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์นั้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนไตรพรีซิด์และไซเดียมไนไตรท์สูงขึ้น การตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ และนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนไตรพรีซิด์และไซเดียมไนไตรท์กับค่ากระแสไฟฟ้า จะได้ผลดังรูปที่ 4.24 จากรูปจะพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนไตรพรีซิด์กับกระแสไฟฟ้า มีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 1.0465 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.9459 และค่าความไวในการตอบสนองของกราฟสารละลายไซเดียมไนไตรท์มีค่า เท่ากับ 0.7169 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.915 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดเคลือบทองที่มีชั้นนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์จะมีการตอบสนองต่อไซเดียมไนไตรพรีซิด์ (หรืออีกนัยหนึ่งก็คือไนตริกออกไซด์) ได้สูงกว่าไซเดียมไนไตรท์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์



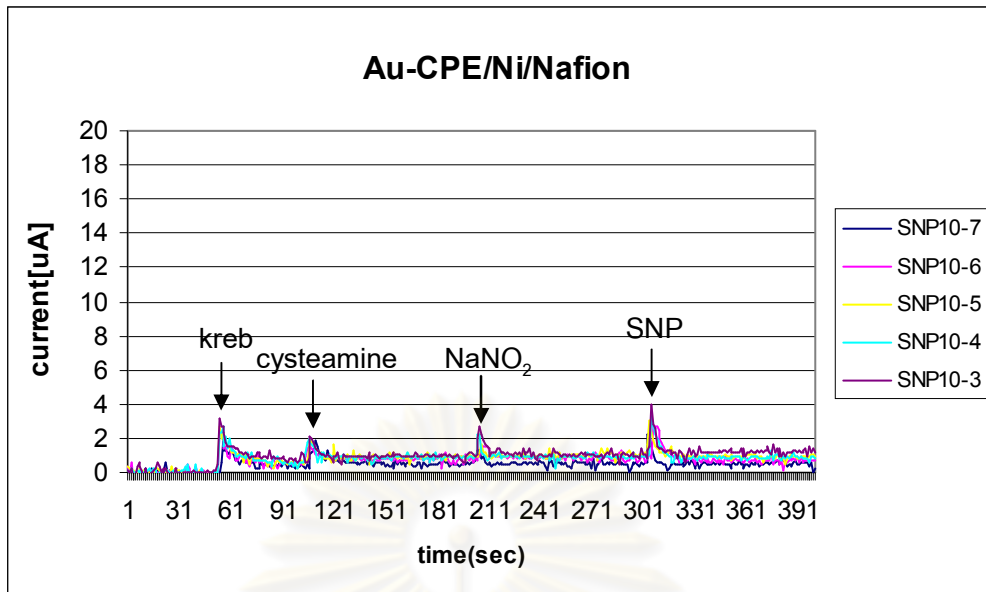
รูปที่ 4.23 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ต่อสารละลายไซเดียมไนไตรพรีซิด์



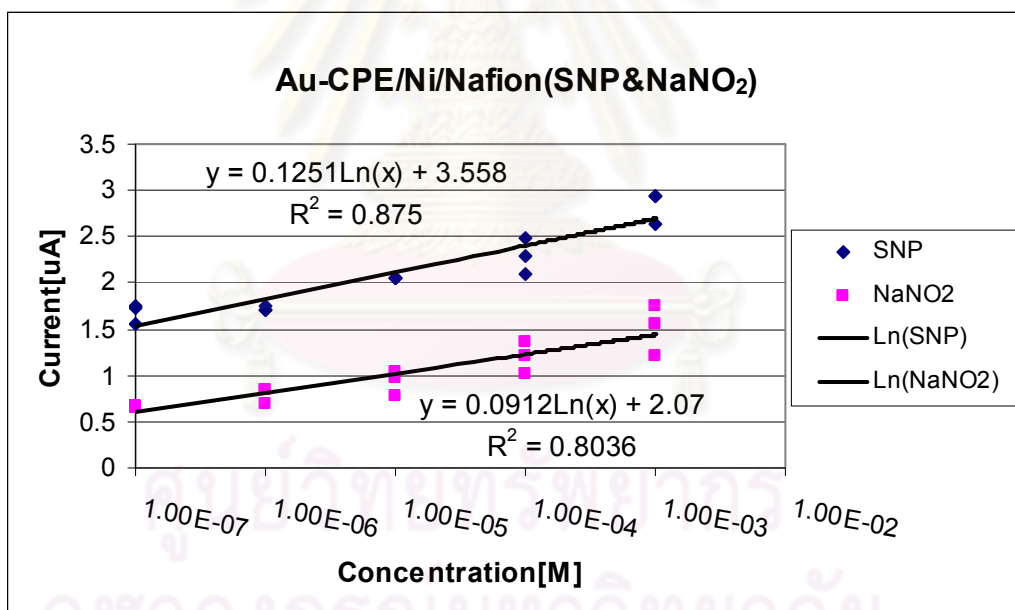
รูปที่ 4.24 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและเคลือบนิเกิลฟทาไลโซยานด์

รูปที่ 4.25 แสดงผลการทดสอบกับอิเล็กโทรดเคลือบทองที่มีชั้นนิเกิลฟทาไลโซยานด์ และนาฟิออน ต่อสารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์และไซเดียมไนโตรท เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์ และไซเดียมไนโตรทกับค่ากระแสไฟฟ้า จะได้ผลดังรูปที่ 4.26 เมื่อพิจารณาความชันของกราฟ สารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์ จะมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ 0.1251 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.875 ส่วนกรณีของสารละลายไซเดียมไนโตรทพบว่ามีความไวในการตอบสนอง เท่ากับ 0.0912 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเคด และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.8036 หรือกล่าวคือมีการตอบสนองต่อไนโตรทยังคงน้อยกว่า สารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.25 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ และนาฟิออนต่อสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์



รูปที่ 4.26 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไซเตียมไนโตรพรัซไซด์ของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองเมื่อเพิ่มนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นนาฟิออนนั้นจะสามารถลดการรบกวนการตอบสนองต่อโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ลดลงได้ประมาณ 8 เท่าตัว อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นนาฟิออนนี้จะทำให้การตอบสนองต่อโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ลดลงประมาณ 8 เท่า เช่นกัน กล่าวคือนาฟิออนสามารถกรองสารรบกวนของโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ได้ แต่ยังไม่แสดงความจำเพาะต่อการวัดไนตริกออกไซด์ได้ตามที่คาดหวังไว้

ตารางที่ 4.3 : ตารางความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอิเล็กโทรดกับค่าความไวในการวัดของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์

ชนิดอิเล็กโทรด	ค่าความไวในการวัดต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2)	เปอร์เซ็นต์(%) การเปลี่ยนแปลงความไวของอิเล็กโทรด
CPE	$Y=0.067\ln(x)+1.8187$	0.9397	100
CPE/Nafion	$Y=0.0524\ln(x)+1.4777$	0.8812	78
CPE/Ni	$Y=0.0756\ln(x)+1.9097$	0.9037	113
CPE/Ni/Nafion	$Y=0.06541\ln(x)+1.7612$	0.8443	98
Au-CPE	$Y=0.7241\ln(x)+15.085$	0.8738	1081
Au-CPE/Nafion	$Y=0.1232\ln(x)+3.271$	0.8356	184
Au-CPE/Ni	$Y=1.0465\ln(x)+21.528$	0.9459	1562
Au-CPE/Ni/Nafion	$Y=0.1251\ln(x)+3.558$	0.875	187

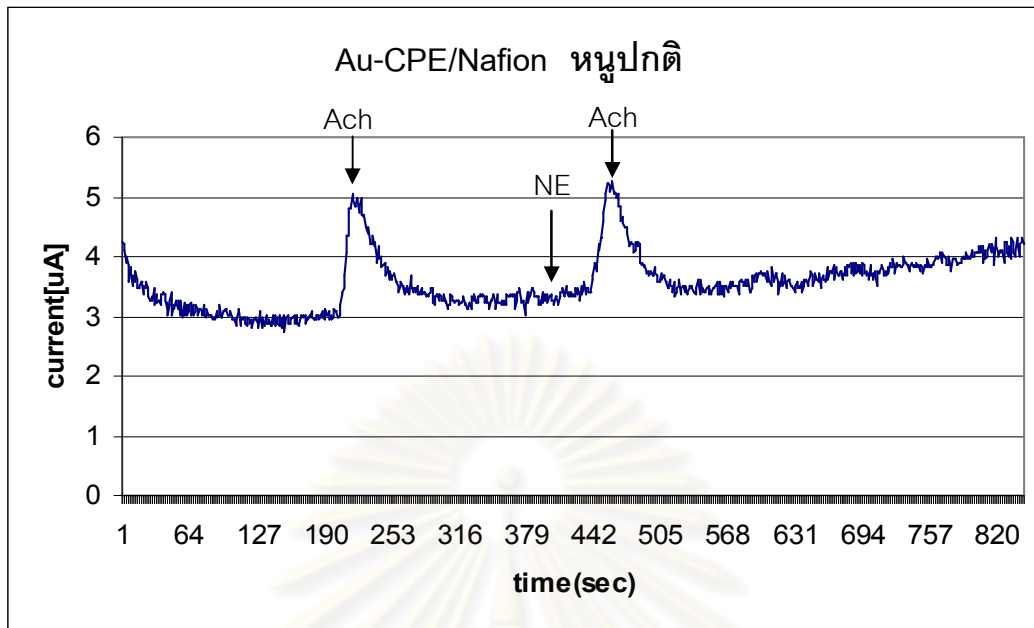
จากตารางเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดอิเล็กโทรดและค่าความไวในการวัดต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์จะเห็นว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนค่าความไวในการวัดน้อยกว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง แสดงว่าการเคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนสามารถช่วยให้ความไวในการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดสูงขึ้นถึงประมาณ 10 เท่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากทองเป็นตัวเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับอิเล็กโทรดโดยการไปปิดช่องว่างของอิเล็กโทรดคาร์บอนดังรูปที่ 4.6 จากนั้นเมื่อนำอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองมาดัดแปลงด้วยนิเกิลฟทาไลโซยานด์เพื่อเพิ่มความไวในการวัดจากตารางจะเห็นว่าความไวในการวัดเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง เมื่อนำมาเคลือบด้วยนาฟิออนเพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับอิเล็กโทรด จากตารางจะเห็นว่าค่าความไวในการวัดลดลงประมาณ 8 เท่า เมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบ

ทองและนิเกิลฟทาโลไซยานด์ แต่ยังคงมีความไวในการวัดที่สูงกว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำอิเล็กโทรดเคลือบทองที่มีชั้นนิเกิลฟทาโลไซยานด์และนาฟิออนมาทดสอบกับสารรบกวน คือ สารละลายโซเดียมไนไตรท์ พบว่าอิเล็กโทรดมีการตอบสนองต่อไนไตรท์ต่ำกว่า การตอบสนองต่อสารละลายโซเดียมไนไตรท์ หรือกล่าวคืออิเล็กโทรดมีความจำเพาะต่อไนไตรท์ออกไซด์สูงกว่าไนไตรท์หรืออาจกล่าวได้ว่านาฟิออนมีการตอบสนองต่อสารรบกวนต่ำกว่า การตอบสนองต่อโซเดียมไนไตรท์ หรืออีกนัยหนึ่งก็คือมีความจำเพาะต่อไนไตรท์ออกไซด์สูงกว่า

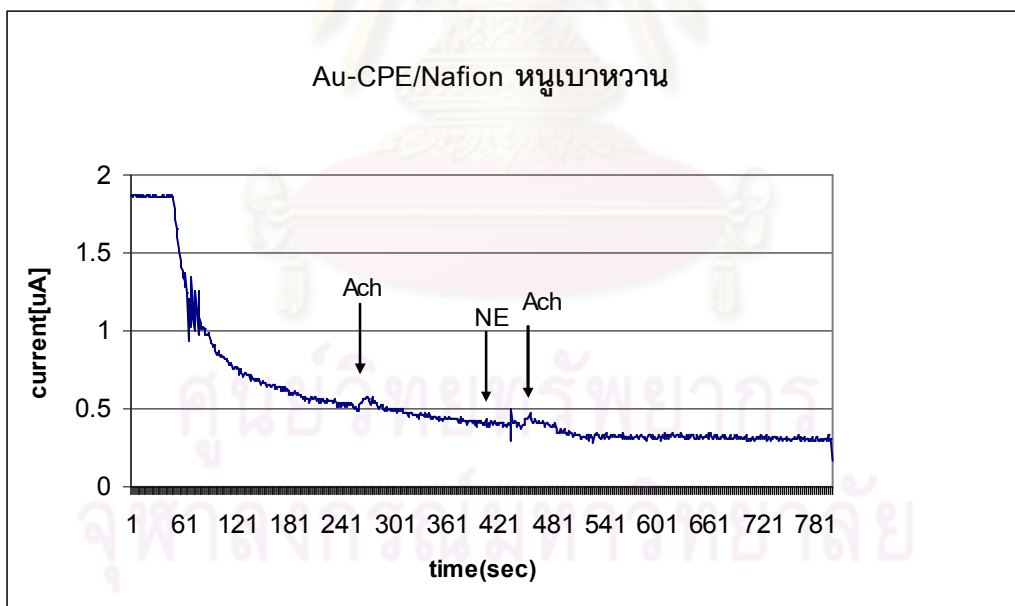
ดังนั้นจึงตัดสินใจใช้นาฟิออนในการทดสอบส่วนประกอบต่างๆ อิเล็กโทรดทั้ง 4 ชนิด ในการทดลองขั้นตอนที่ 4.2 ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับอิเล็กโทรดต่อไนไตรท์ออกไซด์

4.2 การทดลองอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ในสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้นในการวัดไนไตรท์ออกไซด์ในหนูปกติ และหนูเบาหวาน อิเล็กโทรดที่ใช้ทดสอบมี 4 ชนิด ได้แก่ อิเล็กโทรดคาร์บอน, คาร์บอนเคลือบทอง, คาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยานด์, คาร์บอนเคลือบทองและนิเกิลฟทาโลไซยานด์ ทั้ง 4 ชนิดเคลือบด้วยนาฟิออน เพื่อลดสารรบกวนในระบบหลอดเลือดที่จะวัด รูปที่ 4.27 และ 4.28 แสดงตัวอย่างการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อแอสซิติลโคลีนก่อนและหลังหยดนอร์เอพิเนฟรินในหนูปกติและในหนูที่เป็นเบาหวาน ในทางทฤษฎีการหยดแอสซิติลโคลีนจะทำให้เซลล์เอนโดทีเลียมมีการตอบสนองโดยการหลั่งไนไตรท์ออกไซด์ออกมาที่หลอดเลือดโดยอาศัยเอนไซม์ไนไตรท์ออกไซด์ซินเทส จากรูปที่ 4.27 จะเห็นได้ว่าการหยดแอสซิติลโคลีนเพียงอย่างเดียวจะเกิดการตอบสนองซึ่งมีค่าประมาณ 1.91 ไมโครแอมแปร์ แต่เมื่อยดนอร์เอพิเนฟรินจะไม่เกิดการตอบสนอง เนื่องจากเมื่อยดนอร์เอพิเนฟรินหลอดเลือดจะเกิดการหดตัวซึ่งแสดงว่าไม่มีการหลั่งของไนไตรท์ออกไซด์ และเมื่อยดแอสซิติลโคลีนอีกครั้งหลังหยดนอร์เอพิเนฟริน พบว่ามีค่าการตอบสนองประมาณ 1.67 ไมโครแอมแปร์ อาจจะสามารถกล่าวได้ว่านอร์เอพิเนฟรินเป็นตัวกระตุ้นทำให้หลอดเลือดหดตัวและเมื่อยดแอสซิติลโคลีนหลอดเลือดขยายตัวได้อย่างรวดเร็วจึงแสดงถึงความแตกต่างของการหลั่งไนไตรท์ออกไซด์ที่หลอดเลือด และจากรูปที่ 4.28 จะเห็นว่าการหยดแอสซิติลโคลีนเพียงอย่างเดียวจะเกิดการตอบสนองน้อย และเมื่อยดแอสซิติลโคลีนอีกครั้งหลังหยดนอร์เอพิเนฟริน พบว่ามีค่าการตอบสนองที่น้อยเช่นกัน เนื่องจากการทำงานของหลอดเลือดในหนูเบาหวานมีการทำงานที่ผิดปกติจึงทำให้ปริมาณของไนไตรท์ออกไซด์น้อยลง และในบางกรณีเมื่อยดนอร์เอพิเนฟรินในหนูเบาหวาน จะเกิดการตอบสนองที่สูงกว่าการหยดแอสซิติลโคลีน เนื่องจากอาจจะมีกลไกทางเคมีบางอย่างที่ทำให้เกิดการตอบสนองแต่ไม่ทราบแน่ชัดจึงหาข้อสรุปไม่ได้



รูปที่ 4.27 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายแอสติลโคลีนกับนอร์เอพิเนฟรินในหนูปกติ



รูปที่ 4.28 การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองต่อสารละลายแอสติลโคลีนกับนอร์เอพิเนฟรินในหนูปะแหวน

การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงระหว่างการวัดไนตริกออกไซด์ในกรณีหนูปกติ และหนูเบาหวานโดยสารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซินกับอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออน ทำโดยการคำนวณจากค่ากระแสไฟฟ้าหลังจากหยุดแอสซิติลโคลีน โดยนำค่าที่จุดสูงสุดหรือพีคของการตอบสนองลบด้วยค่ากระแสไฟฟ้าพื้นหลัง (base line) จากนั้นนำผลที่ได้มาหารด้วยค่ากระแสไฟฟ้าพื้นหลังคูณ 100 โดยใช้ค่าจากตารางที่ 4.4 นำค่าที่คำนวณได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 : ตารางค่าการตอบสนองต่อแอสซิติลโคลีนของกลุ่มหนูปกติและหนูเบาหวาน เมื่อใช้อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออน

หนูปกติ n(rat) =3, n(test) = 8	I _{Base line} (μ A)	I _{peak} (μ A)	%Change	หนูเบาหวาน n(rat) =3, n(test) = 7	I _{Base line} (μ A)	I _{peak} (μ A)	%Change
1	2.54	3.33	31.1	1	0.78	0.78	0
1	3.52	5.19	47.4	2	0.47	0.47	0
2	0.37	0.37	0	2	0.48	0.48	0
2	0.28	0.44	57.1	2	0.37	0.37	0
2	0.26	0.26	0	3	0.39	0.43	10.3
3	0.36	0.36	0	3	0.21	0.21	0
3	0.23	0.23	0	3	0.25	0.25	0
3	0.25	0.264	5.6				
ค่าเฉลี่ย			17.7	ค่าเฉลี่ย			1.5
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			24.0	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			3.9

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า หนูปกติมีการตอบสนองต่อแอสซิติลโคลีนได้ดีกว่าหนูที่เป็นเบาหวาน เมื่อนำค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงที่คำนวณได้จากการหยุดสารละลายหลังหยุดแอสซิติลโคลีน มาเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงโดยวิธีสารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซินซึ่งวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จะได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 : ตารางความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มหมู่ปกติกับหมู่เบาหวาน เปรอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของไนตริกออกไซด์โดยใช้สารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซีน และอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออนต่อการหดยดสารละลายแอสิติลโคลีน

การทดลองที่ใช้ในการวัดไนตริกออกไซด์(%)	การเปลี่ยนแปลงไนตริกออกไซด์หลังการกระตุ้นด้วยแอสิติลโคลีน ($10^{-5}M$)		
	หมู่ปกติ	หมู่เบาหวาน	สัดส่วนหมู่ปกติ/หมู่เบาหวาน
**DAF	157.01±30.82 (n=5)	55.00±10.39 (n=5)	3:1
Au-CPE/Nafion	17.7±24 (n=3)	1.5±3.9 (n=3)	12:1

**ข้อมูลผลการทดลองงานวิจัยของ Sridulyakul P., et al. [22]

จากตารางจะเห็นได้ว่า การวัดไนตริกออกไซด์ด้วยวิธีไดอะมิโนฟลูออเรสซีน (DAF) ในหมู่ปกติจะให้ผลตอบสนองมากกว่าหมู่เบาหวานโดยคิดเป็นสัดส่วนเท่ากับ 3 ต่อ 1 ส่วนการวัดด้วยอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองในหมู่ปกติจะให้ผลตอบสนองมากกว่าในหมู่เบาหวานโดยคิดเป็นสัดส่วนเท่ากับ 12 ต่อ 1 ซึ่งทำให้สรุปได้ว่า การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยใช้อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างหมู่ปกติกับหมู่เบาหวานได้เช่นเดียวกับวิธีไดอะมิโนฟลูออเรสซีนในระดับหนึ่ง

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 : ตารางแสดงผลการทดลองในสัตว์ทดลอง (หนูปกติและหนูเบาหวาน) โดยใช้ อิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้นทั้ง 4 ชนิด ปริมาณไนตริกออกไซด์จะถูกบันทึกหลังการหยดแอสิติลโคลีน (ความเข้มข้น 10^{-5} M) 5 นาที

กลุ่มหนูทดลอง	ชนิดอิเล็กโทรด	จำนวนหนูที่ใช้	จำนวนหนูทดลองที่สามารถบันทึกค่าปริมาณไนตริกออกไซด์หลังการหยดแอสิติลโคลีน (10^{-5} M)
หนูปกติ	CPE/Nafion	3	2
หนูปกติ	CPE/Ni/Nafion	3	1
หนูปกติ	Au-CPE/Nafion	3	3
หนูปกติ	Au-CPE/Ni/Nafion	2	2
หนูเบาหวาน	CPE/Nafion	1	-
หนูเบาหวาน	CPE/Ni/Nafion	2	-
หนูเบาหวาน	Au-CPE/Nafion	3	2
หนูเบาหวาน	Au-CPE/Ni/Nafion	3	2

จากผลการทดลองในหัวข้อนี้แสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออนอย่างเดียว และมีนิเกิลฟทาไลโซยานาइटและนาฟิออน สามารถวัดไนตริกออกไซด์ในหนูปกติได้ทุกตัว ส่วนหนูเบาหวานซึ่งสามารถผลิตไนตริกออกไซด์ได้น้อยกว่าหนูปกติแม้ว่าจะได้รับการกระตุ้นด้วยแอสิติลโคลีน จึงต้องใช้อิเล็กโทรดที่มีความไว คือ สามารถวัดไนตริกออกไซด์แม้ในปริมาณน้อยๆ ได้แก่ อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง (Au-CPE/Nafion) ส่วนจำนวนหนูเบาหวานที่ไม่ตอบสนองนั้น น่าจะมีสาเหตุเกิดจากอิเล็กโทรดไม่ไวพอจะวัดไนตริกออกไซด์ในปริมาณน้อยๆ

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

วิทยานิพนธ์นี้ได้นำเสนอการประดิษฐ์อิเล็กโทรด สำหรับตรวจวัดไนตริกออกไซด์ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อนำไปตรวจสอบการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมที่หลอดเลือด โดยวิทยานิพนธ์นี้ทำการประดิษฐ์อิเล็กโทรดแล้วทำการทดสอบแบบระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) และแบบในสิ่งมีชีวิต (in vivo) ซึ่งในการทดสอบอิเล็กโทรดเพื่อตรวจวัดไนตริกออกไซด์ในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) ได้ใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรพรัซไซด์เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไนตริกออกไซด์ และสำหรับการทดสอบในสัตว์ทดลอง (in vivo) ใช้สารละลายแอสซิดิลโคลีนเพื่อกระตุ้นเซลล์เอนโดทีเลียมให้หลั่งไนตริกออกไซด์ จากการดำเนินงานสามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1.1. ทำการประดิษฐ์อิเล็กโทรดคาร์บอน โดยวิธีพิมพ์สกรีน และอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง รวมถึงการดัดแปลงพื้นผิวอิเล็กโทรด ด้วยการเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ เพื่อเพิ่มความไวในการวัดและการเคลือบนาฟออน เพื่อเพิ่มความจำเพาะ แล้วนำมาทดสอบการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 8 ชนิด คือ อิเล็กโทรดคาร์บอน, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟออน, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟออน, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและนาฟออน, อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟออน

5.1.2. การตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าสามารถวัดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในช่วงความเข้มข้น 5 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความเป็นเชิงเส้นที่ดีเมื่อทำการวัดในช่วงเวลา 20-80 วินาที และได้ค่าเวลาวัดที่เหมาะสมที่ 40 วินาที ได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ 0.94 และเมื่อเคลือบทองบนผิวอิเล็กโทรดคาร์บอนพบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเคลือบ คือที่ -4.2 โวลต์

5.1.3. สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนและอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทอง สามารถวัดไนตริกออกไซด์จากการหยดสารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ในช่วงความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมลาร์ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มสารละลายซิสทีน จะทำให้สามารถตอบสนองต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ได้สัญญาณดีขึ้น ส่งผลให้การ

ทดสอบด้วยอิเล็กโทรดคาร์บอนและคาร์บอนเคลือบทอง ได้ค่าความไวในการวัด เท่ากับ 0.067 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดค และ 0.7241 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดคตามลำดับ

5.1.4. สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าเมื่อตัดแปลงผิวหน้าอิเล็กโทรดคาร์บอนและคาร์บอนเคลือบทองด้วยนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน และนำอิเล็กโทรดมาทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ที่เพิ่มสารละลายซีสที่มันในช่วงความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ ถึง 10^{-3} โมลาร์ อิเล็กโทรดชนิดคาร์บอนเคลือบทองและนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์ มีการตอบสนองต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ได้ดีที่สุด ได้ค่าความไวในการวัด เท่ากับ 1.0465 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดค และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.94

5.1.5. สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออนเมื่อทดสอบกับสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ ได้ค่าความไวในการวัด เท่ากับ 0.1251 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดค และโซเดียมไนไตรท์ ได้ค่าความไวในการวัด เท่ากับ 0.0912 ไมโครแอมแปร์ต่อเดคเดค และพบว่าโซเดียมไนไตรท์มีการตอบสนองน้อยกว่าสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ประมาณร้อยละ 30 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่านาฟิออนสามารถกรองสัญญาณรบกวนจากสารรบกวนเช่นโซเดียมไนไตรท์ได้ แต่พบว่าในการทดลองครั้งนี้การเคลือบนาฟิออนทำให้การตอบสนองของสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ลดลง เมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์แต่ไม่มีนาฟิออน

5.1.6. สำหรับการทดสอบในสัตว์ทดลอง ใช้อิเล็กโทรด 4 ชนิด ได้แก่ อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟิออน อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองและนาฟิออน และอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออน ซึ่งผลการทดสอบพบว่า อิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออน เป็นอิเล็กโทรดที่ดีที่สุด ซึ่งสามารถวัดไนตริกออกไซด์ในหนูปกติ และหนูเบาหวานได้ หลังจากการกระตุ้นด้วยแอสซิติลโคลีน 10^{-5} โมลาร์

5.2 ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มความจำเพาะให้กับอิเล็กโทรดในการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ จากผลการทดลอง จะพบว่าการเคลือบนาฟิออนจากผลการทดลองสามารถกรองสารรบกวนได้ แต่ทำให้กระแสไฟฟ้าของการวัดสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ลดลงด้วย ดังนั้นควรหาวิธีหรือปรับปรุงการเคลือบใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพความจำเพาะให้กับอิเล็กโทรดในการวัดไนตริกออกไซด์ได้สูงสุด

รายการอ้างอิง

- [1] รัปพร กิตติวัชร.เลือดและระบบน้ำเหลือง. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,15-16
- [2] J.Oni,N.Diab,I.Radtke and W.Schuhmann.2003. Detection of NO release from endothelial cells using Pt micro electrodes modified with a pyrrole-functionalised Mn(II) porphyrin. Electrochimica Acta .48 :3349-3354.
- [3] P.M. Vanhoutte, H.Shimokawa, E.H.C Tang and M.Feletou.2009. Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiologica .196 :193-222.
- [4] ศาสตราจารย์นายแพทย์ ศุภชัย ไชยธีระพันธ์ และศาสตราจารย์นายแพทย์ สมชาย เขี่ยมอ่อง .2540. ENDOTHELIUM กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 25-31
- [5] Zheng,G.Ning and Y.Yang.2006. Study on the technology of nitric oxide (NO) detection in vitro and in vivo. Clinical Hemorheology and Microcirculation .34 :347-352.
- [6] F.Lantoine, S.Trevin, F.Bedioui and J.Devynck.1995.Selective and sensitive electrochemical measurement of nitric oxide in aqueous solution: discussion and new results. Electroanalytical Chemistry .392 :85-89.
- [7] M.Pontie,H.Lecture and F.Bedioui.1999.Improvement in the performance of a nickel complex-based electrochemical sensor for the detection of nitric oxide in solution. Sensor and Actuators B .56 :1-5.
- [8] N.Pereira-Rodrigues, V.Albin, M.Koudelka-Hep, V.Auger, A.Pailleret and F.Bedioui.2002. Nickel tetrasulfonated phthalocyanine based platinum microelectrode array for nitric oxide oxidation.Electrochemistry Communications .4 :922-927.
- [9] J.Katrlík and P.Zalesakova.2002. Nitric oxide determination by amperometric carbon fiber microelectrode. Bioelectrochemistry .56 :73-76.

- [10] N.R. Ferreira, A.Ledo, J.G.Frade, G.A.Gerhardt, J.Laranjinha and R.M.Barbosa.2005. Electrochemical measurement of endogenously produced nitric oxide in brain slices using Nafion/o-phenylenediamine modified carbon fiber microelectrodes. Analytica Chimica Acta .535 :1-7.
- [11] S.Miserere, S.Ledru, N.Ruille, S.Griveau, M.Boujtita and F.Bedioui.2006. Biocompatible carbon-based screen-printed electrodes for the electrochemical detection of nitric oxide. Electrochemistry Communications .8 :238-244.
- [12] L.Agui, J.Manso, P.Yanez-Sedeno and J.M.Pingarron.2006. Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes. Sensor and Actuators .113 :272-280.
- [13] O.D.Renedo and M.J.Arcos.2007. Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. Analytica Chimica Acta .589 :255-260.
- [14] คณาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล.2548. สรีรวิทยา 2. กรุงเทพฯ:มหาวิทยาลัยมหิดล, 423-425
- [15] Rudra.The Endothelium. Available from :<http://hubpages.com/hub/endothelium> [2/Mar/2010]
- [16] มานะ ศรียุทธศักดิ์. 2536. ตัวตรวจวัดชีวภาพ: ไบโอะเซนเซอร์. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 46-47
- [17] M.N. Velasco-Garcia and T. Mottram. 2003. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. Biosystems Engineering .84,1 :1-12.
- [18] D.A.Skoog, F.J.Holler and T.A.Nieman.1998. Principles of Instrumental analysis.United States of America : SAUNDERS COLLEGE, 654-655
- [19] S.Zhu, L.Fan, X.Liu, L.Shi, H.Li, S.Han, and G.Xu.2008. Determination of concentrated hydrogen peroxide at single-walled carbon nanohorn paste electrode. Electrochemistry Communications .10 :656-698.

- [20] M.N. Friedemann, S.W. Robinson and G.A. Gerhardt. 1996. o-Phenylenediamine-Modified Carbon Fiber Electrodes for the Detection of Nitric Oxide. Anal Chem .68 :2621-2628.
- [21] F.Bedioui, S.Trevin, J.Devynck, F.Lantoine, A.Brunet and M.Devynck. 1997. Elaboration and use of nickel planar macrocyclic complex-based sensors for the direct electrochemical measurement of nitric oxide in biological media. Biosensors & Bioelectronic.12 :205-212.
- [22] P. Sridulyakul, N. Wongeak-in and S. Patumraj .2008. Increased nitric oxide level in diabetic rats by vitamin C supplementation: an *in vivo* detection using Diaminofluorescein. Asian Biomedicine .2,5 :371-379.
- [23] H.Al-sa'doni and A.Ferro .2000.S-Nitrosothiol : a class of nitric oxide-donor drugs Clinical Science.98 :507-520.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์เครบส์ริงเจอร์ (Krebs-Ringer Buffer Solution)

เตรียมปริมาตรที่ 500 มิลลิลิตร

1. NaCl	3.95	กรัม
2. KCl	0.175	กรัม
3. CaCl ₂ .H ₂ O	0.185	กรัม
4. NaHCO ₃	0.3	กรัม
5. KH ₂ PO ₄	0.08	กรัม
6. MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	กรัม

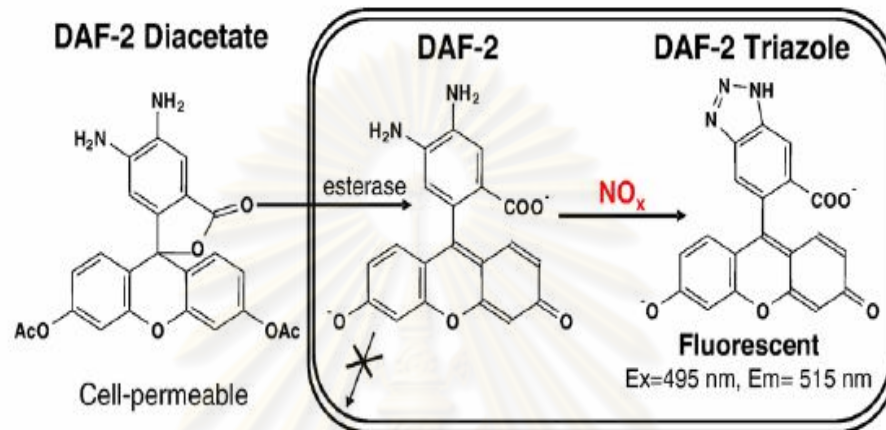
ใช้ DI Water ปรับปริมาตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

หลักการทำงานของสารเรืองแสงไดอะมิโนฟลูออเรสซิน
(DAFs: Diaminofluorescein)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางผลการทดสอบหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของการเคลือบทองต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในความเข้มข้น 0.33 เปอร์เซ็นต์

Potential(V)	Sensor	H ₂ O ₂ Detection (uA)			Mean(uA)	SD(uA)	CV(%)
		1	2	3			
0	1	1.106	0.812	0.426	0.781333	0.341036	43.64791
	2	0.607	0.431	0.377	0.471667	0.120272	25.49935
	3	0.626	0.523	0.406	0.518333	0.110074	21.23618
-1	1	0.289	0.245	0.225	0.253	0.032741	12.94127
	2	0.44	0.25	0.191	0.293667	0.130117	44.30759
	3	0.479	0.386	0.289	0.384667	0.095007	24.69853
-2	1	1.712	1.145	0.866	1.241	0.431093	34.73753
	2	0.93	0.7	0.49	0.706667	0.220076	31.14279
	3	1.179	0.724	0.621	0.841333	0.296928	35.29257
-2.5	1	2.89	2.4	1.91	2.4	0.49	20.41667
	2	1.96	1.42	1.37	1.583333	0.327159	20.6627
	3	2.35	1.86	1.57	1.926667	0.39425	20.46282
-3.4	1	1.27	2.54	2.3	2.036667	0.67471	33.12814
	2	2.89	2.74	2.25	2.626667	0.334714	12.74291
	3	2.98	2.89	2.59	2.82	0.204206	7.24134
-4.2	1	3.08	3.08	2.69	2.95	0.225167	7.632766
	2	5.28	4.21	3.42	4.303333	0.933506	21.69262
	3	3.86	3.62	3.33	3.603333	0.265393	7.365202
-5	1	2.2	2.2	1.7	2.033333	0.288675	14.19714
	2	0.24	0.49	0.49	0.406667	0.144338	35.49284
	3	0.73	0.68	0.49	0.633333	0.126623	19.99307

ภาคผนวก ง

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^6

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-7} (P)	SNP 10^{-7} (P)-thiol(R)
1	0.411	1.083	0.672
2	0.205	0.949	0.744
3	0.313	1.064	0.751
Mean	0.309667	1.032	0.722333
SD	0.10304	0.072505	0.04373
CV(%)	33.27463	7.025695	6.054024

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-6} (P)	SNP 10^{-6} (P)-thiol(R)
1	0.313	1.189	0.876
2	0.201	1.099	0.898
3	0.181	1.169	0.988
Mean	0.231667	1.152333	0.920667
SD	0.071143	0.047258	0.059341
CV(%)	30.70923	4.101084	6.445419

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-5} (P)	SNP 10^{-5} (P)-thiol(R)
1	0.22	1.319	1.099
2	0.191	1.254	1.063
3	0.215	1.256	1.041
Mean	0.208667	1.276333	1.067667
SD	0.015503	0.036964	0.02928
CV(%)	7.429403	2.896104	2.742453

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻⁴ (P)	SNP10 ⁻⁴ (P)-thiol(R)
1	0.308	1.383	1.075
2	0.23	1.367	1.137
3	0.152	1.374	1.222
Mean	0.23	1.374667	1.144667
SD	0.078	0.008021	0.073799
CV(%)	33.91304	0.583473	6.447229

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻³ (P)	SNP10 ⁻³ (P)-thiol(R)
1	0.186	1.632	1.446
2	0.21	1.565	1.355
3	0.215	1.559	1.344
Mean	0.203667	1.585333	1.381667
SD	0.015503	0.040526	0.055985
CV(%)	7.611794	2.55629	4.051999

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ตารางค่าผลการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนที่มีทองต่อสารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์ใน
ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราขยาย 10^5

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-7} (P)	SNP 10^{-7} (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วย เป็น ไมโครแอมแปร์
1	0.083	0.406	0.323	3.23
2	0.113	0.533	0.42	4.2
3	0.157	0.593	0.436	4.36
Mean	0.117667	0.510667	0.393	3.93
SD	0.03722	0.095479	0.061147	0.61
CV(%)	31.63178	18.69703	15.55913	15.55

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-6} (P)	SNP 10^{-6} (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วย เป็น ไมโครแอมแปร์
1	0.205	0.734	0.529	5.29
2	0.308	0.793	0.485	4.85
3	0.338	0.806	0.468	4.68
Mean	0.283667	0.777667	0.494	4.94
SD	0.069759	0.038371	0.03148	0.31
CV(%)	0.245919	0.049341	0.063725	6.37

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-5} (P)	SNP 10^{-5} (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วย เป็น ไมโครแอมแปร์
1	0.328	1.031	0.703	7.03
2	0.382	1.052	0.67	6.7
3	0.406	1.009	0.603	6.03
Mean	0.372	1.030667	0.658667	6.58
SD	0.03995	0.021502	0.050954	0.50
CV(%)	10.73924	2.086216	7.735966	7.73

ภาคผนวก จ (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻⁴ (P)	SNP10 ⁻⁴ (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วย เป็น ไมโครแอมแปร์
1	0.411	1.182	0.771	7.71
2	0.406	1.096	0.69	6.9
3	0.411	1.078	0.667	6.67
Mean	0.409333	1.118667	0.709333	7.09
SD	0.002887	0.055582	0.054629	0.54
CV(%)	0.705232	4.968573	7.701464	7.701

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻³ (P)	SNP10 ⁻³ (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วย เป็น ไมโครแอมแปร์
1	0.416	1.522	1.106	11.06
2	0.489	1.637	1.148	11.48
3	0.412	1.515	1.103	11.03
Mean	0.439	1.558	1.119	11.19
SD	0.043347	0.068505	0.025159	0.25
CV(%)	9.874131	4.397014	2.248391	2.24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาไลโซยานาไนต์ต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^6

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-7} (P)	SNP 10^{-7} (P)-thiol(R)
1	0.338	1.083	0.745
2	0.279	1.044	0.765
3	0.372	1.054	0.682
Mean	0.329667	1.060333	0.730667
SD	0.047057	0.020257	0.043317
CV(%)	14.27403	1.910407	5.928375

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-6} (P)	SNP 10^{-6} (P)-thiol(R)
1	0.396	1.234	0.838
2	0.362	1.275	0.913
3	0.426	1.207	0.781
Mean	0.394667	1.238667	0.844
SD	0.032021	0.034239	0.066204
CV(%)	8.113385	2.76421	7.844103

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-5} (P)	SNP 10^{-5} (P)-thiol(R)
1	0.401	1.524	1.123
2	0.479	1.483	1.004
3	0.445	1.403	0.958
Mean	0.441667	1.47	1.028333
SD	0.039107	0.061539	0.085149
CV(%)	8.854345	4.1863	8.280281

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻⁴ (P)	SNP10 ⁻⁴ (P)- thiol(R)
1	0.548	1.699	1.151
2	0.519	1.674	1.155
3	0.568	1.681	1.113
Mean	0.545	1.684667	1.139667
SD	0.020116	0.01053	0.018927
CV(%)	3.691069	0.625072	1.660728

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻³ (P)	SNP10 ⁻³ (P)- thiol(R)
1	0.558	1.874	1.316
2	0.303	1.874	1.571
3	0.406	1.879	1.473
Mean	0.422333	1.875667	1.453333
SD	0.128282	0.002887	0.128633
CV(%)	30.37464	0.153905	8.850864

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนาฟิออนต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^6

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-7} (P)	SNP 10^{-7} (P)-thiol(R)
1	0.391	1.008	0.617
2	0.386	1.086	0.7
3	0.333	1.023	0.69
Mean	0.37	1.039	0.669
SD	0.03214	0.041388	0.04531
CV(%)	8.686572	3.983485	6.772802

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-6} (P)	SNP 10^{-6} (P)-thiol(R)
1	0.289	1.057	0.768
2	0.298	1.071	0.773
3	0.347	1.106	0.759
Mean	0.311333	1.078	0.766667
SD	0.031214	0.025239	0.007095
CV(%)	10.02601	2.341267	0.925382

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-5} (P)	SNP 10^{-5} (P)-thiol(R)
1	0.318	1.111	0.793
2	0.294	1.057	0.763
3	0.298	1.076	0.778
Mean	0.303333	1.081333	0.778
SD	0.012858	0.027392	0.015
CV(%)	4.238967	2.533189	1.928021

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻⁴ (P)	SNP10 ⁻⁴ (P)- thiol(R)
1	0.274	1.277	1.003
2	0.298	1.296	0.998
3	0.279	1.287	1.008
Mean	0.283667	1.286667	1.003
SD	0.012662	0.009504	0.005
CV(%)	4.463788	0.738683	0.498504

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻³ (P)	SNP10 ⁻³ (P)- thiol(R)
1	0.269	1.477	1.208
2	0.372	1.58	1.208
3	0.455	1.502	1.047
Mean	0.365333	1.519667	1.154333
SD	0.093179	0.053725	0.092953
CV(%)	25.50521	3.535289	8.052561

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบนิเกิลฟทาไลโซยานาไนด์และนาฟิออนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^6

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-7} (P)	SNP 10^{-7} (P)-thiol(R)
1	0.66	1.195	0.535
2	0.318	1.096	0.778
3	0.308	0.978	0.67
Mean	0.428667	1.089666667	0.661
SD	0.200403	0.108638544	0.12175
CV(%)	46.75029	9.969887833	18.41902

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-6} (P)	SNP 10^{-6} (P)-thiol(R)
1	0.958	1.879	0.921
2	1.14	1.879	0.739
3	1.047	1.879	0.832
Mean	1.048333	1.879	0.830667
SD	0.091007	2.71948E-16	0.091007
CV(%)	8.681144	1.4473E-14	10.95594

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-5} (P)	SNP 10^{-5} (P)-thiol(R)
1	0.934	1.874	0.94
2	0.93	1.879	0.949
3	0.881	1.874	0.993
Mean	0.915	1.875666667	0.960667
SD	0.029513	0.002886751	0.028361
CV(%)	3.225433	0.15390535	2.952197

ภาคผนวก ซ (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻⁴ (P)	SNP10 ⁻⁴ (P)- thiol(R)
1	0.758	1.874	1.116
2	0.695	1.874	1.179
3	0.582	1.874	1.292
Mean	0.678333	1.874	1.195667
SD	0.089176	2.71948E-16	0.089176
CV(%)	13.14632	1.45116E-14	7.458254

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻³ (P)	SNP10 ⁻³ (P)- thiol(R)
1	0.528	1.874	1.346
2	0.685	1.879	1.194
3	0.563	1.879	1.316
Mean	0.592	1.877333333	1.285333
SD	0.08242	0.002886751	0.080507
CV(%)	13.92224	0.153768715	6.26349

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฅ

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนาฟิออนต่อสารละลายไซเดียมไนโตรพรัซไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^5

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-7} (P)	SNP 10^{-7} (P)-thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.117	0.275	0.158	1.58
2	0.117	0.265	0.148	1.48
3	0.127	0.259	0.132	1.32
Mean	0.120333	0.266333	0.146	1.46
SD	0.005774	0.008083	0.013115	0.13
CV(%)	4.797925	3.034883	8.982792	8.90

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-6} (P)	SNP 10^{-6} (P)-thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.157	0.314	0.157	1.57
2	0.161	0.302	0.141	1.41
3	0.191	0.343	0.152	1.52
Mean	0.169667	0.319667	0.15	1.5
SD	0.018583	0.021079	0.008185	0.08
CV(%)	10.95274	6.594124	5.456902	5.33

Repeatability	thiol(R)	SNP 10^{-5} (P)	SNP 10^{-5} (P)-thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.191	0.361	0.17	1.7
2	0.196	0.353	0.157	1.57
3	0.205	0.354	0.149	1.49
Mean	0.197333	0.356	0.158667	1.58
SD	0.007095	0.004359	0.010599	0.10
CV(%)	3.595236	1.22441	6.679879	6.32

ภาคผนวก ฅ (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻⁴ (P)	SNP10 ⁻⁴ (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยน หน่วยเป็น ไมโครแอม แปร์
1	0.201	0.415	0.214	2.14
2	0.196	0.424	0.228	2.28
3	0.21	0.421	0.211	2.11
Mean	0.202333	0.42	0.217667	2.17
SD	0.007095	0.004583	0.009074	0.09
CV(%)	3.506392	1.091089	4.168655	4.14

Repeatability	thiol(R)	SNP10 ⁻³ (P)	SNP10 ⁻³ (P)- thiol(R)	*10เปลี่ยน หน่วยเป็น ไมโครแอม แปร์
1	0.205	0.46	0.255	2.55
2	0.161	0.425	0.264	2.64
3	0.186	0.429	0.243	2.43
Mean	0.184	0.438	0.254	2.54
SD	0.022068	0.019157	0.010536	0.10
CV(%)	11.99352	4.3738	4.147895	3.93

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ญ

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาไลโซยานาโนด์ต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล และ โซเดียมไนไตรท์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^5

Repeatability	thiol(R)	NO210-7(P)	NO210-7(R)	NO210-7(P)-thiol(R)	*10เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-7(P)	SNP10-7(P)-NO2(R)	*10เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.083	0.416	0.073	0.333	3.33	0.504	0.431	4.31
2	0.117	0.602	0.103	0.485	4.85	0.561	0.458	4.58
3	0.137	0.504	0.073	0.367	3.67	0.646	0.573	5.73
Mean	0.112333	0.507333	0.083	0.395	3.95	0.570333	0.487333	4.87
SD	0.027301	0.093045	0.017321	0.079775	0.79	0.071459	0.075408	0.75
CV(%)	24.30338	18.33997	20.86808	20.19612	20	12.52927	15.47355	15.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ญ (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	NO210-6(P)	NO210-6(R)	NO210-6(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-6(P)	SNP10-6(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.196	0.84	0.132	0.644	6.44	0.865	0.733	7.33
2	0.25	0.758	0.186	0.508	5.08	0.876	0.69	6.9
3	0.215	0.77	0.24	0.555	5.55	0.946	0.706	7.06
Mean	0.220333	0.789333	0.186	0.569	5.69	0.895667	0.709667	7.09
SD	0.027392	0.044287	0.054	0.069072	0.69	0.043936	0.021733	0.21
CV(%)	12.43217	5.610677	29.03226	12.13927	12.12	4.905347	3.062456	2.96

Repeatability	thiol(R)	NO210-5(P)	NO210-5(R)	NO210-5(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-5(P)	SNP10-5(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.259	1.023	0.127	0.764	7.64	1.028	0.901	9.01
2	0.264	0.949	0.142	0.685	6.85	1.203	1.061	10.6
3	0.259	0.909	0.132	0.65	6.5	1.096	0.964	9.64
Mean	0.260667	0.960333	0.133667	0.699667	6.99	1.109	0.975333	9.75
SD	0.002887	0.057839	0.007638	0.058398	0.58	0.088221	0.0806	0.806
CV(%)	1.107449	6.02279	5.713935	8.346554	8.29	7.955033	8.263824	8.26

ภาคผนวก ญ (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	NO210-4(P)	NO210-4(R)	NO210-4(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-4(P)	SNP10-4(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.245	0.997	0.147	0.752	7.52	1.274	1.127	11.27
2	0.225	1.096	0.147	0.871	8.71	1.233	1.086	10.86
3	0.25	0.987	0.181	0.737	7.37	1.254	1.073	10.73
Mean	0.24	1.026667	0.158333	0.786667	7.86	1.253667	1.095333	10.95
SD	0.013229	0.060252	0.01963	0.073419	0.073	0.020502	0.028184	0.28
CV(%)	5.511982	5.868725	12.39784	9.33291	0.92	1.635366	2.573091	2.55

Repeatability	thiol(R)	NO210-3(P)	NO210-3(R)	NO210-3(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-3(P)	SNP10-3(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.235	1.343	0.161	1.108	11.08	1.771	1.61	16.1
2	0.245	1.156	0.191	0.911	9.11	1.707	1.516	15.16
3	0.264	1.332	0.186	1.068	10.68	1.558	1.372	13.72
Mean	0.248	1.277	0.179333	1.029	10.29	1.678667	1.499333	14.99
SD	0.014731	0.104933	0.016073	0.10413	1.041	0.10929	0.119872	1.198
CV(%)	5.939887	8.217174	8.962501	10.11951	10.11	6.510532	7.99503	7.99

ภาคผนวก ฎ

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดคาร์บอนเคลือบทองที่มีนิเกิลฟทาโลไซยาไนด์และนาฟิออนต่อสารละลายโซเดียมไนโตรพรัซไซด์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล และโซเดียมไนไตรท์ในความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} โมล ที่อัตราการขยาย 10^5

Repeatability	thiol(R)	NO210-7(P)	NO210-7(R)	NO210-7(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-7(P)	SNP10-7(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.064	0.132	0.049	0.068	0.68	0.225	0.176	1.76
2	0.059	0.127	0.059	0.068	0.68	0.215	0.156	1.56
3	0.078	0.142	0.073	0.064	0.64	0.245	0.172	1.72
Mean	0.067	0.133667	0.060333	0.066667	0.66	0.228333	0.168	1.68
SD	0.009849	0.007638	0.012055	0.002309	0.02	0.015275	0.010583	0.10
CV(%)	14.69979	5.713935	19.98137	3.464102	3.03	6.689892	6.299408	5.95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

Repeatability	thiol(R)	NO210-6(P)	NO210-6(R)	NO210-6(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-6(P)	SNP10-6(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
1	0.068	0.152	0.088	0.084	0.84	0.264	0.176	1.76
2	0.078	0.147	0.088	0.069	0.69	0.259	0.171	1.71
3	0.068	0.152	0.083	0.084	0.84	0.254	0.171	1.71
Mean	0.071333	0.150333	0.086333	0.079	0.79	0.259	0.172667	1.72
SD	0.005774	0.002887	0.002887	0.00866	0.08	0.005	0.002887	0.02
CV(%)	8.093695	1.920234	3.343727	10.96235	10.12	1.930502	1.671864	1.162

	thiol(R)	NO210-5(P)	NO210-5(R)	NO210-5(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์	SNP10-5(P)	SNP10-5(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์
	0.083	0.181	0.068	0.098	0.98	0.274	0.206	2.06
	0.088	0.166	0.103	0.078	0.78	0.308	0.205	2.05
	0.093	0.196	0.098	0.103	1.03	0.303	0.205	2.05
Mean	0.088	0.181	0.089667	0.093	0.93	0.295	0.205333	2.05
SD	0.005	0.015	0.01893	0.013229	0.01	0.018358	0.000577	0.005
CV(%)	5.681818	8.287293	21.11118	14.22447	1.075	6.222902	0.281177	0.24

ภาคผนวก ฎ (ต่อ)

	thiol(R)	NO210-4(P)	NO210-4(R)	NO210-4(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์)	SNP10-4(P)	SNP10-4(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์)
	0.093	0.215	0.073	0.122	1.22	0.321	0.248	2.48
	0.103	0.205	0.108	0.102	1.02	0.318	0.21	2.1
	0.083	0.22	0.098	0.137	1.37	0.328	0.23	2.3
Mean	0.093	0.213333	0.093	0.120333	1.20	0.322333	0.229333	2.29
SD	0.01	0.007638	0.018028	0.017559	0.17	0.005132	0.019009	0.19
CV(%)	10.75269	3.580137	19.38468	14.59232	14.16	1.592017	8.288708	8.29

	thiol(R)	NO210-3(P)	NO210-3(R)	NO210-3(P)-thiol(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์)	SNP10-3(P)	SNP10-3(P)-NO2(R)	*10 เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครแอมแปร์)
	0.088	0.264	0.083	0.176	1.76	0.347	0.264	2.64
	0.108	0.264	0.108	0.156	1.56	0.401	0.293	2.93
	0.142	0.263	0.117	0.121	1.21	0.411	0.294	2.94
Mean	0.112667	0.263667	0.102667	0.151	1.51	0.386333	0.283667	2.83
SD	0.027301	0.000577	0.017616	0.027839	0.27	0.034429	0.017039	0.17
CV(%)	24.23147	0.21897	17.15871	18.43631	17.88	8.911649	6.006758	6.00

ภาคผนวก ก

ตารางค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดทั้ง 4 ชนิด ที่วัดไนตริกออกไซด์ในเยื่อบุลำไส้หนูปกติ และ หนูเบาหวาน (ค่ากระแสยอดลบด้วยค่ากระแสพื้นหลัง เมื่อหยุดสารตัวอย่าง)

กลุ่มหนู/ตัวที่	Electrode	Ach (μA)	NE (μA)	Ach (μA)
CON/1	CPE/Nafion	0.05	0	0
CON/1	CPE/Nafion	0	0	0
CON/1	CPE/Nafion	0	0	0
CON/2	CPE/Nafion	0.01	0	0.023
CON/2	CPE/Nafion	0	0.23	0
CON/2	CPE/Nafion	0.01	0.09	0.01
CON/3	CPE/Nafion	0	0	0
CON/3	CPE/Nafion	0	0	0
CON/3	CPE/Nafion	0	0	0
CON/1	CPE/Ni/Nafion	0	0	0
CON/1	CPE/Ni/Nafion	0	0	0
CON/1	CPE/Ni/Nafion	0	0.03	0
CON/2	CPE/Ni/Nafion	0.01	0.08	0.03
CON/2	CPE/Ni/Nafion	0.01	0.08	0.04
CON/2	CPE/Ni/Nafion	0.08	0.09	0.05
CON/3	CPE/Ni/Nafion	0	0.034	0
CON/3	CPE/Ni/Nafion	0	0.053	0
CON/3	CPE/Ni/Nafion	0	0.039	0

ภาคผนวก ฎ (ต่อ)

กลุ่มหนู/ตัวที่	Electrode	Ach (μA)	NE (μA)	Ach (μA)
CON/1	Au-CPE/Nafion	1.46	0	0.79
CON/1	Au-CPE/Nafion	1.91	0	1.67
CON/2	Au-CPE/Nafion	0	0	0
CON/2	Au-CPE/Nafion	0	0	0.16
CON/2	Au-CPE/Nafion	0	0	0
CON/3	Au-CPE/Nafion	0	0	0
CON/3	Au-CPE/Nafion	0	0	0
CON/3	Au-CPE/Nafion	0	0	0.014
CON/1	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0	0
CON/1	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0.054	0
CON/1	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0.108	0.176
CON/2	Au-CPE/Ni/Nafion	0.024	0	0.03
CON/2	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0	0
CON/2	Au-CPE/Ni/Nafion	0.073	0.049	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฎ (ต่อ)

กลุ่มหนู/ตัวที่	Electrode	Ach (μ A)	NE (μ A)	Ach (μ A)
DM/1	CPE/Nafion	0	0	0
DM/1	CPE/Nafion	0	0.02	0
DM/1	CPE/Nafion	0	0.02	0
DM/1	CPE/Ni/Nafion	0	0	0
DM/1	CPE/Ni/Nafion	0	0	0
DM/1	CPE/Ni/Nafion	0	0	0
DM/2	CPE/Ni/Nafion	0	0.132	0
DM/2	CPE/Ni/Nafion	0	0.142	0
DM/2	CPE/Ni/Nafion	0	0.205	0
DM/1	Au-CPE/Nafion	0.3	0	0
DM/2	Au-CPE/Nafion	0	0	0
DM/2	Au-CPE/Nafion	0	0	0
DM/2	Au-CPE/Nafion	0	0	0
DM/3	Au-CPE/Nafion	0.06	0	0.04
DM/3	Au-CPE/Nafion	0	0.054	0
DM/3	Au-CPE/Nafion	0	0.113	0
DM/1	Au-CPE/Ni/Nafion	0.079	0	0.005
DM/1	Au-CPE/Ni/Nafion	0.03	0	0.029
DM/1	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0	0
DM/2	Au-CPE/Ni/Nafion	0.059	0	0.059
DM/2	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0.083	0
DM/2	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0.088	0
DM/3	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0	0
DM/3	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0	0
DM/3	Au-CPE/Ni/Nafion	0	0	0

การประดิษฐ์อิเล็กโทรดคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนสำหรับวัดไนตริกออกไซด์

The Fabrication of Screen-printed Carbon Electrode for Nitric Oxide

นุชนาถ พรชัย¹, มานะ ศรียุทธศักดิ์^{1,2}, สุธลิตถิณณ์ ปทุมราช^{1,3}

¹สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพฯ 10330 E-mail: Nuchanard.P@student.chula.ac.th

²ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพฯ, 10330 E-mail: mana.s@chula.ac.th

³ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพฯ, 10330 E-mail: sutilukp@yahoo.com

บทคัดย่อ

ไนตริกออกไซด์เป็นก๊าซโมเลกุลขนาดเล็กที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะการส่งสัญญาณภายในเซลล์และการขยายตัวของหลอดเลือด ซึ่งพบว่าหากเกิดภาวะที่ก๊าซไนตริกออกไซด์ไม่สมดุล จะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคความดันเลือดสูง และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้นำเสนอการประดิษฐ์คาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยวิธีพิมพ์สกรีนรวมถึงการปรับปรุงพื้นผิวของอิเล็กโทรดให้มีความไวในการวัดไนตริกออกไซด์สูงขึ้น ด้วยการเคลือบชั้นนิกเกิลฟทาโลไซยาไนด์บนขั้วอิเล็กโทรด จากการทดสอบการตอบสนองของอิเล็กโทรด โดยวิธีแอมแปโรเมตริกที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ พบว่าอิเล็กโทรดสามารถตอบสนองกับสารละลายไซเดียมไนโตรพรัสไซด์ที่ใช้ในการสร้างไนตริกออกไซด์ได้โดยการเพิ่มสารกลุ่มไทออลในปฏิกิริยา และจากการทดลองเบื้องต้นของการเคลือบชั้นนิกเกิลฟทาโลไซยาไนด์บนขั้วอิเล็กโทรด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองกับสารละลายไซเดียมไนโตรพรัสไซด์ได้ประมาณ 60% กล่าวคือค่าเฉลี่ยกระแสของอิเล็กโทรดไม่เคลือบและเคลือบนิกเกิลฟทาโรไซยาไนด์ ในสารละลายไซเดียมไนโตรพรัสไซด์ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M เท่ากับ 1.53 ไมโครแอมแปร์ และ 2.44 ไมโครแอมแปร์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไนตริกออกไซด์, ไฟฟ้าเคมี, คาร์บอนอิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน, ไซเดียมไนโตรพรัสไซด์

Abstract

Nitric oxide (NO) is a small major gaseous molecule regarding to several physiological functions, especially with intracellular signaling agent and vasodilation. In case of imbalance of NO, it was a major risk of hypertension and atherosclerosis. In the present study, fabrication of screen-printed

carbon electrode for nitric oxide detection is reported. Surface modification by coating tetrasulfonated nickel phthalocyanine (NiTSPc) is performed to improve sensitivity to nitric oxide. The electrode is characterized using standard sodium nitroprusside (SNP). Amperometric measurement is performed under bias potential at 0.7 V. Response of the screen-printed carbon electrode to SNP was found to be enhanced by adding cysteamine. Moreover it was found that the sensitivity of the electrode increases about 60% by NiTSPc modification. The responses of the uncoated- and coated NiTSPc electrode to 10^{-3} M SNP were 1.53 μ A and 2.44 μ A, respectively.

Keywords: nitric oxide, electrochemical sensors, screen-printed carbon electrode, sodium nitroprusside

1. บทนำ

ไนตริกออกไซด์เป็นก๊าซโมเลกุลขนาดเล็กที่มีความสำคัญอย่างมากในทางการแพทย์ ไนตริกออกไซด์มีผลต่อการขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้อัตราการไหลของเลือดเพิ่มขึ้น ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ไม่สมดุล สามารถพบได้ในกลุ่มโรคต่างๆ เช่น หลอดเลือดหัวใจตีบ หลอดเลือดสมองตีบ โรคเบาหวาน โรคพาร์กินสัน และโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น [1,2] ในปัจจุบันการตรวจวัดระดับไนตริกออกไซด์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น เคมีลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence) อีพอาร์ (electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry) การวิเคราะห์ทางสเปกโตรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) และวิธีของกรีส์ (Griess method) เป็นต้น วิธีการเหล่านี้ไม่สามารถทำการวัดได้ในเวลาจริง (real time) [2,3] วิธีการวัดทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical technique) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำการวัดได้ในเวลาจริง และยังสามารถวัดได้โดยตรงในตัวอย่างทดลอง จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง

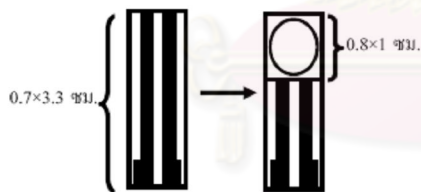
เหมาะสมในการนำมาใช้ในการวัดในตรีกออกไซด์ ในปัจจุบัน อิเล็กโทรดที่ใช้ในการวัดในตรีกออกไซด์มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ อิเล็กโทรดแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode) ที่ทำจากคาร์บอน และ อิเล็กโทรดแบบเข็ม (needle electrode) ที่ทำจากแพลทินัม (Pt) หรือทอง การนำเทคนิคการวัดทางไฟฟ้าเคมีมาใช้ในการตรวจวัดนั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดในตรีกออกไซด์ให้สูงขึ้นได้โดยการเพิ่มความไว (sensitivity) และการเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการวัด (selectivity) ให้กับอิเล็กโทรด [3] โดยมีสารที่นิยมนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพดังกล่าว คือ สารกลุ่ม ฟทาโลไซยานิน (phthalocyanine) และสารนาฟิออน (Nafion) [3,4,5]

สำหรับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อประดิษฐ์ อิเล็กโทรดที่ทำจากคาร์บอนด้วยวิธีพิมพ์สกรีนที่มีการเพิ่มความไวในการวัดในตรีกออกไซด์แล้วนำมาศึกษาประสิทธิภาพของอิเล็กโทรดที่ประดิษฐ์ขึ้นโดยการวัดในตรีกออกไซด์จากสารละลายมาตรฐาน

2. การทดลอง

2.1 การประดิษฐ์อิเล็กโทรดพิมพ์สกรีนคาร์บอน

แผ่นอิเล็กโทรดคาร์บอนประกอบด้วย 2 ขั้วไฟฟ้า คือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าร่วม ทำโดยกระบวนการพิมพ์สกรีนหมึกคาร์บอน (screen printing ink) ลงบนแผ่นพีวีซีหนา 0.2 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องพิมพ์สกรีนพื้นเรียบ รุ่น T-600F อิเล็กโทรดมีความกว้าง 0.7 เซนติเมตร ยาว 3.3 เซนติเมตร โดยมีลายเส้นอิเล็กโทรดกว้าง 2 มิลลิเมตร เพื่อควบคุมพื้นที่ของอิเล็กโทรดในขณะที่ทำการวัดจึงเตรียมแผ่นพีวีซีสี่เหลี่ยมที่มีรูวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางทับด้านบนของอิเล็กโทรด ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 รูปแบบอิเล็กโทรดที่ใช้ทดลอง

2.2 สารเคมี

ในการวัดจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์เครปส์ริงเจอร์ (Krebs-Ringer); pH=7.4 เป็นสารละลายหลักในการเตรียมสารชนิดอื่นๆ และใช้เป็นสารละลายพื้นหลังสำหรับการวัด สารละลายโซเดียมไนโตรพรัไซด์ (Sodium nitroprusside: SNP, Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น $10^{-7} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$ จะถูกใช้เป็นตัวให้ออกซิเจนในตรีกออกไซด์ (nitric oxide donor), สารละลายซิสเทอมีน (cysteamine hydrochloride, Sigma-Aldrich USA) ที่ความเข้มข้น 1 M ถูกใช้เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของโซเดียมไนโตรพรัไซด์ ส่วนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1%-35% ใช้เป็นสารละลายตรวจสอบการทำงานของอิเล็กโทรด และใช้เตตระซัลโฟเนต นิกเกิลฟทาโลไซยานิน (tetrasulfonated nickel

phthalocyanine : NiTSPc, Sigma-Aldrich USA)) เป็นตัวเพิ่มความไวในการวัด

2.3 เครื่องวัดทางไฟฟ้าเคมีและวิธีการทดลอง

เครื่องวัดทางไฟฟ้าเคมีใช้เป็นเครื่องโพเทนทิโอสแตตที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้วัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยทำการวัดแบบแอมเปอร์โรเมตริก

ก่อนเคลือบ NiTSPc ต้องทำการปรับผิว (pre-treated) อิเล็กโทรดก่อนเพื่อให้อิเล็กโทรด มีสภาพผิวที่ใกล้เคียงกัน วิธีการปรับผิว ทำในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS 0.1M; pH 7.4) ตามขั้นตอนต่อไปนี้ คือ (1) ทำไซคลิกโวลแทมเมทรี (cyclic voltammetry : CV) ช่วงของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง $-1.2 \sim +1.2 \text{ V}$, 100 mV/s เป็นเวลา 5 นาที, (2) ป้อนศักย์ไฟฟ้าความถี่ 50 Hz รูปคลื่นสามเหลี่ยม จาก $0.0 \sim 2.9 \text{ V}$ เป็นเวลา 20 วินาที (3) ป้อนศักย์ไฟฟ้า -0.8 V เป็นเวลา 5 วินาที (4) ป้อนศักย์ไฟฟ้า 1.5 V เป็นเวลา 5 วินาที และ (5) ทำ CV ช่วงของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง $-1.2 \sim +1.2 \text{ V}$, 100 mV/s เป็นเวลา 5 นาที

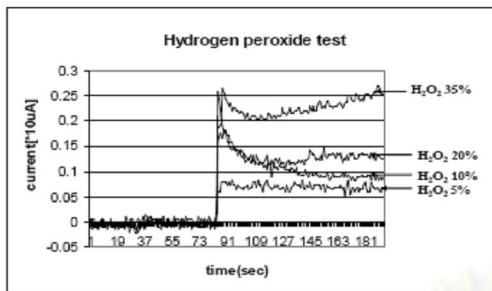
วิธีการเคลือบ NiTSPc ทำโดยการใช้ NiTSPc ความเข้มข้น 2 mM ใน 0.1 M NaOH หยดลงบนอิเล็กโทรดปริมาตร 30 μl จากนั้นป้อนศักย์ไฟฟ้า 1.2 V เป็นเวลา 10 นาที และทำ CV ในช่วงของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง $0.0 \sim +1.2 \text{ V}$, 100 mV/s เป็นเวลา 10 นาที [4]

วิธีการวัดทำโดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้าของอิเล็กโทรดทำงานไว้ที่ 0.7 V ปรับตั้งอัตราขยายสัญญาณ $10^5 - 10^6$ เท่า เริ่มทดสอบการตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5% -35% โดยใช้ปริมาตร 20 μl จากนั้นทดสอบการตอบสนองต่อสารละลายบัฟเฟอร์เครปส์ริงเจอร์ และสารละลายโซเดียมไนโตรพรัไซด์ (SNP) มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวให้ออกซิเจนในตรีกออกไซด์ ที่ความเข้มข้น $10^{-7} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$ ปริมาตร 20 μl และทดสอบการตอบสนองในกรณีที่เพิ่มสารละลายซิสเทอมีนลงในสารละลายบัฟเฟอร์เครปส์ริงเจอร์ และสารละลายมาตรฐาน SNP ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M และ 10^{-2} M

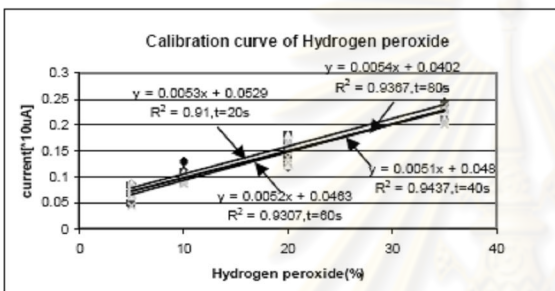
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

รูปที่ 2 แสดงผลการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น การตอบสนองจะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ และรูปที่ 3 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ณ เวลาต่างๆ ซึ่งตารางที่ 1 แสดงค่าความไวและค่า R^2 ของการวัดที่เวลา 20, 40, 60 และ 80 วินาที ในการเลือกเวลานับวินาที 20 วินาที เพราะเป็นช่วงเวลาที่มิสัญญาณการตอบสนองที่เสถียรของการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อพื้นผิวอิเล็กโทรด ดังนั้นจากรูปและตารางจะเห็นว่าความไวในการตอบสนองที่เวลาต่างกันจะไม่ต่างกันมากนัก ซึ่งพิจารณาจาก

ค่า R^2 ที่ดีที่สุด พบว่าที่เวลา 40 วินาที โดยมีค่าความไวในการตอบสนองเท่ากับ $0.051 \mu A/\%H_2O_2$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9437



รูปที่ 2 ลักษณะการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

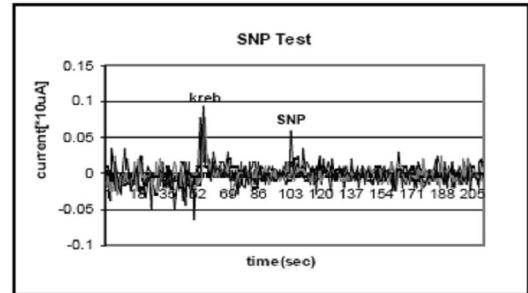


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เวลาต่างๆ

ตารางที่ 1 : ค่าความไวในการวัดของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

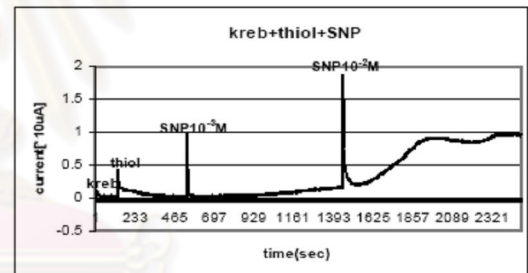
Time(sec)	Slope	R^2
20	$0.0053X + 0.0529$	0.91
40	$0.0051X + 0.048$	0.94
60	$0.0052X + 0.0463$	0.93
80	$0.0054X + 0.0402$	0.93

รูปที่ 4 แสดงผลการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลายบัพเฟอร์คริสตอลและสารละลายมาตรฐาน SNP ที่ความเข้มข้น 10^{-7} - 10^{-2} M จากรูปผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อหยดสารละลายคริสตอลและสารละลาย SNP จะมีการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าที่ค่ามาก หรืออิเล็กโทรดยังไม่ตอบสนองต่อทั้งสารละลายคริสตอลและสารละลาย SNP หรือกล่าวคือ SNP ยังไม่สามารถให้ในตรรกออกไซด์ได้



รูปที่ 4 การตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลายคริสตอลและสารละลาย SNP

รูปที่ 5 แสดงผลการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลายบัพเฟอร์คริสตอลและสารละลายมาตรฐาน SNP ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M และ 10^{-2} M จากผลการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มสารละลายซิสเทอมีนจะทำให้เห็นการตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลาย SNP ที่ชัดเจนขึ้น และตารางที่ 2 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดที่ตอบสนองต่อ SNP ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M เมื่อไม่มีและมีซิสเทอมีน ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าสารละลายซิสเทอมีนมีความสำคัญต่อการทำงานของ SNP เนื่องจากมีรายงานว่าสารละลายซิสเทอมีนมีหมู่อิสระของซัลไฟด์ ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นทำให้สารละลาย SNP เกิดการแตกตัวให้ในตรรกออกไซด์ได้ดีขึ้น



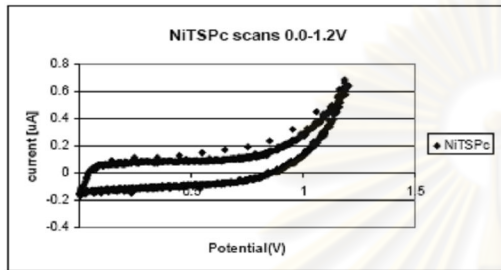
รูปที่ 5 การตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ไม่เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลาย SNP เมื่อมีการเพิ่มสารละลายซิสเทอมีน

ตารางที่ 2 : ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของกระแสตอบสนองที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรดต่อสารละลายชนิดต่างๆ

	Kreb	cysteamine	SNP w/o cysteamine	SNP with cysteamine
\bar{X}	0.16 μA	0.34 μA	0.17 μA	1.53 μA
SD	0.02 μA	0 μA	0.21 μA	0.02 μA
CV(%)	17.3	0	125	1.9

\bar{X} : ค่าเฉลี่ย, SD: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, CV: สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน, ค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลายแต่ละชนิด ทำโดยหยดสารละลายบนอิเล็กโทรดซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของกระแสที่ได้

รูปที่ 6 แสดงการเคลื่อนของอิเล็กโทรดด้วย NiTSPc โดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี และตารางที่ 3 แสดงผลการทดลองอิเล็กโทรดที่เคลือบด้วย NiTSPc จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยกระแสของอิเล็กโทรดที่ทดสอบกับสารละลาย SNP 10^{-3} M เท่ากับ 2.44 μ A และเมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดไม่เคลือบ NiTSPc ค่าเฉลี่ยกระแสของอิเล็กโทรดที่ทดสอบกับสารละลาย SNP 10^{-3} M เท่ากับ 1.53 μ A กล่าวคือการเคลือบ NiTSPc จะช่วยให้อิเล็กโทรดมีความไวในการวัดเพิ่มขึ้นประมาณ 60% อย่างไรก็ตามพบว่าค่าความแปรปรวนในการวัดมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเคลือบ NiTSPc ซึ่งอาจเป็นผลของความแตกต่างของผิวอิเล็กโทรดแต่ละตัวที่ยังไม่สามารถควบคุมการประดิษฐ์ได้



รูปที่ 6 การเคลื่อนอิเล็กโทรดด้วย NiTSPc ที่ช่วงของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 0.0 ~ +1.2 V, 100 mV/s

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของกระแสตอบสนองที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรด เคลือบ NiTSPc ต่อสารละลายชนิดต่างๆ

	Kreb	cysteamine	SNP w/o NiTSPc	SNP with NiTSPc
\bar{X}	0.18 μ A	1.11 μ A	1.53 μ A	2.44 μ A
SD	0.02 μ A	0.19 μ A	0.09 μ A	0.59 μ A
CV(%)	15.7	17.7	1.9	24.4

\bar{X} : ค่าเฉลี่ย, SD: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, CV: สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน, ค่าการตอบสนองของอิเล็กโทรดต่อสารละลายแต่ละชนิด ทำโดยหยดสารละลายบนอิเล็กโทรดซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของกระแสที่ได้

4. สรุปผลการทดลอง

บทความนี้รายงานการศึกษาเบื้องต้นของการประดิษฐ์อิเล็กโทรดคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนสำหรับวัดไนตริกออกไซด์ โดยได้ทำการปรับสภาพผิวอิเล็กโทรดก่อนทำการทดลอง และได้ทดลองเคลือบ NiTSPc เพื่อเพิ่มความไวในการวัด จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าอิเล็กโทรดสามารถวัดไนตริกออกไซด์ที่เกิดจากการแตกตัวของ SNP ได้เมื่อมีการเพิ่มซิสเทอมีนลงในตัวอย่างที่ทำารวัด โดยพบว่า การเคลือบ NiTSPc สามารถเพิ่มความไวในการวัดให้สูงขึ้นประมาณ 60% จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำอิเล็กโทรดที่

ประดิษฐ์ขึ้นไปปรับปรุง และประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ในสิ่งมีชีวิตต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- [1] Oni,N.Diab,I.Radtke, and W.Schuhmann, "Detection of NO release from endothelial cells using Pt micro electrodes modified with a pyrrole-functionalised Mn(II) porphyrin," *Electrochimica Acta* , vol.48, pp.3349-3354, 2003.
- [2] Zheng,G.Ning and Y.Yang, "Study on the technology of nitric oxide (NO) detection in vitro and in vivo," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol.34, pp.347-352, 2006.
- [3] S.Miserere,S.Ledru,N.Ruille,S.Griveau,M.Boujita and F.Bedioui, "Biocompatible carbon-based screen-printed electrodes for the electrochemical detection of nitric oxide," *Electrochemistry Communications*, No.8, pp.238-244, 2006.
- [4] M.Pontie,H.Lecture and F.Bedioui, "Improvement in the performance of a nickel complex-based electrochemical sensor for the detection of nitric oxide in solution," *Sensor and Actuators B*, vol.56, pp.1-5, 1999.
- [5] N.Pereira-Rodrigues, V.Albin, M.Koudelka-Hep, V.Auger, A.Pailleret and F.Bedioui, "Nickel tetrasulfonated phthalocyanine based platinum microelectrode array for nitric oxide oxidation," *Electrochemistry Communications*, Vol.4, pp.922-927, 2002.



นางสาวนุชชา นพชัย สหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย งานวิจัยที่สนใจ คือ การประดิษฐ์อิเล็กโทรดพิมพ์สกรีนคาร์บอนสำหรับวัดไนตริกออกไซด์ในระบบไหลเวียนเลือดขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อ



รศ.ดร มานะ ศรียุทธศักดิ์ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ และสหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย งานวิจัยที่สนใจ คือ ไบโอมิเมติกทรานซิสเตอร์ เซ็นเซอร์ทางเคมี และเครื่องมือทางการแพทย์



รศ.ดร สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสหสาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช บัณฑิตวิทยาลัย งานวิจัยที่สนใจ คือ ระบบไหลเวียนเลือดไหลเวียนขนาดเล็ก

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนุชนาถ พรชัย เกิดวันที่ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ในปีการศึกษา 2547 และ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมชีวเวช คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย