

ไบโอเซนเซอร์ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากนาโนคอมโพสิตของอนุภาคนาโนทอง/เมโซ
เซลลูลาร์โฟมซิลิกา สำหรับการตรวจวัดสารฆ่าแมลง

นายณัฐวัตร สุรทิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ACETYLCHOLINESTERASE BIOSENSORS BASED ON GOLD
NANOPARTICLES/MESOCELLULAR FOAM SILICA NANOCOMPOSITES FOR
DETECTION OF PESTICIDES

Mr. Nattawat Surathin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---------------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ไปโอเซนเซอร์ของอะซิติลโคลีนเอสเทอร์จากนาโนคอมโพสิตของอนุภาคนาโนทอง/เมโซเซลลูโลสโฟมซิลิกาสำหรับการตรวจวัดสารฆ่าแมลง |
| โดย | นายณัฐวัตร สุรทิน |
| สาขาวิชา | วิศวกรรมเคมี |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปริชานนท์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร. จุงใจ ปั้นประณต |

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศศิริวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อาทิวรรณ โชติพิฤกษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปริชานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. จุงใจ ปั้นประณต)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนงค์นาฏ สมหวังชนโรจน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ชัญฉณา ธนชยานนท์)

5470506521: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: MESOCELLULAR FOAM SILICA / PESTICIDE BIOSENSOR/ ULTRASONIC IRRADIATION/ METHYL PARATHION/ METHOMYL

NATTAWAT SURATHIN: ACETYLCHOLINESTERASE BIOSENSORS BASED ON GOLD NANOPARTICLES/ MESOCELLULAR FOAM SILICA NANOCOMPOSITES FOR DETECTION OF PESTICIDES. ADVISOR: ASSOC.PROF. SEEROONG PRICHANONT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST.PROF. JOONGJAI PANPRANOT, Ph.D., 118 pp.

This research is the study of amperometric acetylcholinesterase (AChE) biosensor for detection of organophosphate and carbamate pesticides using mesocellular foam silica (MCF) as support materials for immobilization of enzyme by electrostatic interaction between enzyme and support material. Mesocellular foam silica is a porous material with unique properties such as large surface area, large pore volume, biocompatible, and modifiable surface. Gold nanoparticles (AuNPs) is a conductive material commonly used in biosensors because of its good electron transfer and biocompatibility. Therefore, combination of two remarkable materials with immobilized enzyme for biosensor applications has high potential to improve sensor performances. The experiments of synthesis of AuNPs/MCF nanocomposite were divided into three parts. Firstly, MCF was synthesized using Pluronic 123 triblock copolymer (P123) as a template and tetraethyl orthosilicate (TEOS) as a silica source resulted in MCF product with average pore diameters of 26 nm, surface area of 537.64 m²/g and pore volume 1.02 cm³/g. Secondly, The porous surface of modified MCF was refluxed in toluene solution at the temperature of 100 °C using 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) to attach thiol functional group on porous surface of MCF for gold ion adsorption on MCF surface. Finally, gold nanoparticles were synthesized on MCF using ultrasonic hydrogen free radicals (•H) and hydroxyl free radicals (•OH) initiated by ultrasonic irradiation. These radicals acted as reducing equivalent converting Au³⁺ ion that prepared from chloroauric acid (HAuCl₄) to Au⁰ atom and AuNPs adhered on porous surfaces of MCF. The average size of gold nanoparticles attached inside the pore of MCF was 4.9 nm. When AuNPs/MCF nanocomposites were used for enzyme immobilization, loading was determined at 48.02%. MCF/AuNPs/AChE was then applied as a receptor of biosensor for detection of pesticides. The obtained biosensor was denoted as SPCE/MCF/AuNPs/AChE/Chitosan. The cyclic voltammogram of thiocholine released from the enzymatic hydrolysis showed the oxidation peak at +0.8 V. The inhibition of methyl parathion were in the linear ranges of 1 to 200 ng/ml (sensitivity 0.0928 nA/nM) and 200 to 1600 ng/ml (sensitivity 0.0284 nA/nM) with detection limit of 0.065 ng/mg. On the other hand, The linear range of methomyl responses were from 1 to 10 ng/ml (sensitivity 1.1523 nA/nM) and 10 to 100 ng/ml (sensitivity 0.3204 nA/nM) with detection limit of 0.128 ng/mg. The stability of biosensor stored at 4 C in dry condition was good since it could retain 91 % of initial current response after 20 storage days.

| | |
|---|-----------------------------|
| Department:.....Chemical Engineering..... | Student's Signature..... |
| Field of Study:.....Chemical Engineering..... | Advisor's Signature..... |
| Academic Year:.....2012..... | Co-advisor's Signature..... |

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ วิธีการทำงาน วิจัย ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จุงใจ ปั้นประณต ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา และสนับสนุนอุปกรณ์ในการทำการทดลอง

อาจารย์ ดร. ชัญชนา ธนชยานนท์ ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับความรู้ ในเชิงวัสดุศาสตร์ และอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลงไม่ได้ถ้าขาดบุคคลเหล่านี้ นางสาวปรางค์นาฏ งามมาก และนางสาว รัชณีพัฒน์ กำแพงเพชร สำหรับการให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัย และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อ งานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว และเพื่อนพ้องที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฎ |
| สารบัญรูป..... | ฏ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ที่มาของงานวิจัย..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 3 |
| 1.3 ขอบเขตการวิจัย..... | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| บทที่ 2 ทฤษฎี..... | 6 |
| 2.1 ไปโอเซนเซอร์..... | 6 |
| 2.1.1 แอมเพอโรเมตริกเอนไซม์ไปโอเซนเซอร์..... | 8 |
| 2.1.2 เทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า..... | 9 |
| 2.1.2.1 ไซคลิกโวลแทมเมตรี..... | 9 |
| 2.1.2.2 แอมเพอโรเมตรี..... | 10 |
| 2.1.3 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของไปโอเซนเซอร์..... | 11 |
| 2.2 การตรึงรูปเอนไซม์..... | 13 |
| 2.2.1 การตรึงเอนไซม์ด้วยแรงยึดเหนี่ยว..... | 14 |
| 2.2.2 การกักเก็บเอนไซม์ภายในวัสดุตรึง..... | 15 |
| 2.3 เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส..... | 16 |
| 2.4 วัสดุเมโซพอร์ซิลิกา..... | 18 |
| 2.4.1 การสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา..... | 19 |
| 2.4.2 การตรึงเอนไซม์บนเมโซพอร์ซิลิกา..... | 21 |
| 2.5 อนุภาคนาโนทอง..... | 23 |
| 2.5.1 คุณสมบัติของวัสดุนาโนทอง..... | 23 |
| 2.5.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง..... | 25 |
| 2.5.2.1 วิธีการรีดักชันทางเคมี..... | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.5.2.2 | วิธีการอัลตราโซนิก..... | 26 |
| 2.5.3 | การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/เมโซพอร์สซิลิกานาโนคอมโพสิต..... | 27 |
| 2.6 | โคโคซาน..... | 32 |
| บทที่ 3 | วารสารปริทรรศน์..... | 34 |
| 3.1 | สารฆ่าแมลง..... | 34 |
| 3.1.1 | ประเภทของสารฆ่าแมลง..... | 34 |
| 3.1.1.1 | กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต..... | 34 |
| 3.1.1.2 | กลุ่มคาร์บาเมต..... | 35 |
| 3.1.2 | ปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงในไทย..... | 36 |
| 3.1.3 | ปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลง..... | 36 |
| 3.1.4 | การเจ็บป่วยเนื่องจากสารฆ่าแมลง..... | 38 |
| 3.2 | เมโซพอร์สซิลิกา..... | 39 |
| 3.3 | วัสดุประเภทเมโซพอร์สซิลิกากับการประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์..... | 41 |
| 3.4 | พารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์..... | 46 |
| บทที่ 4 | อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง..... | 49 |
| 4.1 | อุปกรณ์และสารเคมี..... | 49 |
| 4.2.1 | อุปกรณ์..... | 49 |
| 4.2.2 | สารเคมี..... | 50 |
| 4.2 | วิธีการทดลอง..... | 51 |
| 4.2.1 | การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา..... | 51 |
| 4.2.2 | การวิเคราะห์คุณสมบัติของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา..... | 51 |
| 4.2.3 | การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง..... | 52 |
| 4.2.3.1 | การปรับปรุงพื้นผิวของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกาด้วยสารก่อ ฟังก์ชัน..... | 52 |
| 4.2.3.2 | การดูดซับทองไอออนในรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา..... | 53 |
| 4.2.3.3 | การรีดิวซ์ทองไอออนที่ดูดซับอยู่ในรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟม ซิลิกาให้กลายเป็นอนุภาค..... | 53 |
| 4.2.4 | การตรึงเอนไซม์ในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกาเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่ ถูกตรึงรูป..... | 54 |

| | |
|--|----|
| 4.2.5 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูป..... | 54 |
| 4.2.6 การเตรียมสารละลายโคโคซาน..... | 55 |
| 4.2.7 การทำอิเล็กโทรดดัดแปลง..... | 55 |
| 4.2.8 การทดลองเปรียบเทียบผลของชนิดอิเล็กโทรดใช้งาน ต่อการตอบสนองทางไฟฟ้า..... | 56 |
| 4.2.9 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการวัด..... | 57 |
| 4.2.9.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น..... | 57 |
| 4.2.9.2 การศึกษาผลของค่า pH..... | 57 |
| 4.2.9.3 การศึกษาผลของค่า Incubation time..... | 58 |
| 4.2.10 การทดลองวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรออน และเมโทมิล..... | 58 |
| 4.2.11 การทดสอบเสถียรภาพของการเก็บรักษาไบโอเซนเซอร์..... | 59 |
| บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 60 |
| 5.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต MCF/AuNPs..... | 60 |
| 5.2 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในวัสดุตรีงแบบต่างๆ... | 68 |
| 5.3 ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง..... | 71 |
| 5.3.1 การศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงด้วยวัสดุชนิดต่างๆ..... | 71 |
| 5.3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์..... | 74 |
| 5.3.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น..... | 74 |
| 5.3.2.2 ผลของ pH..... | 76 |
| 5.3.2.3 ผลของ incubation time..... | 77 |
| 5.3.3 การศึกษาการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต..... | 79 |
| 5.3.4 การศึกษาการความคงตัวของไบโอเซนเซอร์ต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา..... | 83 |
| 5.3.5 การผลิตซ้ำ (Reproducibility)..... | 85 |
| บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... | 86 |
| 6.1สรุปผลการทดลอง..... | 86 |

| | |
|---|-----|
| 6.1.1 การวิเคราะห์หาคุณสมบัติของวัสดุนาโนคอมโพสิตของเมโซเซลลูลาร์โฟม ซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง..... | 86 |
| 6.1.2 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในวัสดุตรึงแบบ ต่างๆ..... | 87 |
| 6.1.3 การศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ที่ ดัดแปลงด้วยวัสดุชนิดต่างๆ..... | 87 |
| 6.1.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองการวัดค่าของไบโอเซนเซอร์..... | 88 |
| 6.1.5 การศึกษาการวัดสารฆ่าแมลงเมทิล พาราไรออน และเมโทมิล..... | 88 |
| 6.1.6 การศึกษาความคงตัวของอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ในการเก็บรักษา.... | 89 |
| 6.2 ข้อเสนอแนะ..... | 89 |
| รายการอ้างอิง..... | 90 |
| ภาคผนวก..... | 99 |
| ภาคผนวก ก..... | 100 |
| ภาคผนวก ข..... | 108 |
| ภาคผนวก ค..... | 111 |
| ภาคผนวก จ..... | 115 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 121 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 2.1 | การเปรียบเทียบการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ..... | 16 |
| 2.2 | ลักษณะทางกายภาพของวัสดุเมโซพอร์สซิลิกา..... | 20 |
| 2.3 | เปรียบเทียบการใช้สารก่อกำเนิด (functional ligand) ชนิดต่างๆในการปรับปรุงพื้นที่ผิวของเมโซพอร์สซิลิกาชนิด MCM-41, SBA-15 และ MCF เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การไหลของทอง..... | 30 |
| 3.1 | วัตถุดิบทรายที่มีการนำเข้าสู่สูงสุด 10 อันดับแรก ปี 2544 –2546..... | 36 |
| 3.2 | ปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงในพืชผลทางการเกษตรของไทยซึ่งถูกตรวจพบโดย RASFF..... | 37 |
| 3.3 | ข้อดี และข้อจำกัดของวัสดุเมโซพอร์สซิลิกาเปรียบเทียบกับวัสดุชนิดอื่นที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ในงานไบโอเซนเซอร์..... | 42 |
| 3.4 | อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง..... | 45 |
| 5.1 | เปรียบเทียบคุณสมบัติของ MCF ที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้ กับงานวิจัยอื่นๆ..... | 62 |
| 5.2 | เปรียบเทียบอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ที่ใช้อิเล็กโทรดดัดแปลงเพื่อวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไธออน และเมโทมิล..... | 82 |
| 5.3 | เปรียบเทียบผลการเก็บรักษาอิเล็กโทรดดัดแปลงที่ใช้วัสดุ MCF กับงานวิจัยอื่น..... | 84 |
| ก 1 | ตารางแสดงผลการทดลองหาปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง และไม่ถูกตรึง ของวัสดุตรึงต่างชนิดกันคือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS /AuNPs ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง..... | 100 |
| ก 2 | ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ 1 อิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ ที่หาจากวิธีการคำนวณและวิธีของ Ellman’s method ของวัสดุตรึงต่างชนิดกันคือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS/AuNPs..... | 100 |
| ก 3 | ผลของความเข้มข้นของอะซิติลไทโอคลอรีน คลอไรด์ ต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของเครื่องมือวัดไบโอเซนเซอร์ในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9..... | 101 |

| ตารางที่ | หน้า | |
|----------|---|-----|
| ก 4 | ผลของ pH ต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของเครื่องมือวัดไบโอเซนเซอร์ ในระบบวัด ที่ประกอบด้วยสารละลายของอะซิติลไทโอคลอรีน คลอไรด์ ที่ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์..... | 101 |
| ก 5 | ผลของเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง (Incubation time) ต่อเปอร์เซ็นต์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (% Incubation, %) ในระบบวัดที่ของสารละลายของฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติลไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์..... | 102 |
| ก 6 | ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไรออน ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs /AChE /Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อ มิลลิกรัม และกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของการวัดในช่วงความ เข้มข้น A) 1.0 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร B) 200 ถึง 1600 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร..... | 103 |
| ก 7 | ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไรออน ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs /AChE /Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อ มิลลิกรัม..... | 104 |
| ก 8 | ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/AChE/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส..... | 105 |
| ก 9 | ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/MCF/AChE/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส..... | 105 |
| ก 10 | ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/MCF/APTS/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส..... | 106 |
| ก 11 | ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/MCF/APTS/AuNPs/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส..... | 106 |

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| ก 12 | การตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลง ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ที่ ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 โวลต์ ในระบบวัดสารละลายของฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 9 ที่ ประกอบด้วย อะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ทำการผลิตซ้ำตามกระบวนการเดิม จำนวน 10 อิเล็กโทรด..... | 107 |
| ข 1 | ข้อมูลของกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร..... | 109 |
| ข 2 | แสดงปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงในรูพรุนของวัสดุ MCF วัสดุ MCF/ATPS และ วัสดุ MCF/ATPS/AuNPs..... | 110 |
| ค 1 | ข้อมูลของกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 112 |
| ค 2 | กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงในรูพรุนของวัสดุ MCF วัสดุ MCF/ATPS และวัสดุ MCF/ATPS/AuNPs..... | 113 |
| ค 3 | ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์จากการคำนวณ เปรียบเทียบกับการวัดจริง..... | 114 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 2.1 | หลักการทํางานของไบโอเซนเซอร์..... | 6 |
| 2.2 | โครงสร้างของไบโอเซนเซอร์ และความสัมพันธ์ของสัญญาณต่างๆ..... | 7 |
| 2.3 | ลำดับขั้นของการส่งผ่านอิเล็กทรอนิกส์จากสับสเตรทสู่อิเล็กโทรดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน – รีดักชันระหว่างเอนไซม์กับอิเล็กโทรด..... | 9 |
| 2.4 | ลักษณะของสัญญาณที่วัดได้จากวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี..... | 10 |
| 2.5 | ลักษณะของสัญญาณที่วัดได้จากวิธีแอมเพอโรเมตรีจากไบโอเซนเซอร์..... | 11 |
| 2.6 | การจัดจำพวกวิธีการตรึงรูบเอนไซม์ โดย B: เอนไซม์ C: วัสดุตรึง..... | 13 |
| 2.7 | สัญญาณการตอบสนองในรูปกระแสไฟฟ้าต่อระยะเวลา ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ก่อนเติมสารฆ่าแมลง (befor the incubation) และหลังการเติมสารฆ่าแมลง (after the incubation) (Hildebrandt และคณะ, 2008)..... | 17 |
| 2.8 | การตรึงเอนไซม์บนเมโซพอร์ซิลิกาโดยอาศัยแรงยึดเหนี่ยวทางพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ (electrostatic interaction) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic interaction)..... | 23 |
| 2.9 | การปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนของทองด้วยกลูตาไธโอน (glutathione) หรือ กรดไลโปอิก (lipoic acid) ซึ่งทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) สำหรับตรึงเอนไซม์ HRP..... | 24 |
| 2.10 | กลไกการดูดซับของเอนไซม์บนอนุภาคนาโนทองโดยอาศัยแรง a) แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ b) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว และ c) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างพื้นผิวของทองกับอะตอมของซัลเฟอร์ (sulphur) หรือไนโตรเจน (nitrogen) ของเอนไซม์..... | 25 |
| 2.11 | ลักษณะของประจุลบที่เกิดขึ้นบนผิวของอนุภาคของทองซึ่งเป็นผลจากการใช้กรดเข้มข้นเป็นตัวรีดิวซ์ (Petersen และคณะ, 2006)..... | 26 |
| 2.12 | ภาพถ่าย TEM ซึ่งแสดงโครงสร้างของพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาที่มีอนุภาคของทองเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวหลังจากทำการอัลตราโซนิกเป็นเวลา 120 นาที (b) ขนาดของอนุภาคของทองที่สังเคราะห์ได้เฉลี่ยอยู่ที่ 6 นาโนเมตร..... | 29 |

| รูปที่ | หน้า |
|--------|------|
| 2.13 | 31 |
| 2.14 | 31 |
| 2.15 | 32 |
| 2.16 | 33 |
| 3.1 | 38 |
| 3.2 | 40 |
| 3.3 | 41 |
| 3.4 | 46 |
| 3.5 | 47 |
| 3.6 | 48 |
| 5.1 | 61 |
| 5.2 | 62 |
| 5.3 | 64 |
| 5.4 | 65 |

| รูปที่ | หน้า | |
|--------|---|----|
| 5.5 | โครงสร้างของ A) วัสดุ MCF ภาพกำลังขยาย 50 นาโนเมตร B) วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ทอง ภาพกำลังขยาย 50 นาโนเมตร C) วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ทอง ภาพกำลังขยาย 20 นาโนเมตร โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ความถี่ของขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้น จากกระบวนการสังเคราะห์ทองในวัสดุ MCF..... | 66 |
| 5.6 | ความถี่ของขนาดอนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ทองในวัสดุ MCF..... | 67 |
| 5.7 | สเปกตรัม XRD ของวัสดุ a) MCF และ b) MCF/APTS/AuNPs..... | 67 |
| 5.8 | ร้อยละของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง และกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปภายในวัสดุจริงต่างชนิดกัน 3 ชนิด คือ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง..... | 69 |
| 5.9 | ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ a) bare electrode ชนิด SPCE b) SPCE/Chitosan c) SPCE/MCF /Chitosan d) SPCE/MCF/APTS/Chitosan e) SPCE/MCF/APTS/ AuNPs/Chitosan f) SPCE /MCF/AChE/ Chitosan g) SPCE/MCF/APTS/AChE /Chitosan h) SPCE/MCF/APTS/AuNPS/AChE /Chitosan ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 9 ที่ประกอบด้วยอะซิติกไทโอโคลรีน คลอไรด์ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.2 ถึง 1.0 อัตราการสแกน 10 มิลลิโวลต์ต่อวินาที..... | 72 |
| 5.10 | A) แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ AChE กับสารตั้งต้นอะซิติกไทโอโคลรีน คลอไรด์ เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ไทโอโคลรีน B) ปฏิกิริยาออกซิเดชันไทโอโคลรีนบนผิวหน้าอิเล็กโทรด..... | 73 |
| 5.11 | ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นอะซิติกไทโอโคลรีน คลอไรด์ ที่มีปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกันตั้งแต่ 1.5 ถึง 40.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ต่อการตอบสนองทางไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์..... | 75 |
| 5.12 | Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด (V_m) และค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา (K_m)..... | 75 |
| 5.13 | ผลของ pH ต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของเครื่องมือวัดไบโอเซนเซอร์ในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายของอะซิติกไทโอโคลรีน คลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์..... | 76 |

| รูปที่ | หน้า | |
|--------|---|-----|
| 5.14 | กลไกการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ AChE กับสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์..... | 77 |
| 5.15 | ผลของเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง (Incubation time) ต่อเปอร์เซ็นต์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (% Incubation, %) ในระบบวัดที่ของสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์.... | 78 |
| 5.16 | ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไรดอน ของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs /AChE/ Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม และกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของการวัดในช่วงความเข้มข้น A) 1 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร B) 200 ถึง 1600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 79 |
| 5.17 | ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทคาร์บาเมต ชนิดเมโทมิล ของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 400 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม และกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของการวัดในช่วงความเข้มข้น A) 1 ถึง 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร B) 20 ถึง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 80 |
| 5.18 | แนวโน้มของการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของอิเล็กโทรดดัดแปลง เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ A) 32 องศาเซลเซียส และ B) 4 องศาเซลเซียส..... | 83 |
| 5.19 | การตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลง ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 โวลต์ ในระบบวัดสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ทำการผลิตซ้ำตามกระบวนการเดิม จำนวน 10 อิเล็กโทรด..... | 85 |
| ข 1 | การสแกนหาค่าความยาวคลื่นแสงที่เอนไซม์ AChE สามารถดูดซับได้..... | 108 |
| ข 2 | กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 109 |
| ค 1 | แสดงกลไกการเกิดสารสีเหลืองที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จากการทำปฏิกิริยาของสาร DTNB กับไทโอโคลีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์..... | 111 |

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| ค 2 | กราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 112 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันการใช้สารเคมีเป็นพิษจำพวกยาฆ่าแมลงในอุตสาหกรรมทางการเกษตรมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรปี 2551 พบว่าประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกทางการเกษตรมากเป็นอันดับที่ 48 ของโลก แต่กลับมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในปริมาณสูงเป็นอันดับ 5 ของโลก (พิชัย สมบูรณ์วงศ์ และจิรนนท์ เสนานาญ, 2553) ซึ่งการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากนี้ไม่เพียงจะมีผลต่อการทำลายแมลงและวัชพืช แต่ยังส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ โดยเฉพาะการตกค้างของสารเคมีเป็นพิษในสิ่งแวดล้อม ทั้งในพืชผลทางการเกษตร แหล่งน้ำ หรือแม้กระทั่งแทรกซึมและสะสมตัวอยู่ในชั้นดิน ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต โดยจากรายงานสถานการณ์การป่วยด้วยโรคจากสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยปี 2552 พบว่าสารกำจัดศัตรูพืชชนิดที่เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยมากที่สุดเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphated insecticide) และคาร์บาเมต (carbamate insecticide) ที่มีอัตราการเจ็บป่วยจำนวนเฉลี่ย 6 รายต่อ 100,000 ราย และมีอัตราการป่วยตายที่เกิดจากสารเคมีชนิดนี้คิดเป็นร้อยละ 6.2 จากผู้ป่วยทั้งหมด (พิบูล อิสสระพันธุ์, 2554) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการใช้ที่นิยมใช้สารฆ่าแมลง 2 ชนิดนี้เพื่อกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เช่น เมทิล พาราไรออน (methyl parathion) มาลาไรออน (malathion) ไดโครโตฟอส (dicrotophos) และไดคลอวอส (dichlorvos) เป็นต้น สารเคมีชนิดนี้มีระยะเวลาการสลายตัวประมาณ 2 สัปดาห์ถึง 6 เดือน ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพอากาศ และอุณหภูมิ จึงนิยมใช้กับพืชผักที่มีอายุการเพาะปลูก และการเก็บเกี่ยวสั้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2554)

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของสารฆ่าแมลงนั้นสามารถทำได้โดยการใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) เครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry, MS) หรือเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) ซึ่งวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวนี้มีข้อดีที่สามารถตรวจวัดค่าได้ค่าแม่นยำ แต่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง มีขั้นตอนในการวัดและเตรียมสารที่ยุ่งยาก เครื่องมือมีราคาแพง และจำเป็นต้องใช้ผู้ชำนาญการในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดที่เรียกว่า ไบโอเซนเซอร์ (biosensors) ขึ้นมาเป็นทางเลือกที่จะใช้ในการวิเคราะห์สาร เพราะสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการตรวจวัด ขั้นตอนในการตรวจวัดไม่ยุ่งยาก (Pundir และ Chauhan, 2012) โดยอุปกรณ์ตรวจวัดไบโอเซนเซอร์จะประกอบด้วยส่วน

ของสารชีวภาพที่เป็นเอนไซม์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการจะตรวจวิเคราะห์ ตรงเข้ากับ ส่วนของทรานสดิวเซอร์ (transducer) ที่มีความสามารถในการตรวจจับสัญญาณการเปลี่ยนแปลงซึ่ง จะอยู่ในรูปของอิเล็กตรอนที่จะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตัวอย่างได้ โดยกระแส อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะใช้เป็นสัญญาณชี้แนะ (indicate signal) ที่ใช้ในการบ่งบอกปริมาณสารตัวอย่าง ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ (Eggins, 1996) สำหรับไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดสารฆ่าแมลงนั้น จะใช้เอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง ต่อสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphated insecticide) และคาร์บาเมต (carbamate insecticide) มาตรึงบนพื้นผิวอิเล็กโทรดของทรานสดิวเซอร์ โดยการตรึงเอนไซม์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การดูดซับ (adsorption) การกักเก็บ (entrapment) การเชื่อมขวาง (cross linking) เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนการตรึงเอนไซม์เป็นขั้นตอนที่สำคัญเพราะจะส่งผลกระทบต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นควรเลือกใช้วิธีที่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด ซึ่ง พบว่าเทคนิคการตรึงเอนไซม์แรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุ (electrostatic interaction) ระหว่างวัสดุ ตรึงและเอนไซม์เป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีสภาวะในการตรึงที่ไม่รุนแรงทำให้เอนไซม์ สูญเสียกิจกรรมระหว่างการตรึงรูปน้อย วิธีการเตรียมง่าย รวดเร็ว และไม่ส่งผลกระทบต่อ ความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสารตั้งต้น (Bailey และ Ollis, 1986) นอกจากการเลือกวิธีการตรึงที่ ดีแล้วยังต้องคำนึงถึงวัสดุที่จะนำมาใช้ในการตรึงร่วมกับเอนไซม์ ซึ่งต้องมีคุณสมบัติที่สามารถเข้า กับเอนไซม์ได้ดี โดยวัสดุที่นิยมใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ตัวอย่างเช่น พอลิเมอร์ เส้นใย วัสดุพอร์ซันชนิด ต่างๆ ซึ่งวัสดุเหล่านี้จะช่วยเพิ่มพื้นที่ในการยึดเกาะ และป้องกันการชะล้างของเอนไซม์ออกจากอิเล็ก โทรดได้ สำหรับงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้วัสดุรูพรุนประเภทเมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica) ที่มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2-50 นาโนเมตร (Mellini, 2005) เนื่องจากมีขนาดที่เหมาะสมและ สอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่มีขนาดของโมเลกุลประมาณ 4.5 x 6.0 x 6.5 นาโนเมตร (Milkani และคณะ, 2011)

โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาการสังเคราะห์วัสดุรูพรุนประเภทเมโซพอร์ซิลิกา ชนิดเมโซ เซลลูลาร์โฟมซิลิกา (mesocellular foams silica, MCF) มาใช้ในการตรึงเอนไซม์เอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อใช้สร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง ซึ่งข้อดีของวัสดุนี้คือ เมื่อตรึงเอนไซม์รูพรุนของวัสดุ MCF นี้มันจะช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์จากสภาวะแวดล้อม ภายนอกได้ดี ทั้งค่า pH อุณหภูมิ หรือความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ไม่เหมาะสม แต่ก็มีข้อด้อยที่ต้อง คำนึงถึงคือ เรื่องของคุณสมบัติการส่งผ่านกระแสอิเล็กตรอนเนื่องจากวัสดุ MCF ไม่นำไฟฟ้า ดังนั้นจึง มีการประยุกต์ใช้ออนุภาคทองคำขนาดนาโน (gold nanoparticles, AuNPs) มาสังเคราะห์ร่วมกับ MCF โดยจะสังเคราะห์ไว้ภายในรูพรุนของ MCF ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการตรึงเอนไซม์เพื่อช่วยปรับปรุงเรื่อง ของการส่งผ่านกระแสอิเล็กตรอนที่จะเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นไปยัง

ผิวหน้าของอิเล็กโทรดให้ดีขึ้น ซึ่งวิธีการสังเคราะห์วัสดุ MCF/AuNPs จะใช้วิธีอัลตราโซนิกเคชัน (ultrasonication) โดยสารตั้งต้นของทองคือ กรดคลอโรออร์ริก (chloroauric acid, HAuCl_4) ซึ่งจะนำ MCF ลงไปแช่เพื่อให้ไอออนทองคลอไรด์ (AuCl_4^-) เกิดการยึดเกาะบนพื้นผิวของ MCF จากนั้นทำการรีดิวซ์ให้ไอออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) จาก AuCl_4^- ให้เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) เกาะบนพื้นผิวรูพรุนของ MCF โดยสารที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์คือ ไฮโดรเจนพรีเรดิคัลส์ (hydrogen radicals, H^\cdot) และไฮดรอกซิลพรีเรดิคัลส์ (hydroxyl radical, OH^\cdot) ที่เกิดจากการแตกตัวของฟองอากาศในน้ำหลังป้อนคลื่นความถี่ขนาด 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ในกระบวนการอัลตราโซนิก เป็นระยะเวลา 120 นาที (Chen และคณะ, 2001) ซึ่งวัสดุ MPS/AuNPs ที่สังเคราะห์ได้จะนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ และประกอบเข้ากับผิวหน้าของอิเล็กโทรดโดยใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติ นั่นคือ ไคโตซาน (chitosan) เป็นตัวช่วยในการยึดประสาน เนื่องจากมันมีคุณสมบัติที่สามารถเข้ากับสารชีวภาพได้ดี (biocompatibility) ไม่เป็นพิษ (low toxicity) การเตรียมง่าย ราคาไม่แพง และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีหมู่เอมีน (amine group) ซึ่งสามารถยึดเกาะกับหมู่อัลคิล (alkyl group) ของเอนไซม์ได้ดีอีกด้วย (Rinaudo และคณะ, 2006) ซึ่งไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นนี้จะนำไปใช้วัดสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไธออน (methyl parathion) และสารฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตคือ เมโทมิล (metjomyI) โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัด และปรับปรุงเสถียรภาพของเอนไซม์ ทั้งในแง่ของประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา และการเก็บรักษา เพื่อนำไปใช้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลงอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการสร้างไบโอเซนเซอร์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง โดยใช้วัสดุสังเคราะห์เมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง มาใช้สำหรับตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ใช้วัสดุสังเคราะห์ของ เมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง MCF/AuNPs composite) มาใช้ในการตรึงเอนไซม์ AChE ด้วยวิธีดูดซับด้วยแรงทางประจุ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffe) ที่ค่า pH 6.0
2. ศึกษาผลของวัสดุ MCF อนุภาคนาโนทอง (AuNPs) วัสดุ APTS และไคโตซาน (Chitosan) เมื่อนำมาใช้ดัดแปลงอิเล็กโทรดแบบ (screen-printed carbon electrode, SPCE) ต่อพฤติกรรมการตอบสนองทางไฟฟ้าเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์

โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ในระบบวัดที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9 และที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์เข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ป้อนศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.2 ถึง 1.0 โวลต์ อัตราการสแกน 10 มิลลิโวลต์ต่อวินาที และทำการเปรียบเทียบผลระหว่าง

- 2.1 SPCE เปล่าๆ
- 2.2 SPCE/chitosan
- 2.3 AChE/MCF/chitosan
- 2.4 AChE/MCF/APTS/chitosan
- 2.5 SPCE/MCF/APTS/AuNPs/chitosan
- 2.6 SPCE/MCF/AChE/chitosan ไบโอเซนเซอร์
- 2.7 AChE/MCF/APTS/AChE/chitosan ไบโอเซนเซอร์
- 2.8 AChE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/chitosan ไบโอเซนเซอร์

แล้วเลือกชนิดของอิเล็กโทรดไบโอเซนเซอร์ที่ดีที่สุดเพื่อนำไปใช้วัดสารฆ่าแมลงต่อไป

3. ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการวัดของไบโอเซนเซอร์ (ที่เลือกใช้หลังจากการศึกษาในหัวข้อที่ 2)
 - 3.1 หาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับระบบวัด
 - 3.2 หาคความเข้มข้นของสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ที่เหมาะสม
 - 3.3 หาระยะเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง (incubation time) ที่เหมาะสม
4. ทดสอบประสิทธิภาพในการวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรธอน และเมโทมิล ของไบโอเซนเซอร์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อที่ 3
 - 4.1 หาช่วงของความเข้มข้น (linear range) และ ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (detection limit)
 - 4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของการใช้งานของไบโอเซนเซอร์หลังจากทำการเก็บรักษา (Storage stability) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในรูพรุนของวัสดุสังเคราะห์ MCF/AuNPs จะช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปให้มีการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ดี และช่วยเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปให้เกิดสูญเสียน้อยลง

2. เมื่อนำวัสดุสังเคราะห์ MCF/AuNPs มาใช้ตรึงเอนไซม์ในงานไบโอเซนเซอร์ ก็จะช่วยให้เครื่องมือตรวจวัดมีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ที่ตรึงในวัสดุสังเคราะห์นี้จะมีเสถียรภาพที่ดีอยู่ถึงแม้จะถูกเก็บรักษาเป็นเวลานาน
3. ได้ไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพในการวัดสารฆ่าแมลงเมทิล พาราธอน และเมโทมิล

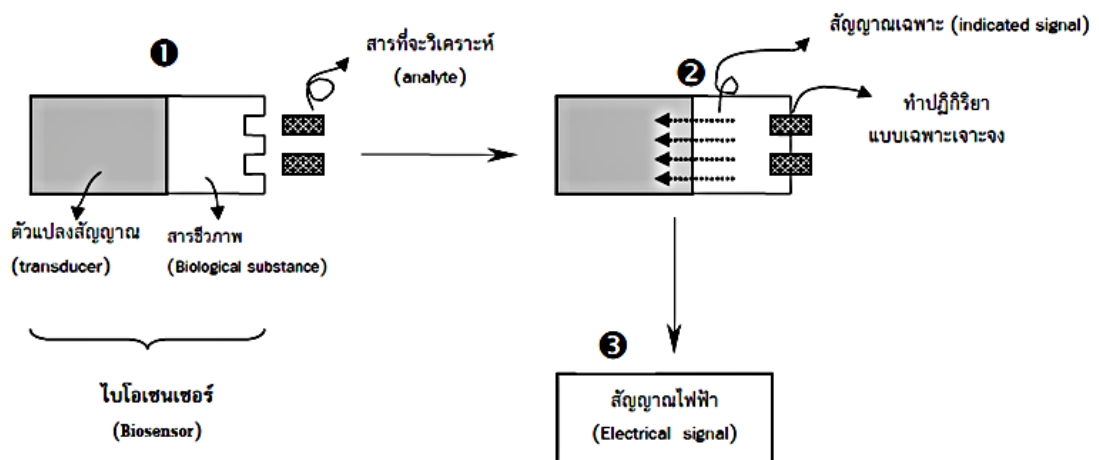
บทที่ 2

ทฤษฎี

ในบทนี้จะกล่าวถึงนิยาม และหลักการในการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง โดยทำการรวบรวมข้อมูลตั้งแต่ชนิดของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารฆ่าแมลงนั้นคือ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และวัสดุที่จะนำมาใช้ตรึงร่วมกับเอนไซม์ ทั้งเมโซพอร์ซิลิกา อนุภาคนาโนทอง และโคโตซาน ซึ่งจะมีการกล่าวถึงวิธีการในการสังเคราะห์วัสดุเหล่านี้ รวมทั้งคุณสมบัติที่ดีที่ช่วยเสริมประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์เมื่อนำวัสดุเหล่านี้มาประยุกต์ใช้งาน

2.1 ไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดและวิเคราะห์หาปริมาณสาร โดยใช้หลักการทางเคมีและชีวเคมี ซึ่งจะอาศัยสารทางชีวภาพ (biological substances) ที่มีความจำเพาะเจาะจงและว่องไวทางปฏิกิริยาต่อสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ มาทำการตรึงเพื่อติดเข้ากับส่วนของตัวตรวจจับ หรือทรานสดิวเซอร์ (transducer) ที่จะทำหน้าที่ในการรับและแปลงสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารทางชีวภาพนั้นกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ สัญญาณที่เกิดขึ้นอาจจะอยู่ในรูปของ อีออน อิเล็กตรอน ความร้อน ก๊าซ หรือคุณสมบัติของมวลที่เปลี่ยนแปลงไป โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นนี้จะถูกแปลงให้อยู่ในรูปสัญญาณทางไฟฟ้า ซึ่งจะสามารถใช้เป็นดัชนีที่จะระบุถึงปริมาณของสารตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์ได้ กลไกการทำงานของไบโอเซนเซอร์ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (ปราณี, 2547)



รูปที่ 2.1 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์

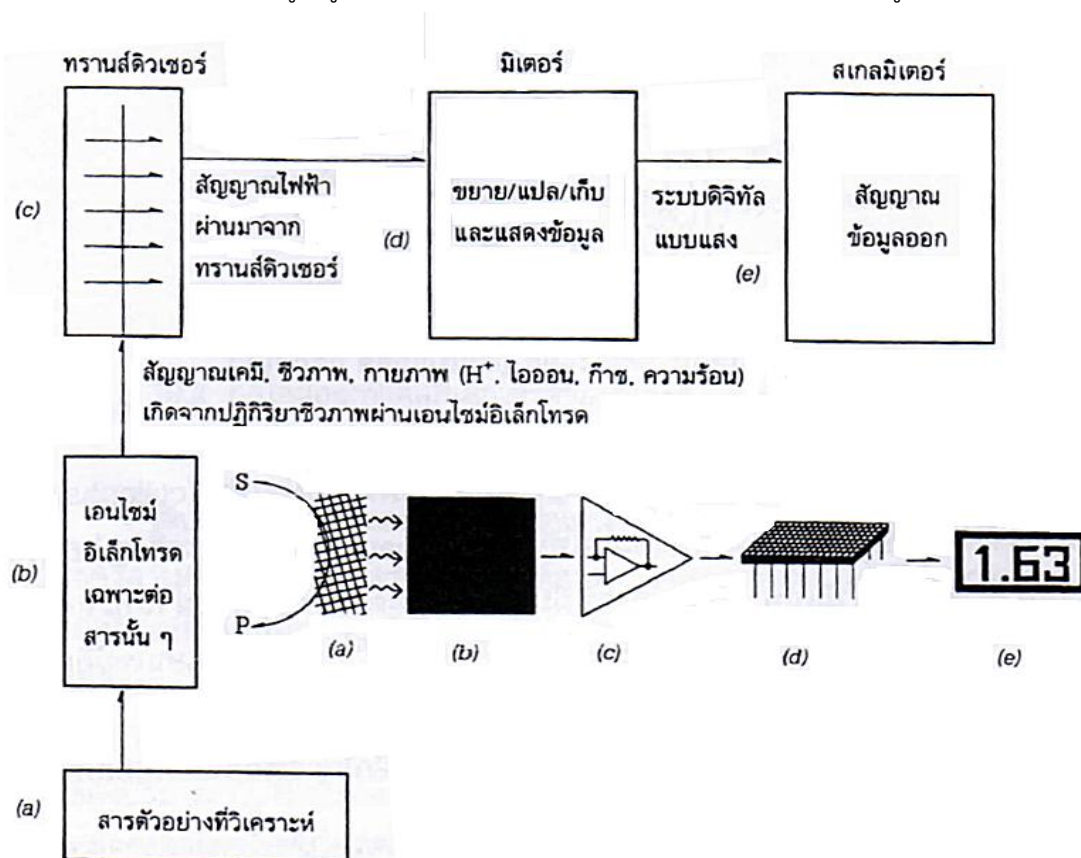
(ที่มา: <http://www.biotec.or.th/biotechnology-th/newsdetail.asp?id=2648>)

องค์ประกอบโดยทั่วไปของไบโอเซนเซอร์เมื่อแบ่งตามหน้าที่การทำงานจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. สารทางชีวภาพ (biological substances) เป็นสารที่ใช้ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสารทางชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ได้แก่ เอนไซม์ ฮอร์โมน แอนติบอดี จุลินทรีย์ และเนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ เป็นต้น โดยสารทางชีวภาพเหล่านี้จะก่อให้เกิดสัญญาณขึ้นเมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด ซึ่งสัญญาณที่เกิดขึ้นนั้นอาจจะอยู่ในรูปของอิออน อิเล็กตรอน ความร้อน ก๊าซ หรือคุณสมบัติของมวลที่เปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะถูกตรวจจับด้วยส่วนของทรานสดิวเซอร์

2. ทรานสดิวเซอร์ (transducer) เป็นเครื่องมือทางไฟฟ้าเคมี เป็นส่วนที่นำมาผนวกเข้ากับสารชีวภาพเพื่อทำหน้าที่ในการตรวจจับและรับสัญญาณที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ โดยสัญญาณที่ตรวจจับได้จะถูกแปลงให้อยู่ในรูปของสัญญาณทางไฟฟ้า โดยค่าสัญญาณทางไฟฟ้านี้จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์

3. ระบบแสดงผล (meter) เป็นหน่วยที่รับหน้าที่แปลสัญญาณและข้อมูลทางไฟฟ้าจากทรานสดิวเซอร์ ให้แสดงอยู่ในรูปแบบสัญญาณดิจิทัลที่สามารถอ่านค่าและนำข้อมูลไปใช้ได้ง่ายขึ้น



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไบโอเซนเซอร์ และความสัมพันธ์ของสัญญาณต่างๆ (ปราณี, 2547)

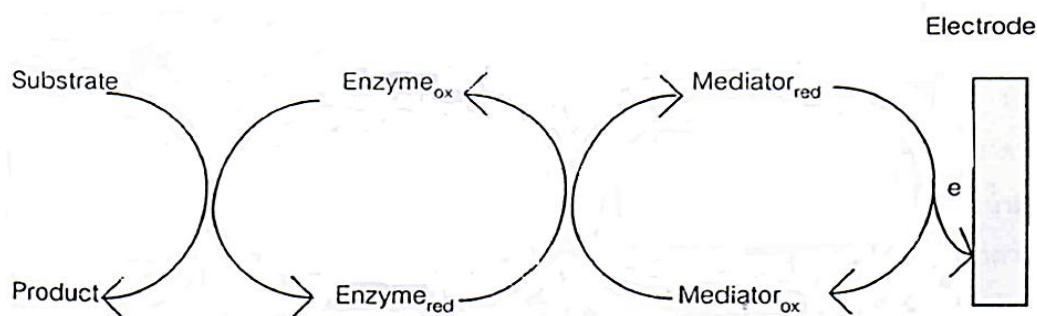
จากรูปที่ 2.2 อิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ (b) ที่มีเอนไซม์ที่มีเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (a) เมื่อนำอิเล็กโทรดนี้ไปจุ่มในสารละลายที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างนั้นแล้วทำให้เกิดสัญญาณซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของ สัญญาณทางเคมี ชีวภาพ ภายภาพ ซึ่งจะสามารถตรวจจับได้ด้วยทรานสดิวเซอร์ (c) แล้วแปลงสัญญาณออกมาในรูปของสัญญาณทางไฟฟ้า ส่งต่อไปยังส่วนของมิเตอร์ (d) ซึ่งจะขยาย/แปล/เก็บข้อมูล ซึ่งสามารถแสดงข้อมูลที่ได้จากการวัดออกมาในรูปแบบดิจิทัลแบบแสง ซึ่งแสดงออกมาเป็นค่าตัวเลข (e) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวัดนี้จะสัมพันธ์กับปริมาณของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

2.1.1 แอมเพโรเมตริกเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์ (Amperometric enzyme biosensors)

เป็นไบโอเซนเซอร์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยส่วนของสารชีวภาพเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตัวอย่างที่ต้องการจะตรวจวิเคราะห์ ตรงเข้ากับส่วนของทรานสดิวเซอร์ที่มีความสามารถในการตรวจจับสัญญาณการเปลี่ยนแปลงซึ่งอยู่ในรูปของอิเล็กตรอน ที่จะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตัวอย่าง โดยกระแสอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะใช้เป็นสัญญาณชี้้นำ (indicate signal) ในการบ่งบอกปริมาณสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ โดยแอมเพโรเมตริกเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์จะใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีที่ประกอบไปด้วยเซลล์ไฟฟ้าเคมีที่มี 3 ขั้ว คือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน working electrode (WE) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง reference electrode (RE) และขั้วไฟฟ้าช่วย auxiliary electrode (AE) การวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีสามารถทำได้โดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ควบคุมได้ แก่ขั้วไฟฟ้าทำงานของเซลล์ไฟฟ้าเคมี หรืออิเล็กโทรด ศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนให้นี้จะทำให้ขั้วไฟฟ้าทำงานมีศักย์ไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะมีผลทำให้สารที่ตรึงอยู่บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงานสามารถเกิดปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer reaction) นั่นคือมีการให้ หรือรับอิเล็กตรอน บนผิวหน้าของขั้วทำงานได้ ทำให้เกิดกระแสอิเล็กตรอนไหลผ่านขั้วทำงาน กระแสอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นนี้จะถูกตรวจวัดโดยวงจรอิเล็กทรอนิกส์ภายนอกซึ่งเป็นส่วนของทรานสดิวเซอร์ และถูกแปลงออกมาเป็นกระแสไฟฟ้าซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยา โดยกลไกในการทำงานสามารถสรุปและแสดงได้ดังรูปที่ 2.3

การถ่ายเทอิเล็กตรอนเกิดจากผลของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพออกซิไดซ์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น (substrate) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ (product) โดยกลไกนี้จะทำให้เอนไซม์กลายเป็นอยู่ในรูปรีดิวซ์เอนไซม์ซึ่งเป็นสถานะที่ไม่เสถียร จึงต้องมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนต่อไปอีกเพื่อให้เอนไซม์กลับไปอยู่ในสถานะของออกซิไดซ์เอนไซม์ดั้งเดิม โดยผ่านทางสารออกซิไดซ์ด้วยสารตัวกลาง (mediator) ซึ่งจะทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพรีดิวซ์ให้กลับสู่สถานะปกติอีกครั้ง และเมื่อทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าขนาดที่เหมาะสมที่ขั้วไฟฟ้าทำงานเทียบกับขั้วอ้างอิงจะทำให้ขั้วไฟฟ้าทำงานมีศักย์ไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไป

เหนี่ยวนำให้สารตัวกลางซึ่งอยู่ในสภาพรีดิวซ์ถูกออกซิไดซ์เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนเข้าสู่อิเล็กโทรด โดยกระแสอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าด้วยทรานส์ดิวเซอร์ซึ่งขนาดของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์



รูปที่ 2.3 ลำดับขั้นของการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสับสเตรทสู่อิเล็กโทรดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน - รีดักชันระหว่างเอนไซม์กับอิเล็กตรอน (พรพิมล ศรีทองคำ และคณะ 2538)

2.1.2 เทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า

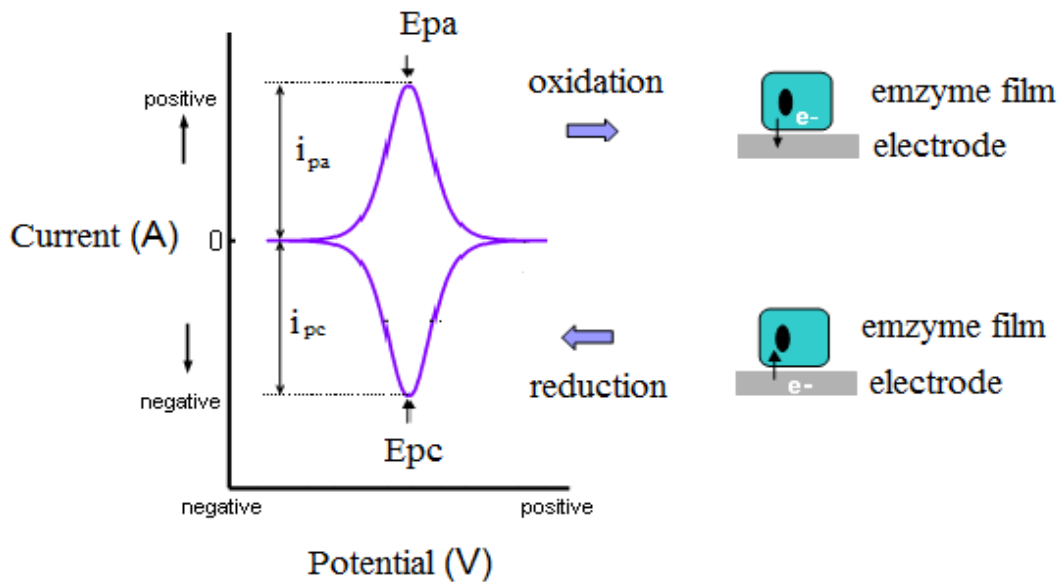
เทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้สำหรับเครื่องตรวจวัดไปโอเซนเซอร์ในงานวิจัยนี้มี 2 วิธี คือ ไชคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry, CV) และแอมเพอโรเมตรี (amperometry)

2.1.2.1 ไชคลิกโวลแทมเมตรี

ไชคลิกโวลแทมเมตรี เป็นการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีที่มีการป้อนศักย์ไฟฟ้าเป็นรอบระหว่างค่าสองค่าแก่อิเล็กโทรด ซึ่งจะทำให้ขั้วไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าไปเมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ทำให้สารบางชนิดที่อยู่รอบๆผิวหน้าของอิเล็กโทรดเกิดปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer reaction) บนผิวของขั้วไฟฟ้าทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านอิเล็กโทรด โดยกระแสที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจวัดได้โดยวงจรอิเล็กทรอนิกส์ภายนอก ซึ่งรูปแบบของสัญญาณที่วัดได้จากไชคลิกโวลแทมเมตรีแสดงดังรูป 2.4

จากรูปที่ 2.4 แสดงให้เห็นสัญญาณในรูปของกระแสซึ่งเกิดจากการป้อนศักย์ไฟฟ้าแบบไชคลิกโวลแทมเมตรี คือ จ่ายศักย์ไฟฟ้าเป็นรอบระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกสลับกับศักย์ไฟฟาลบ ซึ่งทำให้เกิดจุดยอดของกราฟซึ่งมีกระแสสูงสุด 2 จุด คือ จุดยอดของกราฟที่แสดงค่ากระแสสูงสุดที่เป็นบวก (anodic peak current, $i_{p,a}$) ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation peak) เมื่อจ่ายศักย์ไฟฟ้าบวก (anodic peak potential, $E_{p,a}$) และเมื่อทำการรีเวิร์สการสแกนจากศักย์ไฟฟ้าบวกเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบ (cathodic peak potential, $E_{p,c}$) จะทำให้เกิดจุดยอดของกระแสไฟฟ้าสูงสุดที่มีค่าเป็นลบ (cathodic peak current, $i_{p,c}$) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยารีดักชัน

(Reduction peak) สำหรับการนำวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์นั้นก็เพื่อใช้วัดหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงสุด จากการทดลองทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าระหว่างค่าสองค่า



รูปที่ 2.4 ลักษณะของสัญญาณที่วัดได้จากวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี

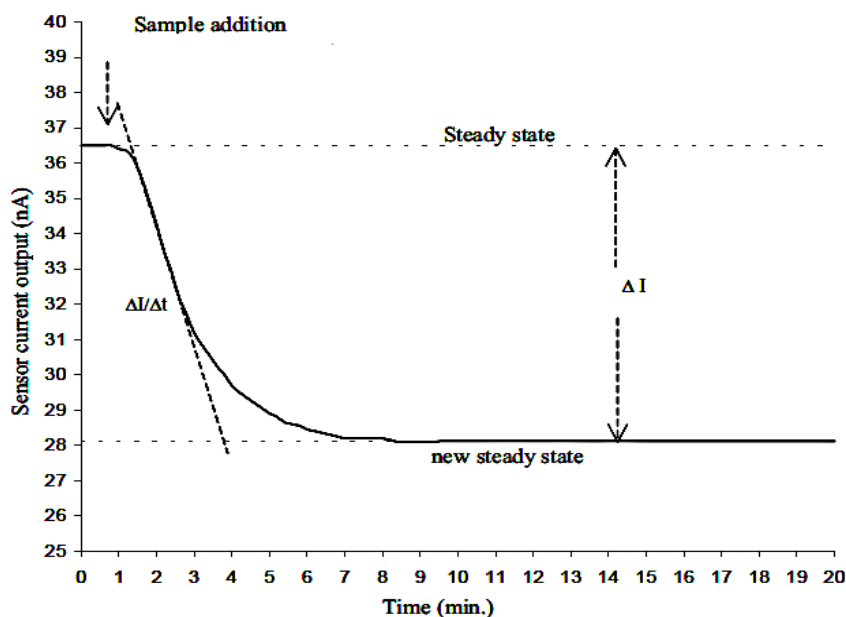
(ที่มา: <http://www.uea.ac.uk/~fea06cbu/techni/volt/volt.htm>)

2.1.2.2 แอมเพอโรเมตรี

แอมเพอโรเมตรี เป็นการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีที่มีการป้อนศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่เหมาะสมค่าหนึ่งซึ่งจะวัดออกมาในรูปของสัญญาณของค่ากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเวลาในขณะที่เกิดปฏิกิริยา สำหรับในงานไบโอเซนเซอร์จะมีการใช้วิธีนี้เพื่อหาปริมาณผลต่างของกระแสไฟฟ้า (ΔI) ซึ่งเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้า ณ จุดเริ่มต้นของระบบวัดที่ยังไม่มีการเติมสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด (sample addition) ลงไป ซึ่งจะวัดออกมาในรูปของกระแสไฟฟ้าเริ่มต้น (I_1) กับจุดที่มีการเติมสารตัวอย่างที่ต้องการที่จะตรวจวัดลงไปในระบบวัดจนเกิดสภาวะสมดุลใหม่ (new steady state) ซึ่งจะมีค่ากระแสไฟฟ้าเป็น (I_2) ค่าความต่างของกระแสไฟฟ้าแสดงดังสมการที่ 2.1 (Liu และ Mattiasson, 2002)

$$\Delta I = I_1 - I_2 \quad (2.1)$$

ซึ่งปริมาณผลต่างของกระแส (ΔI) ที่วัดได้จะสอดคล้องกับปริมาณของสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด โดยกลไกของการวัดแสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะของสัญญาณที่วัดได้จากวิธีแอมเพอโรเมตรีจากไบโอเซนเซอร์ (Liu และ Mattiasson, 2002)

2.1.3 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ (Performance factors)

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นเพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความสามารถในการทำงานของเครื่องมือวัดนี้ โดยคุณสมบัติพื้นฐานของเครื่องมือวัดที่ควรศึกษามีดังนี้

2.1.3.1 พิสัยเชิงเส้น (linear range)

พิสัยเชิงเส้น หมายถึง ความสามารถของเครื่องมือวัดในการวิเคราะห์สาร ที่จะทำ ให้ผลของการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องมือวัดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารที่ทำการ วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด โดยช่วงของ linear range สามารถหาได้จากการเขียนกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสาร (แกนนอน) โดยใช้สมการเส้นตรง ส่วน range จะหมายถึง ช่วงของความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุด ถึงความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยให้ค่าความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยงตรง (precision) อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องและยอมรับได้

2.1.3.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าได้ (Limit of detection, LOQ)

limit of detection หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ที่ ต่ำที่สุด ที่เครื่องมือวัดสามารถวัดค่าได้ โดยที่ค่าที่วัดได้ต้องมีความแม่นยำและความเที่ยง เป็นที่ยอมรับ โดยทั่วไป LOQ คือปริมาณสารที่ให้สัญญาณประมาณ 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

2.1.3.3 ความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity)

ความไวต่อการตอบสนอง เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ (response) ต่อการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้น (concentration) เพื่อดูความสามารถในการตอบสนองของเครื่องมือวัด โดยค่าความไวต่อการตอบสนองจะแสดงได้ด้วยค่าความชันของกราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่าง $R = f(c)$ หรือ $S = dR/dc$ กับ C เมื่อ R คือ ค่าของสัญญาณที่วัดได้ที่มีความสัมพันธ์กับ C ซึ่งคือค่าของความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ โดยจะได้กราฟเส้นตรง $R = kc$ ถ้ามีค่าความชันมากแสดงว่ามีความไวต่อการตอบสนองสูง (high sensitivity)

2.1.3.4 ความจำเพาะ (selectivity)

ความจำเพาะ หมายถึง ความสามารถในการวิเคราะห์สารที่ต้องการในตัวอย่างที่มีสารอื่นเจือปน โดยการศึกษาขึ้นเพื่อตรวจสอบผลกระทบของสารอื่นๆที่อาจมีผลรบกวนต่อการตรวจวัด โดยถ้าเครื่องมือวัดนี้สามารถวัดสารที่ต้องการตรวจวัดที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ก็จะสามารถกล่าวได้ว่าเครื่องมือวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสาร (specific) ที่ต้องการวิเคราะห์

2.1.3.5 การผลิตซ้ำ (reproducibility)

การผลิตซ้ำ หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยมักจะหาระดับความแม่นยำจากค่าเปอร์เซ็นต์ของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

2.1.3.6 เวลาการตอบสนอง (response time)

เวลาการตอบสนอง หมายถึง ระยะเวลาที่เครื่องมือวัดใช้ในการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าจากจุดเริ่มต้นของการวัดจนเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state)

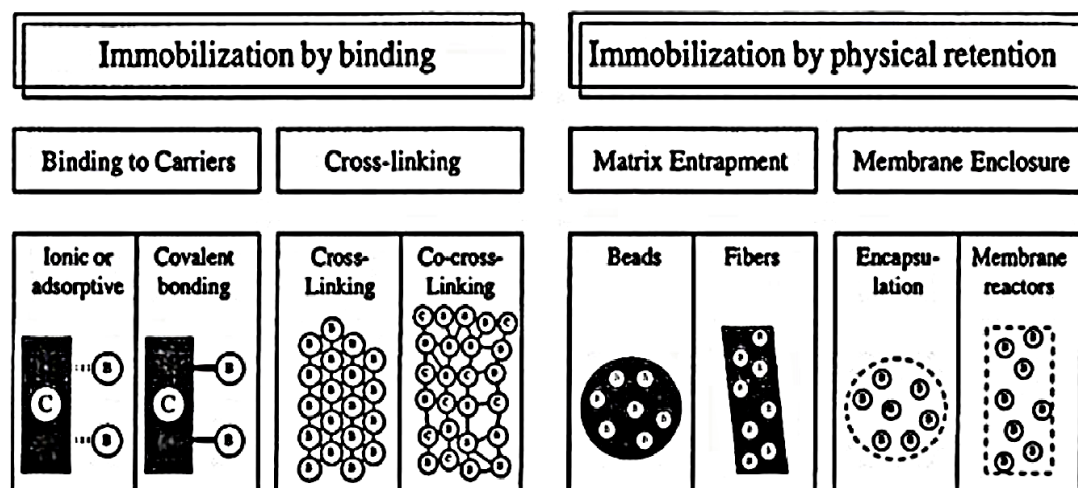
2.1.3.7 เสถียรภาพของการเก็บรักษา (storage stability)

เสถียรภาพของการเก็บรักษา หมายถึง การทดลองเก็บรักษาเครื่องมือวัด ในระยะเวลาหนึ่งจากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในส่วนของสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้ว่าจะมีความสามารถในการทำงานเปลี่ยนแปลงไปมากน้อยแค่ไหน ซึ่งโดยปกติสารชีวภาพที่ถูกตรึงและเก็บไว้เมื่อระยะเวลาผ่านไปก็จะเกิดการเสื่อมสภาพทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานลดลงซึ่งจะส่งผลให้เครื่องมือวัดวัดค่าได้คาดเคลื่อนจากความเป็นจริงมากขึ้น ดังนั้นการทดลองนี้จะทำเพื่อหาระยะเวลาที่เครื่องมือวัดยังสามารถวัดค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ หรืออายุการใช้งานของเครื่องมือวัด (life time) นั้นเอง

2.2 การตรึงรูปเอนไซม์

การตรึงรูปเอนไซม์เป็นการนำเอนไซม์ไปเกาะหรือฝังตัวอยู่ในวัสดุที่อยู่คนละวัฏภาคกับสารละลายปฏิกิริยา อาจทำได้โดยการเชื่อมด้วยพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี โดยการตรึงรูปเอนไซม์ทำเพื่อลดขีดจำกัดของเอนไซม์อิสระเช่น เอนไซม์อิสระไม่เสถียรและถ้าต้องการให้มีแอกทิวิตี (activity) สูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้งาน เอนไซม์อิสระอาจเสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมทั้ง pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสารละลายที่สูงหรือต่ำจนเกินไป โดยจากการทดลองตรึงเอนไซม์ในหลายกรณีพบว่าช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น ทั้งในแง่ของเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา (operating stability) เสถียรภาพในแง่ของการเก็บรักษา (storage stability) ที่เกี่ยวข้องกันโดยตรงกับเสถียรภาพต่อพลังงานภายนอก เช่น พลังงานความร้อน เป็นต้น แต่ข้อเสียที่พบโดยทั่วไปคือ การตรึงรูปเอนไซม์จะมีผลให้แอกทิวิตี หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำได้ช้าลง โดยอาจมีสาเหตุมาจากการสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอง หรือมาจากปัญหาในด้านการถ่ายเทมวลสารซึ่งเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการเกิดปฏิกิริยา

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์สามารถทำได้หลายวิธี แต่โดยทั่วไปแล้วจะแบ่งวิธีการตรึงออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ ประเภทแรกคือ การตรึงด้วยพันธะทางเคมี เช่น การยึดเหนี่ยวกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโคเวเลนต์ หรือการยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเคมีระหว่างเอนไซม์เอง (cross-linking) กระบวนการตรึงทางกายภาพ เช่นการดูดซับ และประเภทที่สองคือ การกักเก็บเอนไซม์ภายในวัสดุตรึง (physical retention) โดยการจัดจำพวกวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การจัดจำพวกวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ โดย B: เอนไซม์ C: วัสดุตรึง (Blanch และ Clark, 1997)

2.2.1 การตรึงเอนไซม์ด้วยการยึดเหนี่ยว (Immobilization by binding)

2.2.1.1 การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

เป็นการดูดซับเอนไซม์บนวัสดุตรึงโดยอาศัยการดูดซับด้วยแรงทางกายภาพ ซึ่งถือเป็นเทคนิคการตรึงเอนไซม์ที่ง่ายทำได้โดยการนำเอาสารละลายเอนไซม์ไปสัมผัสกับวัสดุตรึงที่ภาวะเหมาะสมทำให้เกิดกระบวนการย้ายวัฏภาคของเอนไซม์ไปยึดบนวัสดุตรึงที่เป็นของแข็ง วิธีการตรึงรูปโดยวิธีนี้จะไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างสามมิติและแอกทิวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีแรงจากพันธะเคมี แต่การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการนี้ก็ยังมีข้อเสีย คือ แรงยึดจับระหว่างเอนไซม์และวัสดุตรึงเป็นแรงอย่างอ่อนๆ ทำให้เกิดการหลุดของเอนไซม์จากวัสดุตรึงได้ง่าย ซึ่งอาจทำให้เกิดการสูญเสียเอนไซม์จากวัสดุตรึงได้ ตัวอย่างของวัสดุตรึงที่นำมาใช้ในการดูดซับ เช่น เจลแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate gel) ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ซิลิกาพอร์ (porous silica) อะลูมินา (alumina) และพอลิเมอร์ธรรมชาติ อาทิ แป้ง คอลลาเจน เป็นต้น (ปราณี อานเป็เรือง, 2547)

2.2.1.2 การเชื่อมด้วยแรงทางไอออน (Ionic binding method)

คือการตรึงโดยการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับวัสดุตรึงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยา โดยการใช้แรงทางไอออน การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ มีผลต่อแอกทิวิตีและโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์น้อย กรรมวิธีไม่ซับซ้อนจึงสะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ แต่ข้อเสียคือแรงยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับวัสดุตรึงอ่อน เอนไซม์จะหลุดง่ายที่ความเข้มข้นของไอออนสูง (ionic strength) หรือแรงเกาะจะลดลงเมื่อค่า pH เกิดการเปลี่ยนแปลง

2.2.1.3 การยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding method)

โมเลกุลของเอนไซม์ถูกยึดเหนี่ยวกับวัสดุตรึงโดยด้วยพันธะโคเวเลนต์เป็นการอาศัย หมู่ฟังก์ชันต่างๆ ของเอนไซม์เช่น หมู่อะมิโน คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล และซัลไฟไฮดริล ในการตรึง โดยอาศัยพันธะโคเวเลนต์กับวัสดุตรึงที่ต้องมีการปรับปรุงให้มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถยึดเกาะกับเอนไซม์ได้ โดยจะต้องมีการเติมหมู่ฟังก์ชันด้วยการทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางชนิด เช่น ไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr) และกลูเตอรัลดีไฮด์ (gluteraldehyde) เป็นต้น ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความแข็งแรงของการยึดเกาะของเอนไซม์กับวัสดุตรึงทำให้การหลุดของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ยาก แต่ข้อเสียคือ วิธีการตรึงแบบนี้อาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้ง่ายอันเนื่องมาจากการที่เอนไซม์ต้องทำปฏิกิริยาเคมีเพื่อสร้างพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งอาจจะส่งผลให้เอนไซม์มีแอกทิวิตีลดลง

2.2.1.4 การครอสลิงค์เอนไซม์ (Cross-linking)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จะอาศัยการเชื่อมโยงกันของโมเลกุลเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ของเอนไซม์กับหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีเชื่อมโยงต่อกันไปเรื่อยๆจนเกิดเป็นร่างแหของ

พอลิเมอร์ของเอนไซม์ ซึ่งเมื่อโมเลกุลของเอนไซม์มีขนาดใหญ่ขึ้นก็จะทำให้มันมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างของสารเคมีที่ใช้ใน การครอสลิงค์ เช่น กลูเตอรัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ไบซีไดอะโซเบนซิไดน์ (bisdiazobenzidine) และกรด 2,2 ไดซัลโฟนิค (2,2 disulfonic acid) เป็นต้น ข้อดีของวิธีนี้คือมีการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีทำให้มีความแข็งแรงเอนไซม์จึงหลุดออกจากกันได้ยาก แต่ผลจากการเชื่อมนี้อาจส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ และแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงได้ง่าย

2.2.2 การกักเก็บเอนไซม์ภายในวัสดุตรึง (Physical retention)

เป็นวิธีการกักเก็บเอนไซม์ที่ทำโดยการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในช่องว่างของตาข่าย (matrix) ของพอลิเมอร์ หรือห่อหุ้มเพื่อกักเก็บเอนไซม์ไว้ด้วยแผ่นเยื่อ (membrane) ที่ยอมให้สารซึมผ่านได้ แต่เอนไซม์ไม่สามารถหลุดลอดออกไปได้ เมทริกซ์ที่ใช้ในการกักเก็บเอนไซม์มักเป็นวัสดุประเภทพอลิเมอร์ทั้งพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น แคลเซียมอัลจิเนต (ca-alginate) วุ้น (agar) และคอลลาเจน (collagen) ไคโตซาน (chitosan) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิไพรรอล (polypyrrole) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) เป็นต้น การตรึงรูปเอนไซม์ไว้ในเมทริกซ์ของพอลิเมอร์สามารถทำได้โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปผสมกับสารละลายมอนอเมอร์ก่อน ทำการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน ซึ่งอาจใช้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมเป็นตัวกระตุ้น ซึ่งในระหว่างการก่อตัวของมอนอเมอร์เป็นพอลิเมอร์จะมีการดึงเอาเอนไซม์มากักเก็บไว้ภายในเมทริกซ์ของพอลิเมอร์ด้วย เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดลงจะเกิดเป็นพอลิเมอร์เจลที่ตรึงเอนไซม์กักเก็บไว้ภายใน

นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีวิธีการกักเก็บไว้ในแผ่นเยื่อ หรือในไมโครแคปซูล โดยการกักเก็บเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จะใช้แผ่นเยื่อที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้สามารถกักเก็บเอนไซม์ไว้ภายในได้โดยยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้แต่เอนไซม์จะไม่สามารถหลุดออกมาผ่านแผ่นเยื่อได้ วิธีนี้จึงมีข้อดีตรงช่วยลดปัญหาการหลุดของเอนไซม์จากวัสดุตรึงได้

โดยทั่วไปการเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์ต้องพิจารณาจากที่เหมาะสมกับงานซึ่งนอกจากนี้ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆประกอบด้วย เช่น ราคาค่าใช้จ่าย ระยะเวลาการใช้งานและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป เป็นต้น สำหรับการทดลองนี้จะเลือกใช้วิธีการตรึงเอนไซม์แบบการเชื่อมด้วยพันธะไอออนเนื่องจากจุดประสงค์หลักของงานเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน และยืดอายุการเก็บรักษาของไบโอเซนเซอร์ ซึ่งวิธีการตรึงด้วยพันธะไอออนนี้ จะทำให้เอนไซม์ไม่เกิดการสูญเสียแอกติวิตี และยังเป็นวิธีที่สามารถเตรียมได้ง่าย และมีค่าใช้จ่ายไม่สูง ซึ่งสามารถพิจารณาเทียบกับวิธีการตรึงแบบอื่นๆได้ดังตารางที่ 2.1

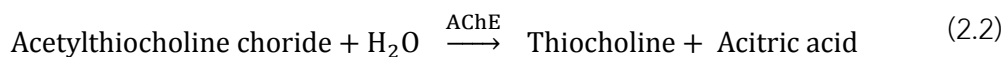
ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ (Bailey และ Ollis, 1986)

| วิธีการตรึงเอนไซม์ | | | | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------|
| สมบัติ | วิธีการดูดซับทางกายภาพ | วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออน | วิธีการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ | วิธีการครอส-ลิงค์เอนไซม์ | วิธีการกักเก็บ |
| การเตรียม | ง่าย | ง่าย | ยาก | ยาก | ยาก |
| แอกทิวิตีของเอนไซม์ | ต่ำ | สูง | สูง | ปานกลาง | สูง |
| ความจำเพาะต่อสับสเตรท | ไม่เปลี่ยน | ไม่เปลี่ยน | เปลี่ยนได้ | เปลี่ยนได้ | ไม่เปลี่ยน |
| แรงเชื่อมพันธะกับวัสดุตรึง | อ่อน | ปานกลาง | แข็งแรง | แข็งแรง | ไม่มี |
| การนำวัสดุตรึงกลับมาใช้ใหม่ | ได้ | ได้ | ไม่ได้ | ไม่ได้ | ไม่ได้/น้อย |
| การนำไปใช้ทั่วไป | ได้ต่ำ | ได้ปานกลาง | ได้ปานกลาง | ได้ต่ำ | ได้สูง |
| ค่าใช้จ่าย | ถูก | ถูก | แพง | ปานกลาง | ถูก |

2.3 เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase enzyme)

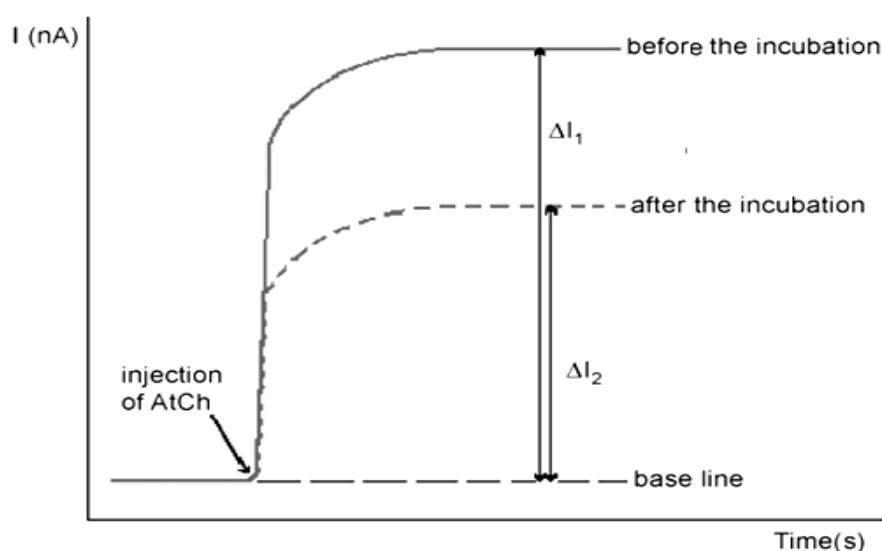
อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE, EC 3.1.1.7) เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากปลาไหลไฟฟ้า มีลักษณะโครงสร้างเป็นโปรตีนที่มีรูปร่างกลมหรือรี (globular protein) มีขนาดของโมเลกุลประมาณ 45 x 60 x 65 อังสตรอม (Milkani และคณะ, 2011) มีน้ำหนักโมเลกุล 280 กิโลดาลตัน และมีจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) เท่ากับ 5.5 เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จะมีคุณสมบัติในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของสารอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ (acetylthiocholine chloride) ให้เกิดเป็นไทโอโคลีน (thiocholine) และกรดอะซิติก (acetic acid) ตามสมการปฏิกิริยาที่ 2.2 โดยเราสามารถตรวจสอบกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ โดยใช้หลักการวัดทางไฟฟ้าเคมีของแอมเพอโรเมตริกเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์ โดยสารไทโอโคลีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนี้ สามารถถูกออกซิไดซ์บนผิวหน้าของอิเล็กโทรดได้เมื่อทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่เหมาะสมค่าหนึ่งเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ซึ่งปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากการวัดด้วยแอมเพอโรเมตริกเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์นี้จะสัมพันธ์โดยตรงกับ

ความเข้มข้นของอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา ตามสมการการเกิดปฏิกิริยา ที่ 2.3 (Pundir และ Chauhan, 2012)



นอกจากนี้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสยังมีคุณสมบัติที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus) และคาร์บาเมต (carbamates) ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงที่มีการใช้ในปริมาณมากในภาคการเกษตร โดยสารฆ่าแมลงสองกลุ่มนี้สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ จึงได้มีการนำเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในการสร้างเครื่องมือวัดที่เรียกว่า อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง

โดยการทำงานของเครื่องมือวัดนี้ก็มีหลักการเช่นเดียวกับไบโอเซนเซอร์ชนิดอื่นๆทั่วไป คืออาศัยปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนอิเล็กโทรดกับซับสเตรทเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณความเข้มข้นของสารที่ทำการตรวจวัด โดยในกรณีของการตรวจวัดสารฆ่าแมลงก็จะพิจารณาจากผลต่างของกระแสไฟฟ้าก่อนและหลังการเติมสารฆ่าแมลงลงไปในระบบวัด ซึ่งจะทำให้เกิดผลแสดงตามรูปที่ 2.7 (Hildebrandt และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.7 สัญญาณการตอบสนองในรูปกระแสไฟฟ้าต่อระยะเวลา ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ก่อนเติมสารฆ่าแมลง (before the incubation) และหลังการเติมสารฆ่าแมลง (after the incubation) (Hildebrandt และคณะ, 2008)

จากรูปที่ 2.6 ซึ่งแสดงลักษณะสัญญาณการตอบสนองของเครื่องมือวัด ทั้งก่อนเติมสารฆ่าแมลง (before the incubation) ที่มีค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ (ΔI_1) และหลังการเติมสารฆ่าแมลง (after the incubation) ที่มีกระแสไฟฟ้าลดลงเป็น (ΔI_2) ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์อะซิทีวโคลินเอสเทอเรสถูกยับยั้งการทำงาน (inhibition) จากสารฆ่าแมลงที่เติมลงไป เราสามารถคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง (% inhibition) การทำงานของเอนไซม์นี้ได้จากสมการที่ 2.4

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\Delta I_1 - \Delta I_2}{\Delta I_1} \times 100 \quad (2.4)$$

โดยค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นสารฆ่าแมลงที่เติมลงไปในระบบวัด นั่นคือสามารถใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเป็นดัชนีที่จะใช้บ่งบอกปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่เติมลงไปในระบบวัดได้ กล่าวคือ ถ้าความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่ตรวจวัดมีความเข้มข้นมากก็จะแสดงค่า % inhibition จากเครื่องมือวัดมากสอดคล้องกัน

2.4 วัสดุเมโซพอร์ซิลิกา (Mesoporous silica materials)

พอร์ซิลิกา (porous silica) เป็นวัสดุอนินทรีย์สังเคราะห์มีลักษณะของโครงสร้างเป็นรูพรุนที่เป็นระเบียบและค่อนข้างสม่ำเสมอ มีพื้นที่ผิวสูงถึง 1,000 ตารางเมตรต่อกรัม และมีปริมาตรรูพรุนสูงประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม (Hoffmann และคณะ, 2006) โดยสามารถแบ่งประเภทของพอร์ซิลิกาจากขนาดของรูพรุนตามระบบ IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) ออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้คือ ไมโครพอร์ (micropore) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนน้อยกว่า 2 นาโนเมตร เมโซพอร์ (mesopore) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2 ถึง 50 นาโนเมตร และมาโครพอร์ (macropore) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนมากกว่า 50 นาโนเมตร ซึ่งวัสดุพอร์ซิลิกาที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นตัวรองรับตัวเร่งปฏิกิริยาในอุตสาหกรรม, ใช้เป็นวัสดุในการดูดซับเพราะมีพื้นที่ผิวสูง มีคุณสมบัติในการคัดขนาดและรูปร่าง (size and shape selectivity) ของโมเลกุล ทำให้เป็นวัสดุที่มีความสามารถในการดูดซับสารได้ดี ในทางการแพทย์เช่น มีการทดลองตรึงเอนไซม์อะซิทีวโคลินเอสเทอเรส ในวัสดุซิลิกาเพื่อช่วยในเรื่องการคัดเลือกสารที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์สำหรับการบำบัดโรคทางระบบประสาท (วราภรณ์ บุรณานนท์, 2009) และมีการนำมาใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ในงานไบโอเซนเซอร์ เป็นต้น

เนื่องจากพอร์ซิลิกามีโครงสร้างที่เป็นลักษณะรูพรุนสม่ำเสมอเป็นระเบียบ มีพื้นที่ผิวสัมผัสและปริมาตรรูพรุนสูงทำให้สามารถบรรจุสารต่างๆได้ในปริมาณมาก จึงมีการนำมาใช้ในการตรึง

เอนไซม์เพื่อช่วยให้เอนไซม์มีความคงตัว สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และสามารถต้านทานการสลายโดยธรรมชาติจาก ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ หรือแม้กระทั่งความเข้มข้น สำหรับวัสดุพอร์สซิลิกาที่นิยมนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ส่วนใหญ่คือคือ เมโซพอร์ (mesopore) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2-50 นาโนเมตร เนื่องจากมีขนาดที่เหมาะสมและสอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่มีขนาดระหว่าง 2-20 นาโนเมตร (Takahashi, 2000)

2.4.1 การสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา (The synthesis of mesoporous silica)

วิธีการในการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆคือ เคมีไมเซลล์ (micelle chemistry) กระบวนการโซล-เจล (sol-gel process) และการอบแห้ง การเผาที่อุณหภูมิสูง (drying and calcination) (อรอนงค์ จุลพันธ์ และคณะ, 2011) โดยมีองค์ประกอบของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ที่สำคัญ 3 ส่วน คือ

1. สารอนินทรีย์ (Inorganic materials) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้สารที่เป็นแหล่งของซิลิกา เช่น เตตระเอทิลออร์โทซิลิเกต (tetraethyl orthosilicate, TEOS) โซเดียมซิลิเกต (sodium silicate) เป็นต้น

2. สารกำหนดโครงสร้าง (Structure-directing agents) ทำหน้าที่คล้ายเป็นแม่พิมพ์ในการสร้างโครงสร้างรูพรุนของเมโซพอร์ซิลิกา เช่น พลูโรนิค พี123 (pluronic P123) ซิติลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromine, CTBA) โซเดียมโดเดซิลซัลโฟเนต (sodium dodecyl sulfonate, SDS) เป็นต้น

3. ตัวทำละลาย (solvent) เช่นน้ำ เอทานอล เป็นต้น

การสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกาขั้นตอนแรกเริ่มจากการละลายสารกำหนดโครงสร้างเช่น พลูโรนิค พี123 (pluronic P123) ลงในตัวทำละลายที่อาจใช้เป็นน้ำหรือเอทานอลที่มีสภาพขั้ว โดยโมเลกุลของสารกำหนดโครงสร้างนั้นจะเกาะกันเป็นกลุ่ม ซึ่งโมเลกุลที่มีขั้วจะเกาะกันล้อมรอบโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว เกิดเป็นกลุ่มโครงสร้างรูปทรงกลม ทรงกลมรี หรือแบบแท่ง ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารกำหนดโครงสร้างที่ละลายในตัวทำละลาย ขั้นตอนนี้เรียกว่า เคมีไมเซลล์ ขั้นตอนที่ต่อไปเป็นการเติมสารโครงสร้างหลักซึ่งเป็นแหล่งของซิลิกาเช่น เตตระเอทิลออร์โทซิลิเกต (tetraethyl orthosilicate, TEOS) สารโครงสร้างหลักนี้จะไปเกาะกับสารกำหนดโครงสร้าง ขั้นตอนนี้เรียกว่า กระบวนการโซลเจล โดยในกระบวนการนี้เริ่มจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ทำให้เกิดอนุภาคที่เป็นของแข็งขนาดเล็กที่เรียกว่า โซล (sol) ซึ่งอนุภาคเหล่านี้จะเกิดการรวมตัวกัน เกิดเป็นโครงข่ายโดยผ่านกลไกแบบคอนเดนเซชัน (condensation polymerization) เกิดเป็นลักษณะเจล (gel) ที่มีสมบัติระหว่างของแข็งและของเหลว จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนสุดท้ายคือนำเจลที่ได้ไปอบแห้งและเผา (drying and calcination) ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 500 องศาเซลเซียส

ขึ้นไป ภายใต้บรรยากาศออกซิเจน หรืออากาศ เพื่อเป็นการกำจัดสิ่งเจือปน เช่น น้ำ ไอออนบวกและไอออนลบต่างๆที่ไม่เสถียร รวมทั้งสารกำหนดโครงสร้างซึ่งเป็นสารประเภทอินทรีย์ เมื่อโดนความร้อนสูงก็จะเกิดการสลายตัวออกไป ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างรูพรุนของสารอนินทรีย์ซึ่งก็คือ เมโซพอร์สซิลิกานั่นเอง

ในการสังเคราะห์เมโซพอร์สซิลิกานั้นจะมีหลักการในการสังเคราะห์แบบเดียวกัน ซึ่งได้อธิบายไว้ในหัวข้อ แต่จะมีข้อแตกต่างกันตรงการเลือกสารโครงสร้าง สารที่ใช้เป็นแหล่งของซิลิกา สารละลาย และสภาวะ (condition) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ซึ่งจะทำให้วัสดุเมโซพอร์สซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีคุณสมบัติที่ต่างกัันดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของวัสดุเมโซพอร์สซิลิกา

| อ้างอิง | ชนิด | สารกำหนดโครงสร้าง | สารแหล่งของซิลิกา | ตัวเร่งปฏิกิริยา | Surface area (m ² /g) | Pore size (nm) | Pore volume (cm ³ /g) |
|------------------------|--------|------------------------|-------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------------------------|
| วีโลวรรณ และคณะ (2009) | MCM-41 | CTBA | TEOS | NaOH | 888 | 3.20 | 0.84 |
| | SBA-15 | pluronic P123 | TEOS | HCl | 798 | 5.40 | 1.06 |
| | MCF | pluronic P123+TMB | TEOS | HCl | 618 | 14.60 | 1.60 |
| Pandya et al., (2004) | MCM-41 | CTBA | SiO ₂ | H ₂ SO ₄ | 1194 | 2.65 | 0.98 |
| | SBA-15 | pluronic P123 | TEOS | HCl | 801 | 6.42 | 1.12 |
| | MCF | pluronic P123+TMB | TEOS | HCl | 840 | 15.30 | 1.16 |
| Orita et al., (2012) | MCM-41 | CTBA+pluronic P123 | TMOS + TEOS | NH ₃ + H ₂ O | 1174 | 2.70 | 1.10 |
| | SBA-15 | CTBA+pluronic P123 | TMOS + TEOS | NH ₃ + H ₂ O | 656 | 9.50 | 1.30 |
| | MCF | CTBA+pluronic P123+TMB | TMOS + TEOS | NH ₃ + H ₂ O | 618 | 22.50 | 2.30 |

หมายเหตุ CTBA คือ ซิติลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyltrimethyl ammonium bromine)

TMB คือ 1,3,5-trimethylbenzene และ TEOS คือ เตตระเอทิลอโทซิลิเกต (Tetraethyl orthosilicate)

2.4.2 การตรึงเอนไซม์บนเมโซพอร์ซิลิกา (Enzyme immobilization on mesoporous materials)

เอนไซม์อิสระ (free enzyme) จะมีสมบัติความเลือกเฉพาะ และความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงภายใต้สภาวะปกติ แต่เมื่อสภาวะแวดล้อมรอบเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป เช่น ภายใต้อุณหภูมิสูงหรือ pH ที่ไม่เหมาะสม เอนไซม์จะถูกยับยั้งกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาได้อย่างง่ายดาย เนื่องจากการสภาวะที่ไม่เหมาะสมเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) หรือโครงสร้างสามมิติจำเพาะ (specific conformation) ของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง ซึ่งหนึ่งในวิธีการในการแก้ปัญหาเหล่านี้คือ การตรึงเอนไซม์บนพื้นผิวที่เป็นของแข็ง เพื่อให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น (Lee และคณะ, 2009)

ในอดีตการตรึงเอนไซม์จะตรึงบนวัสดุรองรับ (support) ที่เป็นของแข็ง โดยเฉพาะการตรึงบนซิลิกาเจล (Livage และคณะ, 2001) แต่ก็มีข้อเสียเพราะขนาดรูพรุนของซิลิกาเจลมีขนาดเล็กและไม่สม่ำเสมอ ซึ่งแตกต่างจากวัสดุเมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica, MPS) ที่มีลักษณะของรูพรุนที่สม่ำเสมอและมีขนาดรูพรุน 2-50 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ที่มีขนาดระหว่าง 2-20 นาโนเมตร (Takahashi, 2000) นอกจากนี้พื้นผิวยังมีคุณสมบัติที่สามารถเข้ากับสารชีวภาพได้ดี (biocompatibility) ไม่มีความเป็นพิษ (low cytotoxicity) มีพื้นที่สำหรับการตรึงเอนไซม์มาก (large surface areas) และง่ายต่อการปรับปรุงพื้นผิว (easy functionalization) เนื่องจากพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาประกอบไปด้วยหมู่ซิลานอลเป็นส่วนใหญ่ (silanol groups, Si-OH)

ในการตรึงเอนไซม์บนวัสดุเมโซพอร์ซิลิกานั้นสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่ง่าย และมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการน้อยก็คือ การตรึงเอนไซม์โดยอาศัยการดูดซับ (adsorption method) ซึ่งจะอาศัยแรงยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับเมโซพอร์ซิลิกาในแบบต่างๆ เช่น แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ (electrostatic interaction), แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic interaction) แรงพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

2.4.2.1 แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ (Electrostatic interaction)

เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ที่ทำได้ง่าย โดยอาศัยความต่างศักย์ของประจุที่ตรงข้ามกันระหว่างประจุของซิลิกากับเอนไซม์ โดยลักษณะทางประจุของทั้งซิลิกา และเอนไซม์สามารถปรับเปลี่ยนได้เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึง โดยจะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลาย ซึ่งเป็นตัวแปรหลักที่ต้องพิจารณาร่วมกับค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) ของทั้งเมโซพอร์ซิลิกาและเอนไซม์ โดยหลักการในการพิจารณาความเป็นประจุของสารคือ ถ้าสารนั้นมีค่า pI น้อยกว่าค่า pH ของสารละลายแล้ว มันจะแสดงลักษณะประจุที่เป็นลบ แต่ถ้าสารนั้นมีค่า pI มากกว่าค่า pH ของสารละลายแล้ว มันจะแสดงลักษณะประจุที่เป็นบวก (Lee และคณะ,

2009) ซึ่งโดยทั่วไปค่า pI ของซิลิกาที่มีค่าประมาณ 2 ส่วนเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีค่า pI มากกว่า 2 เมื่อเลือกค่า pH ที่เหมาะสมในการตรึงเมโซพอร์ซิลิกากับเอนไซม์ก็จะมีประจุที่ตรงข้ามกันและสามารถดึงดูดกันได้

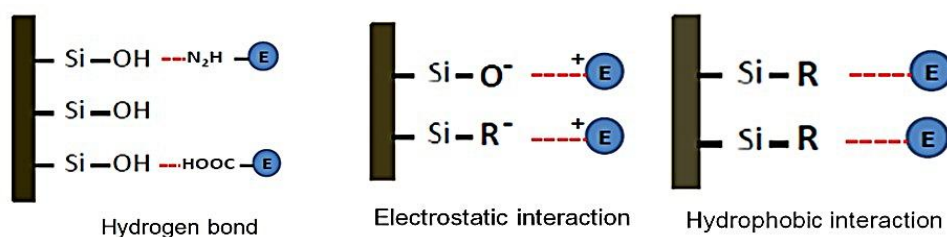
วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองตรึงเอนไซม์ฮอสเรดิชเปอร์ออกซิเดสในรูพรุนของเมโซพอร์ซิลิกา 3 ชนิด คือ MCF-41 SBA-15 และ MCF โดยค่า pI ของเมโซพอร์ซิลิกาเท่ากับ 2 และเอนไซม์ฮอสเรดิชเปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 8.9 สภาวะที่ใช้ในการตรึงคือในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 8 ซึ่งที่สภาวะนี้จะทำให้เมโซพอร์ซิลิกาทั้ง 3 ชนิด มีค่า pI น้อยกว่าค่า pH จึงแสดงลักษณะทางประจุที่เป็นลบ และเอนไซม์ฮอสเรดิชเปอร์ออกซิเดสมีค่า pI มากกว่าค่า pH จึงแสดงลักษณะทางประจุที่เป็นบวกทำให้เอนไซม์สามารถตรึงอยู่ในรูพรุนของเมโซพอร์ซิลิกาได้ด้วยแรงยึดเหนี่ยวทางประจุ (electrostatic interaction)

2.4.2.2 แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic interaction)

เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่เป็นสารอินทรีย์ หรือแรงระหว่างโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (nonpolar molecules) สำหรับคุณสมบัติ hydrophobic ของเมโซพอร์ซิลิกาสามารถสร้างได้จากการทำการเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) ด้วยสารออร์แกโนซิลเลน (organosilane) (Chong and Zhao, 2004) โดยจะเกิดปฏิกิริยา โซลเจล (sol-gel) ขึ้นรอบๆผิวของอนุภาคซิลิกา ทำให้อนุภาคซิลิกาไม่ชอบน้ำ ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการปรับปรุงพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาเพื่อให้สามารถเกิดการยึดเกาะกับส่วนไม่มีขั้วในโมเลกุลของเอนไซม์ได้

2.4.2.3 แรงพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond)

เป็นพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมที่มีสภาพลบ หรือมีอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงกับอะตอมของไฮโดรเจนที่สร้างพันธะโคเวเลนต์ กับอะตอมที่มีอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงอีกอะตอมหนึ่ง อะตอมที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงๆได้แก่ ฟลูออรีน (F) ออกซิเจน (O) และไนโตรเจน (N) พันธะไฮโดรเจนอาจเกิดขึ้นมีความแข็งแรงมากกว่าแรงแวนเดอร์วาลส์ แต่อ่อนกว่าพันธะโคเวเลนต์ และพันธะไอออนิก สำหรับการตรึงเอนไซม์บนวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาด้วยพันธะไฮโดรเจน จะเป็นการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างไฮโดรเจนอะตอมของหมู่อะมิโน หรือคาร์บอกซิลิกาของเอนไซม์กับไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ซิลานอล (Si-OH) ที่พื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกา (Chong และ Zhao, 2004)



รูปที่ 2.8 การตรึงเอนไซม์บนเมโซพอร์ซิลิกาโดยอาศัยแรงยึดเหนี่ยวทางพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ (electrostatic interaction) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic interaction) (Chong และ Zhao, 2004)

2.5 อนุภาคนาโนทอง (Gold nanoparticles, AuNPs)

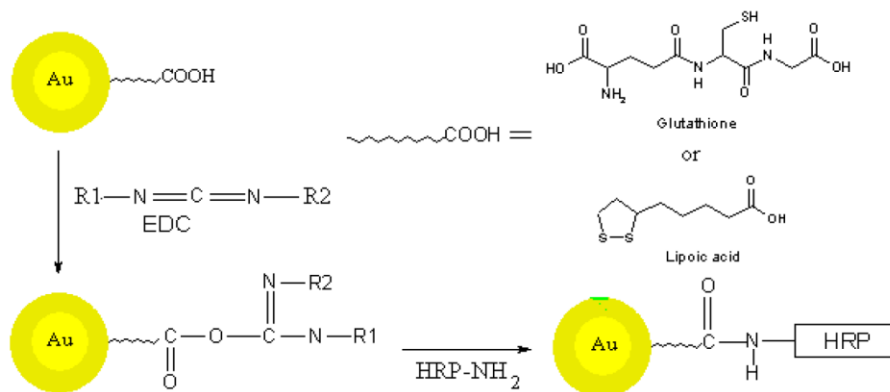
การสร้างอะซิติวโคลีนเอสเทอร์สไปโอเซนเซอร์ เพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง โดยใช้เมโซพอร์ซิลิกามาเป็นวัสดุรองรับสำหรับตรึงเอนไซม์นั้น มีข้อดีคือวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาจะช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ซึ่งมีผลทำให้เครื่องมือวัดมีเสถียรภาพที่ดี และมีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้น แต่ทั้งนี้วัสดุเมโซพอร์ซิลิกาก็ยังมีข้อด้อยสำคัญที่ควรปรับปรุงนั่นคือเรื่องของคุณสมบัติในการถ่ายเทอิเล็กตรอน หรือการนำไฟฟ้า ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมากเพราะสไปโอเซนเซอร์ที่จะสร้างในงานวิจัยนี้จะใช้หลักการวัดแบบแอมเพอโรเมตริกซึ่งเป็นการวัดที่อาศัยสัญญาณอิเล็กตรอนเป็นหลัก ดังนั้นแนวทางในการแก้ไขคือใช้อนุภาคนาโนของทอง (gold nanoparticles, AuNPs) มาเป็นวัสดุในการสังเคราะห์ร่วม เนื่องจากทองมีคุณสมบัติที่ดีในเรื่องของการถ่ายเทอิเล็กตรอนและการนำไฟฟ้า ซึ่งจะสามารถช่วยลดปัญหาในส่วนนี้ได้และยังเป็นการปรับปรุงประสิทธิภาพในการตรวจวัดของอะซิติวโคลีนเอสเทอร์สไปโอเซนเซอร์ให้ดีขึ้นอีกด้วย

2.5.1 คุณสมบัติของวัสดุนาโนทอง (Gold nanoparticle properties)

อนุภาคนาโนของทองมีลักษณะโครงสร้างเป็นทรงกลมที่มีขนาดตั้งแต่ 1-150 นาโนเมตร มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงซึ่งทองที่มีขนาดอนุภาค 2 นาโนเมตร สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อกับลิแกนด์ได้ถึง 100 ลิแกนด์ต่อหนึ่งอนุภาคของทอง (Rana และคณะ, 2012) วิธีการในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองนั้นก็ทำได้ง่าย สามารถควบคุมขนาดและการกระจายตัวของทองได้

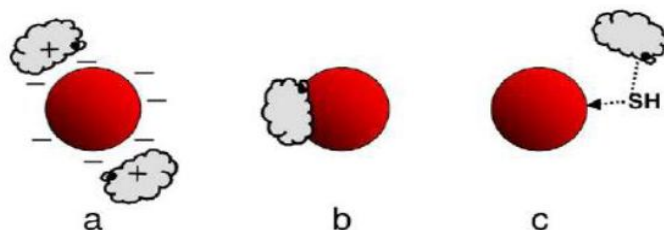
เมื่อพิจารณาคุณสมบัติที่ดีของทองที่จะช่วยเสริมประสิทธิภาพเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานสไปโอเซนเซอร์มีดังนี้คือ ทองมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าที่ดีสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการส่งถ่ายอิเล็กตรอน (mediator) ได้ดี ทองมีความเฉื่อยมันจึงมีเสถียรภาพในการทำงานสูงเมื่อเทียบกับโลหะชนิดอื่นๆ ที่มีการนำมาใช้ในงานสไปโอเซนเซอร์เช่น เงิน แพลตตินัม พัลลาเดียม เป็นต้น นอกจากนี้

ทองยังไม่เป็นพิษและมีคุณสมบัติที่สามารถเข้ากับสารชีวภาพ (biocompatible) โดยเฉพาะเอนไซม์ได้ดี และยังสามารถปรับแต่งพื้นผิวให้เกิดหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ที่เหมาะสมกับการใช้งานได้ Ahirwal และคณะ (2009) ได้ทำการปรับปรุงพื้นผิวของทองด้วยการทำปฏิกิริยาเติมหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) โดยใช้กลูตาไธโอน (glutathione) หรือ กรดไลโปอิก (lipoic acid) ซึ่งจะทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) บนผิวหน้าของอนุภาคของทองคำนาโน โดยนำอนุภาคของทองที่ปรับปรุงพื้นผิวให้มีหมู่ฟังก์ชันนี้ จะนำไปใช้ประโยชน์ในการตรึงเอนไซม์ฮอร์เรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) โดยจะเป็นการตรึงที่อาศัยแรงยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโควาเลนต์ที่เกิดจากหมู่เอมีน (amine group, NH₂) ของเอนไซม์ กับหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ที่พื้นผิวของทอง โดยใช้สารอีดีซี (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC) เป็นตัวช่วยในการเร่งให้เกิดการยึดเกาะกัน กลไกในการตรึงเอนไซม์โดยการปรับปรุงพื้นผิวของทองจะแสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 การปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคนาโนของทองด้วยกลูตาไธโอน (glutathione) หรือ กรดไลโปอิก (lipoic acid) ซึ่งทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) สำหรับตรึงเอนไซม์ HRP (Ahirwal และคณะ, 2009)

อนุภาคนาโนทองมีขนาดที่สอดคล้องกับขนาดโมเลกุลของสารชีวภาพ (biomolecules) เช่น โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ เป็นต้น จึงสามารถนำมาบูรณาการร่วมกันได้ดี ซึ่งนอกจากจะสามารถตรึงเอนไซม์ได้โดยใช้วิธีการปรับปรุงพื้นผิวเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชันมายึดเกาะกับเอนไซม์แล้ว ก็ยังสามารถตรึงเอนไซม์บนพื้นผิวของทองได้ด้วยคุณสมบัติการดูดซับทางกายภาพระหว่างพื้นผิวของทองกับเอนไซม์โดยผ่านทางแรงดึงดูดทางประจุ นั่นคือประจุลบของพื้นที่ผิวโลหะทองกับประจุบวกของเอนไซม์ แรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว และแรงดึงดูดระหว่างพื้นผิวของโลหะทองกับอะตอมของซัลเฟอร์ (sulphur) หรือไนโตรเจน (nitrogen) ของเอนไซม์ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 กลไกการดูดซับของเอนไซม์บนอนุภาคนาโนทองโดยอาศัยแรง a) แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ b) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว และ c) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างพื้นผิวของทองคำกับอะตอมของซัลเฟอร์ (sulphur) หรือไนโตรเจน (nitrogen) ของเอนไซม์ (Thobhani และคณะ, 2010)

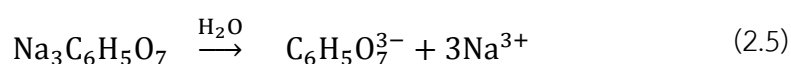
2.5.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง (Synthesis of gold nanoparticles)

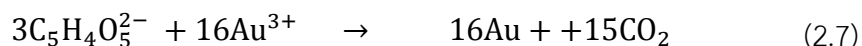
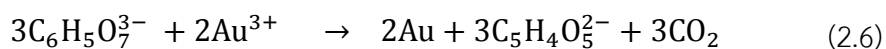
การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองสามารถทำได้โดยการรีดิวซ์ไอออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) ที่เตรียมจากกรดคลอโรอริก (chloroauric acid, HAuCl_4) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตอนุภาคนาโนทองให้เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) (Cao และคณะ, 2011) โดยสารที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) อาจเป็นกรดเข้มข้น หรือฟรีเรดิคอลลส์ (free radical) ของอะตอมหรือโมเลกุลของสาร ซึ่งจะขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการสังเคราะห์ โดยในบทนี้จะนำเสนอวิธีที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคของทองขนาดนาโน 2 วิธี คือ วิธีการรีดักชันทางเคมี (chemical reduction method) และวิธีอัลตราโซนิก (ultrasonic irradiation)

2.5.2.1 วิธีการรีดักชันทางเคมี (chemical reduction method)

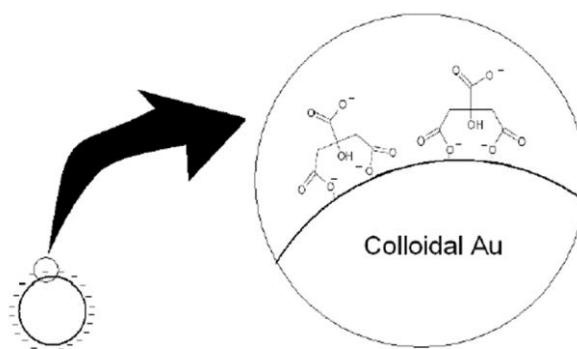
วิธีการรีดักชันทางเคมี เป็นการสังเคราะห์ทองโดยอาศัยการรีดิวซ์ไอออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) ให้เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) ด้วยตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ที่เป็นกรดเข้มข้นโดยกรดเข้มข้นที่เป็นที่นิยมใช้ ได้แก่ โซเดียมโบโรไฮไดร (sodium borohydride, NaBH_4) และไตรโซเดียมซิเตรท (trisodium citrate, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ซึ่งขนาดของอะตอมของทองที่สังเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของอัตราส่วนของกรดคลอโรอริก ซึ่งเป็นแหล่งของไอออนของทองต่อสารตัวรีดิวซ์ (gold ions/reducing agent) ในสารละลาย

Petersen และคณะ (2006) ได้ทำการสังเคราะห์ทองโดยใช้สารตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นไตรโซเดียมซิเตรท (trisodium citrate, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ซึ่งแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังสมการที่ 2.5, 2.6 และ 2.7





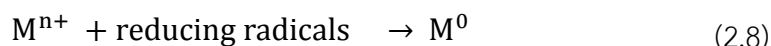
วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน แต่ก็มีข้อเสียที่อาจจะเป็นผลจากการตกค้างของกรดเข้มข้นที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์ โดยจากรายงานของ Petersen และคณะ (2006) พุดถึงผลจากการใช้กรดเข้มข้นในการสังเคราะห์ทองที่ส่งผลให้เกิดลักษณะของประจุลบบนพื้นผิวของทอง ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ลักษณะของประจุลบที่เกิดขึ้นบนผิวของอนุภาคของทองซึ่งเป็นผลจากการใช้กรดเข้มข้นเป็นตัวรีดิวซ์ (Petersen และคณะ, 2006)

2.5.2.2 วิธีอัลตราโซนิก (ultrasonic irradiation)

การใช้วิธีอัลตราโซนิกในการสร้างตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ที่เป็นอนุมูลอิสระของอะตอมหรือโมเลกุลเพื่อมาทำหน้าที่ในการรีดิวซ์อนุภาคโลหะชนิดต่างๆจากไอออนให้กลายเป็นอะตอมหรืออนุภาค แสดงกลไกดังสมการที่ 2.8 และ 2.9



สำหรับวิธีการรีดิวซ์ไอออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) เพื่อทำให้เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) นั้นสามารถทำได้โดยใช้วิธีอัลตราโซนิกซึ่งเป็นการป้อนคลื่นความถี่ลงไป ในสารละลายของกรดคลอโรอริก (chloroauric acid, HAuCl_4) โดยคลื่นความถี่ที่ป้อนเข้าไปนี้จะทำให้ในน้ำเกิดฟองอากาศขึ้น และเมื่อฟองอากาศในสารละลายเกิดการแตกตัวก็จะทำให้เกิด

ไฮโดรเจนฟรีเรดิคอลลส์ (hydrogen radicals, $H \cdot$) และไฮดรอกซิลฟรีเรดิคอลลส์ (hydroxyl radical, $OH \cdot$) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ทำให้เกิดอนุภาคนาโนของทอง โดยกลไกของการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังสมการที่ 2.10, 2.11 และ 2.12



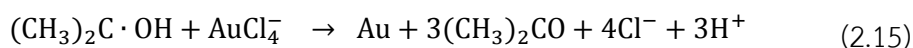
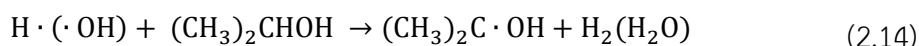
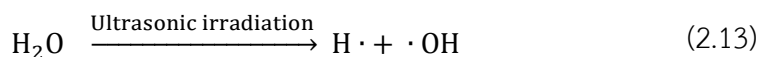
ซึ่งวิธีที่ใช้ในการสังเคราะห์ทั้งสองวิธีสามารถนำมาใช้ในการรีดิวซ์ทอง สำหรับการสังเคราะห์วัสดุผสมทอง/เมโซพอร์สซิลิกานาโนคอมโพสิตได้ แต่เมื่อพิจารณาเรื่องของผลกระทบที่เกิดจากการตกค้างของกรดเข้มข้นบนอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้จากวิธีการรีดักชันทางเคมีแล้ววิธีอัลตราโซนิคจึงเป็นวิธีที่ค่อนข้างน่าสนใจว่าเนื่องจากไม่มีผลกระทบของการตกค้างของสารที่ใช้รีดิวซ์ และวิธีนี้ยังสามารถควบคุมการกระจายตัวของอนุภาคของทองที่เกิดบนพื้นผิววัสดุเมโซพอร์สซิลิกาได้ โดยขึ้นอยู่กับความถี่ที่ป้อน ระยะเวลา และความเข้มข้นของ *กรดคลอโรอริก* ที่ใช้ (Cobley และคณะ, 2011)

2.5.3 การสังเคราะห์ อนุภาคทอง/ เมโซพอร์สซิลิกานาโนคอมโพสิต (The synthesis of gold/mesoporous silica nanocomposites)

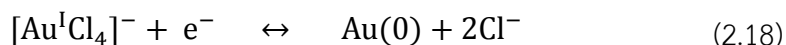
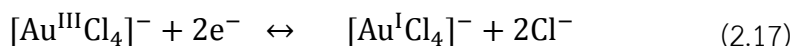
เนื่องจากวัสดุเมโซพอร์สซิลิกาที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ มีข้อดีในการช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ถูกตรึงให้มีเสถียรภาพ ซึ่งจะมีผลทำให้เครื่องมือวัดมีความคงตัวในการวัด แต่ทั้งนี้วัสดุเมโซพอร์สซิลิกาก็ยังมีข้อด้อยสำคัญที่ควรปรับปรุงนั่นคือเรื่องของคุณสมบัติในการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมากเพราะไบโอเซนเซอร์ที่จะสร้างในงานวิจัยนี้จะใช้หลักการวัดแบบแอมเพอโรเมตริกซึ่งเป็นการวัดที่อาศัยการถ่ายเทอิเล็กตรอนเป็นหลัก ดังนั้นแนวทางในการแก้ไขคือใช้อนุภาคนาโนของทอง (gold nanoparticles, AuNPs) มาเป็นวัสดุในการสังเคราะห์ร่วม เนื่องจากทองมีคุณสมบัติที่ดีในเรื่องของการนำไฟฟ้ามันจึงสามารถนำมาช่วยเรื่องการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งจะสามารถช่วยลดปัญหาในส่วนนี้ได้ และยังเป็นการปรับปรุงประสิทธิภาพในการตรวจวัดของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ให้ดีขึ้นอีกด้วย

Chen และคณะ (2001) ได้ทำการสังเคราะห์วัสดุนาโนทองไว้ในรูพรุนของเมโซพอร์สซิลิกา (SiO_2) โดยใช้วิธีอัลตราโซนิค สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ทองคือ กรดคลอโรอริก (chloroauric acid, $HAuCl_4$) ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ให้เกิดเป็นวัสดุผสมระหว่างทองกับเมโซพอร์สซิลิกา (AuNPs/MPS) เริ่มจากแช่วัสดุเมโซพอร์สซิลิกาในสารละลายกรดคลอโรอริกในระบบกวนผสม

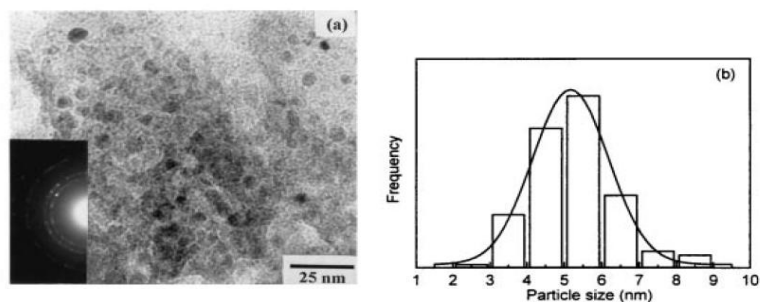
ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ ไอออนทองคำคลอไรด์ (AuCl_4^-) เกิดการยึดเกาะบนพื้นผิวของอนุภาคเมโซพอร์ซิลิกา จากนั้นทำการรีดิวซ์ให้ไอออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) จากทองคำคลอไรด์ (AuCl_4^-) ให้เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) เกาะบนพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกา โดยสารที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์คือไฮโดรเจนพรีเรดิคอลลส์ (hydrogen radicals, H^\cdot) และไฮดรอกซิลพรีเรดิคอลลส์ (hydroxyl radical, OH^\cdot) ที่เกิดจากการแตกตัวของฟองอากาศในสารละลายหลังป้อนคลื่นความถี่ขนาด 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ในกระบวนการอัลตราโซนิก เป็นระยะเวลา 120 นาที ซึ่งในขั้นตอนของการอัลตราโซนิกนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรีดิวซ์จะทำการผสมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ลงไปด้วยเพื่อเพิ่มเรดิคอลลส์อะตอมหรือโมเลกุลที่เกิดจากเอทานอลนั่นคือ $(\text{CH}_3)_2\text{C}\cdot\text{OH}$ ทำให้มีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ไอออนของทองเพิ่มขึ้นกลไกการรีดิวซ์ไอออนของทองให้เกิดเป็นอะตอมของทองที่มีลักษณะเป็นอนุภาคยึดเกาะบนพื้นผิวของรูพรุนแสดงดังสมการที่ 2.13 2.14 2.15 และ 2.16 (Chen และคณะ, 2001)



โดย Oyama และคณะ (2009) ได้แสดงสมการของกลไกในการรีดิวซ์ไอออนของทอง (Au^{3+}) จากทองคำคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ให้เกิดเป็นอนุภาคทอง (Au^0) แสดงดังสมการที่ 3.5 และ 3.6



ผลการจากการสังเคราะห์อนุภาคทองในรูพรุนของเมโซพอร์ซิลิกาจากการทดลองของ Chen และคณะ (2001) พบว่า อนุภาคทองที่เกิดขึ้นจะมีขนาดโดยเฉลี่ยที่ 6 นาโนเมตร และมีลักษณะของพื้นที่ผิวแสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 (a) ภาพถ่าย TEM ซึ่งแสดงโครงสร้างของพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาที่มีอนุภาคของทองเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวหลังจากทำการอัลตราโซนิกเป็นเวลา 120 นาที (b) ขนาดของอนุภาคของทองที่สังเคราะห์ได้เฉลี่ยอยู่ที่ 6 นาโนเมตร (Chen และคณะ, 2001)

เนื่องจากการสังเคราะห์วัสดุผสมนาโนทอง/เมโซพอร์ซิลิกา (AuNPs/MPS) ในขั้นตอนแรกจะต้องนำวัสดุเมโซพอร์ซิลิกามาแช่ในสารละลายกรดคลอโรอริกเพื่อให้เกิดการดูดซับของทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) บนพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกา ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการรีดิวซ์ให้ทองในรูปของไอออนเปลี่ยนเป็นรูปของอนุภาคยึดเกาะบนพื้นผิวซิลิกา ซึ่งปัญหาส่วนใหญ่ที่พบระหว่างขั้นตอนการดูดซับคือ เกิดการดูดซับของทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) บนพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกได้ในปริมาณน้อย และต้องใช้ระยะเวลาาน เช่นการทดลองของ Chen และคณะ (2001) ใช้ระยะเวลาในขั้นตอนของการดูดซับนี้นานถึง 3 สัปดาห์ ซึ่งนั่นอาจจะเป็นเพราะว่าลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาที่ปกคลุมไปด้วยหมู่ซิลานอล (Si-OH) และมีลักษณะทางประจุที่เป็นลบ จึงทำให้เกิดการดูดซับเอาทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ซึ่งมีลักษณะทางประจุที่เป็นลบเหมือนกันได้ยาก ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุง และพัฒนากระบวนการดูดซับของทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) บนพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้วิธีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยสารก่อกำบังชั้น (functional ligand) ซึ่งสารประเภทนี้เมื่อนำไปใช้ปรับปรุงพื้นที่ผิวของซิลิกาก็จะช่วยให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมในการดูดซับทองคลอไรด์ไอออน และทำให้พื้นที่ผิวของซิลิกาแสดงลักษณะประจุที่เป็นบวกจึงสามารถดูดซับทองคลอไรด์ไอออนที่มีประจุลบได้ดี ซึ่งความเป็นประจุของเมโซพอร์ซิลิกา ก่อน และหลังปรับปรุงด้วยสารก่อกำบังชั้น สามารถตรวจสอบได้จากเครื่องวัดศักย์ไฟฟ้าซีตารีโพเทนเซียน (zeta potential measurements) โดยงานวิจัยที่มีการใช้สารก่อกำบังชั้นนี้ในการปรับปรุงพื้นที่ผิวของเมโซพอร์ซิลิกาเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การโหลดของทอง จะแสดงดังตารางที่ 2.3

Gutierrez และคณะ (2011) ได้ทำสังเคราะห์วัสดุผสมนาโนทอง/เมโซพอร์ซิลิกา (AuNPs/MPS) โดยมีการใช้สารก่อกำบังชั้นนั้นคือ 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ในการปรับปรุงพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกา ซึ่งขั้นตอนของการปรับปรุงเริ่มจากการนำสาร APTS ผสมกับ

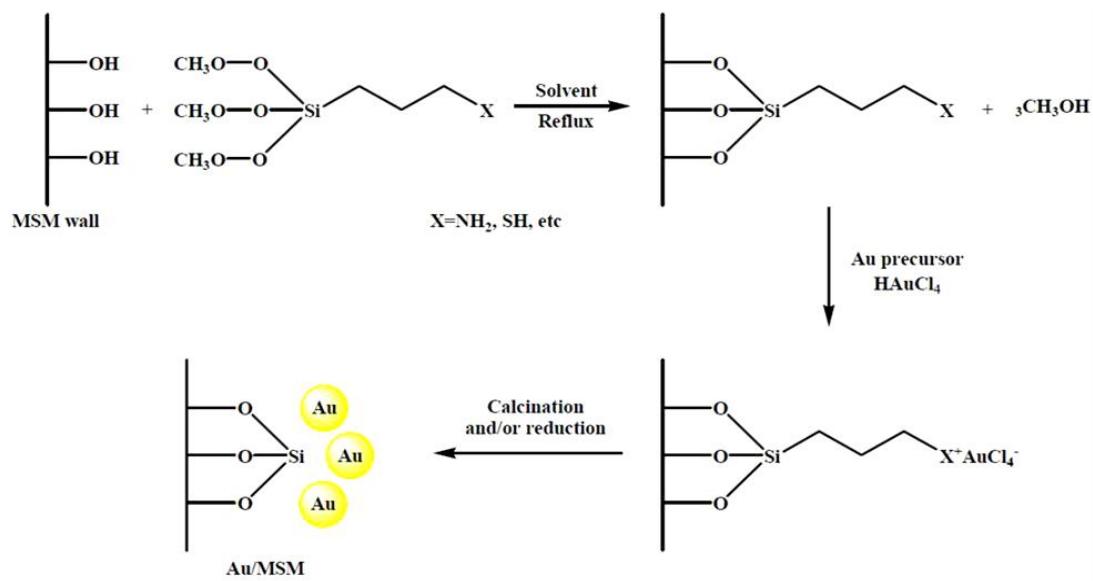
เมโซพอร์ซซิลิกาแล้วนำไปทำการรีฟลักซ์ (reflux) ในสารละลายโพลูอินที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ข้ามคืนซึ่งผลจากการรีฟลักซ์ก็จะทำให้เกิดการยึดเกาะของ ATPS บนพื้นผิวของเมโซพอร์ซซิลิกาทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดูดซับทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ได้ดีขึ้น โดยในขั้นตอนต่อมาก็จะนำวัสดุเมโซพอร์ซซิลิกาที่ปรับปรุงแล้วนี้ไปแช่ในสารละลายกรดคลอโรอริก (chloroauric acid, HAuCl_4) เมื่อเกิดการดูดซับของทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) แล้วก็จะนำมาผ่านกระบวนการสุดท้ายคือทำการรีดิวซ์ให้อิออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) จากทองคลอไรด์ (AuCl_4^-) เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) เกาะบนพื้นผิวของเมโซพอร์ซซิลิกา โดยเขาใช้วิธีการรีดิวซ์ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดร (sodium borohydride, NaBH_4) ซึ่งเป็นกรดเข้มข้น และนำไปผ่านการอบเผา (calcination) ไล่ความชื้น ไอออน หรือสารอินทรีย์อื่นๆที่ปนเปื้อนออกไป ซึ่งกลไกในการสังเคราะห์สรุปเป็นแผนภาพตามรูปที่ 2.13

ตารางที่ 2.3 เปรียบการใช้สารก่อกำเนิดฟังก์ชัน (functional ligand) ชนิดต่างๆในการปรับปรุงพื้นที่ผิวของเมโซพอร์ซซิลิกาชนิด MCM-41, SBA-15 และ MCF เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การโหลดของทอง

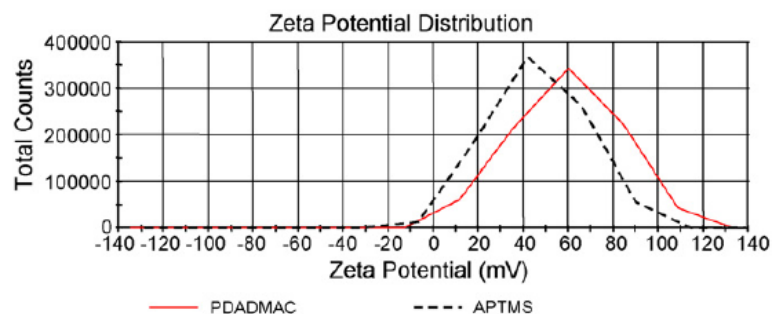
| Support | Functional ligand | Au Precursor | Au loading (%wt) | Au size (nm) | Reference |
|---------|---|---------------------------------------|------------------|---------------|-----------------------|
| MCM-41 | - | HAuCl_4 | 0.13 - 1.21 | - | Lu et al., 2004 |
| | - | HAuCl_4 | 1.0 | 3.0 - 18.0 | Sobczak et al., 2007 |
| | APS | HAuCl_4 | 4.0 | 5.1 | Chi et al., 2005 |
| | APS | HAuCl_4 | 3.1 - 3.2 | 3.4 ± 0.5 | Ghosh et al., 2003 |
| | MPS | HAuCl_4 | 3.2 - 3.5 | 3.2 ± 0.5 | Ghosh et al., 2003 |
| SBA-15 | - | HAuCl_4 | 1.0 | 3.0 - 8.0 | Li et al., 2009 |
| | APS | HAuCl_4 | 5.0 | 4.1 ± 0.8 | Gabaldon et al., 2007 |
| | APTS | HAuCl_4 , AgNO_3 | 6.0 | 2.9 | Zhang et al., 2009 |
| | APTS | HAuCl_4 | 6.0 | 3.0 - 5.0 | Richards et al., 2006 |
| | MPTS | HAuCl_4 | 4.53 | 5.0 - 8.0 | Chen et al., 2009 |
| | MPS | HAuCl_4 | 2.0 | 3.4 - 6.6 | Rombi et al., 2009 |
| MCF | $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{ClSi}$ | HAuCl_4 | 15.0 | 4.0 | Zhao et al., 2005 |

หมายเหตุ APS: 3-Aminopropyltrimethoxysilane
 APTS: 3-Aminopropyltriethoxysilane
 MPS: 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane
 MPTS: 3-Mercaptopropyltriethoxysilane
 $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{ClSi}$: Chlorodimethyloctylsilane

Ashayer และคณะ (2008) ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคของทองบนอนุภาคซิลิกา โดยการใช้อัลตราโซนิก โดยมีการเปรียบเทียบสารก่อกำเนิดชั้น 2 ชนิดที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกา คือ 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) และสาร polydiallyldimethyl ammonium chloride (PDADMAC) ซึ่งมีคุณสมบัติของศักย์ไฟฟ้าที่แตกต่างกัน โดยตรวจได้จากเครื่องวัดศักย์ไฟฟ้าซีตาริโพนเทนเซียน (zeta potential measurements) ซึ่งพบว่าสาร PDADMAC มีศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกมากกว่าสาร APTMS ซึ่งผลแสดงดังรูปที่ 2.14

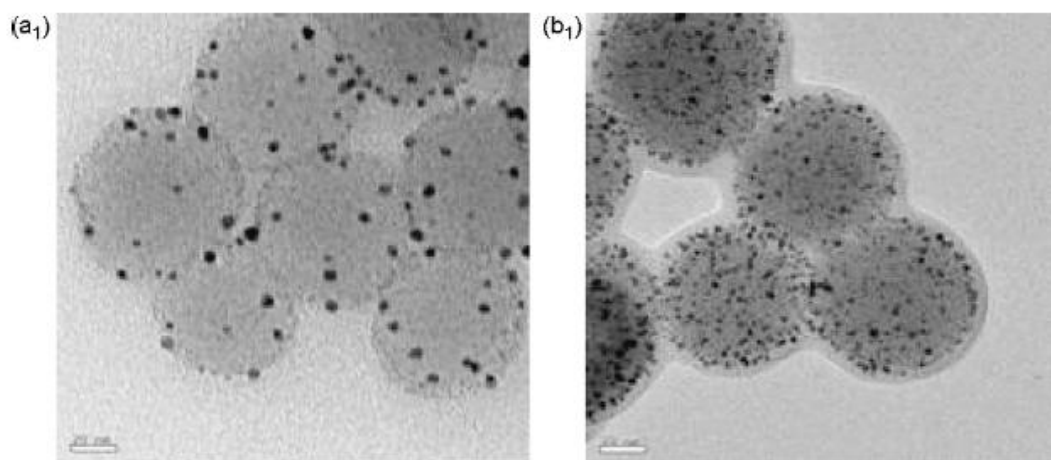


รูปที่ 2.13 แสดงขั้นตอนของการสังเคราะห์ผสมนาโนทอง-เมโซพอร์ซิลิกา (AuNPs-MPS nanocomposite) โดยเริ่มต้นจากการปรับปรุงพื้นผิวของเมโซพอร์ซิลิกา การดูดซับทองคลอไรด์ไอออน (AuCl₄⁻) และการรีดิวซ์ทองไอออนให้เป็นอนุภาค (Gutierrez และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.14 เปรียบเทียบค่าศักย์ไฟฟ้าระหว่างสาร APTMS กับสาร PDADMAC ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกา (Ashayer และคณะ, 2008)

ซึ่งลักษณะของศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกก็จะช่วยให้สามารถดูดซับคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ที่มีประจุลบได้ดี ทำให้เปอร์เซ็นต์ในการโหลดของทองคำบนอนุภาคซิลิกาเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเปรียบเทียบสารก่อกำเนิดชั้นสองตัวนี้ในการปรับปรุงพื้นที่ผิวของซิลิกาเพื่อดูดซับทองคำคลอไรด์ไอออนพบว่า PDADMAC จะช่วยให้ซิลิกาดูดซับทองคำคลอไรด์ได้มากกว่าสาร APTMS ทำให้ปริมาณอนุภาคของทองที่เกิดขึ้นหลังจากการรีดิวซ์ด้วยวิธีอัลตราโซนิกของวัสดุซิลิกาที่ปรับปรุงพื้นที่ผิวด้วยสาร PDADMAC มีปริมาณ 40% ซึ่งมากกว่าซิลิกาที่ปรับปรุงพื้นที่ผิวด้วยสาร APTMS ที่มีอนุภาคของทองเกิดขึ้นครอบคลุมพื้นที่ที่ 25% ซึ่งผลของการเกิดของทองคำบนอนุภาคซิลิกาแสดงดังรูปที่ 2.15



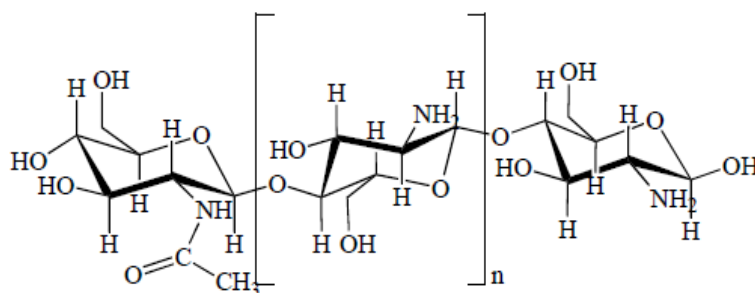
รูปที่ 2.15 แสดงการเกิดขึ้นของอนุภาคของทองบนพื้นผิวของซิลิกาที่มีการปรับปรุงด้วยสารก่อกำเนิดชั้นที่แตกต่างกันคือ (a₁) สาร APTMS (b₁) สาร PDADMAC (Ashayer และคณะ, 2008)

ซึ่งวัสดุผสมระหว่างทองกับเมโซพอร์ซิลิกาที่สังเคราะห์ได้นี้จะนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ และนำไปประกอบเข้ากับอิเล็กโทรดของของไบโอเซนเซอร์ โดยใช้ไคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ จะใช้เป็นตัวช่วยในการยึดประสาน ให้วัสดุผสมระหว่างทองกับเมโซพอร์ซิลิกาที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวของอิเล็กโทรดได้อย่างแข็งแรง และไม่เกิดการหลุดออกของเอนไซม์ (enzyme leaching) ซึ่งคุณสมบัติของไคโตซานจะกล่าวไว้ในหัวข้อที่ 2.6

2.6 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซาน คือสารไบโอพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่ง เป็นพอลิเมอร์ชนิดประจุบวก (polycationic polymer) ที่ประกอบไปด้วยหน่วยของ D-glucosamine โครงสร้างโมเลกุลแสดงดังรูปที่ 2.16 โดยไคโตซานเป็นสารที่สามารถสกัดได้จากธรรมชาติซึ่งโดยทั่วไปมักพบเป็นองค์ประกอบอยู่ในเปลือกของสัตว์พวก กุ้ง ปู และแมลง ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีของไคโตซานคือ เป็นวัสดุชีวภาพ

ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ (low toxicity) สามารถเข้ากับสารชีวภาพได้ดี (biocompatibility) ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์จะช่วยเป็นตัวยึดประสานระหว่างวัสดุที่ตรึงเอนไซม์ เข้ากับผิวหน้าของอิเล็กโทรดของเครื่องไบโอเซนเซอร์ได้ และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีหมู่เอมีน (amine group) ซึ่งสามารถยึดเกาะกับหมู่อัลคิล (alkyl group) ของเอนไซม์ได้ดีอีกด้วย (Rinaudo และคณะ, 2006)



ที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน (Aranaz และคณะ, 2009)

ปรารภงานมากมาย และคณะ (2011) ได้ศึกษาการสร้างไบโอเซนเซอร์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดยาฆ่าแมลงชนิดมาลาไธออน (malathion) โดยมีการใช้ไคโตซานเป็นตัวช่วยในการยึดประสานวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่ตรึงเอนไซม์ เข้ากับผิวหน้าของอิเล็กโทรดซึ่งชั้นของเมทริกซ์ที่ทำการโมดิฟายด์ (modified) ประกอบไปด้วยชั้นของปรัสเซียนบลู (prussian blue, PB) ที่จะทำหน้าที่เป็นมีเดียเตอร์ (mediator) นั่นคือชั้นที่ช่วยในการส่งถ่ายอิเล็กตรอนเคลื่อนที่อยู่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดแบบคาร์บอน (screen-printed carbon electrode, SPCE) ในชั้นแรก และชั้นของไคโตซานที่ช่วยยึดประสานระหว่างวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่ตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ให้ยึดเกาะอยู่บนอิเล็กโทรดได้เป็นชั้นถัดมา โดยลักษณะการเรียงตัวของเมทริกซ์บนผิวหน้าอิเล็กโทรดคือ SPCE/PB/MCF/AChE/chitosan ซึ่งเมื่อพิจารณาการนำไคโตซานมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ก็พบว่ามันมีข้อดีในแง่ของการช่วยยึดประสาน วิธีการสังเคราะห์ง่ายไม่ยุ่งยาก เข้ากับเอนไซม์ที่มีความอ่อนไหวได้ดีโดยไม่ส่งผลเสียต่อเอนไซม์ และที่สำคัญเป็นวัสดุที่ราคาถูกแต่ก็มีข้อด้อยในเรื่องของการนำไฟฟ้า ซึ่งข้อด้อยนี้สามารถทดแทนได้ด้วยการนำไปโมดิฟายด์ร่วมกับวัสดุอื่นๆ ที่นำไฟฟ้า เช่น ทอง เงิน พอลิเมอร์นำไฟฟ้า หรือแม้กระทั่งปรัสเซียนบลูที่ถูกนำมาใช้ร่วมกับไคโตซานในงานนี้

บทที่ 3 วารสารปริทรรศน์

การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณสารฆ่าแมลงโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะสร้างไบโอเซนเซอร์ที่มีเสถียรภาพในการตรวจวัด และการเก็บรักษา โดยมีการเลือกใช้วัสดุระดับนาโนที่มีคุณสมบัติช่วยเสริมประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ทั้งเมโซเซลลูลาร์ โพลีซิลิกา อนุภาคนาโนทอง และโคโคซาน ซึ่งในบทนี้จะรวบรวมงานวิจัยที่กล่าวถึงการนำวัสดุนาโนที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์

3.1 สารฆ่าแมลง (Insecticides)

3.1.1 ประเภทของสารฆ่าแมลง

สารฆ่าแมลงที่มีการใช้กันมานานและแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine insecticide) ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate insecticide) คาร์บาเมต (carbamate Insecticide) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid insecticide) (เวณิกา เบ็ญจพงษ์ และคณะ, 2009) แต่มีเพียง 2 กลุ่มที่สามารถนำมาใช้ดัดแปลงเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดสารฆ่าแมลงได้นั้นคือ สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต ซึ่งมีความเฉพาะต่อเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส คือมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นในงานนี้เราจะกล่าวถึงคุณสมบัติเบื้องต้น และหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แคในสารเคมี 2 กลุ่มนี้

3.1.1.1 กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate Insecticide)

สารฆ่าแมลงกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีพิษตกค้างไม่นาน เนื่องจากระยะเวลาการสลายตัวประมาณ 2 สัปดาห์ถึง 6 เดือน ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพอากาศ และอุณหภูมิ จึงนิยมใช้กับพืชผักที่มีอายุการเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยวสั้น (กรมควบคุมมลพิษ 2554) ความเป็นพิษของสารพิษกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กลไกในการออกฤทธิ์ของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ สารฆ่าแมลงกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ที่เป็นผลกระทบต่อระบบประสาทของแมลง โดยสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้จะมีตำแหน่งของการออกฤทธิ์ที่บริเวณรอยต่อที่เป็นช่องว่างระหว่างเซลล์ประสาท (synaptic receptors) ซึ่งกระแสประสาทของแมลงโดยปกติแล้วสามารถผ่านช่องว่างนี้ได้โดยอาศัยสารนำกระแสประสาท (neurotransmitters) ซึ่งสารนำกระแสประสาทที่สำคัญในตัวของแมลงคือ อะซิติลโคลีน (acetylcholine, Ach) โดยเมื่อสารตัวนี้ทำหน้าที่ในการส่งผ่านกระแสประสาทเรียบร้อยแล้วก็จะถูกเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ทำการย่อยสลายไปแต่เมื่อมีการใช้สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโน

ฟอสเฟตในการกำจัดแมลงศัตรูพืช สารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ก็จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส โดยโมเลกุลของยาฆ่าแมลงจะจับตัวกับเอนไซม์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า ฟอสฟอรีเลชัน (phosphorylation) โดยสารประกอบเชิงซ้อนนี้สามารถย้อนกลับได้ (reversible complex) แต่ต้องใช้เวลานานหลายชั่วโมงหรือหลายวันกว่าเอนไซม์จะหลุดจากสารประกอบเชิงซ้อนและสามารถกลับคืนสู่รูปเดิมได้ เมื่อเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติก็จะทำให้เกิดการสะสมของอะซีติลโคลีนที่เส้นประสาทของแมลงซึ่งจะมีผลให้เกิดการกระตุ้นของกระแสประสาทอย่างรุนแรงทำให้แมลงมีอาการชักกระตุก เป็นอัมพาตและตายลงในที่สุด (Perry et al., 1998)

3.1.1.2 กลุ่มคาร์บาเมต (Cabamate Insecticide)

เป็นสารพิษที่กำจัดศัตรูพืชได้อย่างกว้างขวางเช่นเดียวกับสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต โดยสารฆ่าแมลงชนิดนี้จะมีความเป็นพิษและการออกฤทธิ์คล้ายกันกับสารพิษในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต แต่ว่าร่างกายของคนหรือสัตว์ที่ได้รับสารพิษกลุ่มคาร์บาเมตนี้จะกลับคืนสู่สภาวะปกติได้เร็วกว่าการได้รับสารพิษจากกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต โดยทั้งสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตจะมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสเหมือนกัน แต่กลุ่มคาร์บาเมตจะมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่สั้นกว่า มีการตกค้างสั้น และสลายตัวได้อย่างรวดเร็วกว่า ซึ่งสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มักใช้กำจัดพวกแมลงชนิดปากดูดศัตรูพืชที่อยู่ในดิน เช่น ไส้เดือนฝอย หอยทาก ซึ่งสารพิษที่มีพิษร้ายแรงของกลุ่มนี้เช่น คาร์โบฟูราน (carbofuran) เมทโธมิล (methomyl) ส่วนสารพิษที่มีพิษปานกลางของกลุ่มนี้เช่น เมธิโอคาร์บ (methiocarb) คาร์บาริล (carbaryl) เป็นต้น

3.1.2 ปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงในไทย

โดยเมื่อพิจารณาข้อมูลของการนำสารเคมีอันตรายที่ใช้กำจัดศัตรูพืชที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรก ในระหว่าง ปี 2544 ถึง 2546 ตามตารางที่ 3.1 ก็พบว่ามีสารกลุ่มเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตอยู่หลายรายการเช่น เมตามิโดฟอส (methamidophos) เมทิล พาราไรออน (methyl parathion) คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกสารฆ่าแมลงเมทิล พาราไรออน ที่เป็นหนึ่งในสารฆ่าแมลงที่มีการนำเข้ามาใช้มากที่สุดมาใช้เป็นสารฆ่าแมลงเพื่อทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้น

ตารางที่ 3.1 วัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรก ปี 2544 -2546

| ลำดับที่ | ปี 2544 | ปี 2545 | ปี 2546 |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | Glyphosate isopropylamine salt | Glyphosate isopropylamine salt | Glyphosate isopropylamine salt |
| 2 | 2,4-d sodium salt | Paraquat dichloride | 2,4-d sodium salt |
| 3 | Methamidophos | Methamidophos | Paraquat dichloride |
| 4 | Atrazine | 2,4-d sodium salt | Atrazine |
| 5 | Ametryn | Atrazine | Ametryn |
| 6 | Methyl parathion | Ametryn | Methyl parathion |
| 7 | Mancozeb | Mancozeb | Endosulfan |
| 8 | Endosulfan | Methyl parathion | Mancozeb |
| 9 | Paraquat dichloride | Endosulfan | Butachor |
| 10 | Sulfur | Sulfur | Chlorpyrifos |

ที่มา: ฝ่ายทะเบียนและการอนุญาตวัตถุมีพิษ กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3.1.3 ปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลง

สำหรับข้อมูลการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงในผักและผลไม้ส่งออกไปยังประเทศในกลุ่มยุโรปที่มีการตรวจพบโดยระบบตรวจสอบความปลอดภัยภายใต้ระบบเตือนภัยสินค้าอาหาร (RASFF – Rapid Alert for Food and Feed) แสดงดังตารางที่ 3.2

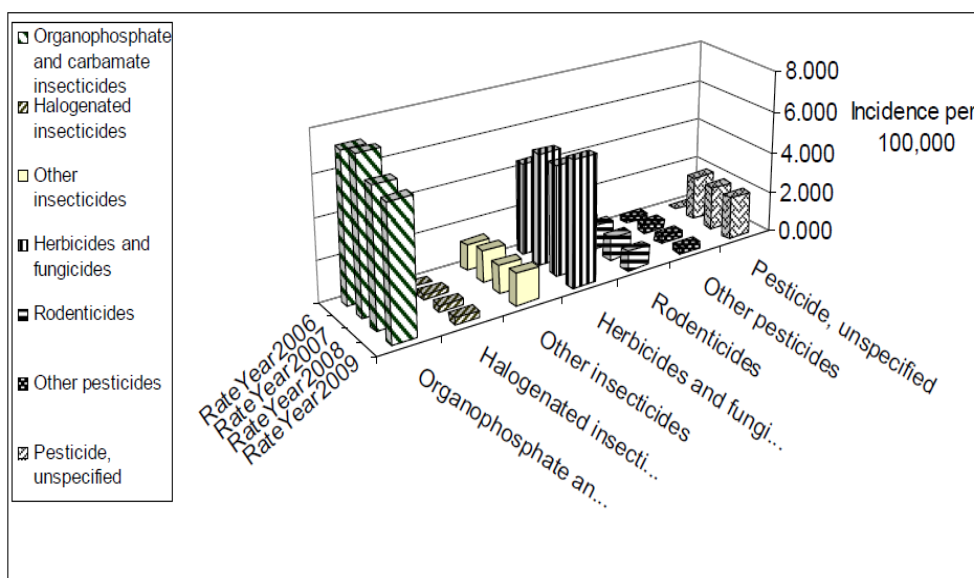
จากตารางจะเห็นว่าสารฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนในผัก และผลไม้ที่เป็นสินค้าส่งออกของไทย ยังมีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงในปริมาณที่เกินค่ามาตรฐาน (ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่สามารถยอมรับได้ MRL) อยู่หลายเท่าในแทบทุกรายการที่โดนตรวจพบ โดยเฉพาะพืชผักประเภท ถั่วฝักยาว มะเขือ ที่ถูกตรวจพบการปนเปื้อนบ่อยครั้งที่สุด มูลนิธิโลกสีเขียวได้สำรวจการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในการเกษตรด้วยวิธีการฉีดยาพบว่า สารเคมีที่พ่นออกไปมีเพียงร้อยละ 0.2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่โดนแมลงโดยตรง ส่วนที่เหลือร้อยละ 99.8 เปอร์เซ็นต์จะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 3.2 ปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงในพืชผลทางการเกษตรของไทยซึ่งถูกตรวจพบ โดย RASFF (ที่มา: <https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/index.cfm?event=searchResultList>)

| ประเภทของสารฆ่าแมลง | ชนิดของสารฆ่าแมลง | ระดับการปนเปื้อนที่ ถูกตรวจพบ (mg/kg - ppm) | ระดับการปนเปื้อนสูงสุด ที่สามารถ ยอมรับได้ MRL (mg/kg - ppm) | ประเภทของ ผักที่ตรวจ พบ | วันที่ตรวจพบ /ประเทศ ที่ตรวจพบ |
|---------------------|-------------------|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| คาร์บาเมต | Methomyl | 0.35 | 0.02 | ดอกหอม | 24 ม.ค. 54/ฟินแลนด์ |
| | Methomyl | 0.18 | 0.02 | มะละกอ | 15ก.พ.54/เนเธอร์แลนด์ |
| | Carbofuran | 0.36 | 0.02 | ผักกระเฉด | 23 พ.ค. 54/ เนเธอร์แลนด์ |
| | Carbofuran | 0.91 | 0.02 | ผักชี | |
| ออร์กาโน ฟอสเฟต | Triazophos | 0.14 | 0.05 | ถั่วฝักยาว | 11 ม.ค. 54/เดนมาร์ก |
| | Omethoate | 1.90 | 0.02 | ถั่วฝักยาว | 2 ก.พ. 54/เนเธอร์แลนด์ |
| | Dimethoate | 0.49 | 0.02 | ถั่วฝักยาว | 7 ก.พ. 54/เนเธอร์แลนด์ |
| | Omethoate | 0.21 | 0.02 | ผักกระเฉด | 6 พ.ค. 54/เนเธอร์แลนด์ |
| | EPN | 0.15 | 0.01 | ถั่วฝักยาว | 19 ต.ค. 54/UK |
| | Profenofos | 2.20 | 0.05 | ผักคะน้า | 19 ธ.ค. 54/นอร์เวย์ |
| | Dimethoate | 0.17 | 0.02 | มะเขือยาว | 31 ธ.ค. 54/ฝรั่งเศส |
| | Omethoate | 0.16 | 0.02 | | |
| | Dimethoate | 1.40 | 0.02 | ผักกระเฉด | 13 ธ.ค. 54/เยอรมันนี |
| Omethoate | 1.90 | 0.02 | | | |
| คาร์บาเมต | Methomyl | 0.42 | 0.02 | ถั่วฝักยาว | 9 ม.ค. 55/นอร์เวย์ |
| | Carbofuran | 0.057 | 0.02 | ถั่วฝักยาว | 2 ม.ค. 55/เนเธอร์แลนด์ |
| | Methomyl | 0.074 | 0.02 | มะละกอ | 6 พ.ค. 55/ฟินแลนด์ |
| | Dicofol | 1.2 | 0.05 | พริกสด | 8 ต.ค. 55/เดนมาร์ก |
| ออร์กาโน ฟอสเฟต | Dimethoate | 0.095 | 0.02 | มะละกอ | 6 พ.ค. 55/ฟินแลนด์ |

3.1.4 การเจ็บป่วยเนื่องจากสารฆ่าแมลง

จากรายงานสถานการณ์การเจ็บป่วยด้วยโรคที่เกิดจากสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย (พิบูล อิสสระพันธุ์, 2554) แสดงข้อมูลดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 สารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วย (พิบูล อิสสระพันธุ์, 2554)

จากรูปเป็นผลของอัตราการเกิดโรคอันเนื่องมาจากสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชในปี 2006 ถึง 2009 ซึ่งพบว่าสารฆ่าแมลงที่เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยมากที่สุดคือ สารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต ซึ่งความร้ายแรงของโรคที่เกิดจากสารฆ่าแมลงในกลุ่มนี้จะมีอัตราการตายคิดเป็นร้อยละ 6.2 % จากผู้ป่วยจากสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ทั้งหมด ซึ่งถือว่าสูงและค่อนข้างเป็นอันตรายมากเมื่อเทียบกับสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มอื่นๆ

จากข้อมูลทั้งการนำเข้าสารเคมีอันตรายมาใช้ในประเทศรวมถึงข้อมูลการปนเปื้อนเกินมาตรฐานของสารฆ่าแมลงที่ตรวจพบในอาหาร จะเห็นว่าสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต จะเป็นสารที่นิยมใช้งานในวงกว้าง จึงทำให้มีการตกค้างในพืชผลทางการเกษตรซึ่งถูกตรวจพบได้บ่อยครั้งโดยเฉพาะสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตซึ่งมีระยะเวลาในการสลายตัวนานกว่ากลุ่มคาร์บาเมต ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการสร้างเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไรธอน และคาร์บาเมต ชนิดเมโทมิล โดยใช้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารทั้งสองกลุ่มนี้ มาดัดแปลงใช้งานไบโอเซนเซอร์ เพื่อสร้างเครื่องมือสำหรับใช้ในการตรวจวัดสารฆ่าแมลง ซึ่งจะทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อน และสามารถนำข้อมูลการที่ได้จากการวัดไปเป็นแนวทางในการป้องกัน และแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงต่อไปได้

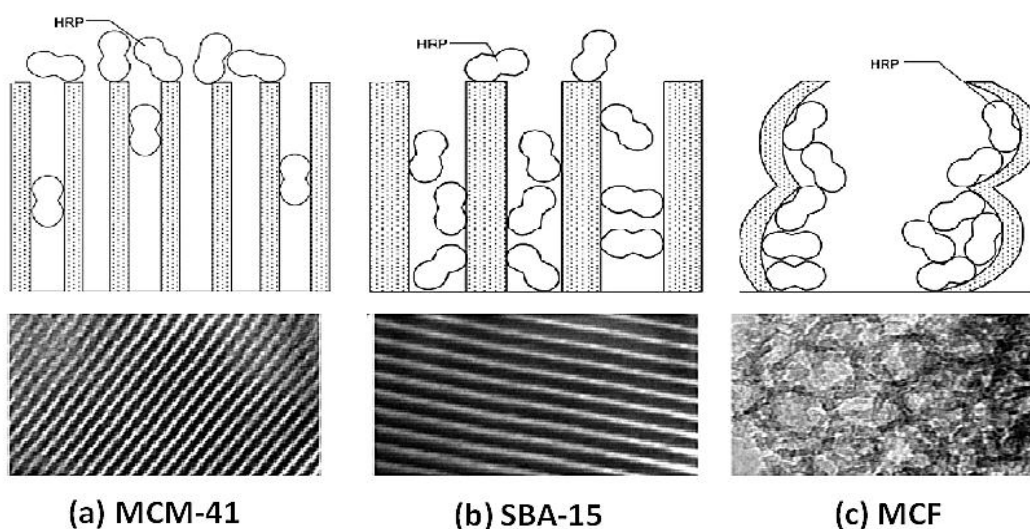
สำหรับขั้นตอนการสร้างไบโอเซนเซอร์นั้นจะนำเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมาตรึงในเมโซพอร์ซิลิกาซึ่งเป็นวัสดุที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุน ซึ่งการตรึงเอนไซม์ในวัสดุรูพรุนจะช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้นทั้งในด้านของการเร่งปฏิกิริยา และการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ (Orita และคณะ, 2012; วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ, 2009) เมื่อเอนไซม์ยังสามารถรักษากิจกรรมได้ดีอยู่ก็จะทำให้เครื่องมือตรวจวัดไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นสามารถตรวจวัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับวัสดุรูพรุนประเภทเมโซพอร์ซิลิกานั้นมีคุณสมบัติทั่วไป และมีการนำมาใช้งานได้ในรูปแบบไหนบ้างสามารถพิจารณาได้ในหัวข้อถัดไป

3.2 เมโซพอร์ซิลิกา

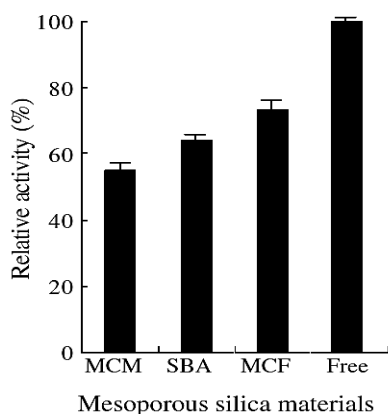
เมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica) เป็นวัสดุที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนสม่ำเสมอ (highly uniform) มีพื้นที่ผิวสูง (high surface area) ประมาณ 1,500 ตารางเมตรต่อกรัม และปริมาตรรูพรุนสูง (large pore volume) ประมาณ 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม (Ispas และคณะ, 2008; Park และคณะ, 2003) เมื่อมีการนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ก็จะช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพ และยังสามารถปกป้องเอนไซม์จากสภาวะแวดล้อมภายนอกนั้นคือ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ หรือแม้กระทั่งความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมได้ (Takahashi และคณะ, 2000; Orita และคณะ 2012) สำหรับวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่นิยมนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ เพราะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2-50 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่มีขนาดระหว่าง 2-20 นาโนเมตร (Takahashi, 2000)

วัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่มีการสังเคราะห์ใช้งานจะมีรูปร่างของโครงสร้างและขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันออกไปโดยชนิดที่มีการสังเคราะห์ใช้กันเช่น FSM-16, MCM-41, MCM-48, SBA-15 และ MCF (Lettow และคณะ, 2000 ; Hoffmann และคณะ, 2006) ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตรงโครงสร้างของรูพรุน และขนาดของรูพรุนเช่น Chi และคณะ (2005) สังเคราะห์ MCM-41, MCM-48 และ SBA-15 ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2.9, 2.3 และ 5.5 นาโนเมตรตามลำดับ วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ (2009) สังเคราะห์ MCM-41, SBA-15 และ MCF ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 3.2, 5.4 และ 14.6 นาโนเมตรตามลำดับแบบจำลองโครงสร้างของรูพรุนแสดงดังรูปที่ 3.2 โดย MCM-41 จะมีโครงสร้างแบบเฮกซะโกนอล (hexagonal) ที่มีรูพรุนสม่ำเสมอรูปทรงกระบอก (dimensional cylindrical pore) ส่วน SBA-15 ก็มีลักษณะโครงสร้างที่เหมือนกับ MCM-41 แต่จะมีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่กว่าคือประมาณ 6-15 นาโนเมตร และ MCF จะมีโครงสร้างแบบคิวบิก (cubic shape) มีขนาดของรูพรุนใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองชนิด โดยเมื่อเรียงตามขนาดของรูพรุนจากมากไปน้อยจะได้ว่า MCF>SBA-15>MCM-41 ตามลำดับ

ซึ่งขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันของวัสดุเหล่านี้เมื่อนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์จะส่งผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยจากการทดลองตรึงเอนไซม์ฮอสรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) ในวัสดุรูพรุน 3 ชนิดคือ MCM-41, SBA-15 และ MCF ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 3.2, 5.4 และ 14.6 นาโนเมตรตามลำดับ พบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงรูไว้เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ทั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง พบว่า MCF ที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดสามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ได้สูงสุด โดยที่อุณหภูมิห้องพบว่าวัสดุ MCF สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ MCM-41 และ SBA-15 มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ (วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ, 2009) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Orita และคณะ (2012) Orita ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ cholesteryl ester hydrolase (EC 3.1.1.13) ในวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่มีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ MCM-41, SBA-15 และ MCF ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2.7, 9.5 และ 22.5 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับบนวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่แตกต่างกันนี้พบว่า MCF ซึ่งมีขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดสามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ดีที่สุด และมีผลกระทบต่อแอกทิวิตีหรือกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับวัสดุรูพรุนอีกสองชนิดคือ MCM-41 และ SBA-15 แสดงดังรูปที่ 3.3 แต่การตรึงเอนไซม์ในวัสดุเมโซพอร์ซิลิกานั้นจะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ (free enzyme) แต่ในระยะยาวจะเป็นผลดีเพราะวัสดุรูพรุนเหล่านี้สามารถช่วยปกป้องเอนไซม์จากสิ่งแวดล้อมภายนอกทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ให้ลดลงอย่างช้าๆ ไม่สูญเสียง่ายเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ



รูปที่ 3.2 แบบจำลองลักษณะโครงสร้างของรูพรุนและภาพถ่าย TEM ของ (a) MCM-41, (b) SBA-15 และ (c) MCF (วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ, 2009)



รูปที่ 3.3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ (Activity) เมื่อทำการตรึงในวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาชนิดต่างๆ เทียบกับเอนไซม์อิสระ (Orita และคณะ, 2012)

จากการทดลองทั้ง 2 งานวิจัยจะเห็นว่าการนำเอนไซม์มาตรึงรูปภายในวัสดุตรึงประเภทเมโซพอร์ซิลิกาจะช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สูง โดยเฉพาะวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาชนิด MCF ซึ่งมีขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดจะสามารถเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกที่จะสังเคราะห์วัสดุ MCF เพื่อที่จะนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสสำหรับดัดแปลงอิเล็กทรอนิกส์สร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง ซึ่งในหัวข้อถัดไปจะนำเสนองานวิจัยที่มีการนำวัสดุประเภทเมโซพอร์ซิลิกานี้มาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์

3.3 วัสดุประเภทเมโซพอร์ซิลิกากับการประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์

การสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลงทั้งกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมตนั้นจะมีการใช้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) เป็นส่วนของสารชีวภาพเหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันตรงส่วนของวัสดุที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ วิธีที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ รวมถึงอิเล็กทรอนิกส์ที่เลือกใช้ ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการวัดของไบโอเซนเซอร์แตกต่างกัน สำหรับในหัวข้อนี้ก็นำเสนอข้อมูลของวัสดุชนิดต่างๆที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ในงานไบโอเซนเซอร์ว่ามีข้อดี และข้อจำกัดอย่างไรบ้าง อิทธิพลของพารามิเตอร์ (parameters) ที่มีผลต่อตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์ รวมถึงยกตัวอย่างงานที่มีการใช้ไบโอเซนเซอร์ในการวัดสารฆ่าแมลง โดยเริ่มจากวัสดุที่เลือกใช้ตรึงเอนไซม์ซึ่งงานวิจัยนี้จะใช้วัสดุเมโซพอร์ซิลิกาชนิด MCF มาตรึงเอนไซม์เนื่องจากมันมีคุณสมบัติเด่นในด้านของการช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุชนิดอื่น ซึ่งการเปรียบเทียบด้านคุณสมบัติทั้งข้อดี และข้อจำกัด แสดงดังตารางที่ 3.3

จากตารางที่ 3.3 จะเห็นว่าจุดเด่นของวัสดุเมโซพอร์ซิลิกา คือ ช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ ซึ่งตรงตามจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ ที่ต้องการจะสร้างไบโอเซนเซอร์ที่มีเสถียรภาพ

ในการตรวจวัด และมีเสถียรภาพในการเก็บรักษา คือสามารถเก็บหัตถ์อิเล็กโทรดไว้ได้นานโดยที่ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ตรึงอยู่บนอิเล็กโทรดมีการสูญเสียกิจกรรมไปน้อยที่สุด ดังนั้นวัสดุ เมโซพอร์ซิลิกาจึงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 ข้อดี และข้อจำกัดของวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาเปรียบเทียบกับวัสดุชนิดอื่นที่ใช้ในการตรึง เอนไซม์ ในงานไบโอเซนเซอร์ (Ispas และคณะ, 2009)

| วัสดุ | ข้อดี | ข้อจำกัด |
|---|--|--|
| เมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica) | <ol style="list-style-type: none"> 1. รักษาเสถียรภาพด้านการทำงานและการเก็บรักษาของเอนไซม์ ในสถานะที่ไม่เอื้ออำนวย เช่น organic solvent ที่ไม่เหมาะสม อุณหภูมิที่สูงเกินไป 2. มีพื้นที่ผิวสูง (high surface area) | <ol style="list-style-type: none"> 1. การแพร่ของสารไม่ค้อยดี (diffusion barriers) 2. ในการสังเคราะห์จะพบกับปัญหาตรงที่ขนาดรูพรุนและโครงสร้างอาจมีการเปลี่ยนแปลง 3. ไวต่อค่า pH และการเปลี่ยนแปลงประจุ |
| วัสดุนาโน เช่น คาร์บอนนาโนทิวป์ | <ol style="list-style-type: none"> 1. มีพื้นที่ที่ active ต่อกระบวนการไฟฟ้าเคมี 2. นำไฟฟ้า | <ol style="list-style-type: none"> 1. การรวมตัวกันของอนุภาค ควบคุมยาก |
| วัสดุของแข็ง (solid supports) เช่น โลหะ กลาสซี คาร์บอน ที่ตรึงกับเอนไซม์ ผ่านพันธะโควาเลนต์ | <ol style="list-style-type: none"> 1. มีเสถียรภาพ (stable) 2. ไม่มีปัญหาด้านการแพร่ 3. วัสดุของแข็งบางชนิดนำไฟฟ้า เช่น ทองนาโน 4. เวลาในการตอบสนองสั้น (short response time) | <ol style="list-style-type: none"> 1. ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก 2. การนำกลับมาใช้ใหม่ (reproducibility) 3. เอนไซม์อาจสูญเสียสภาพ |
| พอลิเมอร์ ตรึงโดยวิธีกักเก็บ (entrapment) | <ol style="list-style-type: none"> 1. พอลิเมอร์หลายๆชนิดมีคุณสมบัติเข้ากับเอนไซม์ได้ดี (biocompatible) 2. สามารถใช้สร้างส่วนของสารชีวภาพ (bioreceptors) ได้หลากหลาย 3. พอลิเมอร์บางชนิดนำไฟฟ้าได้ | <ol style="list-style-type: none"> 1. การแพร่ของสารไม่ค้อยดี (diffusion barriers) |
| โซลเจล (sol-gel) ตรึงโดยวิธีกักเก็บ (entrapment) | <ol style="list-style-type: none"> 1. การผลิตใช้ขั้นตอนเดียว และใช้อุณหภูมิต่ำ | <ol style="list-style-type: none"> 1. การแพร่ของสารไม่ค้อยดี 2. มีปัญหาในการควบคุมขนาดของรูพรุน (pore size) 3. การนำกลับมาใช้ใหม่ |

Wu และคณะ ในปี 2007 ได้สังเคราะห์วัสดุผสมระหว่างเมโซพอร์ซิลิกา/คาร์บอน (mesocellular silica/carbon nanocomposite foams, MSCF) เพื่อนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase, GOD) สร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยวัสดุ MSCF ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดรูพรุนกระจายตัวอยู่ในช่วง 7 ถึง 20 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ตรึงคือ $7.0 \times 5.5 \times 8.0$ นาโนเมตร ซึ่งเมื่อนำมาตรึงเอนไซม์ ด้วยวิธีการดูดซับพบว่าวัสดุชนิดนี้มีปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่สามารถตรึงรูปได้คิดเป็น 44.8 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อนำเอนไซม์ที่ตรึงรูปในวัสดุ MSCF มาตัดแปลงบนอิเล็กโทรด แบบ GCE ที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วยสารแนฟฟิออน (nafion) จะได้ชั้นของอิเล็กโทรดเป็น GCE/nafion /MSCF/GOD ซึ่งเมื่อนำไปวัดกลูโคสซึ่งละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7 โดยป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ -400 มิลลิโวลต์ พบว่าช่วงความเข้มข้นของกลูโคสที่วัดได้ (linear range) คือ 0.05 ถึง 5.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (detection limit) มีค่า 35 ไมโครโมลาร์ เมื่อทดสอบการเก็บรักษาอิเล็กโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าวัสดุ MSCF ยังช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สูงโดยอิเล็กโทรด ยังมีการตอบสนองถึง 94 %

Jingjing และคณะ ในปี 2009 ได้ทำการทดลองสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคส โดยตรึงเอนไซม์ GOD ในวัสดุสังเคราะห์ผสมระหว่างอนุภาคนาโนทองคำกับเมโซพอร์ซิลิกาชนิด SBA-15 (AuNPs/SBA-15) โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ทำโดยปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ SBA-15 ด้วยสารก่อกำบังขั้น ((3-aminopropyl)triethoxylane, APTES หรือ APTS) เพื่อให้วัสดุชนิดนี้ สามารถดูดซับทองไอออนจากสารตั้งต้นคือสารละลาย HAuCl₄ แล้วทำการรีดิวซ์ด้วยกรด KBH₄ ให้เกิดเป็นอะตอมยึดเกาะในวัสดุ SBA-15 ซึ่งวัสดุชนิดนี้เมื่อนำไปใช้ตรึงเอนไซม์ GOD แล้ว นำไปตรวจวัดกลูโคสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7 พบว่าสามารถ ตรวจวัดกลูโคสได้ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 48 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ เมื่อทดสอบการเก็บรักษาอิเล็กโทรดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าวัสดุ MSCF ยังช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สูงโดยอิเล็กโทรด ยังมีการตอบสนองถึง 91 %

Wu และคณะ ปี 2011 ได้ทำการทดลองสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง ประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดโมนโครโทฟอส (monocrotophos) โดยใช้วัสดุ MCF มาใช้เป็นวัสดุ สำหรับตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปใน 1 อิเล็กโทรด มีปริมาณ 50 มิลลิยูนิต ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุตรึง MCF นี้จะถูกนำมาตัดแปลงบนอิเล็กโทรด ร่วมกับสารพอลิเมอร์ชนิดพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Poly(vinyl alcohol), PVA) ซึ่งจะมีลักษณะของ ชั้นอิเล็กโทรดที่ตัดแปลงเป็น GCE/PVA/MCF/AChE โดยก่อนนำมาวัดสารฆ่าแมลงเขาได้ทำการ

ทดสอบปัจจัยที่จะมีผลต่อการวัดนั้นคือค่า pH ซึ่งพบว่า pH 9 เป็นค่าที่ให้การตอบสนองของกระแสสูงสุด เมื่อนำไปวัดสารฆ่าแมลงในระบบวัดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นคืออะซิติลโคลีน คลอไรด์เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ค่า incubation time คือ 10 นาที ศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนคือ 0.68 โวลต์ ก็พบว่าสามารถตรวจวัดสารฆ่าแมลงชนิดโมโนโคโตฟอสได้ในช่วงความเข้มข้น 0.05 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อนำมาทดสอบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วันพบว่าวัสดุ MCF สามารถช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สูง ทำให้การตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ถูกเก็บรักษา ยังมีการตอบสนองของกระแสสูงถึง 92% เมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดที่ทำการผลิตในวันแรก

ซึ่งจากทั้ง 3 งานวิจัยจะเห็นว่าวัสดุรูพรุนประเภทเมโซพอร์ซิซิลิกา โดยเฉพาะ MCF เมื่อนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อนำไปใช้วัดสารฆ่าแมลงจะช่วยรักษาความคงตัวของอิเล็กโทรดให้มีปริมาณการตอบสนองของสัญญาณที่สูงถึงแม้ว่าจะเก็บรักษาโดยใช้เวลานานถึง 1 เดือน และวัสดุประเภทนี้มีคุณสมบัติ modifiable surface คือสามารถปรับปรุงพื้นผิวของอนุภาคได้ง่ายจึงมีการนำวัสดุชนิดต่างๆ มาดัดแปลงโดยเฉพาะโลหะวัสดุเช่น อนุภาคนาโนทอง เพื่อช่วยปรับปรุงคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าของวัสดุเหล่านี้ เมื่อนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ก็จะช่วยให้มีประสิทธิภาพในการตอบสนองทางไฟฟ้าได้ดีขึ้น ตัวอย่างงานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้วัสดุชนิดต่างๆ เช่น พอลิเมอร์ เส้นใย หรือวัสดุโลหะ มาดัดแปลงร่วมกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลงแสดงดังตารางที่ 3.4

จากตารางที่ 3.4 เมื่อพิจารณาจากวัสดุชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์เพื่อใช้ในงานไบโอเซนเซอร์พบว่าวัสดุชนิดเมโซพอร์ซิซิลิกาจะสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ในปริมาณสูงที่สุดคือ 92 เปอร์เซ็นต์ใน 30 วัน โดยวัสดุชนิดอื่นๆ เช่น เมมเบรนของพอลิเมอร์ Poly(acrylonitrile-methylmethacrylate-sodium vinylsulfonate) ก็ช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ซึ่งการที่กิจกรรมของเอนไซม์ในอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ลดลงอย่างช้าๆ นั้นจะช่วยให้สามารถเก็บไว้ใช้งานได้นาน

ตารางที่ 3.4 อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง

| ชนิดของเมทริกซ์ที่ใช้ในการตรึง/ชนิดอิเล็กโทรด | วิธีการตรึง | สารที่ทำการวิเคราะห์ | Linearity (μM) | Detection limit (μM) | Incubation time (min) | Storage stability (day) | เอกสารอ้างอิง |
|---|---------------------------|----------------------|--|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| PAN membrane/AuNPs/Pt electrode | Covalent | Paraoxon | 3.6×10^{-7} - 3.6×10^{-4} | 0.026×10^{-5} | 20 | ลดลงเหลือ 90% (90 วัน) | Marinov และคณะ (2010) |
| PAMAM-gold/CNTs/GCE | Electrostatic interaction | Carbofuran | 4.8×10^{-3} - 9.0×10^{-2} | 4.0×10^{-3} | 9 | ลดลงเหลือ 90% (21 วัน) | Qu และคณะ (2010) |
| Graphitenanoplatelet - Chitosan composite/GCE | Covalent | Chloropyrifos | 1.0×10^{-4} - 1.0 | 1.58×10^{-4} | 10 | ลดลงเหลือ 85% (30 วัน) | Ion และคณะ (2010) |
| Chitosan/PB/MWCNTs/AuNPs/Au electrode | Electrodeposition | malathion | 0.05×10^{-3} - 75×10^{-3} | 0.05×10^{-3} | 10 | ลดลงเหลือ 90 % (30 วัน) | Zhai และคณะ (2013) |
| PB-Chitosan/GCE | Covalent | Carbaryl | 0.01-0.4 | 3.0×10^{-3} | 10 | ลดลงเหลือ 86% (30 วัน) | Song และคณะ (2011) |
| MWCNTs-Au nanocomposites / GCE | Hydrophilic adhesion | Malathion | 3.0×10^{-3} - 3.027 | 1.81×10^{-3} | 8 | ลดลงเหลือ 85% (30 วัน) | Du และคณะ (2010) |
| MCF/GCE | Electrostatic interaction | Monocrotophos | 2.0×10^{-4} - 4.48×10^{-2} | 2.0×10^{-4} | 10 | ลดลงเหลือ 92 % (30 วัน) | Wu และคณะ (2011) |

หมายเหตุ GCE คือ อิเล็กโทรดแบบกาสีคาร์บอน

MWCNTs คือ วัสดุคาร์บอนนาโนทิวบ์

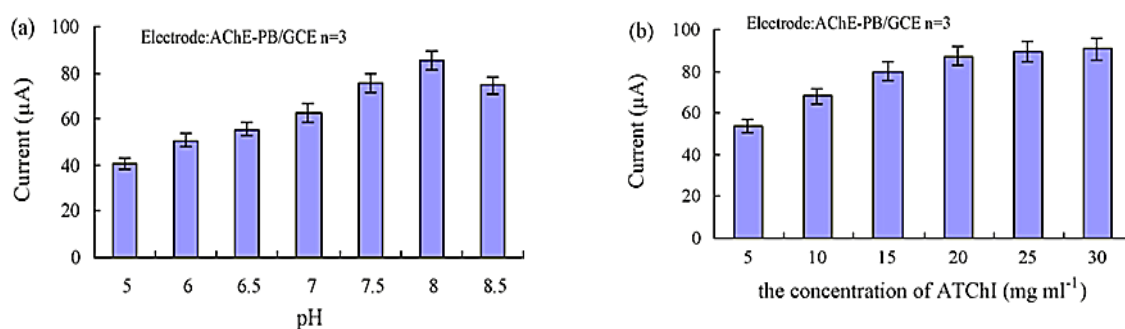
PB คือ สารปรัสเซียน บลู

PAN membran คือ เมมเบรนจากวัสดุพอลิเมอร์ Poly(acrylonitrile-methylmethacrylate-sodium vinylsulfonate) membranes

PAMAM คือ พอลิอะมีโดเอมีน

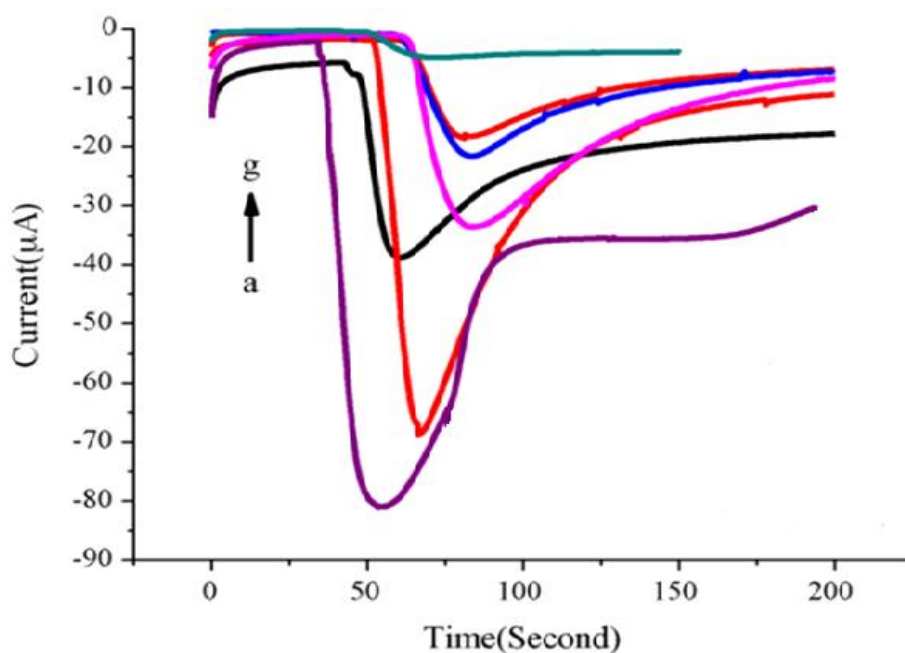
3.4. พารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์

Sun และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการสร้างไบโอเซนเซอร์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต ชนิดไดโคลออส (dichlovos) โดยทำการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ด้วยวิธีคลอสลิงค์ (cross-linking) ด้วยสารกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) แล้วตรึงเข้ากับอิเล็กโทรดด้วยไคโตซาน ซึ่งอิเล็กโทรดที่ใช้เป็นแบบกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด (glassy carbon electrode) มีการปรับปรุงโดยการเคลือบด้วยชั้นของพลัสเซียนบลู (prussian blue, PB) เพื่อช่วยในเรื่องการถ่ายเทอิเล็กตรอน โดยชั้นของอิเล็กโทรดประกอบด้วย: AChE/Chitasan/PB/GCE จากนั้นนำไปใช้ในการตรวจวัดค่า ซึ่งมีขั้นตอนของการวัดคือ จุ่มอิเล็กโทรดลงไปในระบบวัดซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution) และสารอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ (Acetylthiocholine chloride) หลังจากนั้นทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าคงที่ค่าหนึ่งซึ่งจะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าเกิดขึ้นจากกระแสอิเล็กตรอนที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของเอนไซม์กับสารอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ เกิดการถ่ายเทมายังผิวหน้าของอิเล็กโทรด ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อกระแสคือ ค่า pH และความเข้มข้นของสารอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ โดยการทดสอบผลของค่า pH ทำโดยปรับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในระบบวัดให้มีค่า pH ตั้งแต่ 5 ถึง 8.5 ซึ่งพบว่าที่ค่า pH 8 ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงสุดดังนั้นค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการวัดคือ pH 8 และทดสอบความเข้มข้นของสารอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5 ถึง 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของสารอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงและเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการวัด ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.4



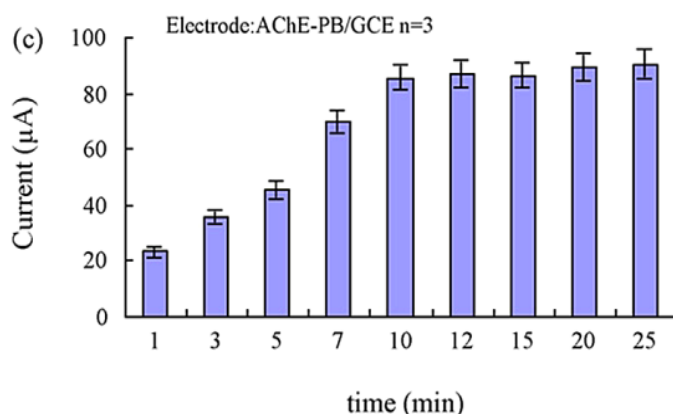
รูปที่ 3.4 การทดสอบหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสม a) ค่า pH b) ความเข้มข้นของสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์

เมื่อได้ค่า pH และความเข้มข้นของอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์ที่เหมาะสมแล้ว ก็จะนำไปใช้วัดสารฆ่าแมลงต่อไป โดยเมื่อเติมสารฆ่าแมลงชนิดไดโคลออส (dichlovos) ลงในระบบวัดแล้ว สารฆ่าแมลงนี้จะไปยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ทำให้ไม่เกิดกระแสอิเล็กตรอนถ่ายเทมายังอิเล็กโทรด กระแสไฟฟ้าจึงลดลงเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่เติมลงไป ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 สัญญาณการตอบสนองของ AChE/Chitosan/PB/GCE ไบโอเซนเซอร์ในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8 และอะซิติลไทโอโคลีนคลอไรด์เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังเติมสารฆ่าแมลงไดโคลออส (Dichlovos) ที่ความเข้มข้น (a) 0 (b) 10 (c) 30 (d) 100 (e) 300 (f) 500 (g) 1000 นาโนกรัมต่อลิตร

ซึ่งอีกปัจจัยในการวัดสารฆ่าแมลงที่ต้องคำนึงถึงคือค่า เวลาการตอบสนอง (incubation time) ที่ใช้ในการตอบสนองต่อสารฆ่าแมลงตั้งแต่จุดเริ่มต้นที่เติมสารฆ่าแมลงจนเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) โดยจะใช้ค่าเวลาเป็นมาตรฐานเดียวกันทุกความเข้มข้นที่วัด ดังนั้นจึงต้องหาเวลาที่เหมาะสมที่จะทำให้แน่ใจได้ว่าสามารถวัดได้ครอบคลุมทุกความเข้มข้น โดยค่าเวลาการตอบสนอง (Incubation time) ของ Sun และคณะ (2009) คือ 10 นาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.6 เนื่องจากเป็นเวลาที่หลังจากเติมสารฆ่าแมลงลงไปแล้วการตอบสนองเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ ที่จุดนี้



รูปที่ 3.6 ค่าเวลาการตอบสนอง (Incubation time) ที่เหมาะสม

โดยคุณสมบัติเบื้องต้นของไบโอเซนเซอร์ที่สำคัญที่ควรตรวจวัด คือ ช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้ (linear range) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าได้ (detection limit) และเสถียรภาพในการเก็บรักษา (storage stability) สำหรับงานวิจัยของ Sun และคณะ (2009) พบว่า ช่วงความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงไดโคลวอสที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 10 นาโนกรัมต่อลิตร ถึง 10 ไมโครกรัมต่อลิตรมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าได้ที่ 2.5 นาโนกรัมต่อลิตร และเสถียรภาพในการเก็บรักษาพบว่าหลังจุ่มในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8 และอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือ 95.1 เปอร์เซ็นต์จากเริ่มต้น

บทที่ 4

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

4.1 อุปกรณ์และสารเคมี

4.1.1 อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P100, 1000 และ P5000 บริษัท Gilson ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องปั่นกวนด้วยแรงแม่เหล็กและให้ความร้อน (magnetic stirrers and heater) บริษัท Barnstead Thermolyne , ประเทศแคนาดา
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น MP220 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
4. เครื่องอัลตราโซนิก คลีนเนอร์ (ultrasonic cleaner) แบบอ่าง รุ่น CREST-MODEL HT บริษัท ไฮแอนติพิโตโปรโมชัน จำกัด
5. ตู้อบความร้อนสูญญากาศ (vacuum oven) รุ่น VD23 บริษัท Binder model ประเทศ สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องตรวจวัดค่าทางเคมีไฟฟ้า potentiostat/Galvanostat รุ่น PGSTAT101 บริษัท Metrohm Autolab ประเทศเนเธอร์แลนด์
7. อิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrodes) แบบ Ag/AgCl รุ่น 6.0733.100 บริษัท Metrohm AG 9101 Herisau ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
8. อิเล็กโทรดช่วยแพลตินัม (auxiliary electrode) แบบ Separate Pt-rod electrode 6.0331.00 บริษัท Metrohm AG 9101 Herisau ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
9. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy หรือ TEM รุ่น Jem 2010 บริษัท Jeol
10. เครื่องวิเคราะห์ Brunaur-Emmet-Teller (BET)
11. เครื่องวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)
12. เครื่องวิเคราะห์ศักย์ซีต้า Zeta potential
13. เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-ray Diffractometer, XRD)
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectrophotometer
14. โถดูดความชื้น
15. ขวดเทฟลอน Teflon

16. เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิ
17. เต้าเผาความร้อนสูง

4.1.2 สารเคมี

1. เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) EC. 3.1.1.7 type VI-S บริษัท Sigma-Aldrich (844 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
2. ไคโตซาน (deacetylation degree 85 % , MW 2000 kDa) บริษัท Seafresh chitosan ประเทศไทย
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Fisher Scientific
4. โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (NaH_2PO_4) บริษัท Fisher Scientific
5. ไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรต (hydrogen tetrachloroaurate, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) หรือเรียกอีกชื่อว่า กรดคลอโรอูริก ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Sigma-Aldrich
6. พลูโรนิค พี123 (pluronic P123) บริษัท BASF corporation ประเทศ USA
7. เตตระเอทอกซีไซเลน (tetraethoxysilane, TEOS) ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Sigma-Aldrich
8. 1,2,3-ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5-trimethylbenzene, TMB) บริษัท Sigma-Aldrich
9. 3-อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTS) บริษัท Fluka
10. อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ (acetylthiocholine chloride, ATC) บริษัท Sigma-Aldrich
11. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ความบริสุทธิ์ 37% บริษัท Asian Chemie (Thailand) Company limited
12. สารละลายโทลูอีน (toluene, C_7H_8) ความบริสุทธิ์ 97% บริษัท Asian Chemie(Thailand) Company limited
13. สารละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, CH_2Cl_2) ความบริสุทธิ์ 97% บริษัท Asian Chemie(Thailand) Company limited
14. สารละลายไอโซโพรพานอล (isopropanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) ความบริสุทธิ์ 97% บริษัท Asian Chemie(Thailand) Company limited
15. กรดอะซิติก บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ

16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Ajax Chemical
17. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)
18. สาร DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) ความบริสุทธิ์ 98% บริษัท Sigma-Aldrich

4.2 วิธีการทดลอง

4.2.1 การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (mesocellular foam silica, MCF) ทำได้โดยละลายสารกำหนดโครงสร้างพลูโรนิค พี 123 (pluronic P123) จำนวน 2 กรัม ลงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1.6 โมลาร์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนด้วยเครื่อง hotplate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เทอร์โมมิเตอร์คอยวัดอุณหภูมิ และคอยควบคุมเพื่อให้อุณหภูมิของระบบคงที่ที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสาร 1,2,3-ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5-trimethylbenzene, TMB) ปริมาณ 1 กรัมตามลงไป ทำการผสมปั่นกวนจนสารละลายผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารเตตระเอททอกซีไซเลน (tetraethoxysilane, TEOS) ซึ่งเป็นแหล่งของซิลิกาลงไป 4.25 กรัม ทำการผสมปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 110 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองในตู้อบความร้อน ผสมปั่นกวนที่อุณหภูมินี้ต่อเนื่องอีก 24 ชั่วโมง เมื่อกระบวนการของการผสมเสร็จสิ้นลงจะเกิดตะกอนลักษณะสีขาวขึ้นในสารละลาย ซึ่งจะต้องนำมาผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน (whatman) เบอร์ 5 เพื่อแยกเอาเฉพาะตะกอนที่เกิดขึ้น จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำสองครั้ง นำมากรอง และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาผ่านกระบวนการสุดท้ายคือ การเผาที่เรียกอีกอย่างว่า การแคลไซน์ (calcine) ในเตาเผาความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดน้ำสารอินทรีย์ และไอออนบวกหรือลบต่างๆที่ปนเปื้อนอยู่ในโครงสร้างซิลิกาออกไป ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นเมโซพอร์ัส ซิลิกาที่มีลักษณะเป็นผง (วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ, 2009)

4.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเมโซพอร์ัสโฟมซิลิกา

การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (MCF) ที่สังเคราะห์ขึ้น สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ สำหรับ MCF คุณสมบัติแรกที่เมื่อทำการสังเคราะห์วัสดุนี้แล้วจะต้องนำมาตรวจวัดคือ พื้นที่ผิว (surface area) ปริมาตรรูพรุน (pore volume) และขนาดรูพรุน (pore diameter) ซึ่งมีความสำคัญต่อการนำไปใช้ตรึงเอนไซม์ เพราะ MCF ที่สังเคราะห์ได้นั้นต้องมีขนาดของรูพรุนที่กว้างพอที่จะสามารถตรึงเอนไซม์ AChE ที่มีขนาด

4.5x6.0x6.5 นาโนเมตรได้ (Milkani และคณะ, 2011) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องวิเคราะห์พื้นผิว BET ซึ่งจะใช้เทคนิคของการดูดซับก๊าซไนโตรเจน (nitrogen adsorption isotherm) ของวัสดุที่ต้องการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ (Brunauer-Emmett-Teller method, BET) หลังจากนั้นจะนำมาทดสอบหาคุณสมบัติทางเคมีคือ การตรวจสอบหาหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว MCF ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยการใช้เครื่องมือเอฟทีไออาร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพนั่นคือศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของ MCF ด้วยเครื่อง Zeta potential และดูลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของรูพรุนได้โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีสมรรถภาพสูงสามารถให้ข้อมูลโครงสร้างของรูพรุน และรูปร่างของวัสดุ MCF ที่มีขนาดรูพรุนระดับนาโนได้

หลังจากนั้นในขั้นตอนต่อมาเมื่อมีการปรับปรุงพื้นผิวของ MCF ด้วยสารก่อกำบังชั้น APTS แล้วจะสามารถตรวจสอบการเกิดขึ้นสารนี้พบวัสดุ MCF ได้ด้วยเครื่องมือเอฟทีไออาร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพนั่นคือศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของ MCF ด้วยเครื่อง Zeta potential

และในส่วนสุดท้ายเมื่อนำวัสดุ MCF ไปสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแล้วสามารถตรวจสอบเกิดขึ้นของอนุภาคนาโนทองในรูพรุนของ MCF ได้ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ซึ่งถ้าเกิดทองจริงจะปรากฏลักษณะของโครงสร้างเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายทั่วไปบนพื้นผิว MCF ซึ่งสามารถยืนยันว่าโครงสร้างที่เกิดขึ้นบน MCF เป็นทองจริงโดยการตรวจวัดด้วยเครื่องเอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรคชัน (X-Ray diffraction, XRD) ซึ่งสามารถยืนยันชนิดของธาตุ และลักษณะโครงสร้างผลึกของธาตุที่เกิดขึ้นได้ และสุดท้ายคือการตรวจหาคุณสมบัติทางศักย์ไฟฟ้าบนพื้นผิวด้วยเครื่อง Zeta potential

4.2.3 การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง

สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (MCF/AuNPs) จะแบ่งการดำเนินงานออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ MCF ขั้นตอนการดูดซับทองไอออนในรูพรุนของวัสดุ MCF และขั้นตอนการรีดิวซ์ทองไอออนที่ดูดซับอยู่ในรูพรุนของวัสดุ MCF ให้กลายเป็นอนุภาคนาโนทองของทองยัดเกาะในรูพรุน

4.2.3.1 การปรับปรุงพื้นผิวของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกาด้วยสารก่อกำบังชั้น

การปรับปรุงพื้นผิววัสดุ MCF ด้วยสารก่อกำบังชั้น (Functional ligand) ในการทดลองนี้จะใช้สาร 3-อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTS) เพื่อเตรียมพื้นผิววัสดุ MCF ให้เหมาะสมสำหรับดูดซับไอออนของทองในรูปของคลอไรด์ไอออน

(AuCl_4^-) ซึ่งการปรับปรุงพื้นผิววัสดุ MCF ด้วยสารก่อกำเนิดชั้นนี้จะทำให้คุณสมบัติทางประจุของพื้นผิว รุพรมมีค่าประจุไฟฟ้าเป็นบวกมากขึ้น (Ashayer และคณะ 2008) ทำให้สามารถดูดซับทองคลอไรด์ ไอออนที่มีประจุลบได้ดีขึ้น

โดยขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวเริ่มต้นจากการเติมวัสดุ MCF จำนวน 1 กรัม และสารก่อกำเนิดชั้น APTS ร้อยละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวล (%w/w) ลงในสารละลายโทลูอินเข้มข้น ที่มีความบริสุทธิ์ 97% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมปั่นกวนให้เข้ากันโดยใช้เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการถ่ายสารใส่ขวดเทฟลอน (teflon bottle) ปิดฝาให้สนิท แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้อบความร้อนธรรมดา ซึ่งกระบวนการนี้จะ เป็นกระบวนการของการรีฟลักซ์สารในโทลูอินเพื่อปรับปรุงพื้นผิว ซึ่งวัสดุ MCF ที่ผ่านการรีฟลักซ์ใน โทลูอินแล้ว จะนำมาทำการล้างผ่านกระดาษกรอง 2 รอบ รอบแรกทำการล้างด้วยสารละลายโทลูอิน ที่มี ความบริสุทธิ์ 97% และรอบที่สองล้างด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนความบริสุทธิ์ 97% แล้วนำ MCF ที่เหลืออยู่บนกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วที่ฝาปิดมิดชิด แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำไปใช้งาน (วิไลวรรณ ช่วยยก และคณะ, 2009)

4.2.3.2 การดูดซับทองไอออนในรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

การดูดซับทองไอออนในรูพรุนของวัสดุ MCF นั้นไอออนของทองที่ถูกดูดซับจะอยู่ใน รูปของทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ที่มีลักษณะเป็นประจุลบ ซึ่งเตรียมโดยการแช่วัสดุ MCF ที่ ปรับปรุงพื้นผิวแล้วจำนวน 1 กรัมแช่ ในสารละลายผสมระหว่างกรดคลอโรอริก (HAuCl_4) ที่ความ เข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ และสารละลายไอโซโพรพานอลที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในน้ำปราศจาก ไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดเทฟลอนแล้วปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น MCF ที่ดูดซับ AuCl_4^- ในสารละลายที่ประกอบไปด้วยไอโซโพรพานอลใน ขวดเทฟลอนปิดฝานี้จะนำไปผ่านกระบวนการรีดิวซ์เพื่อให้เกิดทองในขั้นตอนถัดไป (ดัดแปลงวิธีการ ทดลองมาจาก Chen และคณะ 2001)

4.2.3.3 การรีดิวซ์ทองไอออนที่ดูดซับอยู่ในรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา ให้กลายเป็นอนุภาค

ขั้นตอนนี้เป็น การนำวัสดุ MCF ที่ทำการดูดซับทองคลอไรด์ไอออนจากขั้นตอนที่ 4.2.3.2 มาผ่านกระบวนการรีดิวซ์ด้วยวิธีอัลตราโซนิก เพื่อรีดิวซ์ให้ไอออนของทอง (gold ions, Au^{3+}) จากทองคลอไรด์ (AuCl_4^-) ที่ดูดซับบนผิวของวัสดุ MCF กลายเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) ที่อยู่ในลักษณะของอนุภาคเกาะบนพื้นผิวของวัสดุ MCF

โดยขั้นตอนของการรีดิวซ์สามารถทำได้โดยนำสารผสมที่ผ่านกระบวนการดูดซับแล้ว ตามขั้นตอนที่ 4.2.3.2 ซึ่งมีปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วย MCF 1 กรัม มาทำการไล่ก๊าซ

(gas purging) ออกซิเจนออกไป ด้วยการพ่นด้วยก๊าซอาร์กอน (argon gas) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการโซนิเคชัน (sonication) ในเครื่องอัลตราโซนิก คลีนเนอร์ แบบอ่าง โดยการป้อนคลื่นความถี่ขนาด 40 กิโลเฮิรตซ์ เป็นระยะเวลา 120 นาที ซึ่งจะทำให้เกิดการรีดิวซ์ไอออนของทอง (Au^{3+}) ให้กลายเป็นอะตอมของทอง (Au^0) โดยสมการของการเกิดการรีดิวซ์จะแสดงไว้ในบทที่ 2 สมการ 2.13 ถึง 2.14 หลังจากนั้นจะนำมารองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 5 แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีก 3 รอบ จากนั้นนำ MCF/APTS/AuNPs ที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งวัสดุ MCF/APTS/AuNPs ที่สังเคราะห์ขึ้นจะเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วปิดฝาสนิท และเก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำไปใช้งาน (ดัดแปลงวิธีการทดลองมาจาก Chen และคณะ 2001)

4.2.4 การตรึงเอนไซม์ในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

ขั้นตอนต่อมาเป็นการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ในรูพรุนของวัสดุ MCF ทั้ง 3 แบบคือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF ที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยสาร APTS (MCF/APTS) และวัสดุ MCF ที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง (MCF/APTS/AuNPs) จะใช้วิธีในการตรึงเดียวกัน โดยเริ่มจากการทำการละลายเอนไซม์ปริมาณ 0.001 กรัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่า pH 6.0 ปริมาณ 2 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมวัสดุตรึงปริมาณ 0.1 กรัม ลงในสารละลายเอนไซม์นั้นแล้วปั่นกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Wu และคณะ, 2011) จากนั้นทำการแยกส่วนของเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปออกจากเอนไซม์ที่ยังเหลืออยู่ในสารละลายโดยใช้วิธีการกรอง แล้วล้างเพื่อแยกเอาเอนไซม์ที่อยู่ภายนอกวัสดุตรึงออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 จากนั้นวัสดุตรึงที่มีเอนไซม์ตรึงรูปที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองจะนำกลับไปละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการดัดแปลงอิเล็กโทรดในขั้นตอนถัดไป

4.2.5 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำได้โดยวิธีของ Ellman's method (Milkani และคณะ, 2011) วิธีการทดลองเริ่มจากเตรียมเอนไซม์ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองมีกิจกรรมเริ่มต้นที่ 844 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 9.0 แล้วการดูดเอนไซม์ปริมาตร 1 3 6 9 และ 12 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร แล้วเติมสาร DTNB (ซึ่งจะเป็นสารที่จะไปทำปฏิกิริยากับไทโอโคลีน ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารอะซิติลไทโอโคลีน

คลอไรด์ของเอนไซม์ แล้วทำให้เกิดสารสีเหลือง ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร) ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ในคิวเวทท์ (cuvette) แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จะเกิดสารสีเหลืองเกิดขึ้น จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงซึ่งกราฟมาตรฐาน และข้อมูลผลการทดลองแสดงไว้ในภาคผนวก ค ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ที่รูปร่างสามารถหาได้จากการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปในหัวข้อที่ 4.2.4 ปริมาตร 3 ไมโครลิตรซึ่งเป็นปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการตัดแปลงอิเล็กโทรด 1 อิเล็กโทรด มาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น อะซิติกไทโอโคลีน คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร แล้วเติมสาร DTNB ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จะเกิดสารสีเหลืองเกิดขึ้น จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ซึ่งปริมาณการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปเทียบหากิจกรรมของเอนไซม์ได้จากกราฟมาตรฐานที่ทำไว้ในตอนแรก ซึ่งกิจกรรมที่วัดได้จะเป็นกิจกรรมที่เท่ากับ 1 อิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์มี (ดัดแปลงวิธีมาจากการทดลองของ Milkani และคณะ, 2011)

4.2.6 การเตรียมสารละลายโคโคซาน

โคโคซานจะใช้เป็นสารเชื่อมประสานให้วัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเอนไซม์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของอิเล็กโทรดได้ดี โดยจะใช้โคโคซานที่มีความเข้มข้นที่ (5% ของน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเตรียมจากการละลายโคโคซานจำนวน 5 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะได้สารละลายโคโคซานเนื้อเดียวที่มีลักษณะใส หลังจากนั้นทำการปรับค่า pH ให้เหมาะสมกับเอนไซม์คือ pH 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร เป็นสารปรับค่า pH (ซึ่งค่า pH ของโคโคซานที่สามารถปรับค่าได้สูงสุดคือ pH 6.5 เพราะถ้าค่า pH มากกว่านี้จะทำให้โคโคซานเปลี่ยนจากลักษณะที่ใสเป็นขุ่น) ซึ่งสารละลายโคโคซานที่เตรียม 1 ครั้งจะเก็บไว้ใช้ได้นาน 3 วัน โดยเก็บที่อุณหภูมิห้องด้วยการกวนผสมที่ความเร็วรอบช้าๆ ตลอดเวลา (สกนธ์ พันธุ์วิทยากุล และคณะ 2008)

4.2.7 การทำอิเล็กโทรดดัดแปลง

เอนไซม์ AChE ที่ถูกตรึงในวัสดุ MCF/AuNPs จะถูกนำมาประกอบเข้ากับส่วนของอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) แบบ SPCE โดยจะใช้สารละลายโคโคซานที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 4.2.6 เป็นตัวช่วยในการยึดประสานระหว่าง MCF/AuNPs/AChE กับพื้นผิวของอิเล็กโทรดทำงาน ขั้นตอนนี้สามารถทำได้โดยการหยดสารแขวนลอย MCF/AuNPs/AChE ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของ SPCE แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำ

การหยดทับอีกครั้งด้วยสารละลายไคโตซานปริมาตร 3 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งใช้เวลา 20 นาที ในโถดูดความชื้น (desiccator) ซึ่งจะได้อิเล็กโทรดที่ถูกดัดแปลงและพร้อมใช้งาน โดยมีลักษณะชั้นของอิเล็กโทรดเป็น SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/chitosan ซึ่งสามารถนำไปใช้งานได้ทันที ส่วนวิธีการเก็บรักษาจะเก็บไว้ภาชนะปิดมิดชิดแล้วแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2.8 การทดลองเปรียบเทียบผลของชนิดอิเล็กโทรดใช้งาน ต่อการตอบสนองทางไฟฟ้า

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบความสามารถในการตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลงด้วย MCF MCF/APTS MCF/APTS/AuNPs และไคโตซาน เมื่อนำมาใช้ในการตรึงร่วมกับ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในงานไบโอเซนเซอร์ โดยการทดลองจะทำการเตรียมอิเล็กโทรด 8 ประเภท เพื่อเปรียบเทียบกัน คือ

- 1 SPCE เปล่า
- 2 SPCE/chitosan
- 3 AChE/MCF/chitosan
- 4 AChE/MCF/APTS/chitosan
- 5 SPCE/MCF/APTS/AuNPs/chitosan
- 6 SPCE/MCF/AChE/chitosan ไบโอเซนเซอร์
- 7 AChE/MCF/APTS/AChE/chitosan ไบโอเซนเซอร์
- 8 AChE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/chitosan ไบโอเซนเซอร์

ดังนั้นจึงเป็นอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ซึ่งจะทดสอบเปรียบเทียบกันและเลือกอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ที่ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อเตรียมอิเล็กโทรดเสร็จสิ้นแล้ววิธีการวัดค่าจะใช้เทคนิคของไซคลิกโวลแทมเมตรี ซึ่งเป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้าแบบสแกนระหว่าง -0.2 ถึง 1.0 โวลต์ อัตราการสแกน 10 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ในระบบวัดที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 9.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์เข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ โดยจะทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งอิเล็กโทรดที่จุ่มในระบบวัดนี้จะให้ค่าของกระแสที่เปลี่ยนแปลงไปตามค่าศักย์ไฟฟ้าที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบเพื่อดูแนวโน้มว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงชนิดไหนทำให้การตอบสนองเชิงไฟฟ้าสูงสุด และเพื่อเลือกศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับนำไปวัดสารฆ่าแมลงในขั้นตอนถัดไป สำหรับการเตรียมอิเล็กโทรดแต่ละแบบทำโดย

4.2.8.1 SPCE/chitosan ไบโอเซนเซอร์

ใช้สารละลายไคโตซานที่เตรียมได้จากในขั้นตอนที่ 4.2.6 มาหยดลงบนอิเล็กโทรดแบบ SPCE แล้วปล่อยให้แห้งในโถอบความชื้นเป็นเวลา 20 นาที

4.2.8.2 การเตรียมอิเล็กโทรดในแบบที่ 3-5

สำหรับอิเล็กโทรดในแบบที่ 3-5 มีวิธีการเตรียมที่เหมือนกันคือนำวัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS วัสดุ MCF/APTS/AuNPs ปริมาณ 0.1 กรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมปั่นกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปิดปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยดลงบนอิเล็กโทรด SPCE แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ในโถอบความชื้นเป็นเวลา 20 นาที

4.2.8.3 การเตรียมอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ในแบบที่ 6-8

เตรียมโดยการนำสารละลายเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปในวัสดุทั้ง 3 คือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS วัสดุ MCF/APTS/AuNPs ที่เตรียมเหมือนขั้นตอนที่ 4.2.4 มาหยดลงบนอิเล็กโทรดแบบ SPCE แล้วปล่อยให้แห้งในโถอบความชื้นเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการหยดทับด้วยสารละลายไคโตซานอีกชั้นโดยใช้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้งในโถอบความชื้นเป็นเวลา 20 นาที ก็จะได้อิเล็กโทรดดังข้อ 6-8

4.2.9 การสอบปฏิกิริยาที่มีผลต่อการวัด

สำหรับการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์นั้นจะใช้หลักการของแอมเพอร์โรเมตริก ซึ่งเป็นการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่ค่าคงที่ค่าหนึ่งในระบบที่ประกอบด้วยสารตั้งต้น และสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะทำหน้าที่รักษาค่า pH โดยศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนเข้าไปนี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายอิเล็กตรอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ถ่ายเทมายังอิเล็กโทรด ซึ่งกระแสอิเล็กตรอนนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นค่ากระแสไฟฟ้าโดยส่วนทรานสดิวซ์เซอร์ของเครื่องไบโอเซนเซอร์ ซึ่งการทดลองในส่วนนี้จะเป็นการหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวัดนั้นคือ ค่า pH ของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และค่า Incubation time

4.2.9.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น

สามารถทำได้โดยการเตรียมสารตั้งต้นนั้นคืออะซีติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 1.5 5 10 15 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 แล้วนำมาทดสอบการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรด โดยการจุ่มอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ที่ได้จากการทดสอบและเลือกในหัวข้อที่ 4.2.9 จากนั้นป้อนศักย์ไฟฟ้าขนาด 0.8 โวลต์เข้าไป แล้วดูการตอบสนองทางไฟฟ้า โดยเลือกความเข้มข้นที่ให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองสูงสุดเป็นค่าที่เหมาะสม

4.2.9.2 การศึกษาผลของค่า pH

สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่า pH ต่างๆคือ 6 7.4 9 10 และ 11 ซึ่งแต่ละชุดจะประกอบด้วยสารตั้งต้นที่กำหนดค่าไว้ที่ 15 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทดสอบการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรด โดยการจุ่มอิเล็กโทรดที่ได้จากการทดสอบและเลือกในหัวข้อที่ 4.2.9 จากนั้นป้อนศักย์ไฟฟ้าขนาด 0.8 โวลต์เข้าไป แล้วดูการตอบสนองทางไฟฟ้า โดยเลือกค่า pH ที่ให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองสูงสุดเป็นค่าที่เหมาะสม ซึ่งค่านี้จะนำไปใช้ในการวัดสารฆ่าแมลงต่อไป

4.2.9.3 การศึกษาผลของ Incubation time

Incubation time คือระยะเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง สำหรับการทดลองนี้จะเปรียบเทียบการใช้เวลาที่ 5 10 15 และ 20 นาที เพื่อดูแนวโน้มของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยค่าการยับยั้งจะวัดออกมาในรูปของ % incubation (สมการการคำนวณแสดงไว้ในหัวข้อ 2.3 สมการที่ 2.4) ซึ่งสามารถหาได้โดยการนำอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ไปจุ่มในระบบวัดที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นคืออะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการวัดกระแสไฟฟ้าโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 0.8 โวลต์ จะได้ค่ากระแสออกมาค่าแรก ให้เป็นค่ากระแสเริ่มต้น (I_1) จากนั้นเมื่อนำไปวัดสารฆ่าแมลงจะทำโดยนำอิเล็กโทรดไปจุ่มในสารฆ่าแมลงโดยใช้ระยะเวลาในการจุ่มที่ต่างกัน คือ 5 10 15 และ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดกระแสในระบบเดิมโดยป้อนศักย์ไฟฟ้าเท่าเดิมก็จะได้กระแสครั้งที่สองออกมา (I_2) ซึ่งกระแสครั้งที่สองนี้จะมีค่าลดลงจากค่าแรกเนื่องจากเอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานโดยสารฆ่าแมลง ซึ่ง % inhibition สามารถหาได้โดยใช้สมการที่ 2.4 โดยอาศัยค่า I_1 และ I_2 ดังนั้นในส่วนนี้เราจะต้องหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยที่มั่นใจได้ว่าที่ระยะเวลานั้นเอนไซม์ถูกยับยั้งจากสารฆ่าแมลงเต็มที่แล้ว

4.2.10 การทดลองวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรออน และเมโทมิล

ในการทดลองนี้จะใช้อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ในการวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรออน (methyl parathion) ที่เป็นสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และเมโทมิล (methomyl) ที่เป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมต โดยการใช้ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารฆ่าแมลงทั้งสองชนิด สามารถดำเนินการได้เหมือนกันโดยการจุ่มหัววัดนั้นคืออิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ที่ได้จากการทดสอบและเลือกในหัวข้อที่ 4.2.9 ลงไปในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่ได้จากข้อ 4.2.9.2 และสารตั้งต้นนั้นคือ อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ เข้มข้นตามที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 4.2.9.1 จากนั้นทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าให้กับขั้วทำงานที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ขนาด 0.8 โวลต์ เทียบกับขั้วอ้างอิง ($Ag/AgCl$) ซึ่งจะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น รอจนกระแสไฟฟ้านั้นคงที่แล้วทำการจดบันทึกเป็นค่ากระแสไฟฟ้าเริ่มต้น (I_1) (ซึ่งกระแสไฟฟ้า

ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดมาจากกลไกการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างการเกิดการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ จากเอนไซม์) เสร็จแล้วล้างอิเล็กโทรดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 หลังจากนั้นนำอิเล็กโทรดเดิมไปจุ่มในสารละลายที่มีสารฆ่าแมลงที่ต้องการตรวจวัด และทราบความเข้มข้นที่แน่นอน โดยใช้ระยะเวลาในการจุ่มประมาณตามที่หาได้จากการทดลอง ข้อ 4.2.9.3 เสร็จแล้วล้างอิเล็กโทรดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 แล้วนำอิเล็กโทรดเดิมที่จุ่มสารฆ่าแมลงแล้วไปวัดในระบบวัดเดิมอีกครั้ง ซึ่งจะพบว่าอิเล็กโทรดที่นำไปจุ่มในสารฆ่าแมลงก่อนนำมาวัดนั้นกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะลดลง เนื่องจากสารฆ่าแมลงที่เติมลงไปจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์กับสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ทำการจดบันทึกกระแสไฟฟ้าสุดท้ายเป็น (I_2) จากนั้นนำค่า I_1 และ I_2 ไปคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% inhibition) ตามสมการที่ 2.4 ซึ่งผลจากการทดลองนี้สามารถนำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่ทำการตรวจวัด กับค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเอนไซม์ (% inhibition) ที่คำนวณได้จากค่ากระแสไฟฟ้า เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหาความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงได้

โดยพารามิเตอร์ที่ต้องทำการศึกษาคือ ช่วงความเข้มข้นเชิงเส้นของสารฆ่าแมลงที่เครื่องวัดสามารถวัดได้ (linear range) ค่า sensitivity ของไบโอเซนเซอร์ที่หาได้จากความชันของกราฟในช่วงที่เป็นเส้นตรงของความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่ทำการตรวจวัด กับค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเอนไซม์ (% inhibition) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องวัดสามารถวัดได้ (limit of detection) ซึ่งคำนวณหาจากสูตร $3(S.D.)/m$ เมื่อ S.D. คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของข้อมูลที่ได้จากการวัด และ m คือค่า sensitivity

4.2.11 การทดสอบเสถียรภาพของการเก็บรักษาไบโอเซนเซอร์

การทดสอบเสถียรภาพของการเก็บรักษาเครื่องมือวัดอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ คือการตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่องมือวัด เมื่อถูกใช้งานหรือเก็บรักษาในระยะเวลาหนึ่งๆ เพราะไบโอเซนเซอร์เป็นเครื่องมือที่ประกอบไปด้วยสารชีวภาพที่เป็นเอนไซม์ดังนั้นเมื่อระยะเวลาของการใช้งานเพิ่มมากขึ้นเอนไซม์ก็จะเกิดการเสื่อมสภาพลงทำให้เครื่องมือวัดนี้มีประสิทธิภาพในการวัดที่ลดลงด้วย โดยการทดสอบเสถียรภาพของการเก็บรักษา (storage stability) สามารถทำได้โดยนำอิเล็กโทรดที่สังเคราะห์ได้ตามวิธีในหัวข้อที่ 4.2.8.3 และอิเล็กโทรดแบบ SPCE/AChE /chitoasn (ที่เตรียมจากการหยุดเอนไซม์ 3 ไมโครลิตร และทับอีกชั้นด้วยไคโตซาน 3 ไมโครลิตร) มาทำเก็บรักษาในสถานะแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นระยะเวลา 20 วัน แล้วดูการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการตอบสนองของอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์แต่ละชนิดเปรียบเทียบกับกัน

บทที่ 5

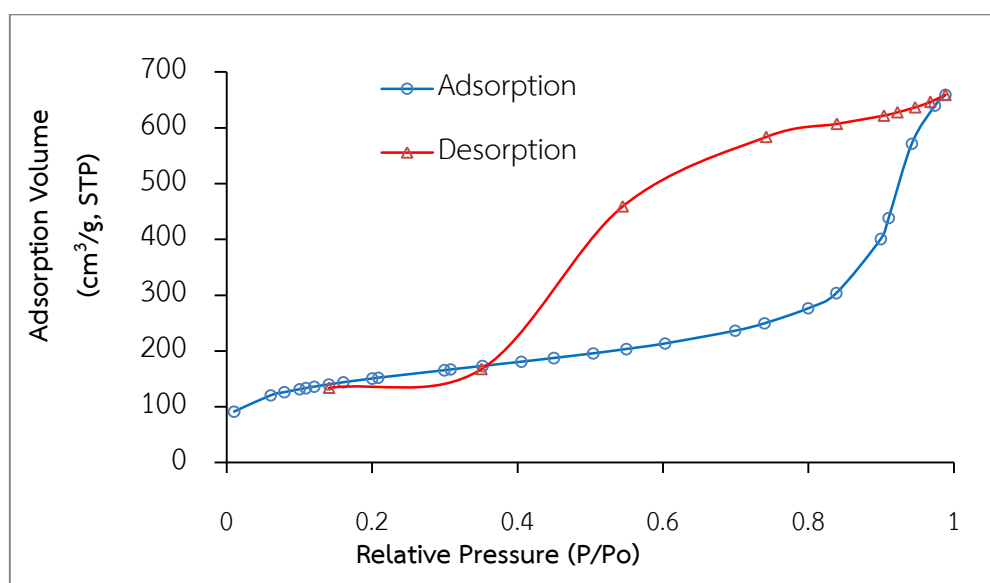
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการดัดแปลงอิเล็กโทรดสำหรับอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไปโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดสารฆ่าแมลง โดยใช้วัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตของเมโซเซลลูลาร์โพรพซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง (MCF/AuNPs) เป็นวัสดุสำหรับตรึงเอนไซม์ ซึ่งผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ส่วน โดยในส่วนแรกเป็นการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ การวัดพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุนโดยใช้วิธี BET (Brunauer-Emmett-Teller Method) การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของพื้นผิววัสดุโดยใช้ FT-IR Spectroscopy การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของพื้นผิววัสดุในแง่ของศักย์ไฟฟ้าโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Zeta potential และการศึกษาโครงสร้างของวัสดุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) ร่วมกับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction, XRD) จากนั้นในส่วนที่สองจะเป็นผลของการศึกษาการตรึงเอนไซม์ในวัสดุ และส่วนสุดท้ายเป็นการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุไปประกอบกับอิเล็กโทรดแบบสกรีนพริ้นท์คาร์บอนอิเล็กโทรด (Screen-printed carbon electrodes) สร้างเป็นไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง โดยในส่วนนี้จะนำเสนอปัจจัยที่ส่งผลต่อการวัดของไปโอเซนเซอร์ทั้ง pH ความเข้มข้นของสับสเตรท และ incubation time รวมถึงวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไปโอเซนเซอร์นี้ต่อการวัดสารฆ่าแมลงทั้งในกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต

5.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต MCF/APTS/AuNPs

วัสดุที่ใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ AChE เพื่อนำไปสร้างไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลงนั้นเป็นวัสดุชนิด MCF ซึ่งจัดอยู่ในประเภทเมโซพอร์ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 2 ถึง 50 นาโนเมตร ตามข้อมูลจาก IUPAC (Warren และ Wiesner, 2009) ซึ่งวัสดุประเภทนี้มีคุณสมบัติที่ดีเมื่อนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์เพราะมีขนาดที่เหมาะสม และสอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์ AChE ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ $4.5 \times 6.0 \times 6.5$ นาโนเมตร (Milkani และคณะ, 2011) และมีข้อดีที่ช่วยในการรักษากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งเป็นการช่วยชะลอการเสื่อมสภาพทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุสามารถนำไปใช้งานได้ยาวนานขึ้น (Orita และคณะ, 2012) แต่มีจุดด้อยในเรื่องของคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าซึ่งสามารถปรับปรุงได้โดยการสังเคราะห์วัสดุทองภายในรูพรุนซึ่งจะกล่าวถึงในผลการทดลองในหัวข้อถัดไป สำหรับวัสดุประเภทนี้ทำการสังเคราะห์ขึ้นจากสารกำหนดโครงสร้างพลูโรนิค พี123 (pluronic P123) ร่วมกับสารโครงสร้างหลักประเภทซิลิกาคือ เตตระเอทิลอโท

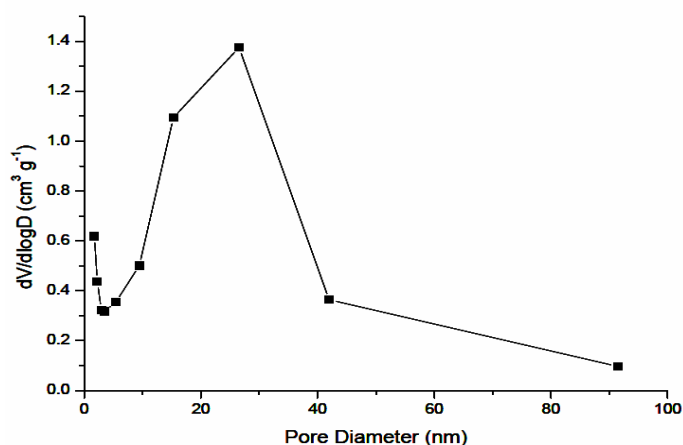
ซิลิกาเกต (tetraethyl orthosilicate, TEOS) ซึ่งผลการสังเคราะห์จะได้วัสดุ MCF ที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว เมื่อนำมาวิเคราะห์หาคูณสมบัติทางกายภาพคือ พื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุน โดยใช้วิธี BET ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยความสัมพันธ์ของปริมาณการดูดซับ (adsorption) และการคายซับ (desorption) ของแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ในวัสดุ MCF จะพบรูปแบบความสัมพันธ์แสดงดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 ไอโซเทิร์มของการดูดซับ และการคายซับแก๊สไนโตรเจนบนพื้นผิวของ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้น ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5.1 แสดงไอโซเทิร์มของการดูดซับและการคายซับซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความดันย่อย (relative pressure, P/P_0) กับปริมาณการดูดซับที่สภาวะสมดุล (adsorption volume) ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่ามีลักษณะของกราฟเป็นแบบฮิสเทอรีซิสลูป (hysteresis loop) แบบ H2 คือเส้นกราฟทั้งสองเส้นไม่ทับกันในช่วงทำให้เกิดลักษณะของลูป และเมื่อนำผลไอโซเทิร์มของการดูดซับของวัสดุ MCF นี้ไปเทียบกับไอโซเทิร์มของการดูดซับทั้ง 6 ชนิดในระบบ IUPAC ที่ถูกจำแนกโดย Brunauer ในปี ค.ศ. 1945 ก็พบว่าวัสดุ MCF นี้มีลักษณะของไอโซเทิร์มการดูดซับตรงกับชนิดที่ 4 (type IV) ซึ่งไอโซเทิร์มชนิดนี้มักพบในวัสดุที่มีรูพรุนแบบเมโซพอร์ัส (mesoporous) ที่มีขนาดระหว่าง 2 ถึง 50 นาโนเมตร (Warren และ Wiesner, 2009) และสามารถนำข้อมูลไอโซเทิร์มของการดูดซับแก๊สไนโตรเจนนี้มาคำนวณหาพื้นที่ผิวของ (surface area) ปริมาตรของรูพรุน (pore volume) และการกระจายตัวของขนาดรูพรุน (pore-size distribution) ได้โดยใช้สมการของบีเจเอช (Barrett-Joyner-Halenda, BJH)

ซึ่งพบว่าวัสดุ MCF ที่สังเคราะห์เพื่อนำมาใช้ตรึงเอนไซม์ในงานนี้มีพื้นที่ผิวของรูพรุน 537.6 ตารางเมตรต่อกรัม ปริมาตรของรูพรุน 1.02 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม และขนาดรูพรุนที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ที่ 26 นาโนเมตร โดยมีการกระจายตัวของขนาดรูพรุนแสดงดังรูปที่ 5.2 และเมื่อเทียบกับ MCF ที่สังเคราะห์ได้จากงานวิจัยอื่นดังตารางที่ 5.1 ก็พบว่าวัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ได้จากงานนี้มีพื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุนไม่สูงมากนัก แต่ขนาดของรูพรุนมีขนาดที่กว้างพอที่จะใช้ในการตรึงเอนไซม์ AChE ที่มีขนาดโมเลกุล $4.5 \times 6.0 \times 6.5$ นาโนเมตร (Milkani และคณะ, 2011)



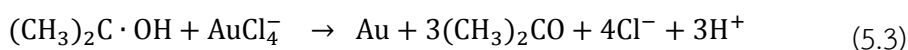
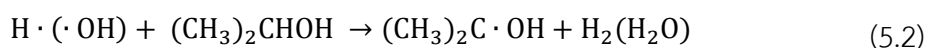
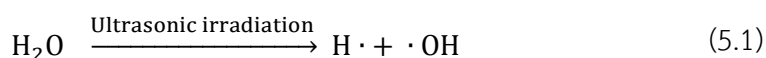
รูปที่ 5.2 การกระจายตัวของขนาดรูพรุนของ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้น

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ MCF ที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้ กับงานวิจัยอื่นๆ

| อ้างอิง | พื้นที่ผิว (m ² /g) | ปริมาตรรูพรุน (cm ³ /g) | ขนาดของรูพรุน (nm) |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Miao และคณะ (2011) | 800 | 1.60 | 8.1 |
| วีไลวรรณ และคณะ (2008) | 618 | 1.60 | 14.8 |
| Piumetti และคณะ (2011) | 925 | 2.60 | 16.0 |
| Xu และคณะ (2011) | 527 | 1.78 | 19.7 |
| ปรางค์นาฏ และคณะ (2011) | 700 | 1.95 | 21.5 |
| Su และคณะ (2006) | 660 | 1.54 | 22.1 |
| Liu และคณะ (2006) | 660 | 1.54 | 24.5 |
| งานวิจัยนี้ | 537 | 1.02 | 26.0 |
| Russo และคณะ (2012) | 693 | 2.02 | 30.5 |
| Kim และคณะ (2011) | 634 | 2.40 | 33.0 |
| Kim และคณะ (2012) | 647 | 1.70 | 39.2 |

วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อจะนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ AChE ในงานนี้เมื่อนำไปใช้ในในงานไบโอเซนเซอร์จะมีจุดด้อยในเรื่องของการนำไฟฟ้า ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีแนวคิดในการปรับปรุงคุณสมบัติในเรื่องของการนำไฟฟ้าของวัสดุ MCF ให้ดีขึ้นโดยใช้วิธีการสังเคราะห์วัสดุทองที่มีอนุภาคนาโนให้เกิดขึ้นภายในรูพรุนของวัสดุ MCF แต่เนื่องจากพื้นผิวของวัสดุ MCF มีคุณสมบัติทางศักย์ไฟฟ้าเป็นลบมันจึงดูดซับของคลอไรด์ (AuCl_4^-) ซึ่งมีประจุลบได้ไม่มากนัก ทำให้ปริมาณทองที่อาจจะสังเคราะห์ให้เกิดในรูพรุนของวัสดุ MCF อาจมีปริมาณน้อยไปด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงพื้นผิวของ MCF ก่อน โดยใช้สารก่อกำบังที่ขั้วชนิด 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ซึ่งจะช่วยให้พื้นผิวของ MCF มีศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกมากขึ้นซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสให้สามารถดูดซับของคลอไรด์ (AuCl_4^-) ซึ่งมีประจุลบได้มากขึ้น ทำให้ปริมาณอนุภาคของทองที่จะสังเคราะห์ได้บน MCF มีปริมาณมากขึ้นไปด้วย (Gutierrez และคณะ, 2011)

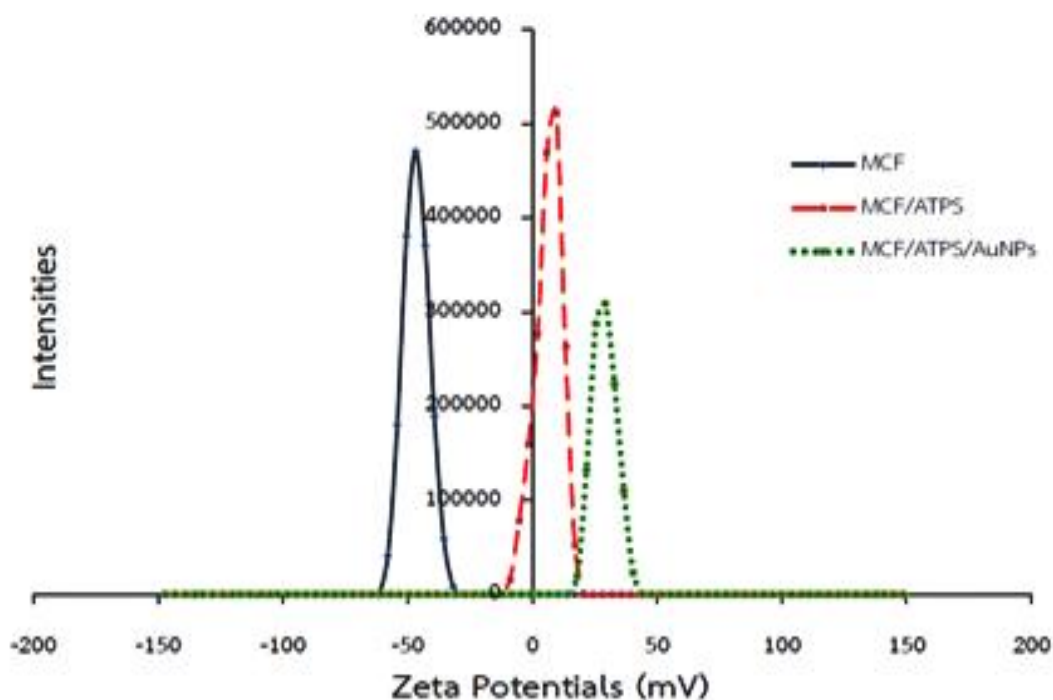
โดยวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองจะใช้วิธีอัลตราโซนิก (ultrasonic irradiation) ซึ่งทำโดยการนำวัสดุ MCF มาแช่ในสารละลายกรดคลอโรอิก (chloroauric acid, HAuCl_4) ซึ่งเป็นแหล่งของทอง โดยทองในรูปของคลอไรด์ (AuCl_4^-) ซึ่งมีประจุลบจะดูดซับบนพื้นผิวภายในรูพรุนของวัสดุ MCF จากนั้นจะใช้วิธีอัลตราโซนิกนั้น คือป้อนคลื่นความถี่ขนาด 40 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นระยะเวลา 120 นาที เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแตกตัวของน้ำ และไฮโปพรานอลในสารละลายไปเป็นไฮโดรเจนฟรีเรดิคอลล (hydrogen radicals, H^\cdot) ไฮดรอกซิลฟรีเรดิคอลล (hydroxyl radical, OH^\cdot) และ $((\text{CH}_3)_2\text{C}\cdot\text{OH})$ ซึ่งฟรีเรดิคอลลที่เกิดขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ ที่จะรีดิวซ์ทองในรูปของไอออน (gold ions, Au^{3+}) จากทองคลอไรด์ (AuCl_4^-) ที่ดูดซับอยู่ภายในรูพรุน ให้เกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) ยึดเกาะบนพื้นผิวภายในรูพรุนของวัสดุ MCF ซึ่งกลไกการรีดิวซ์แสดงดังสมการที่ (5.1) ถึง (5.4) (Chen และคณะ, 2001)



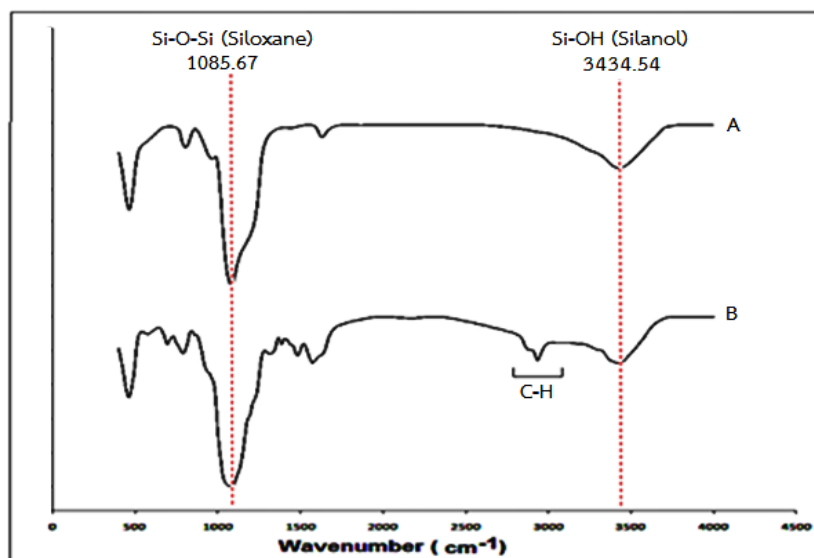
คุณสมบัติของศักย์ไฟฟ้าของวัสดุ MCF วัสดุ MCF ที่ปรับปรุงด้วยสาร APTS (MCF/APTS) และวัสดุ MCF ที่สังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง (MCF/APTS/AuNPs) แสดงดังรูปที่ 5.3 ซึ่งเป็นการวัดโดยใช้ zeta potential ในน้ำปราศจากไอออนที่ pH 7.0 โดยพบว่าวัสดุ MCF มีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ

ที่ -46.33 มิลลิโวลต์ และวัสดุ MCF เมื่อนำมาผ่านการปรับปรุงพื้นผิวด้วย APTS และสังเคราะห์ทอง จะทำให้มีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกเพิ่มขึ้นโดยวัสดุ MCF/APTS มีค่า $+5.58$ มิลลิโวลต์ และ MCF/APTS/AuNPs มีค่า $+27.10$ มิลลิโวลต์

จากรูปที่ 5.4 คือผลการวิเคราะห์หาคุณสมบัติเคมีของพื้นผิววัสดุ MCF ซึ่งพบว่า เกิดจุดสูงสุดของกราฟจุดแรกที่ 1085.67 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็นจุดสูงสุดที่อยู่ในช่วง 1000 ถึง 1200 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็นช่วงที่แสดงว่าพื้นผิวของวัสดุ MCF ประกอบด้วยหมู่ซิลอกเซน (Si-O-Si) และเกิดจุดสูงสุดของกราฟจุดที่สองที่ 3434.54 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็นจุดสูงสุดที่อยู่ในช่วง 3200 ถึง 3700 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็นช่วงที่แสดงว่าพื้นผิวของวัสดุ MCF ประกอบด้วยหมู่ซิลานอล (Si-OH) ดังนั้น วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้จะมีคุณสมบัติทางเคมีของพื้นผิวเบื้องต้นประกอบไปด้วยหมู่ซิลอกเซน กับหมู่ซิลานอล (Montiel และคณะ, 2007; Zhang และคณะ, 2004) และเมื่อทำการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ MCF ด้วยสาร APTS จะพบว่าทำให้เกิดจุดสูงสุดที่ 2932.93 เซนติเมตร⁻¹ และ 2884.18 เซนติเมตร⁻¹ เพิ่มเข้ามาด้วยซึ่งเป็นจุดสูงสุดที่แสดงว่ามีหมู่ฟังก์ชันของ C-H เกิดขึ้น (Luan et al., 2005) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสาร APTS ที่ใช้ปรับปรุงวัสดุ MCF ไปเกิดหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของ MCF จริงเนื่องจากโมเลกุลของสาร APTS ที่มีสูตรโมเลกุล $C_9H_{23}NO_3Si$ นั้นมีส่วนประกอบของหมู่ฟังก์ชันของ C-H อยู่ด้วย

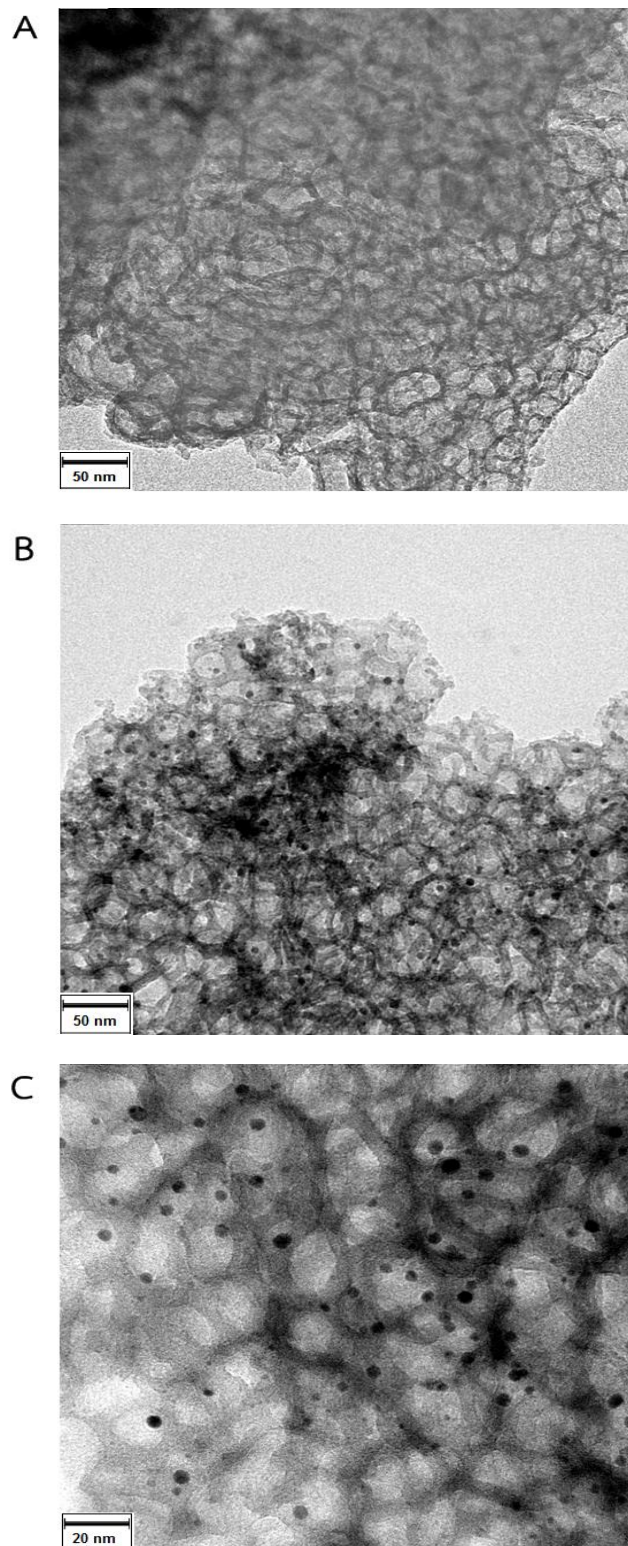


รูปที่ 5.3 ศักย์ไฟฟ้าโดยวิธี Zeta potential ของวัสดุ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs

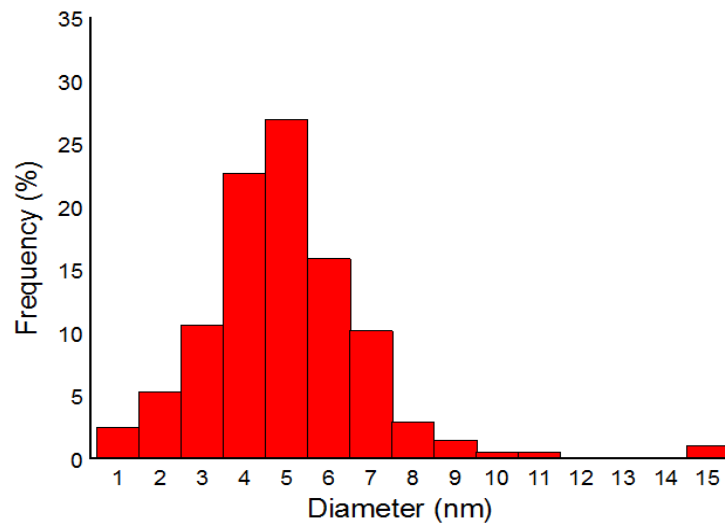


รูปที่ 5.4 คุณสมบัติทางเคมีของพื้นผิววัสดุโดยใช้ FT-IR Spectroscopy ของ A) MCF และ B) MCF/APTS

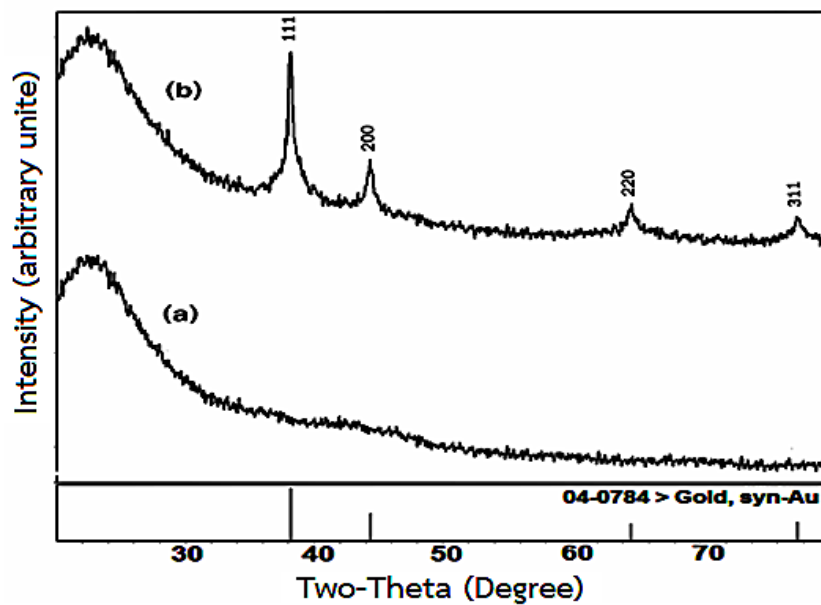
จากรูปที่ 5.5 แสดงภาพถ่ายโครงสร้างของวัสดุ MCF จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยรูป a) แสดงลักษณะโครงสร้างของวัสดุ MCF ก่อนทำการสังเคราะห์ทอง รูป b) แสดงโครงสร้างของวัสดุ MCF หลังทำการสังเคราะห์ทอง ซึ่งจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงบนพื้นผิวของวัสดุ MCF โดยจะเกิดลักษณะโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นทรงกลมซึ่งคาดว่าจะป็นอนุภาคของทองเกิดขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดอยู่บริเวณขอบๆของโครงสร้างรูพรุน (ส่วนที่มีลักษณะของสีเข้ม) และมีบางส่วนอีกเล็กน้อยที่เกิดบริเวณกลางโครงสร้างรูพรุน (ส่วนที่มีลักษณะของสีจาง) เนื่องจากภาพถ่ายนี้เป็นภาพถ่ายที่เกิดจากการส่องผ่านอนุภาคของวัสดุ MCF ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าโครงสร้างทรงกลมส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นบริเวณขอบๆ ของรูพรุนในภาพ TEM คือ อนุภาคของทองที่เกิดอยู่ภายในรูพรุนของวัสดุ MCF และโครงสร้างทรงกลมบางส่วนที่เกิดบริเวณตรงกลางของรูพรุนในภาพ TEM คือ อนุภาคของทองที่เกิดอยู่นอกรูพรุนของวัสดุ MCF รูปที่ 5.6 แสดงความถี่ของขนาดอนุภาคทองที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทั้งภายใน และนอกรูพรุนของวัสดุ MCF ซึ่งจะพบว่าความถี่ของขนาดของอนุภาคทองที่มีขนาดประมาณ 5 นาโนเมตร เกิดขึ้นในปริมาณมากที่สุดคือ 27 เปอร์เซ็นต์เทียบกับอนุภาคของทองที่เกิดขึ้นทั้งหมด โดยค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคทองที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้มีค่าเท่ากับ 4.9 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของโครงสร้างรูพรุนของ MCF ที่มีขนาด 26 นาโนเมตรแล้วจะเห็นว่าอนุภาคของทองที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของ MCF อยู่ประมาณ 5 เท่า ดังนั้นก็น่าจะมีพื้นที่ว่างภายในรูพรุนของวัสดุ MCF/APTS/AuNPs เพียงพอที่จะใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ AChE ที่มีขนาดโมเลกุล 4.5 x 6.0 x 6.5 นาโนเมตร (Milkani และคณะ, 2011)



รูปที่ 5.5 โครงสร้างของ A) วัสดุ MCF ภาพกำลังขยาย 50 นาโนเมตร B) วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ที่ทอง ภาพกำลังขยาย 50 นาโนเมตร C) วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ที่ทอง ภาพกำลังขยาย 20 นาโนเมตร โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



รูปที่ 5.6 ความถี่ของขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้น จากกระบวนการสังเคราะห์ทองในวัสดุ MCF



รูปที่ 5.7 สเปกตรัม XRD ของวัสดุ a) MCF และ b) MCF/APTS/AuNPs

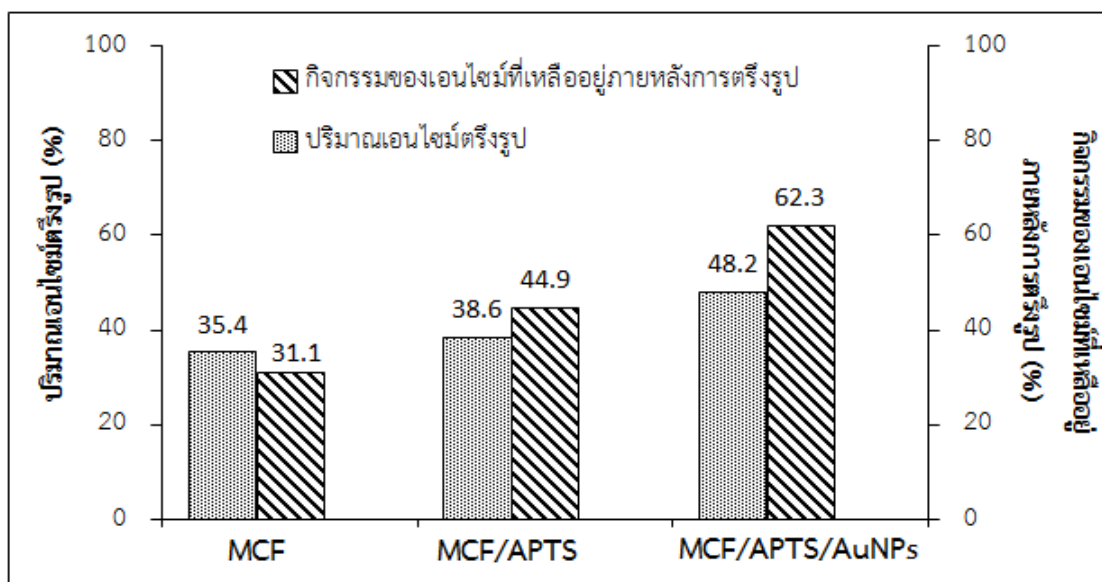
รูปที่ 5.7 แสดงสเปกตรัมของวัสดุที่อาศัยการวัดมุม 2θ (two-theta) ซึ่งเป็นมุมของคลื่นรังสีเอกซ์ที่เกิดการเลี้ยวเบนเมื่อตกกระทบกับวัสดุที่ตรวจวัด โดยวัสดุแต่ละชนิดก็จะให้ค่าของมุมของการเกิดการเลี้ยวเบนของรังสีออกมาเป็นเส้นสเปกตรัมที่แตกต่างกัน สำหรับวัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานนี้จะมีลักษณะของสเปกตรัมแสดงดังรูป a) ซึ่งจะเห็นว่าลักษณะเส้นสเปกตรัมราบเรียบไม่เกิดจุดสูงสุดใดๆ แต่วัสดุ MCF ที่ผ่านการสังเคราะห์อนุภาคทองจะพบว่าเส้นสเปกตรัมเกิดจุดสูงสุด

(peak) ที่ 111 200 220 และ 311 ซึ่งตรงกับมุม 2θ (two-theta) ที่ 38.21 44.41 64.61 และ 77.61 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำลักษณะของเส้นสเปกตรัมที่เกิดจุดสูงสุดแบบนี้ไปเทียบกับค่ามาตรฐาน literature pattern standard of Au (JCPDS, file no. 04-0784) ก็พบว่าตรงกับสเปกตรัมของโลหะทอง ดังนั้นผลของสเปกตรัม XRD ก็สามารถใช้เพื่อช่วยยืนยันได้ว่าการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์อนุภาคของทองให้เกิดขึ้นในวัสดุ MCF และนอกจากนี้ยังช่วยสนับสนุนผลการส่องดูลักษณะโครงสร้างของ MCF ที่ปรากฏในรูปที่ 5.5 b) ว่าโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นจุดทรงกลมที่เกิดขึ้นนั้นเป็นอนุภาคของทองจริง ซึ่งผลของสเปกตรัม XRD นอกจากจะสามารถบอกชนิดของธาตุได้แล้ว ยังสามารถใช้บอกวัฏภาคเชิงผลึกได้ว่าเป็นแบบใด สำหรับวัสดุทองที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้มีลักษณะโครงสร้างผลึกเป็นแบบคิวบิก (cubic)

5.2 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในวัสดุตรึงแบบต่างๆ

ในหัวข้อนี้จะเป็นการศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์ AChE ในวัสดุตรึงที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือ 1) MCF 2) MCF/ATPS และ 3) MCF/ATPS/AuNPs เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ทั้งในแง่ของปริมาณ และกิจกรรมของเอนไซม์ โดยในขั้นตอนการตรึงรูปจะใช้หลักการของการยึดเหนี่ยวทางประจุ (electrostatic interaction) ซึ่งเป็นหลักการตรึงที่อาศัยการดูดซับทางประจุที่ตรงข้ามกันระหว่างวัสดุตรึงกับเอนไซม์ โดยการทำให้อิออนไอโซอิเล็กทริก (isoelectric, pI) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารนั้นๆ โดยเอนไซม์ AChE มีค่า pI เท่ากับ 5.5 (Rosenberry และคณะ, 1974) และวัสดุ MCF มีค่า pI เท่ากับ 2.0 (Hoffmann และคณะ, 2006) โดยถ้าค่า pH ของสารละลายมีค่ามากกว่า pI ของสาร สารนั้นจะแสดงลักษณะประจุลบ แต่ถ้าค่า pH ของสารละลายมีค่าน้อยกว่า pI ของสาร สารนั้นจะแสดงลักษณะประจุบวก (Lee และคณะ, 2009) ซึ่งในทางทฤษฎีถ้าต้องการให้ AChE ดูดซับในรูพรุนของ MCF ได้ด้วยประจุที่ตรงข้ามแล้วจะต้องใช้สารละลายที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง $2.0 < pH < 5.5$ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์กับวัสดุ MCF มีประจุตรงข้ามกันและดูดซับกันได้ แต่ในความเป็นจริงที่ค่า pH ในช่วงนี้มีสถานะที่เป็นกรดซึ่งไม่เหมาะกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่จะทำงานได้ดีที่ค่า pH 7.4 (Kaya และคณะ, 2013) ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้ pH เท่ากับ 6.0 ซึ่งจะทำให้เอนไซม์มีลักษณะทางประจุเป็นลบอ่อนๆ และวัสดุตรึง MCF มีสถานะทางประจุเป็นลบ ที่เป็นสถานะที่เหมาะสมกว่าเนื่องจากมีความเป็นกรดอ่อนๆ ซึ่งอาจจะไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์มากนัก ประกอบกับมีงานวิจัยของ Orita และคณะ ในปี 2012 ที่ทำการตรึงเอนไซม์โคเลสเตอรอลเอสเทอเรสไฮโดรเลส (cholesterol ester hydrolase) ที่มีค่า pI 5.8 ในวัสดุ MCF pI 2.0 ซึ่งใช้ pH 6.0

เป็นสภาวะในการตรึงเอนไซม์เช่นกัน ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังตรึงรูปลดลงแต่ยังเหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของวิไลวรรณ และคณะ ในปี 2009 ที่ตรึงเอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) ที่มีค่า pI 8.9 ในวัสดุ MCF pI 2.0 โดยใช้ pH 10.0 เป็นสภาวะในการตรึง ซึ่งที่สภาวะนี้ทำให้วัสดุตรึงแสดงประจุลบ และเอนไซม์แสดงประจุลบอ่อนๆ แต่ก็พบว่าเอนไซม์ก็สามารถเกิดการดูดซับในวัสดุ MCF ได้ โดยมีปริมาณเอนไซม์ที่ดูดซับในรูพรุนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ของการทดลองนี้คือ ตรึงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 6.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 0.5 มิลลิกรัม และวัสดุตรึงปริมาณ 0.1 กรัม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 5.8



รูปที่ 5.8 ร้อยละของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง และกิจกรรมของเอนไซม์หลังตรึงรูปภายในวัสดุตรึงต่างชนิดกัน 3 ชนิด คือ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากรูปที่ 5.8 เป็นผลของการหาปริมาณของเอนไซม์ตรึงรูป และกิจกรรมของเอนไซม์ภายหลังการตรึงรูปที่เหลืออยู่เมื่อเทียบจากสภาวะเริ่มต้น โดยเมื่อทำการตรึงเอนไซม์ในวัสดุตรึงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ครบกำหนด 2 ชั่วโมง (Wu และคณะ, 2011) แล้วจะนำสารละลายนี้มาทำการกรอง แล้วล้างเพื่อแยกเอาส่วนที่เอนไซม์ถูกตรึงรูปอยู่ในวัสดุตรึงออกจากเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึงรูปซึ่งยังคงละลายอยู่ในสารละลาย จากนั้นนำเอนไซม์ส่วนที่ไม่ถูกตรึงนี้มาหาปริมาณของเอนไซม์ที่ยังมีเหลืออยู่ โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 277 นาโนเมตร และเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ข ก็จะได้ปริมาณของเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึงรูปออกมา ส่วนปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปหาได้จากการทำสมมูลมวลสาร นั่นคือปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูป มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดในสารละลายหักออกด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึงรูปซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงใน MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs มีปริมาณร้อยละ 35.40 38.60 และ 48.20 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 0.177 0.193 และ 0.241 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักวัสดุตรึง 0.1 กรัมตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสามารถในการตรึงเอนไซม์ของวัสดุตรึงทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกันก็พบว่า MCF ที่ถูกปรับปรุงพื้นผิวแล้วจะมีความสามารถในการดูดซับเอนไซม์ได้ดีกว่า MCF พื้นฐาน เพราะปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับสูงกว่า ซึ่งนั่นอาจเป็นผลมาจากสารที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ MCF คือ APTS และ อนุภาคนาโนทอง โดยเมื่อพิจารณาการดูดซับเอนไซม์ที่เกิดจากแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) ที่สภาวะในการตรึงเอนไซม์คือ pH 6.0 นั้น จะพบว่าวัสดุ MCF ที่มีค่า pi เท่ากับ 2.0 จะแสดงลักษณะทางประจุที่เป็นลบ และเอนไซม์ AChE ที่มีค่า pi เท่า 5.5 แสดงลักษณะทางประจุที่เป็นลบอ่อนๆ ทำให้เอนไซม์ดูดซับบน MCF ได้น้อยเนื่องจากมีประจุลบเหมือนกัน แต่เมื่อทำการปรับปรุงพื้นผิว MCF ด้วยวัสดุ APTS และสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง ก็พบว่าลักษณะทางประจุบนพื้นผิวของวัสดุเป็นบวกมากขึ้นตามผลการทดลองในรูปที่ 5.3 ที่เป็นการวัดศักย์ไฟฟ้า zeta potential ในน้ำปราศจากไอออนที่ pH 7.0 ของ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs แล้วพบว่ามีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็น -46.33 +5.58 และ +27.1 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าบนผิวของวัสดุนี้จะมีแนวโน้มแบบเดียวกันกับในสภาวะของการตรึงเอนไซม์คือ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่เอนไซม์มีลักษณะเป็นประจุลบอ่อนๆ จึงทำให้เอนไซม์จะเกิดการดูดซับบนวัสดุ MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs ได้ดี โดยเอนไซม์จะเกิดการดูดซับสูงที่สุดในวัสดุ MCF/APTS/AuNPs เนื่องจากมีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกมากที่สุดจึงดูดซับเอนไซม์ที่มีสภาวะทางประจุเป็นลบที่ pH 6 ได้ดีที่สุด นอกจากนี้อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ขึ้นภายในรูพรุน และมีบางส่วนอีกเล็กน้อยที่ภายนอกรูพรุนของวัสดุ MCF จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับเอนไซม์ เนื่องจากวัสดุนาโนทองมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูง โดยทองที่มีขนาดอนุภาค 2 นาโนเมตร สามารถเชื่อมต่อกับลิแกนด์ได้ถึง 100 ลิแกนด์ (Rana และคณะ, 2012)

ในส่วนของการหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปนั้นสามารถทำได้โดยนำเอนไซม์ที่ตรึงรูปในวัสดุตรึงมาหากิจกรรมที่เหลืออยู่หลังการตรึงรูป โดยใช้วิธีการทดสอบด้วยสารเคมีตามวิธีของ Ellmen's method ซึ่งใช้ DTNB มาทำปฏิกิริยากับไทโอโคลีน (ผลิตภัณฑ์) ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ แล้วทำให้เกิดสารเชิงซ้อนสีเหลือง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร กลไกการเกิดสีสามารถดูได้ในภาคผนวก ค (Milkani และคณะ, 2011) โดยวิธีการคือ นำเอนไซม์ตรึงรูปในวัสดุตรึงทั้ง 3 แบบคือ

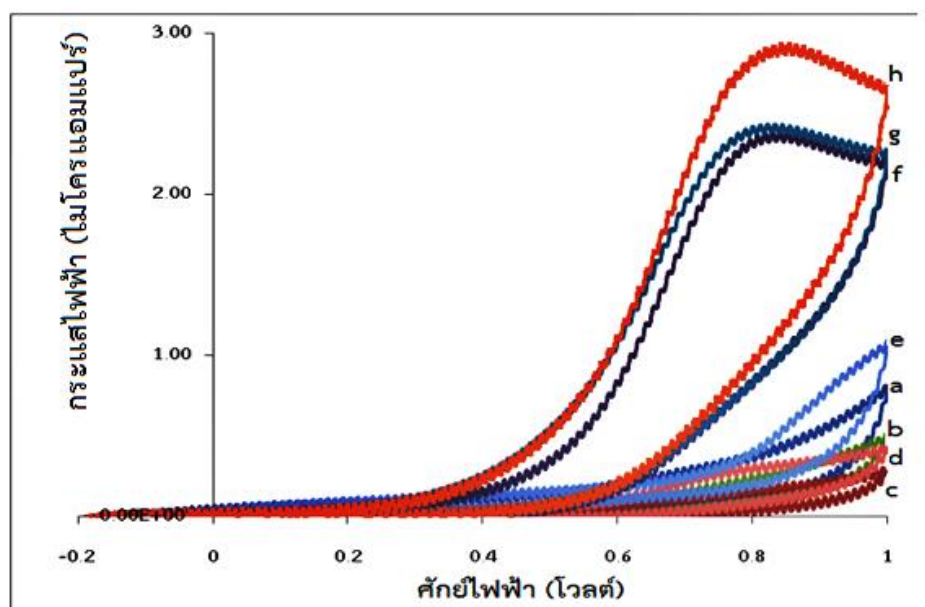
MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs ที่กรองแยก และละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปริมาณ 3 ไมโครลิตร (ซึ่งเท่ากับปริมาณที่ใช้ในการตัดแปลงอิเล็กโทรด 1 อิเล็กโทรด) มาทำปฏิกิริยากับอะซิติลโคลีน คลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ 6 ไมโครลิตร และสาร DTNB เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ 1 มิลลิลิตร โดยจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบหาปริมาณเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานกิจกรรมของเอนไซม์ที่แสดงในภาคผนวก ค โดยผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เหลืออยู่ในวัสดุ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs คือ 31.1 44.9 และ 62.3 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสภาวะเริ่มต้น ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า MCF/APTS/AuNPs นอกจากจะมีความสามารถในการดูดซับเอนไซม์สูงสุดแล้ว ยังมีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดด้วย ดังนั้นจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ในงานไบโอเซนเซอร์ ซึ่งวัสดุชนิดนี้จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ที่ 0.38 ยูนิตต่อ 1 อิเล็กโทรด ซึ่งมากกว่าการทดลองของ Wu และคณะ (2011) ที่ทำการทดลองตรึงเอนไซม์ AChE ในวัสดุ MCF แล้วนำมาตัดแปลงบนอิเล็กโทรดแบบ GCE ซึ่งพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 0.05 ยูนิตต่ออิเล็กโทรด แต่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ ปรารักษ์นาฏ และคณะ (2011) และ Du และคณะ (2010) ที่มีการตัดแปลงอิเล็กโทรดด้วยเอนไซม์ AChE ที่มีกิจกรรม 0.6 ยูนิต ซึ่งพบว่าปริมาณเอนไซม์ต่ออิเล็กโทรดปริมาณเท่านี้จะให้การตอบสนองทางไฟฟ้าสูงสุด

5.3 ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารฆ่าแมลง

5.3.1 การศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของอิเล็กโทรดที่ตัดแปลงด้วยวัสดุชนิดต่างๆ

สำหรับในหัวข้อนี้จะนำเสนอผลของการศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของอิเล็กโทรดตัดแปลงในรูปของสัญญาณไฟฟ้าเมื่อทำการตัดแปลงด้วยวัสดุชนิดต่างชนิดกันคือ MCF APTS AuNPs และไคโตซาน วิธีการทดลองทำโดยการตัดแปลงอิเล็กโทรดชนิดต่างๆ 8 ชนิด คือ a) SPCE เปล่า b) SPCE/chitosan c) SPCE/MCF/chitosan d) SPCE/MCF/APTS/chitosan e) SPCE/MCF/APTS/AuNPs/chitosan f) SPCE/MCF/AChE/chitosan g) SPCE/MCF/APTS/AChE/chitosan e) SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/chitosan เพื่อทดสอบผลของการตัดแปลงอิเล็กโทรด ต่อการตอบสนองสัญญาณไฟฟ้าแล้วทำการเลือกอิเล็กโทรดตัดแปลงชนิดที่เหมาะสมที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการวัดสารฆ่าแมลงต่อไป โดยการวัดการตอบสนองทางสัญญาณไฟฟ้าของอิเล็กโทรดตัดแปลงนี้จะใช้หลักการวัดแบบไซคลิกโวลโทแทมเมตรี ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าโดยการป้อนศักย์ไฟฟ้าเป็นรอบระหว่างค่าสองค่าซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ที่ -0.2 ถึง 1.0 โวลต์ (ปรารักษ์นาฏ และคณะ, 2011) โดยจุ่มอิเล็กโทรดที่ต้องการทดสอบลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 (Wu

และคณะ, 2011) ที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลของการตอบสนองของอิเล็กโทรดแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 5.9

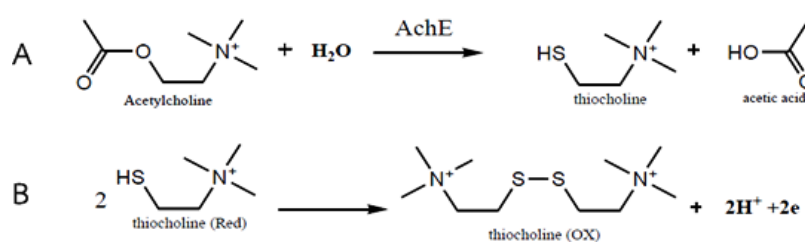


รูปที่ 5.9 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรมของ a) bare electrode ชนิด SPCE b) SPCE/Chitosan c) SPCE/MCF /Chitosan d) SPCE/MCF/APTS/Chitosan e) SPCE/MCF/APTS/AuNPs/Chitosan f) SPCE /MCF/AChE/Chitosan g) SPCE/MCF/APTS/AChE/Chitosan h) SPCE/MCF/APTS/AuNPS /AChE/Chitosan ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 9 ที่ประกอบด้วยอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.2 ถึง 1.0 อัตราการสแกน 10 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

ซึ่งจากรูปที่ 5.9 รูป a) เป็นผลการตอบสนองทางไฟฟ้าของ SPCE เปล่า ค่าการตอบสนองสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 0.7 ไมโครแอมแปร์ และเมื่อมีการใช้วัสดุ MCF MCF/APTS และโคโตซาน มาดัดแปลงจะได้ผลดังรูปที่ 5.9 b c และ d ซึ่งพบว่าค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าค่อนข้างน้อย เนื่องจากวัสดุที่นำมาดัดแปลงนี้มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้น้อย (Wan และคณะ, 2003) ซึ่งให้ค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงสุดที่ 0.4 0.2 และ 0.3 ไมโครแอมแปร์ตามลำดับ ซึ่งพบว่าต่ำกว่า SPCE เปล่า ซึ่งตรงกันข้ามกับวัสดุ MCF/APTS/AuNPs ที่ให้ค่าการตอบสนองสูงสุดที่ 1.0 ไมโครแอมแปร์ ซึ่งสูงกว่า SPCE เปล่า นั้นเป็นเพราะวัสดุนี้มีส่วนประกอบของอนุภาคนาโนทองซึ่งมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าที่ดี ดังนั้นจะเห็นแนวโน้มที่ชัดเจนว่าวัสดุ MCF/APTS/AuNPs เมื่อนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์จะให้ค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าที่ดีกว่าวัสดุ MCF และวัสดุ MCF/APTS ส่วนโคโตซาน

ถึงแม้จะนำไฟฟ้าได้ค้อยไม่ดี แต่ก็มักถูกนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์เนื่องจากมีคุณสมบัติ ที่สามารถเข้ากับสารชีวภาพได้ดี (biocompatibility) และการนำมาช่วยเคลือบที่ชั้นนอกสุดของ อิเล็กโทรดก็จะช่วยไม่ให้วัสดุที่อยู่บนอิเล็กโทรดหลุดออกมาในสารละลายได้ (Norouzi และคณะ, 2010; Zhai และคณะ, 2013; Sun และ Wang, 2010)

ต่อมาเมื่อนำวัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS/AuNPs ไปตรึงเอนไซม์ AChE แล้วนำมาดัดแปลงบนอิเล็กโทรดดังรูปที่ 5.9 f) ถึง h) พบว่าอิเล็กโทรดทั้ง 3 ชนิดให้การตอบสนองทางไฟฟ้าที่สูงมากเมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดแบบ a) ถึง e) เพราะเอนไซม์ที่ถูกตรึงในอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงนี้จะไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นที่มีอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ คือ อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์เป็นไทโอโคลีน และกรดอะซิติก ซึ่งสารไทโอโคลีน ที่เป็นผลิตภัณฑ์นี้จะอยู่ในรูปของตัวรีดิวซ์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าจะทำให้เกิดการส่งถ่ายอิเล็กตรอนมายังอิเล็กโทรด ซึ่งกระแสอิเล็กตรอนนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า กลไกในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และการถ่ายเทอิเล็กตรอนไปยังอิเล็กโทรดแสดงดังรูปที่ 5.10



รูปที่ 5.10 A) แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ AChE กับสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ไทโอโคลีน B) ปฏิกิริยาออกซิเดชันไทโอโคลีนบนผิวหน้าอิเล็กโทรด (Norouzi และคณะ, 2010)

โดยเมื่อเปรียบเทียบอิเล็กโทรดที่มีเอนไซม์ AChE ทั้ง 3 ชนิด จะพบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลง SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/chitosan จะให้ค่ากระแสการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงที่สุด (oxidation peak) ที่ 2.9×10^{-6} แอมแปร์ ตรงกับศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 มิลลิโวลต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของปรารักษ์นาฏ และคณะ ปี 2011 ที่ดัดแปลงอิเล็กโทรดโดยใช้สารปรัสเซียน บลู (prussian blue, PB) กับวัสดุ MCF เอนไซม์ AChE และไคโตซาน ซึ่งลักษณะของชั้นอิเล็กโทรดจะเป็นแบบ SPCE/PB/MCF/AChE/Chitosan ดังนั้นจากการศึกษาพฤติกรรมของการตอบสนองของอิเล็กโทรดดัดแปลงแบบต่างๆพบว่าวัสดุ MCF/APTS/AuNPs เมื่อนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ AChE และนำไปดัดแปลงอิเล็กโทรดร่วมกับฟิล์มไคโตซานจะเป็นอิเล็กโทรดแบบที่ให้การตอบสนองที่ดี โดยมีการตอบสนองสูงสุดที่ค่าศักย์ไฟฟ้า +0.8 โวลต์ ซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหลัก ดังนั้นจึง

สามารถนำไปใช้ทดสอบหาปริมาณสารฆ่าแมลงได้โดยอาศัยกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ด้วยสารฆ่าแมลงซึ่งจะกล่าวถึงในผลการทดลองถัดไป

5.3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์

5.3.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น

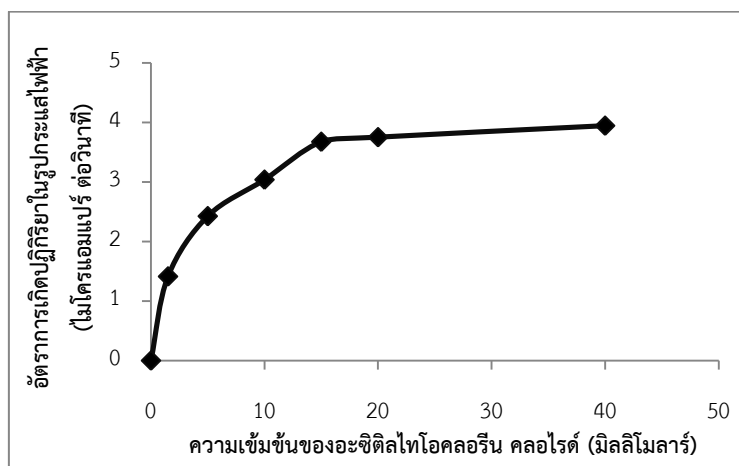
ปัจจัยแรกที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นอะซิติลโคลีน คลอไรด์ ซึ่งทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยนำอิเล็กโทรดดัดแปลง SPCE/MCF/APTS/AChE/Chitosan มาทดสอบการตอบสนองทางไฟฟ้าในระบบวัดที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ที่ความเข้มข้นของอะซิติลโคลีน คลอไรด์ในช่วง 1.5 ถึง 40.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.11

จากผลการทดลองรูปที่ 5.11 จะเห็นว่าปริมาณการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสารตั้งต้นจนถึงความเข้มข้นที่ 15.0 มิลลิโมลาร์ แล้วจะเริ่มคงที่ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์นี้ในเชิงจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปจะพบว่า เป็นปฏิกิริยาที่มีสารตั้งต้น 2 สารคือ อะซิติลโคลีน คลอไรด์ และน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีปริมาณมากเกินไป เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยจนถือว่าละลายได้ ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับสารกำหนดปฏิกิริยา (limiting reagent) นั่นคือ อะซิติลโคลีน คลอไรด์ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นกับอัตราการเกิดปฏิกิริยามีลักษณะที่สอดคล้องกับ Michaelis-Menten kinetics เมื่อใช้หลักการของ Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด (V_m) และค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) ซึ่งมีการแปลงแบบจำลองของ Michaelis-Menten kinetics ให้อยู่ในรูปสมการเส้นตรงคือ

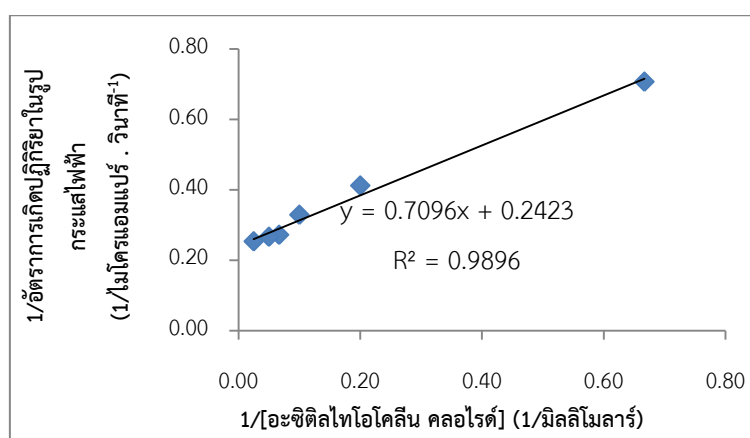
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m[S]} \quad (5.5)$$

เมื่อ V คือ อัตราการเกิดปฏิกิริยาในรูปของกระแสไฟฟ้า หน่วยไมโครแอมแปร์ต่อวินาที (โดยใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา response time 90 วินาที) และ S คือความเข้มข้นของสารตั้งต้น หน่วยมิลลิโมลาร์ ซึ่งจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ และ $1/[S]$ จะได้ค่า V_m และ K_m เท่ากับ 1.41 ไมโครแอมแปร์ต่อวินาที และ 0.34 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Wu และคณะ (2011) ที่ศึกษาผลของสารตั้งต้นอะซิติลโคลีน คลอไรด์ ที่มีต่อเอนไซม์ซึ่งดัดแปลงบนอิเล็กโทรดร่วมกับวัสดุ MCF พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 0.38 มิลลิโมลาร์ Du และคณะในปี 2007 ที่ดัดแปลงอิเล็กโทรดร่วมกับซิลิกาเจล และอนุภาคนาโนทองมีค่า K_m เท่ากับ 0.45 มิลลิโมลาร์ และ

Joshi และคณะ (2005) ที่ดัดแปลงอิเล็กโทรดร่วมกับพอลิเอทิลีนอิมีน (polyethyleneimine) มีค่า K_m เท่ากับ 1.50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งล้วนมีค่า K_m มากกว่าเอนไซม์ที่ดัดแปลงบนอิเล็กโทรด SPCE/MCF/APTS/ AuNPs/AChE/Chitosan ในงานวิจัยนี้ที่มีค่า K_m 0.34 มิลลิโมลาร์ ซึ่งค่า K_m นี้คือค่าความเข้มข้นของสารเริ่มต้นที่ทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด ตาม Michaelis-Menten kinetics สามารถใช้บอกถึงความเข้ากันได้ดี (affinity) ของเอนไซม์ AChE กับสารตั้งต้นได้ ดังนั้นจะสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสม เมื่อนำไปในการนำไปใช้วัดค่าของไบโอเซนเซอร์ดัดแปลงแล้วทำให้การตอบสนองทางไฟฟ้าสูงคือ 15.0 มิลลิโมลาร์



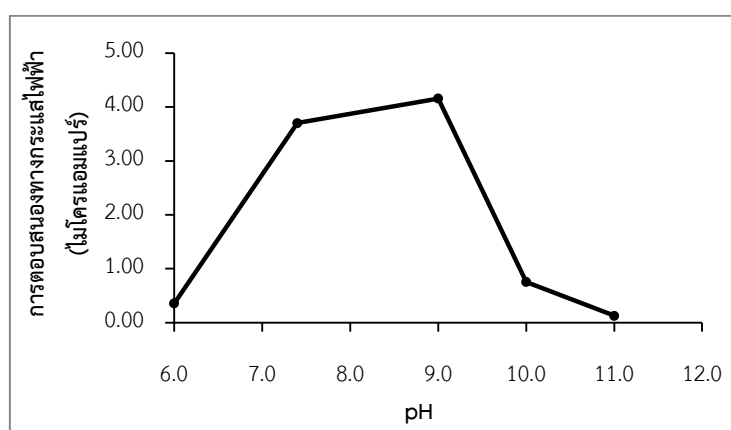
รูปที่ 5.11 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นอะซิติลโคลีน คอลไรต์ ที่มีปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1.5 ถึง 40.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ต่อการตอบสนองทางไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์



รูปที่ 5.12 Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่าอัตราการผลิตปฏิกิริยาสูงสุด (V_m) และค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา (K_m)

5.3.2.2 ผลของ pH

ปัจจัยที่สองที่จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลงคือ ค่า pH ของสารละลายที่ใช้ในระบบวัด ซึ่งการทดสอบผลของค่า pH ต่อการวัดสามารถทำได้โดยการใช้น้ำอิเล็กโทรดที่ผลิตขึ้นไปวัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างกัน โดยสำหรับการทดลองนี้จะทดสอบที่ค่า pH เท่ากับ 6.0 7.4 9.0 10.0 และ 11.0 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.13



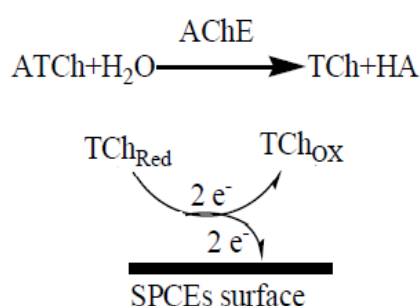
รูปที่ 5.13 ผลของ pH ต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของเครื่องมือวัดไบโอเซนเซอร์ในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายของอะซีติลไทโอโคลอรีน คลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์

โดยพบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 9.0 จะทำให้ไบโอเซนเซอร์มีการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wu และคณะ ปี 2011 ที่ทำการตรึงเอนไซม์ AChE ใน MCF ก็พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 9.0 จะทำให้อิเล็กโทรดมีการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงที่สุดเช่นกัน ซึ่งต่างจากธรรมชาติของเอนไซม์ชนิดนี้ที่จะสามารถทำงานได้ดีที่ค่า pH 7.4 นั้นอาจจะเป็นผลมาจากการตรึงรูปของเอนไซม์ในวัสดุตรึงอาจจะมีผลต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ทำให้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในสถานะที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ อาจจะเป็นเพราะสภาพความเป็นประจุของเอนไซม์ ณ ตำแหน่งที่ถูกตรึงรูปอาจแตกต่างกับในสารละลาย โดยที่ pH 9.0 จะมีการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงที่สุด ซึ่งเป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้

5.3.2.3 ผลของ incubation time

ปัจจัยที่สามที่ควรพิจารณาเมื่อนำอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงไปใช้วัดสารฆ่าแมลงคือ incubation time ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง ซึ่ง

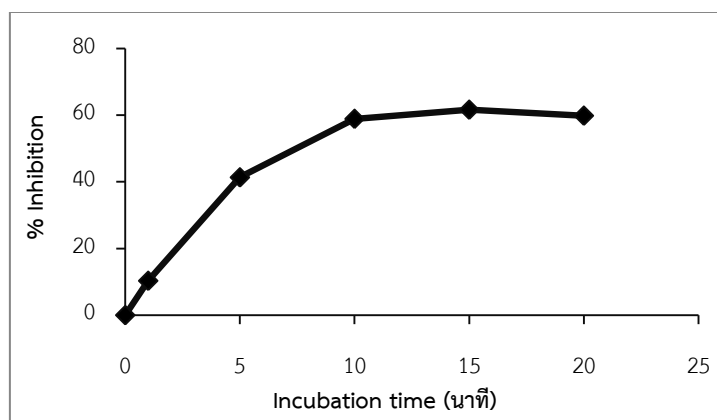
สารฆ่าแมลงที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้มี 2 ประเภทคือสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต โดยหลักการทำงานคือ ปกติเอนไซม์ AChE จะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารอะซิติลโคลีน คลอไรด์ (ATCh) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไทโอโคลีน (TCh) และกรดอะซิติค (HA) โดยไทโอโคลีนที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์จะอยู่ในรูปของสารรีดิวซ์ (TCh_{Red}) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมค่าหนึ่ง ซึ่งกระแสอิเล็กตรอนที่ส่งถ่ายสู่อิเล็กโทรดจะถูกแปลงเป็นกระแสไฟฟ้า ซึ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 5.14



รูปที่ 5.14 กลไกการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ AChE กับสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ (Gan และคณะ, 2010)

แต่ในกรณีที่น่าไปใช้วัดสารฆ่าแมลงนั้น เมื่อนำอิเล็กโทรดไปจุ่มในสารละลายที่ประกอบด้วยสารฆ่าแมลง สารฆ่าแมลงจะไปยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองลดลงด้วย ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ให้สารฆ่าแมลงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นก็เป็ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง เพราะต้องแน่ใจได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ นั้นสารฆ่าแมลงได้ทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เต็มที่แล้ว สำหรับการยับยั้งเอนไซม์ AChE ที่เกิดจากสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต นั้นจะเป็นแบบผกผันได้ (reversible inhibition) มีการออกฤทธิ์ในระยะสั้นประมาณ 1 ถึง 2 วัน แต่สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะเกิดการยับยั้งเอนไซม์ AChE แบบถาวรไม่ผกผัน (irreversible inhibition) ความเป็นพิษจึงอยู่คงนาน (Albuquerque และคณะ, 2007; Eckert และคณะ, 2007; กรมควบคุมมลพิษ 2545) สำหรับในการทดลองนี้ได้ทดลองใช้ระยะเวลาที่ปล่อยให้สารฆ่าแมลงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆกันคือ 5 10 15 และ 20 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.15 ซึ่งจะเห็นว่าที่เวลา 5 ถึง 10 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้น และเริ่มคงที่หลังจากใช้ระยะเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลงเกินกว่า 10 นาที ดังนั้นระยะเวลาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จะใช้ในการทดลองนี้คือ 10 นาที

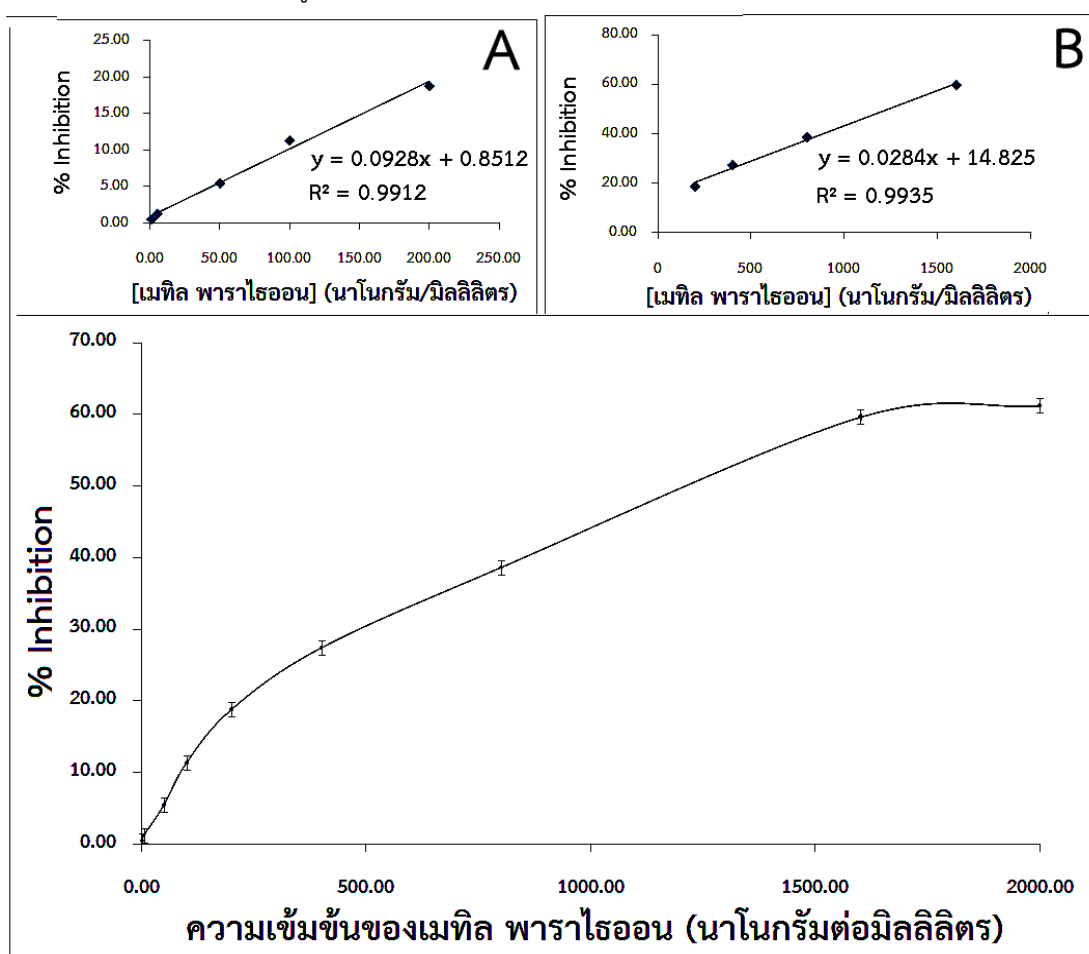
เพราะให้ % inhibition สูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wu และคณะ ในปี 2011 ได้ทำการตรึง เอนไซม์ AChE ในวัสดุ MCF เหมือนกัน แต่ยึดเอนไซม์ในวัสดุตรึงนี้เข้ากับอิเล็กโทรดแบบ GCE โดยใช้โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol, PVA) ลักษณะของชั้นอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงแล้ว เป็น GCE/MCF/AChE/PVA พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย สารฆ่าแมลงคือ 10 นาทีเช่นเดียวกัน



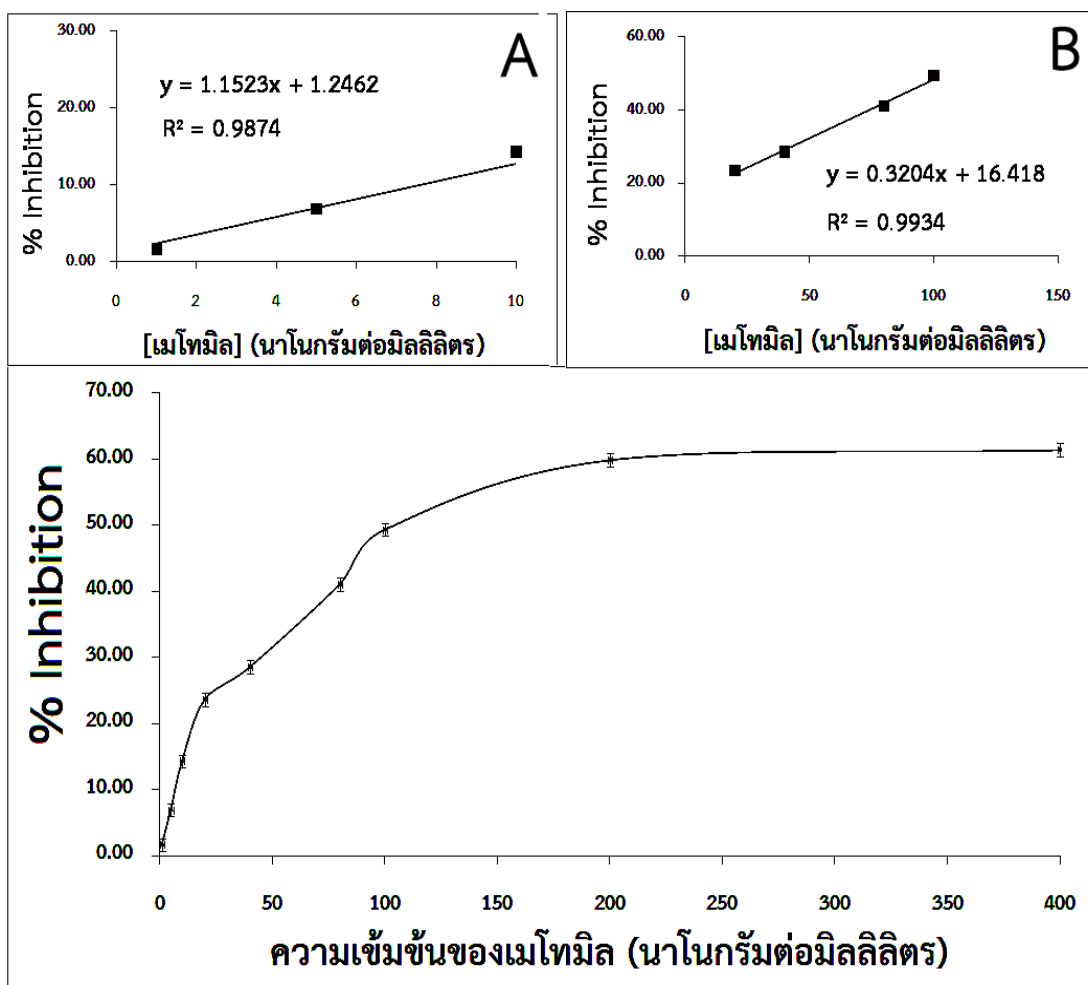
รูปที่ 5.15 ผลของเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง (Incubation time) ต่อเปอร์เซ็นต์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (% Inhibition, %) ในระบบวัดที่ของ สารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์

5.3.3 การศึกษาการตรวจวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต

เมื่อเราทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัดปริมาณของสารฆ่าแมลงแล้วในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษาการนำไปโอเซนเซอร์นี้ไปตรวจวัดสารฆ่าแมลงทั้งประเภทออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต สำหรับการทดลองนี้สารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตจะเลือกใช้เมทิล พาราไรออน (methyl parathion) และสารฆ่าแมลงประเภทคาร์บาเมตจะใช้เมโทมิล (methomyl) โดยสภาวะที่ใช้ในการตรวจวัดคือ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ที่ประกอบด้วยอะซิติกไทโอโคลีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ และ incubation time 10 นาที ซึ่งผลการตรวจวัดสารฆ่าแมลงทั้ง 2 ชนิดแสดงดังรูปที่ 5.16 และ 5.17



รูปที่ 5.16 ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไรออน ของอะซิติกโคลีนเอสเทอร์สไปโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม และกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของการวัดในช่วงความเข้มข้น A) 1 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม B) 200 ถึง 1600 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม



รูปที่ 5.17 ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทคาร์บาเมต ชนิดเมทิลเมทิล ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ไบโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของการวัดในช่วงความเข้มข้น A) 1 ถึง 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร B) 20 ถึง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 5.16 จะเห็นว่าการทดลองวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรออน ในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีช่วงที่ค่าของการวัดตอบสนองเป็นเชิงเส้นตรง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชัน (sensitivity) เท่ากับ 0.0928 ไมโครแอมแปร์ ลิตร นาโนกรัม⁻¹ และในช่วงที่สองที่ความเข้มข้น 200 ถึง 1600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชัน (sensitivity) เท่ากับ 0.028 ไมโครแอมแปร์ ลิตร นาโนกรัม⁻¹ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (lower detection limit) ซึ่งคำนวณจากสูตร $3(S.D.)/sensitivity$

เมื่อ S.D. คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลการวัด ซึ่งจะเลือกใช้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของช่วงที่วัดได้ และ sensitivity หาได้จากความชันของกราฟ ซึ่งในการหาค่า lower detection limit จะใช้ค่า sensitivity ในช่วงที่มีความเข้มข้นต่ำสุดนั้นคือกราฟรูป 5.16A ซึ่งพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (lower detection limit) เท่ากับ 0.065 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม และจากรูปที่ 5.17 เป็นการทดลองวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมโทมิลในช่วง 1 ถึง 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าช่วงที่การวัดตอบสนองเป็นแบบเชิงเส้นแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชัน (sensitivity) เท่ากับ 1.1523 ไมโครแอมแปร์ ลิตร นาโนกรัม⁻¹ และในช่วงที่สองที่มีความเข้มข้น 10 ถึง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชัน (sensitivity) เท่ากับ 0.3204 ไมโครแอมแปร์ ลิตร นาโนกรัม⁻¹ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (lower detection limit) เท่ากับ 0.128 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อพิจารณาความเที่ยงตรงของข้อมูลจากข้อมูลกระแสไฟฟ้าที่ทำการทดลองวัด 3 ซ้ำ (n=3) พบว่าการกระจายตัวของข้อมูล %RSD ไม่เกิน 3 % ซึ่งถือว่าค่อนข้างแม่นยำในการวัด และเมื่อนำช่วงของความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่ตรวจวัดได้โดยอะซิติกโคลีนเอสเทอร์สไปโอเซนเซอร์ ในการทดลองนี้ไปเปรียบเทียบกับค่า Maximum Residue Limits หรือ MRLs ซึ่งเป็นค่าที่ใช้กำหนดระดับปริมาณสารพิษซึ่งเป็นอันตรายทางเคมีที่ยอมให้มีการปนเปื้อนในอาหารได้สูงสุด สำหรับมาตรฐานยุโรป EU สารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรธอน และเมโทมิล จะมีค่า MRLs ที่ยอมให้ปนเปื้อนในผักและผลไม้เช่น ผักคะน้า ถั่วฝักยาว มะเขือ พริก กะหล่ำปลี แครอท ทุเรียน มังคุด มะนาว แตงโม มะม่วง ฯลฯ ที่ 0.02 ppm หรือ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าช่วงของสารฆ่าแมลงที่วัดได้จากอะซิติกโคลีนเอสเทอร์สไปโอเซนเซอร์ที่ดัดแปลงขึ้นด้วย SPCE/MCF/APTS/ AuNPs/AChE/Chitosan สามารถวัดได้ครอบคลุมค่า MRLs ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ของสารฆ่าแมลงทั้งสองชนิด เมื่อเทียบกับไปโอเซนเซอร์ชนิดอื่นๆที่ดัดแปลงขึ้นมาเพื่อตรวจวัดสารฆ่าแมลงทั้ง 2 ชนิดนี้ ได้ทำการรวบรวมไว้ดังตารางที่ 5.2 ซึ่งจะเห็นว่าอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงขึ้นด้วย SPCE/MCF/APTS/AuNPs /AChE/Chitosan มีช่วงของการตรวจวัดสารฆ่าแมลงทั้งเมทิล พาราไรธอน และเมโทมิลที่น้อยกว่าการงานวิจัยของ Gong และ Nunes แต่มีค่า detection limit ที่ต่ำกว่า นั่นคือสามารถวัดสารฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าได้ดีกว่า

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ที่ใช้อิเล็กโทรดดัดแปลง เพื่อวัดสารฆ่าแมลงชนิดเมทิล พาราไรออน และเมโทมิล

| ชนิดของสารฆ่าแมลง | ชั้นของอิเล็กโทรดที่ดัดแปลง | ช่วงของความเข้มข้น ที่สามารถวัดได้ (linear range) นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร | ความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถวัดได้ (Detection limit) นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร | อ้างอิง |
|-------------------------------------|---|---|---|----------------------|
| เมทิล พาราไรออน (ออร์กาโนฟอสเฟต) | GCE/Au-PPy/AChE | ช่วงแรก 5 - 120 ช่วงที่สอง 500 - 4500 | 2.00 | (Gong และคณะ, 2009) |
| | GCE/LDHs/AChE | ช่วงแรก 5 - 120 ช่วงที่สอง 500 - 4500 | 0.60 | (Gong และคณะ, 2013) |
| | GCE/Calciumcarbonate/AChE/Chitosan | ช่วงแรก 5 - 200 ช่วงที่สอง 748 - 3748 | 0.97 | (Gong และคณะ, 2009) |
| | SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan | ช่วงแรก 1 - 200 ช่วงที่สอง 200 - 1600 | 0.06 | งานวิจัยนี้ |
| เมโทมิล (คาร์บาเมต) | GCE/PEDT/PPO/AChE | 0.4 - 113.5 | 0.30 | (Nunes และคณะ, 2004) |
| | Graphite working electrode/SbQ-PVA/AChE | 0.4 - 113.5 | 0.16 | (Nunes และคณะ, 2004) |
| | SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan | ช่วงแรก 1 - 10 ช่วงที่สอง 10 - 100 | 0.13 | งานวิจัยนี้ |

หมายเหตุ

GCE คือ อิเล็กโทรดแบบกลาสซีคาร์บอน

SPCE คือ อิเล็กโทรดแบบสกรีนพริ้นคาร์บอนอิเล็กโทรด

PPy คือ โพลีไพรอล

LDHs คือ Layered double hydroxides

PEDT คือ poly 3,4-ethylenedioxythiophene

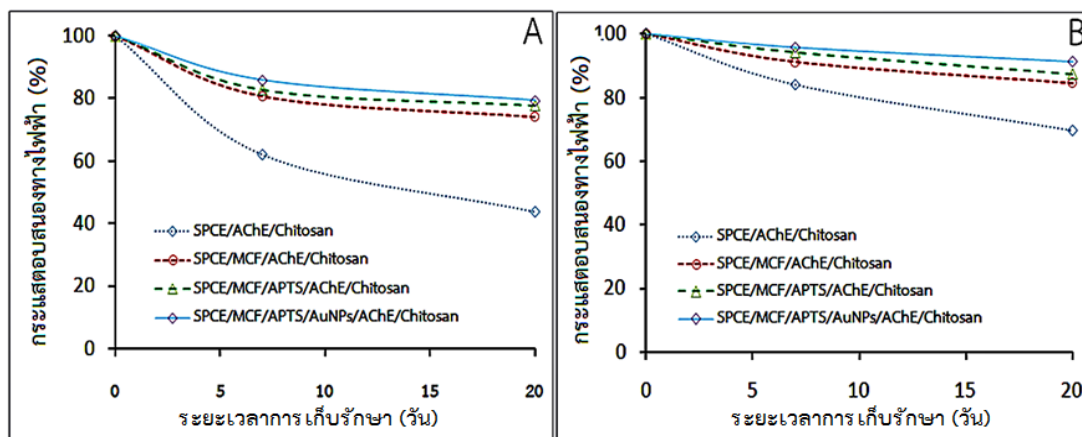
PPO คือ polyphenol oxidase

SbQ คือ styrylpyridinium

PVA คือ poly(vinyl alcohols)

5.3.4 การศึกษาการความคงตัวของไบโอเซนเซอร์ต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา

ในการทดลองส่วนนี้จะเป็นการทดสอบความคงตัวในการวัดของไบโอเซนเซอร์ หลังจากผลิตขึ้นมาแล้วเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 20 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสที่เป็นอุณหภูมิห้อง ในสภาวะแห้ง (dry electrode) ซึ่งผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 5.18



รูปที่ 5.18 แนวโน้มของการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของอิเล็กโทรดที่ดัดแปลง เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ A) 32 องศาเซลเซียส และ B) 4 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5.18 พบว่าอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงด้วยเอนไซม์ร่วมกับไคโตซาน (SPCE/AChE/Chitosan) เมื่อทำการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 7 และ 20 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าจะมีค่าของการตอบสนองทางไฟฟ้าลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุพอร์ซันทั้ง 3 ชนิดคือวัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS/AuNPs โดยอิเล็กโทรดดัดแปลง SPCE/AChE/Chitosan นี้จะมีค่าสัญญาณการตอบสนองที่ลดลงจาก 100.00 เปอร์เซ็นต์ในวันแรกที่ทำกรผลิต ลดลงเหลือ 62.34 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 และลดลงเหลือ 43.75 เปอร์เซ็นต์เมื่อผ่านไป 20 วัน ซึ่งน้อยกว่าอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงด้วยเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุ MCF ที่มีค่าการตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้าในวันที่ 20 มากกว่า 74.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าวัสดุ MFC เป็นวัสดุที่สามารถช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดี การตรึงเอนไซม์ไว้ในรูพรุนของวัสดุชนิดนี้ยังจะช่วยปกป้องเอนไซม์จากสภาพแวดล้อมภายนอกที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ชนิดนี้จะต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ แต่ในกรณีนี้ต้องถูกเก็บที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แต่วัสดุชนิดนี้ยังช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้มากกว่า 74.00 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการเปลี่ยนอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาอิเล็กโทรดดัดแปลงที่ผลิตขึ้น ก็พบว่าอุณหภูมิที่ต่ำลงช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียไปช้าลง

โดยอิเล็กโทรดที่ถูกดัดแปลงด้วยเอนไซม์ที่ไม่ได้ตรึงในวัสดุ MCF จะมีการตอบสนองลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ในวันแรกเหลือ 70.00 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 20 ซึ่งสูงกว่าที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ส่วนอิเล็กโทรดที่ถูกดัดแปลงด้วยเอนไซม์ที่ตรึงในวัสดุ MCF ก็พบว่าในวันที่ 20 สามารถรักษาสัญญาณการตอบสนองได้มากกว่า 84.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุทั้ง 3 แบบคือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS/AuNPs จะพบว่าผลของการปรับปรุงพื้นผิวของ MCF ด้วย APTS และอนุภาคนาโนทองไม่ส่งผลเสียต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ ซึ่งสังเกตได้จากผลการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน โดยวัสดุ MCF/APTS/AuNPs จะเป็นวัสดุที่สามารถรักษาสัญญาณการตอบสนองของอิเล็กโทรดได้มากที่สุดคือ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 20 วันยังสามารถรักษาสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์ไว้ได้ถึง 91.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบผลของการเก็บรักษาอิเล็กโทรดดัดแปลงกับงานวิจัยอื่นตามตารางที่ 5.3 พบว่าการดัดแปลงอิเล็กโทรดโดยใช้วัสดุ MCF ในการตรึงเอนไซม์จะช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ในปริมาณที่สูงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu และคณะ ในปี 2011 ที่ทำการทดลองตรึงเอนไซม์ AChE ในวัสดุตรึง MCF ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะแห้งเมื่อผ่านไป 30 วัน วัสดุ MCF สามารถช่วยรักษา กิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ดี โดยมีค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองร้อยละ 92.00 % เมื่อเทียบกับกระแสที่วัดได้ในวันแรก แต่ต่างจากงานของปรางค์นากู และคณะ ในปี 2011 ที่ดัดแปลงอิเล็กโทรดโดยใช้วัสดุ MCF แต่ดูดซับเอนไซม์ไว้ภายนอกของตัววัสดุทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพเร็ว โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 20 วัน ค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองลดลงอย่างมาก จนเหลือร้อยละ 40.00 % เมื่อเทียบกับกระแสที่วัดได้ในวันแรก

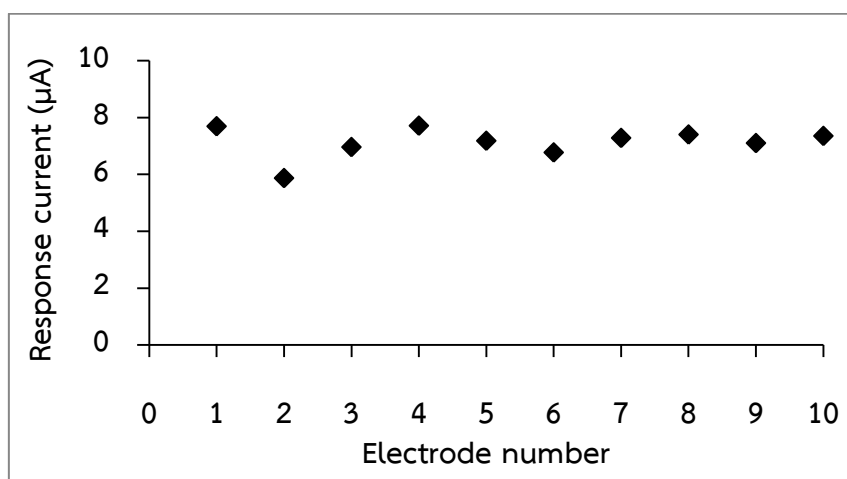
ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบผลของการเก็บรักษาอิเล็กโทรดดัดแปลงที่ใช้วัสดุ MCF กับงานวิจัยอื่น

| งานวิจัยของ | วิธีการตรึงเอนไซม์ | อิเล็กโทรดดัดแปลงแบบ | ผลของการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4°C |
|--------------------------|---|-----------------------------------|--|
| Wu และคณะ (2011) | ตรึงเอนไซม์ AChE ด้วยการดูดซับภายในรูพรุน ของ MCF | GCE/MCF/AChE/PVA | เก็บไว้ 30 วัน สามารถรักษาสัญญาณการตอบสนองไว้ได้ 92% |
| ปรางค์นากู และคณะ (2011) | ตรึงเอนไซม์ AChE ด้วยการดูดซับภายนอกรูพรุนของ MCF | SPCE/PB/MCF/AChE/chitosan | เก็บไว้ 20 วัน สามารถรักษาสัญญาณการตอบสนองไว้ได้ 40% |
| งานวิจัยนี้ | ตรึงเอนไซม์ AChE ด้วยการดูดซับภายในรูพรุน ของ MCF | SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan | เก็บไว้ 20 วัน สามารถรักษาสัญญาณการตอบสนองไว้ได้ 92% |

จากภาพรวมของการดัดแปลงอิเล็กโทรดเพื่อใช้ในการวัดสารฆ่าแมลงประเภท ออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมต พบว่าอิเล็กโทรดไบโอเซนเซอร์ที่ดัดแปลงขึ้นนี้มีช่วงของ ความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่วัดได้ครอบคลุมที่กฎหมายกำหนด ซึ่งมาตรฐานอาหารยุโรปได้กำหนด ว่าห้ามมีสารฆ่าแมลงชนิดเมโทลมิล และเมทิล พาราไธออนเกิน 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในผักและ ผลไม้เช่น ผักคะน้า ถั่วฝักยาว มะเขือ พริก กะหล่ำปลี แครอท ทูเรียน มังคุด มะนาว แตงโม มะม่วง ฯลฯ แต่ในสถานการณ์จริงจะมีผักบางชนิดที่มักมีการตรวจพบการปนเปื้อนเกินค่ามาตรฐานมากๆ เช่น ถั่วฝักยาว ที่พบการปนเปื้อนถึง 420 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม เกินค่ามาตรฐานกำหนดถึง 21 เท่า (ตรวจพบในวันที่ 9 มีนาคม 2555 ในประเทศนอร์เวย์) ซึ่งเครื่องมือวัดที่ดัดแปลงขึ้นยังไม่สามารถ ตรวจวัดได้หากมีค่าการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงเกินจากค่ามาตรฐานในปริมาณที่สูงมากๆ ดังนั้น จะต้องทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง (dilute solution) ก่อนทำการตรวจวัด

5.3.5 การผลิตซ้ำ (Reproducibility)

เมื่อทำการผลิตอิเล็กโทรดดัดแปลงชนิด MCF/APTS/AuNPs/AChE ซ้ำตามกระบวนการ เดิม จำนวน 10 อิเล็กโทรด แล้วนำไปทดสอบการตอบสนองทางไฟฟ้า ด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี โดยป้อนความศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 โวลต์ ในระบบวัดสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ ประกอบด้วย อะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าละมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 3.50 (n = 10) แสดงดังรูปที่ 5.19



รูปที่ 5.19 การตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลง ด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 โวลต์ ในระบบวัดสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ทำการผลิตซ้ำตามกระบวนการเดิม จำนวน 10 อิเล็กโทรด

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 การวิเคราะห์หาคุณสมบัติของวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตของเมโซเซลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง

1. จากกราฟไอโซเทิร์มของการดูดซับที่ได้จากวิธีวัดด้วย BET พบว่า กราฟมีลักษณะเป็นไอโซเทอริชิสรูป แบบ H2 โดยลักษณะของกราฟตรงกับไอโซเทิร์มของการดูดซับแบบที่ 4 (type IV) ในระบบ IUPAC ซึ่งมักพบในวัสดุรูพรุนประเภทเมโซพอร์ส ที่มีขนาดรูพรุนอยู่ระหว่าง 2 ถึง 50 นาโนเมตร เมื่อนำข้อมูลจากไอโซเทิร์มของการดูดซับของ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้สมการของบีเจเอช คำนวณหาคุณสมบัติทางกายภาพก็พบว่า MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นในการทดลองนี้มีขนาดรูพรุน 26 นาโนเมตร มีปริมาตรรูพรุน 1.02 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม และมีพื้นที่ผิวของรูพรุน 537.6 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม
2. เมื่อนำไปหาคุณสมบัติทางเคมีของพื้นผิวของวัสดุด้วย FTIR จะพบว่า MCF ประกอบไปด้วยหมู่ซิลานอล และหมู่ไฮโดรเจน และเมื่อใช้ zeta potential ตรวจสอบคุณสมบัติทางไฟฟ้าบนพื้นผิววัสดุพบว่า มีศักย์เป็นลบโดยมีค่า -46.33 โวลต์ ซึ่งในการนำวัสดุนี้มาสังเคราะห์ทองต้องปรับพื้นผิวให้มีลักษณะที่เหมาะสมก่อนโดยใช้สารก่อฟังก์ชัน APTS ปรับปรุงพื้นผิว ซึ่งพบว่า จะช่วยให้วัสดุ MCF/APTS มีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นบวกเพิ่มขึ้นเป็น +5.58 โวลต์ ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคของทองจะช่วยให้ดูดซับคลอไรด์ไอออนลบ (AuCl_4^-) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตทองได้มากขึ้น
3. เมื่อนำวัสดุ MCF/APTS มาสังเคราะห์ทองก็พบว่า ศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกสามารถดูดซับทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ที่เป็นประจุได้ดี เมื่อนำไปผ่านการรีดิวซ์ด้วยวิธีอัลตราโซนิกเพื่อรีดิวซ์ทองในรูปของไอออน (gold ion, Au^{3+}) จากทองคลอไรด์ไอออน (AuCl_4^-) ที่ดูดซับอยู่ในรูพรุนของวัสดุ MCF/APTS ในเกิดเป็นอะตอมของทอง (gold atoms, Au^0) โดยผลจากการสังเคราะห์เมื่อนำไปส่อง TEM จะพบว่าเกิดอนุภาคของทองส่วนใหญ่อยู่ภายในรูพรุนของวัสดุ โดยมีขนาดของอนุภาคที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 4.9 นาโนเมตร และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นผลึกด้วย XRD ก็พบว่าทองที่เกิดขึ้นมีลักษณะโครงสร้างผลึกเป็นแบบคิวบิก

6.1.2 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในวัสดุตรึงแบบต่างๆ

1. ในหัวข้อนี้เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ของวัสดุทั้งในแง่ของปริมาณ และกิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัสดุที่ทำการทดลองเปรียบเทียบคือ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs ซึ่งผลการทดลองพบว่าสามารถตรึงรูปเอนไซม์ได้ในปริมาณ 35.40 38.60 และ 48.20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับปริมาณเอนไซม์ในสารละลาย
2. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อปริมาตร 3 ไมโครลิตรซึ่งเป็นปริมาตรที่ใช้ตัดแปลงอิเล็กโทรดต่อ 1 อิเล็กโทรด พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ใน MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.144 0.22 และ 0.38 ยูนิตตามลำดับ เมื่อพิจารณาทั้งปริมาณเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปจะพบว่า MCF/APTS/AuNPs เป็นวัสดุที่ให้ทั้งปริมาณเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด

6.1.3 การศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ที่ตัดแปลงด้วยวัสดุชนิดต่างๆ

1. ผลการทดสอบวัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS วัสดุ MCF/APTS/AuNPs และโคโตซาน ต่อพฤติกรรมการตอบสนองทางไฟฟ้าบนอิเล็กโทรดแบบ SPCE พบว่า MCF MCF/APTS และโคโตซาน ให้การตอบสนองทางไฟฟ้าไม่ดีนักเนื่องจากเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ไม่นำไฟฟ้า แต่ตรงข้ามกับวัสดุ MCF ที่มีการสังเคราะห์ทองไว้ภายในรูพรุนของอนุภาค (MCF/APTS/AuNPs) จะพบว่ามี การตอบสนองเชิงไฟฟ้าที่สูงกว่าเพราะทองจะช่วยปรับปรุงในเรื่องของคุณสมบัติการนำไฟฟ้าของวัสดุ
2. เมื่อนำ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs มาทดสอบการนำไฟฟ้าอีกครั้งเมื่อมีการตรึงเอนไซม์ไว้ภายใน โดยวัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 9 ที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าวัสดุ MCF/APTS/AuNPs มีการตอบสนองดีที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จะเลือกใช้อิเล็กโทรดที่ตัดแปลงโดยใช้วัสดุ MCF/APTS/AuNPs มาใช้วัดสารฆ่าแมลง ร่วมกับฟิล์มโคโตซานที่ถึงแม้ว่าจะไม่นำไฟฟ้าแต่ช่วยในเรื่องป้องกันการหลุดออกของเอนไซม์ และวัสดุตรึงจากอิเล็กโทรด

6.1.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองการวัดค่าของไบโอเซนเซอร์

1. ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นพบว่าที่ความเข้มข้นอะซิติกไทโอโคลีน คลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์ เป็นสภาวะที่ทำให้เอนไซม์บิโกลิโพรดของไบโอเซนเซอร์ทำงานได้ดีจึงมีการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงที่สุด
2. ผลของ pH ของสารละลายที่ใช้เป็นสภาวะในการวัด พบว่าที่ค่า pH ของสารละลายที่วัดเท่ากับ 9 เป็นสภาวะที่ทำให้เอนไซม์บิโกลิโพรดของไบโอเซนเซอร์ทำงานได้ดีจึงมีการตอบสนองทางไฟฟ้าสูงที่สุด
3. ระยะเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง (incubation time) พบว่าที่เวลา 10 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมที่เราจะสามารถมั่นใจได้ว่าสารฆ่าแมลงได้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เต็มที่แล้ว

6.1.5 การศึกษาการวัดสารฆ่าแมลงเมทิล พาราไรออน และเมโทมิล

1. ผลการวัดสารฆ่าแมลงเมทิล พาราไรออน ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตพบว่าช่วงที่สามารถตรวจวัดได้ (linear range) แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม ช่วงที่ 2 ที่ความเข้มข้น 200 ถึง 1600 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม โดยในช่วงแรกจะมีการตอบสนองในการวัดที่เร็วกว่าเพราะมีค่า sensitivity เท่ากับ 0.0928 นาโนแอมแปร์ต่อนาโนโมลาร์ ซึ่งมากกว่าช่วงที่สองที่มีค่าเท่ากับ 0.0284 นาโนแอมแปร์ต่อนาโนโมลาร์ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้อยู่ที่ 0.065 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงพบว่าสามารถวัดได้ครอบคลุมช่วงของค่า MRLs ของเมทิล พาราไรออน (มาตรฐานยุโรป) ที่กำหนดว่าห้ามมีสารฆ่าแมลงชนิดนี้เกิน 20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมในผักและผลไม้
2. ผลการวัดสารฆ่าแมลงเมโทมิล ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงประเภทคาร์บาเมตพบว่าช่วงที่สามารถตรวจวัดได้ (linear range) แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม ช่วงที่ 2 ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม โดยในช่วงแรกจะมีการตอบสนองในการวัดที่เร็วกว่าเพราะมีค่า sensitivity เท่ากับ 1.1523 นาโนแอมแปร์ต่อนาโนโมลาร์ ซึ่งมากกว่าช่วงที่สองที่มีค่าเท่ากับ 0.3204 นาโนแอมแปร์ต่อนาโนโมลาร์ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้อยู่ที่ 0.128 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงพบว่าสามารถวัดได้ครอบคลุมช่วงของค่า MRLs

ของเมโทมิล (มาตรฐานยุโรป) ที่กำหนดว่าห้ามมีสารฆ่าแมลงชนิดนี้เกิน 20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมในผักและผลไม้

6.1.6 การศึกษาความคงตัวของอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ในการเก็บรักษา

1. การทดสอบการเก็บรักษาเอนไซม์บนอิเล็กโทรดแบบ SPCE เทียบระหว่าง
 - 1) SPCE/AChE/chitosan 2) SPCE/MCF/AChE/chitosan 3) SPCE/MCF/APTS/AChE/chitosan และ 4) SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/chitosan พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึงในวัสดุ MCF คืออิเล็กโทรดประเภทที่ 1 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเร็วมาก โดยมีค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าลดลงเหลือ 43.75 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 20 วันที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุ MCF คือ อิเล็กโทรดประเภทที่ 2) 3) และ 4) พบว่าวัสดุ MCF สามารถช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ดี โดยมีค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าลดลงเหลือ 74.07 77.81 และ 79.32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้ เป็นระยะเวลา 20 วันที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่เมื่อลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็น 4 องศาเซลเซียสก็พบว่าอิเล็กโทรดประเภทที่ 1 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเร็ว โดยมีค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าลดลงเหลือ 69.77 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 20 วัน ส่วนอิเล็กโทรดประเภทที่ 2) 3) และ 4) พบว่าวัสดุ MCF สามารถช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ดี อีกทั้งอุณหภูมิก็ช่วยให้เอนไซม์เสื่อมสภาพช้าลงด้วยทำให้ยังมีค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าที่สูงอยู่ โดยเหลือ 84.59 87.31 และ 91.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 20 ตามลำดับ
2. การทดสอบการผลิตอิเล็กโทรดดัดแปลงชนิด MCF/APTS/AuNPs/AChE ทั้งหมด 10 อิเล็กโทรดเพื่อทดสอบความคงตัวในการวัดในด้วยเทคนิคแอมเพโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 โวลต์ ในระบบวัดสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติกไทโอโคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 3.50

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองได้ใช้ฟิล์มโคโตซานเป็นวัสดุชั้นนอกที่เคลือบอยู่บนอิเล็กโทรดซึ่งข้อดีของวัสดุนี้คือเข้ากับเอนไซม์ได้ดี และช่วยสิ่งที่ดัดแปลงอยู่บนอิเล็กโทรดไม่หลุดออก แต่ข้อเสียคือเรื่องของการนำไฟฟ้า ดังนั้นอาจจะเลือกใช้วัสดุชนิดอื่นที่สามารถนำไฟฟ้าได้ ไม่ละลายน้ำ และเข้ากับเอนไซม์ได้ดีมาทดแทนโคโตซานเพราะไบโอเซนเซอร์จะเป็นการวัดที่อาศัยหลักการทางไฟฟ้าเคมี ดังนั้นคุณสมบัติของการนำไฟฟ้าของวัสดุจึงสำคัญ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. รายงานสถานการณ์มลพิษทางน้ำจากนาข้าว และการจัดการ. สำนักจัดการคุณภาพน้ำกรมควบคุมมลพิษ (กันยายน 2554): 20-21.
- กรมวิชาการเกษตร. คุณภาพและความปลอดภัยของวัตถุดิบอันตรายทางการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร, (2542): 7.
- ชูลีพร บุตรโคตร. ชีวอินทรีย์ ทางเลือกที่ยั่งยืนเพื่อเกษตรกรไทย. กรุงเทพธุรกิจ (6 ตุลาคม 2555).
- นวลศรี ทยาพัชร. สารพิษตกค้างทางเกษตรกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ มสธ, 2533.
- ปรารักษ์นาฏ งามมาก จุงใจ ปั้นประณต และสิริรุ่ง ปรีชานนท์. อะซีติลโคลีนเอสเทอร์สไปโอเซนเซอร์ที่มียีนส์ประกอบของซิลิกา-โคโตซาน นาโนคอมโพสิตสำหรับการตรวจวัดยาฆ่าแมลง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554.
- ปราณี อ่านเปรื่อง, “การประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงรูป” ใน เอนไซม์ทางอาหาร, พิมพ์ครั้งที่ 4 (กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547), หน้า 234-254.
- พรพิมล ศรีทองคำ, ชาญเดช หรูอนันต์, กฤษณพงศ์ กิรติกร, ดวงแข บุตรกุล, กรุณา กนกजारูจิตร, และ ธวัชชัย สุวรรณคำ, “การกำจัดสัญญาณแทรกสอดจากกรดแอสคอร์บิก เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณซูโคสในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม” (สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพและคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2538).
- พิชัย สมบูรณ์วงศ์ และจิรนนท์ เสนานาญ. “เกษตรอินทรีย์ ผลดีต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม,” ไทยนิวส์ (2 เมษายน 2553).
- พิบูล อีสสระพันธุ์, “สถานการณ์การเจ็บป่วยด้วยโรคจากการสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย,” เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเพื่อการเฝ้าระวังสารเคมีทางการเกษตร (16 - 17 มิถุนายน 2554): 15-18.
- วารสารณ์ บุรณานนท์. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม 16, 2 (เมษายน - มิถุนายน 2552): 14-17.
- วิไลวรรณ ช่วยยก, จุงใจ ปั้นประณต, ชัญชณา ธนชยานนท์ และสิริรุ่ง ปรีชานนท์, “การตรึงเอนไซม์ฮอสเตรติชเปอร์ออกซิเดสบนนาโนคอมพอสิตของซิลเวอร์และซิลิกาชนิดเมโซ

พอร์,” (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทศึกษิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551).

เวณิกา เบ็ญจพงษ์, พรรรัตน์ สิ้นชัยพานิช, เรณู ทวีชาติวิทยากุล, วีรยา การพานิช, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, เพ็ญนภา กาญจนามั่งคักดี, จันทิมา โปธ, นวรัตน์ ว่องไวเมธี, กังสดาลสิงห์สูง, เพ็ญพร นันทนรุ่งเรือง, และ ณิชการณ ชุ่นหอม, “ สิ้นค้าอาหารทางการเกษตรกลุ่มพืชอาหาร,” โครงการศึกษาแนวทางการเฝ้าระวัง สิ้นค้าเกษตรที่มีความเสี่ยง สำนักงานมาตรฐานสิ้นค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2552): 33-35.

สกนธ์ พันธุ์วิทยากุล, มานะ ศรียุทธศักดิ์, และ สิริรุ่ง ปรีชานนท์, “การตรึงเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุคอมโพสิตของ มีโซพอร์ซิลิกาอนุภาคนาโนของเงินและโคโตซานเพื่อประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์,” (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทศึกษิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551): 29-35.

อรอนงค์ จุลพันธ์, และ เมตตา เจริญพานิช, “การสังเคราะห์ซิลิกาเมโซพอร์ที่มีขนาดรูพรุน 2 ขนาด,” การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17 (2550): 1-3.

ภาษาอังกฤษ

Ahirwal, K. G., and Mitra, K. C. Direct Electrochemistry of Ahirwal Horseradish Peroxidase-Gold Nanoparticles Conjugate. Sensors 9 (2009): 881-894.

Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. Current Chemical Biology 3 (2009): 203-230.

Ashayer, R., Mannan, H. S., and Sajjadi, S. Synthesis and characterization of gold nanoshells using poly(diallyldimethyl ammonium chloride). Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 329 (2008): 134-141.

Bailey, J.E., and Ollis, D.F., In: “Biochemical Engineering Fundamentals” (2nd edition), McGraw- Hill Book Co., Singapore, 1986.

Blanch, H. W., and Clark, D. S. In: “Biochemical Engineering”, Marcel Dekker, Inc., U.S.A., 1997.

Chen, L. F., Hu, J. C., and Richards, R. M. Intercalation of aggregation-free and well-dispersed gold nanoparticles into the walls of mesoporous silica as a

- highly active catalyst for n-alkane and alcohols oxidation. J. Am. Chem. Soc. 131 (2009): 914–915.
- Chen, W., Cai, W., Zhang, L., Wang, G., Zhang, L. Sonochemical Processes and Formation of Gold Nanoparticles within Pores of Mesoporous Silica. Journal of Colloid and Interface Science 238 (2001): 291–295.
- Chi, S. Y., Lin, P. H., and Mou, Y. C. CO oxidation over gold nanocatalyst confined in mesoporous silica. Applied Catalysis A: General 284 (2005): 199–206.
- Chong, A. S. M., and Zhao, X. S. Desing of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. Catal. Today. 93-95 (2004): 293-299.
- Chong, A. S. M., Zhao, X. S., Kustedjo, A. T., Qiao, S. Z. Functionalization of large-pore mesoporous silica with organosilanes by direct synthesis. Micropor. Mesopor. Mater. 72 (2004): 33-42.
- Cobley, J. A., Mason, T. J., Alarjah, M., Ashayer, R., Mannan, H. S. The effect of ultrasound on the gold plating of silica nanoparticles for use in composite solders. Ultrasonics Sonochemistry 18 (2011): 37–41.
- Daniel, M. C. and Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis and nanotechnology. Chem. Rev. 104 (2004): 309
- Du, D., Wang, M., Cai, J., Qin, Y., Zhang, A. One-step synthesis of multiwalled carbon nanotubes–gold nanocomposites for fabricating amperometric acetylcholinesterase biosensor, Sens. Actuators B 143 (2010): 524–529.
- Du, Dan., Chen, S., Cai, J., Song, D. Comparison of drug sensitivity using acetylcholinesterase biosensor based on nanoparticles–chitosan sol–gel composite. Journal of Electroanalytical Chemistry 611 (2007): 60–66.
- Eggs, B. R. **Biosensors: An Introduction**. Wiley & Sons and B.G. Teubner Publisher, New York (1996).

- Gabaldon, J.P., Bore, M., and Datye, A. K. Mesoporous silica supports for improved thermal stability in supported Au catalysts. Top. Catal 44 (2007): 253–262.
- Ghosh, A., Patra, C. R., Mukherjee, P., Sastry, M., Kumar, R. Preparation and stabilization of gold nanoparticles formed by *in situ* reduction of aqueous chloroaurate ions within surface-modified mesoporous silica. Microporous Mesoporous Mater 58 (2003): 201–211.
- Gong, J., Wang, L., and Zhang, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. Biosens. Bioelectron 24 (2009): 2285–2288.
- Gutiérrez, F. L., Hamoudi S., and Belkacemi, K. Synthesis of Gold Catalysts Supported on Mesoporous Silica Materials: Recent Developments. Catalysts 1 (2011): 97-154.
- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., Froba, M. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. Angewandte Chemie 45 (2006): 3216 – 3251.
- Ion, A. C., Ion, I., Culetu, A., Gherase, D., Moldovan, C. A., Iosub, R., Dinescu, A. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructure chitosan composite material for organophosphate pesticides. Mater. Sci. Eng. C 30 (2010): 817–821.
- Ispas, C., Sokolov, I., and Andreescu, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. Anal Bioanal Chem 393 (2009): 543–554.
- Kaya, H. B., Qzcan, B., Sisecioglu, M., Ozdemir, H. Purification of Acetylcholinesterase by 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from Human Erythrocytes. Springer Science+Business Media New York 2013.
- Kim J., Desch, R. J., Thiel, S. W., Guliants V. V., Pinto, N. G., Energetics of protein adsorption on amine-functionalized mesostructured cellular foam silica. Journal of Chromatography A 1218 (2011): 7796– 7803.
- Kim, J., Desch, R. J., Thiel, S. W., Guliants, V. V., Pinto, N. G., Adsorption of biomolecules on mesostructured cellular foam silica: Effect of acid

- concentration and aging time in synthesis. *Microporous and Mesoporous Materials* 149 (2012) 60–68
- Korkut S., Keskinler, B., and Erhan, E. An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobio- composite film for determination of phenol derivatives. *Talanta* 76 (2008): 1147–1152.
- Lee, H. C., Lin, S. T., and Mou Y. C. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today* 4 (2009): 165-179.
- Lettow , S. J, Han , J. Y., Winkel, S. P., Yang, P., Zhao D., Stucky D. G., Ying Y. J., Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir* 16 (2000): 8291-8295.
- Li, L., Jin, C., Wang, X. C., Ji, W. J., Pan, Y., van der Knaap, T., van der Stoel, R., Au, C. T. Cyclohexane oxidation over size-uniform Au nanoparticles (SBA-15 hosted) in a continuously stirred tank reactor under mild conditions. *Catal. Lett* 129 (2009): 303–311.
- Liu, J., and Mattiasson, B. Microbial BOD sensors for wastewater analysis. *Water Research* 36 (2002): 3786–3802.
- Liu, Y. M., Feng, W. L., Li T. C., He .H. Y., Dai, W. L., Huang, W., Cao Y., Fan K. N. Structure and catalytic properties of vanadium oxide supported on mesocellulous silica foams (MCF) for the oxidative dehydrogenation of propane to propylene. *Journal of Catalysis* 239 (2006): 125–136.
- Livage, J., Coradin, T., and Roux, C. Encapsulation of biomolecules in silica gels. *Journal of Physics: Condensed Matter* 13 (2001): 673.
- Lu, G. M., Zhao, R., Qian, G., Qi, Y. X., Wang, X. L., Suo, J. S. A highly efficient catalyst Au/MCM-41 for selective oxidation cyclohexane using oxygen. *Catal. Lett* 97 (2004): 115–118.
- Marinov, I., Ivanov, Y., Gabrovska, K., Godjevargova, T. Amperometric acetylthiocholine sensor based on acetylcholinesterase immobilized on nanostructured polymer membrane containing gold nanoparticles. *J. Mol. Catal. B* 62 (2010): 67–75.

- Mellini, M., Micro- and Mesoporous Carbon Forms, Chrysotile, and Clathrates. Reviews in Mineralogy and Geochemistry 57 (2005): 435-448.
- Miao, Y., Lu, G., Liu, X., Guo, Y., Wang, Y., Guo, Y. Mo-functionalized MCF meso-material and its catalytic performance for epoxidation of propylene by cumene hydroperoxide. Microporous and Mesoporous Materials 122 (2009): 55–60.
- Milkani, E., Lambert, R. C., and Mcgimpsey, W. G. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. Analytical Biochemistry 408 (2011): 212–219.
- Orita, T., Tomita, M., Saito, T., Nishida N., Kato, K. Immobilization of cholesterol esterase in mesoporous silica materials and its hydrolytic activity toward diethyl phthalate. Materials Science and Engineering C 32 (2012): 718–724.
- Pandya, H. P., Jasra, V. R., Newalkar, L. B., Bhatt, N. P. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. Microporous and Mesoporous Materials 77 (2005): 67–77.
- Perry, A., Yamamoto, S. I., Ishaaya, I., Perry, R. Y. Insecticides in agriculture and environment retrospects and prospects. Narosa Publishing House, New Dehil (1998): 61.
- Petersen, R., Larsen, T., Andersen, Z. O., Kildeby, L. N. Immobilization of Cutinase on Nanoparticles. Faculty of physics and nanotechnology, Aalborg University, Denmark, 21 December 2006.
- Piumetti, M., Bonelli, B., Massiani, P., Dzwigaj, S., Rossetti, I., Casale, S., Gaberova, L., Armandi, M., Garrone, E. Effect of vanadium dispersion and support properties on the catalytic activity of V-SBA-15 and V-MCF mesoporous materials prepared by direct synthesis. Catalysis Today 176 (2011): 458– 464.
- Pundir, S. C., and Chauhan, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination. Analytical Biochemistry (2012): 1-13.

- Qu, Y., Sun, Q., Xiao, F., Shi, G., Jin, L. Layer-by-layer self-assembled acetylcholinesterase /PAMAM–Au on CNTs modified electrode for sensing pesticides. Bioelectrochemistry 77 (2010): 139–144.
- Rebelo, L. P., Netto, C. G. C. M., Toma, H. E., Andrade L. H. Enzymatic Kinetic Resolution of (*RS*)-1-(Phenyl)ethanols by *Burkholderia cepacia* Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles. J. Braz. Chem. Soc., 21 (2010): 1538.
- Richards, R., Li, Z., Kubel, C., and Parvulescu. V.I. Size tunable gold nanorods evenly distributed in the channels of mesoporous silica. ACS Nano 2 (2008): 1205–1212.
- Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science 31 (2006): 603–632.
- Rombi, E., Cutrufello, M. G., Cannas, C., Casu, M., Gazzoli, D., Occhiuzzi, M., Monacia, R., Ferino, I. Modifications induced by pretreatments on Au/SBA-15 and their influence on the catalytic activity for low temperature CO oxidation. Phys. Chem. Chem. Phys 11 (2009): 593–602.
- Russo, P. A., Riberiro, M. M. L., Carrott, P. J. M. Trends in the condensation/evaporation and adsorption enthalpies of volatile organic compounds on mesoporous silica materials. Microporous and Mesoporous Materials 151 (2012): 223–230.
- Shulga, O., and Kirchoff, J. R., An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer, Electrochem. Commun 9 (2007): 935–940.
- Sobczak, I., Kusior, A., Grams, J., Ziolk, M. The role of chlorine in the generation of catalytic active species located in Au-containing MCM-41 materials. J. Catal 245 (2007): 259–266.
- Song, Y., Zhang, M., Wang, L., Wan, L., Xiao, X., Ye, S., Wang, J. A novel biosensor based on acetylcholinesterase/Prussian blue–chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides. Electrochim. Acta 56 (2011): 7267–7271.

- Sun X., and Wang, X. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides. Biosensors and Bioelectronics 25 (2010): 2611–2614.
- Su, Y., Liu, Y. M., Wang, L. C., Chen M., Cao, Y., Dai, W. L., He H. Y., Fan K. N. Tungsten-containing MCF silica as active and recyclable catalysts for liquid-phase oxidation of 1,3-butanediol to 4-hydroxy-2-butanone. Applied Catalysis A: General 315 (2006): 91–100.
- Takahashi, H. Super Enzyme - Enzyme Stabilization in Mesoporous Materials. R&D Review of Toyota CRDL 35, 4 (24 May 2000): 12.
- Thobhani, S., Attree, S., Boyd, R., Kumarswami, N., Noble, J. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. Journal of Immunological Methods 356 (2010): 60–69.
- Warren, S. C., and Wiesner, U. Self-assembled ordered mesoporous metals. Pure Appl. Chem. 81 (2009): 73–84.
- Wu, S., Lan, X., Zhao, W., Li, Y., Zhang, L., Wang, H., Han, M., Tao, S. Controlled immobilization of acetylcholinesterase on improved hydrophobic gold nanoparticle/Prussian blue modified surface for ultra-trace organophosphate pesticide detection, Biosens. Bioelectron 27 (2011) 82–87.
- Xu, L., Ye, Z., Cui, Q., Gu, Z., Mercier, L. Surface-initiated catalytic ethylene polymerization within nano-channels of ordered mesoporous silicas for synthesis of hybrid silica composites containing covalently tethered polyethylene. Polymer 52 (2011): 5961-5974.
- Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z., Lin, X. Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. Sensors and Actuators B 114 (2006): 774–780.
- Zhai, C., Sun, X., Zhao, W., Gong, Z., Wang, X. Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/ multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition. Biosensors and Bioelectronics 42 (2013): 124–130.

- Zhang, T., Liu, X. Y., Wang, A. Q., Yang, X. F., Mou, C. Y., Su, D. S., Li, J. Synthesis of thermally stable and highly active bimetallic Au-Ag nanoparticles on inert supports. Chem. Mater 21 (2009): 410–418.
- Zhao, L., Zhu, G. S., Zhang, D. L., Chen, Y., Qiu, S. L. A surface modification scheme for incorporation of nanocrystals in mesoporous silica matrix. J. Solid State Chem 178 (2005): 2980–2986.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ ก1 ตารางแสดงผลการทดลองหาปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง และไม่ถูกตรึง ของวัสดุตรึงต่างชนิดกันคือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS/AuNPs ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

| วัสดุตรึง | ความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง | | ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ถูกตรึง | |
|----------------|--|---------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| | | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | % | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | % |
| MCF | 0.5 | 0.323 | 64.60 | 0.177 | 35.40 |
| MCF/APTS | 0.5 | 0.307 | 61.40 | 0.193 | 38.60 |
| MCF/APTS/AuNPs | 0.5 | 0.259 | 51.80 | 0.241 | 48.20 |

ตารางที่ ก2 ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ 1 อีเลกโทรดของไบโอเซนเซอร์ ที่หาจากวิธีการคำนวณและวิธีของ Ellman's method ของวัสดุตรึงต่างชนิดกันคือ วัสดุ MCF วัสดุ MCF/APTS และวัสดุ MCF/APTS/AuNPs

| วัสดุตรึง | ความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง | | ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ถูกตรึง | |
|----------------|--|---------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| | | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | % | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | % |
| MCF | 0.5 | 0.323 | 64.60 | 0.177 | 35.40 |
| MCF/APTS | 0.5 | 0.307 | 61.40 | 0.193 | 38.60 |
| MCF/APTS/AuNPs | 0.5 | 0.259 | 51.80 | 0.241 | 48.20 |

ตารางที่ ก3 ผลของความเข้มข้นของอะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของเครื่องมือวัดไบโอเซนเซอร์ในระบบวัดที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9

| ความเข้มข้นของอะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ (มิลลิโมลลาร์) | การตอบสนองทางกระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์) | | | | สัมประสิทธิ์การกระจาย (% RSD) |
|--|--|------------|------------|--------|-------------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | |
| 1.5 | 1.35 | 1.38 | 1.51 | 1.41 | 0.34 |
| 5.0 | 2.44 | 2.41 | 2.43 | 2.43 | 0.01 |
| 10.0 | 3.03 | 3.02 | 3.07 | 3.04 | 0.10 |
| 15.0 | 3.48 | 3.88 | 3.67 | 3.68 | 0.73 |
| 20.0 | 4.22 | 3.50 | 3.54 | 3.75 | 2.91 |
| 40.0 | 4.34 | 3.99 | 4.41 | 4.25 | 0.79 |

ตารางที่ ก4 ผลของ pH ต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าของเครื่องมือวัดไบโอเซนเซอร์ในระบบวัด ที่ประกอบด้วยสารละลายของอะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลลาร์

| pH | การตอบสนองทางกระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์) | | | | สัมประสิทธิ์การกระจาย (% RSD) |
|------|--|------------|------------|--------|-------------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | |
| 6.0 | 0.44 | 0.38 | 0.26 | 0.36 | 1.61 |
| 7.4 | 3.57 | 4.05 | 3.49 | 3.70 | 1.65 |
| 9.0 | 3.75 | 4.34 | 4.38 | 4.16 | 2.00 |
| 10.0 | 0.73 | 0.73 | 0.81 | 0.76 | 0.16 |
| 11.0 | 0.11 | 0.13 | 0.15 | 0.13 | 0.23 |

ตารางที่ ก5 ผลของเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารฆ่าแมลง (Incubation time) ต่อเปอร์เซ็นต์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (% Incubation, %) ในระบบวัดที่ของสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์

| เวลา (นาที) | การตอบสนองทางกระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์) | | | | | | | | | | S.D. | % RSD |
|----------------|---|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|--------------|-------|----------|
| | ก่อน | หลัง | % I1 | ก่อน | หลัง | % I2 | ก่อน | หลัง | % I3 | % I (เฉลี่ย) | | |
| 1.0 | 4.66 | 4.19 | 10.09 | 4.52 | 4.06 | 10.18 | 4.60 | 4.11 | 10.65 | 10.31 | 0.061 | 0.598 |
| 5.0 | 4.66 | 2.79 | 40.13 | 4.31 | 2.53 | 41.30 | 4.41 | 2.53 | 42.63 | 41.35 | 1.045 | 2.525 |
| 10.0 | 4.47 | 1.83 | 59.06 | 4.57 | 1.85 | 59.52 | 4.40 | 1.84 | 58.18 | 58.92 | 0.308 | 0.522 |
| 15.0 | 4.82 | 1.91 | 60.37 | 4.65 | 1.7 | 63.44 | 4.97 | 1.93 | 61.17 | 61.66 | 1.690 | 2.741 |
| 20.0 | 4.30 | 1.70 | 60.47 | 4.42 | 1.84 | 58.37 | 4.69 | 1.84 | 60.77 | 59.87 | 1.136 | 1.897 |

ตารางที่ ก6 ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไธออน ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม และกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของการวัดในช่วงความเข้มข้น A) 1.0 ถึง 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร B) 200 ถึง 1600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

| ความเข้มข้นของเมทิลพาราไธออน (ng/ml) | Current response (μ A) | | % Inhibition 1 | Current response (μ A) | | % Inhibition 2 | Current response (μ A) | | % Inhibition 3 | % Inhibition เฉลี่ย | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) | สัมประสิทธิ์การกระจาย (% RSD) |
|--------------------------------------|-----------------------------|-------|----------------|-----------------------------|-------|----------------|-----------------------------|-------|----------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | Before | After | | Before | After | | Before | After | | | | |
| 1.00 | 7.69 | 7.65 | 0.52 | 6.59 | 6.56 | 0.46 | 7.28 | 7.25 | 0.41 | 0.46 | 0.002 | 0.44 |
| 5 | 5.87 | 5.81 | 1.02 | 5.72 | 5.65 | 1.22 | 5.77 | 5.69 | 1.39 | 1.21 | 0.023 | 1.89 |
| 50 | 6.96 | 6.57 | 5.60 | 6.44 | 6.10 | 5.28 | 6.56 | 6.20 | 5.49 | 5.46 | 0.018 | 0.32 |
| 100 | 8.13 | 7.18 | 11.69 | 5.58 | 4.97 | 10.93 | 6.66 | 5.90 | 11.41 | 11.34 | 0.098 | 0.87 |
| 200 | 7.18 | 5.88 | 18.11 | 7.34 | 5.90 | 19.62 | 7.37 | 5.99 | 18.72 | 18.82 | 0.385 | 2.04 |
| 400 | 6.77 | 4.93 | 27.18 | 6.66 | 4.82 | 27.63 | 6.66 | 4.83 | 27.48 | 27.43 | 0.035 | 0.13 |
| 800 | 7.28 | 4.46 | 38.74 | 7.28 | 4.45 | 38.87 | 8.39 | 5.17 | 38.38 | 38.66 | 0.043 | 0.11 |
| 1600 | 7.40 | 2.88 | 61.08 | 7.67 | 3.16 | 58.80 | 7.40 | 3.03 | 59.05 | 59.64 | 1.042 | 1.75 |
| 2000 | 7.71 | 3.07 | 60.18 | 8.43 | 3.22 | 61.80 | 8.14 | 3.12 | 61.67 | 61.22 | 0.540 | 0.88 |

ตารางที่ ก7 ผลการวัดสารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดเมทิล พาราไธออน ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไปโอเซนเซอร์ (SPCE/MCF/APTS/AuNPs/AChE/Chitosan) ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 1 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม

| ความ เข้มข้น ของเมโท มิล (ng/ml) | Current response (μ A) | | % Inhibition 1 | Current response (μ A) | | % Inhibition 2 | Current response (μ A) | | % Inhibition 3 | % Inhibition เฉลี่ย | ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน S.D. | สัมประสิทธิ์ การ กระจาย % RSD |
|--|--------------------------------|-------|----------------------|--------------------------------|-------|----------------------|--------------------------------|-------|----------------------|---------------------------|---------------------------------|--|
| | Before | After | | Before | After | | Before | After | | | | |
| 1 | 7.86 | 7.74 | 1.53 | 8.14 | 7.98 | 1.97 | 8.81 | 8.68 | 1.48 | 1.66 | 0.049 | 2.92 |
| 5 | 6.27 | 5.83 | 7.02 | 6.20 | 5.80 | 6.45 | 6.58 | 6.10 | 7.29 | 6.92 | 0.123 | 1.77 |
| 10 | 6.80 | 5.83 | 14.26 | 6.84 | 5.90 | 13.74 | 6.91 | 5.88 | 14.91 | 14.30 | 0.223 | 1.60 |
| 20 | 6.68 | 5.16 | 22.75 | 6.96 | 5.26 | 24.43 | 6.66 | 5.09 | 23.57 | 23.58 | 0.471 | 2.00 |
| 40 | 6.24 | 4.40 | 28.53 | 6.07 | 4.35 | 28.33 | 6.05 | 4.31 | 28.76 | 28.54 | 0.031 | 0.11 |
| 80 | 6.27 | 3.73 | 40.51 | 7.72 | 4.48 | 41.97 | 7.45 | 4.41 | 40.81 | 41.10 | 0.396 | 0.96 |
| 100 | 6.07 | 3.05 | 49.75 | 8.16 | 4.11 | 49.63 | 8.16 | 4.19 | 48.65 | 49.34 | 0.243 | 0.49 |
| 200 | 7.81 | 3.11 | 60.18 | 7.52 | 3.05 | 59.44 | 7.57 | 3.03 | 59.97 | 59.86 | 0.097 | 0.16 |
| 400 | 7.10 | 2.74 | 61.41 | 7.35 | 2.84 | 61.22 | 8.73 | 3.36 | 61.51 | 61.38 | 0.015 | 0.0236 |

ตารางที่ ก 8 ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/AChE/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส

| จำนวนวันที่ทำการเก็บรักษา | อิเล็กโทรดแบบ SPCE/AChE/Chitosan | | | | | | | | % การตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้า | |
|---------------------------|----------------------------------|------------|------------|--------|--------------------------|------------|------------|--------|-------------------------------|-------|
| | อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส | | | | อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส | | | | | |
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | 4 °C | 30 °C |
| 0 | 4.40 | 4.41 | 4.38 | 4.40 | 4.29 | 4.30 | 4.36 | 4.32 | 100 | 100 |
| 7 | 3.65 | 3.80 | 3.78 | 3.74 | 2.68 | 2.65 | 2.70 | 2.68 | 84.09 | 62.04 |
| 20 | 3.05 | 3.08 | 3.08 | 3.07 | 1.87 | 1.87 | 1.93 | 1.89 | 69.77 | 43.75 |

ตารางที่ ก 9 ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/MCF/AChE/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส

| จำนวนวันที่ทำการเก็บรักษา | อิเล็กโทรดแบบ SPCE/MCF/AChE/Chitosan | | | | | | | | % การตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้า | |
|---------------------------|--------------------------------------|------------|------------|--------|--------------------------|------------|------------|--------|-------------------------------|--------|
| | อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส | | | | อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส | | | | | |
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | 4 °C | 30 °C |
| 0 | 3.40 | 2.41 | 3.38 | 3.31 | 3.29 | 3.29 | 3.36 | 3.32 | 100.00 | 100.00 |
| 7 | 3.01 | 3.04 | 3.02 | 3.02 | 2.68 | 2.65 | 2.70 | 2.68 | 91.23 | 80.72 |
| 20 | 2.80 | 2.79 | 2.80 | 2.80 | 2.47 | 2.47 | 2.43 | 2.46 | 84.59 | 74.07 |

ตารางที่ ก 10 ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/MCF/APTS/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส

| จำนวนวันที่ทำการเก็บรักษา | อิเล็กโทรดแบบ SPCE/MCF/APTS/Chitosan | | | | | | | | % การตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้า | |
|---------------------------|--------------------------------------|------------|------------|--------|--------------------------|------------|------------|--------|-------------------------------|--------|
| | อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส | | | | อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส | | | | | |
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | 4 °C | 30 °C |
| 0 | 3.44 | 3.46 | 3.48 | 3.40 | 3.43 | 3.73 | 5.53 | 3.53 | 100.00 | 100.00 |
| 7 | 3.20 | 3.22 | 3.19 | 3.20 | 2.88 | 3.00 | 4.69 | 2.95 | 94.12 | 82.87 |
| 20 | 2.80 | 2.89 | 2.98 | 2.89 | 2.80 | 2.80 | 4.37 | 2.80 | 87.31 | 77.81 |

ตารางที่ ก 11 ผลของกระแสการตอบสนองทางไฟฟ้า (%) ของไบโอเซนเซอร์แบบ SPCE/MCF/APTS/AuNPs/Chitosan เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส

| จำนวนวันที่ทำการเก็บรักษา | อิเล็กโทรดแบบ SPCE/MCF/APTS/AuNPs/Chitosan | | | | | | | | % การตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้า | |
|---------------------------|--|------------|------------|--------|--------------------------|------------|------------|--------|-------------------------------|-------|
| | อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส | | | | อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส | | | | | |
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | 4 °C | 30 °C |
| 0 | 5.27 | 5.57 | 5.69 | 5.66 | 5.65 | 5.65 | 5.53 | 5.61 | 100 | 100 |
| 7 | 5.42 | 5.39 | 5.44 | 5.42 | 4.97 | 4.79 | 4.69 | 4.82 | 95.7 | 85.86 |
| 20 | 5.17 | 5.16 | 5.16 | 5.16 | 4.56 | 4.42 | 4.37 | 4.45 | 91.22 | 79.32 |

ตารางที่ ก 12 การตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลงชนิด MCF/APTS/AuNPs/AChE ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.8 โวลต์ ในระบบวัดสารละลายของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9 ที่ประกอบด้วย อะซิติกไทโอคลอรีน คลอไรด์ ความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ทำการผลิตซ้ำตามกระบวนการเดิม จำนวน 10 อิเล็กโทรด

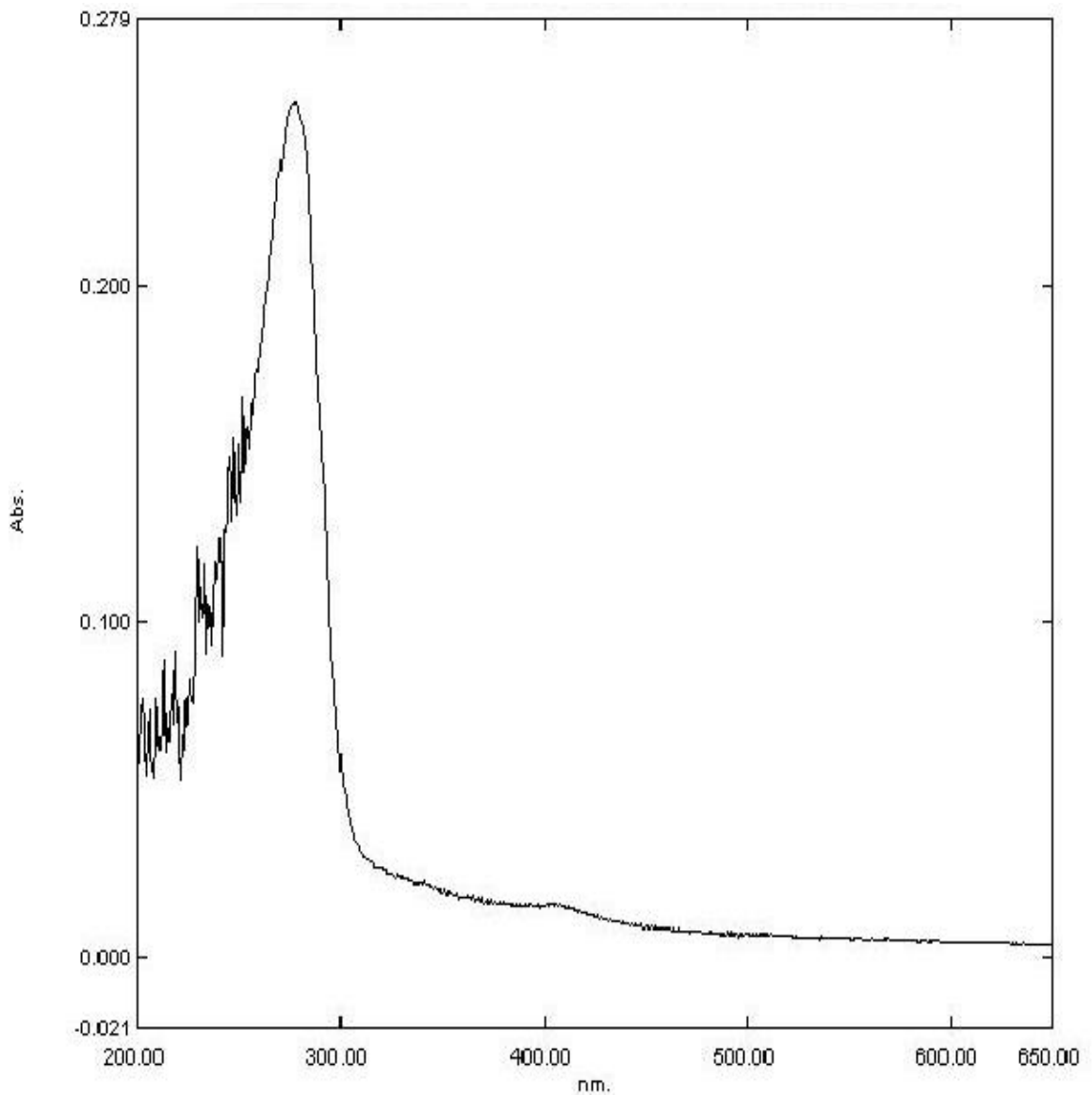
| อิเล็กโทรดดัดแปลง | กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนอง (ไมโครแอมแปร์) |
|----------------------------------|--|
| 1 | 7.69 |
| 2 | 5.87 |
| 3 | 6.96 |
| 4 | 7.71 |
| 5 | 7.18 |
| 6 | 6.77 |
| 7 | 7.28 |
| 8 | 7.40 |
| 9 | 7.10 |
| 10 | 7.35 |
| เฉลี่ย | 7.13 |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน S.D. | 0.25 |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ %RSD | 3.50 |

ภาคผนวก ข

การหาปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุตรึง

สูตรคำนวณ: ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง = ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น - ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึง

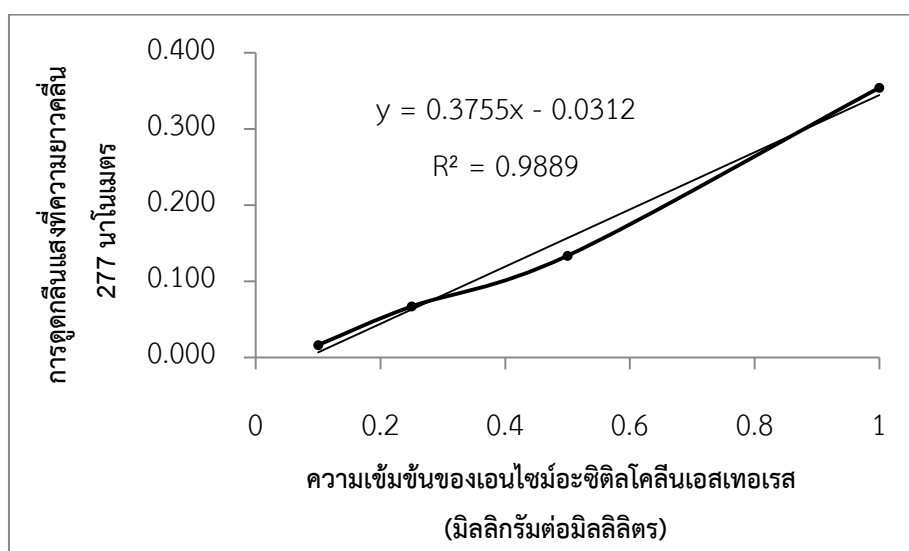
*** โดยปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึงสามารถเทียบหาได้จากกราฟมาตรฐาน (โดยเอนไซม์จะมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร ดังรูปที่ ข.1)



รูปที่ ข.1 การสแกนหาค่าความยาวคลื่นแสงที่เอนไซม์ AChE สามารถดูดซับได้

ตารางที่ ข.1 ข้อมูลของกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร

| ความเข้มข้นของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอร์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร | | | |
|---|---|------------|------------|--------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 1.00 | 0.356 | 0.346 | 0.360 | 0.354 |
| 0.50 | 0.126 | 0.135 | 0.139 | 0.133 |
| 0.25 | 0.069 | 0.062 | 0.069 | 0.067 |
| 0.10 | 0.020 | 0.015 | 0.013 | 0.016 |



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ซึ่งสามารถหาปริมาณเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึงได้โดยนำเอนไซม์ไปแช่ในวัสดุตรึงต่างชนิดกัน 3 ชนิดคือ MCF MCF/ATPS และ MCF/APTS/AuNPs เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระบบที่มีการกวนผสม จากนั้นนำมากรองเพื่อแยกเอาเอนไซม์ส่วนที่ไม่ถูกตรึง คือส่วนผ่านกระดาษกรองมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงนี้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานรูปที่ 2 เพื่อเปลี่ยนเป็นค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ ข.2

ตารางที่ ข.2 แสดงปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงในรูปพูนของวัสดุ MCF วัสดุ MCF/ATPS และวัสดุ MCF/ATPS/AuNPs

| วัสดุตรึง | การดูดกลืนแสง ของเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง ที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร | | | | ความ เข้มข้น เอนไซม์ เริ่มต้น (มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร) | ความเข้มข้นเอนไซม์ ที่ไม่ถูกตรึง | | ความเข้มข้นเอนไซม์ ที่ถูกตรึง | |
|----------------|--|---------------|---------------|--------|---|-------------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | | มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร | % | มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร | % |
| MCF | 0.090 | 0.088 | 0.092 | 0.090 | 0.5 | 0.323 | 64.60 | 0.177 | 35.40 |
| MCF/ATPS | 0.086 | 0.084 | 0.082 | 0.084 | 0.5 | 0.307 | 61.40 | 0.193 | 38.60 |
| MCF/ATPS/AuNPs | 0.065 | 0.068 | 0.064 | 0.066 | 0.5 | 0.259 | 51.80 | 0.241 | 48.20 |

ตัวอย่างการคำนวณ

จากสูตร

ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง = ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลาย - ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึง

ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลายที่เตรียมมีความเข้มข้น 0.5 mg/ml

ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึงซับในวัสดุ MCF เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร มีค่า

- ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ครั้งที่ 1: 0.090
- ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ครั้งที่ 2: 0.088
- ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ครั้งที่ 3: 0.092

ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึงมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย $(0.090 + 0.088 + 0.092)/3 = 0.090$

เทียบจากกราฟมาตรฐานที่ค่าการดูดกลืนแสง 0.090 จะมีความเข้มข้นของเอนไซม์: 0.323 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น

ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับ = ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลาย - ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกดูดซับ

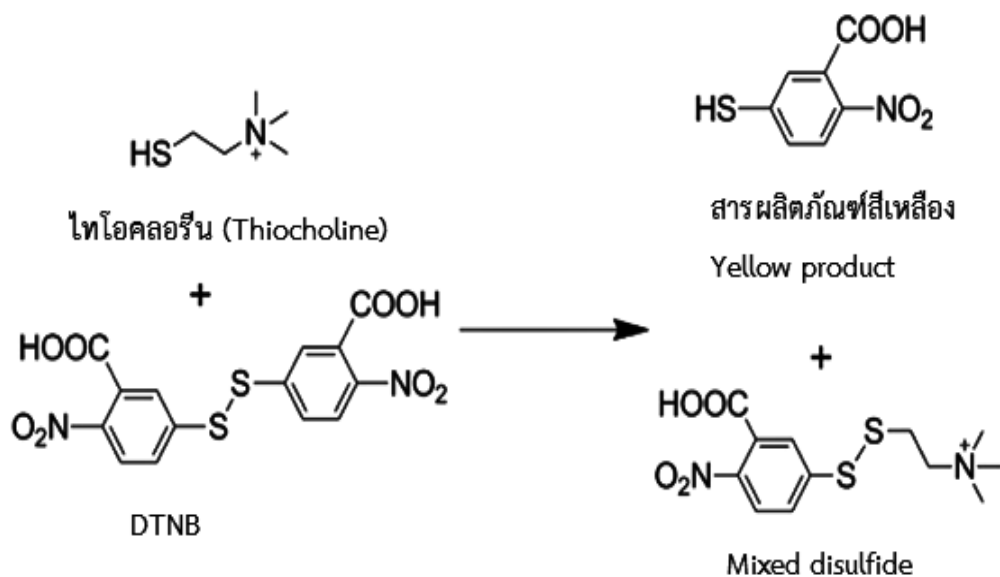
$$= 0.5 - 0.307 \quad \text{มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

$$= 0.177 \quad \text{มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 35.40\%)}$$

ภาคผนวก ค

การหากิจกรรมของเอนไซม์

การหากิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยวิธีของ Ellman's Method มีหลักการคือ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นคือ อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ (acetylthiocholine chloride) ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก และไทโอคลอรีน ซึ่งเราสามารถตรวจสอบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมเท่าไรได้โดยการนำสาร DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) มาทำปฏิกิริยากับสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้คือไทโอคลอรีน ซึ่งจะทำให้เกิดสารสีเหลืองที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (Milkani และคณะ, 2011) กลไกการเกิดสีแสดงดังรูปที่ ค1 โดยปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์กับความเข้มของสารสีเหลืองที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กันคือ ถ้าเอนไซม์มีกิจกรรมอยู่ในปริมาณมากมันจะสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นคือ อะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ แล้วทำให้เกิดสารไทโอคลอรีนได้ในปริมาณมาก เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสาร DTNB จะทำให้เกิดสารสีเหลืองเข้ม แต่ถ้ากิจกรรมของเอนไซม์มีอยู่ในปริมาณน้อยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นคือ ไทโอคลอรีนจะน้อยตามไปด้วย เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสาร DTNB จะให้สารที่มีสีเหลืองจาง ดังนั้นเมื่อความเข้มของสีเหลืองแตกต่างกันตามปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าที่แตกต่างกันด้วย

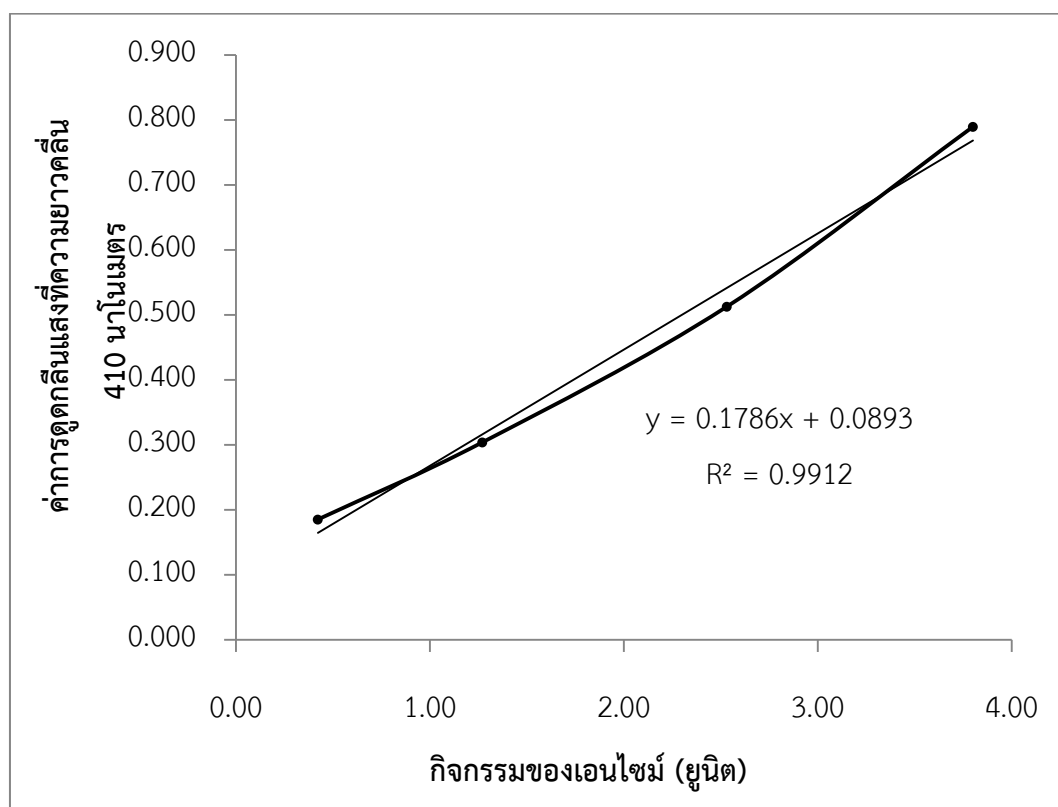


รูปที่ ค1 แสดงกลไกการเกิดสารสีเหลืองที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จากการทำปฏิกิริยาของสาร DTNB กับไทโอคลอรีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์

วิธีการทดลองเริ่มจากเตรียมเอนไซม์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองมีกิจกรรมเริ่มต้นที่ 844 หน่วยต่อมิลลิกรัม) แล้วนำมาหากิจกรรมที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ โดยทำปฏิกิริยากับสาร DTNB แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ตามวิธีของ Ellman's method สร้างเป็นกราฟมาตรฐานดังรูปที่ ค.2

ตารางที่ ค.1 ข้อมูลของกราฟมาตรฐานสำหรับเทียบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ปริมาณเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส | | | การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร | | | |
|------------------------------------|-----------|-------|---|------------|------------|--------|
| ไมโครลิตร | มิลลิกรัม | ยูนิต | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 0.0005 | 0.42 | 0.189 | 0.180 | 0.186 | 0.185 |
| 3 | 0.0015 | 1.27 | 0.303 | 0.301 | 0.307 | 0.304 |
| 6 | 0.0030 | 2.53 | 0.508 | 0.517 | 0.512 | 0.512 |
| 9 | 0.0045 | 3.80 | 0.789 | 0.786 | 0.793 | 0.789 |



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานการสำหรับเทียบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่างการคำนวณ

ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลายที่เตรียมมีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

*** แต่การทดลองนี้เทียบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ต่อ 1 อีเล็กโทรดของไปโอเซนเซอร์

การหากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นจากวิธี spectrophotometry

เนื่องจากวัสดุแต่ละชนิดมีความสามารถในการตรึงรูปเอนไซม์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ MCF MCF/ATPS และ MCF/ATPS/Au มีความสามารถในการตรึงรูปเอนไซม์ในปริมาณ 35.40% 38.60% และ 48.20% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณเอนไซม์จากเริ่มต้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 0.177 0.193 และ 0.241 มิลลิกรัมตามลำดับ ดังนั้นถ้าเราใช้แค่ปริมาณ 3 ไมโครลิตรก็จะมีปริมาณเอนไซม์อยู่ 0.531×10^{-3} 0.579×10^{-3} และ 0.723×10^{-3} มิลลิกรัมตามลำดับ เมื่อเอนไซม์ AChE มีกิจกรรมอยู่ 844 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ดังนั้นปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุ MCF MCF/APTS และ MCF/APTS/AuNPs ในปริมาตร 3 ไมโครลิตรก็จะมีปริมาณ 0.45 0.49 และ 0.61 ยูนิตตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมที่คำนวณได้จากวิธีนี้เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุที่ตรงที่สมมติให้ไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)

การหากิจกรรมของเอนไซม์หลังตรึงรูปจากวิธี Ellman's method

ในความเป็นจริงในกระบวนการของการตรึงรูปเอนไซม์ที่ต้องผ่านการกวนผสม หรือกรองเพื่อแยกเอนไซม์ ตรึงรูปออกจากส่วนที่ไม่ถูกตรึงรูป เอนไซม์จะเกิดการเสื่อมสภาพ ดังนั้นต้องใช้วิธี Ellman's method เพื่อตรวจสอบให้ทราบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุที่ตรงที่ยังคงเหลืออยู่หลังกระบวนการตรึงรูปมีปริมาณเท่าใด โดยวิธีคือ นำเอนไซม์ไปแช่ในวัสดุที่ตรงต่างชนิดกัน 3 ชนิดคือ MCF MCF/ATPS และ MCF/APTS/ AuNPs เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระบบที่มีการกวนผสม จากนั้นนำมากรองเพื่อแยกเอาเอนไซม์ส่วนที่ถูกตรึง ปริมาณ 3 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับอะซิติลไทโอโคลีน คลอไรด์ ในสารละลาย DTMB ซึ่งจะทำให้เกิดสีเหลืองเกิดขึ้น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงนี้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน รูปที่ ค.1 เพื่อเปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จะได้ผลแสดงดังตารางที่ ค.2 (กิจกรรมของเอนไซม์จริง)

ตารางที่ ค.2 กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงในรูปของวัสดุ MCF วัสดุ MCF/ATPS และวัสดุ MCF/ATPS/AuNPs

| วัสดุที่ตรง | การดูดกลืนแสง ของเอนไซม์ที่ถูกตรึง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร | | | | กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต) |
|----------------|---|------------|------------|--------|------------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | |
| MCF | 0.111 | 0.116 | 0.117 | 0.115 | 0.14 |
| MCF/ATPS | 0.130 | 0.127 | 0.131 | 0.129 | 0.22 |
| MCF/ATPS/AuNPs | 0.157 | 0.159 | 0.156 | 0.157 | 0.38 |

ตารางที่ ค.3 ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์จากวิธี Spectrophotometry เปรียบเทียบกับ
กิจกรรมของเอนไซม์จากวิธี Ellman's method

| วัสดุตั้ง | % เอนไซม์ ที่ถูกตรึง | กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป | | |
|----------------|-------------------------|--|---|--|
| | | กิจกรรมของเอนไซม์ เริ่มต้น ใช้วิธี spectrophotometry | กิจกรรมของ เอนไซม์จริง ใช้วิธี Ellman's method | ร้อยละของกิจกรรม ของเอนไซม์ที่ เหลืออยู่หลังการ ตรึงรูปเมื่อเทียบกับ กับสถานะเริ่มต้น (%) |
| MCF | 35.40 | 0.45 | 0.14 | 31.1 |
| MCF/ATPS | 38.60 | 0.49 | 0.22 | 44.9 |
| MCF/ATPS/AuNPs | 48.20 | 0.61 | 0.38 | 62.3 |

ดังนั้นเราสามารถหาปริมาณของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เทียบจากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นได้
ดังตาราง ค 3 ซึ่งจะพบว่า MCF/APTS/AuNPs มีกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นเหลืออยู่สูงสุดที่ 62.3
เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก จ
บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

Nattawat Surathin, Joongjai Panpranot, Chanchana Thanachayanont, Seeroong Prichanont “SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES/MESOCCELLULAR FOAM SILICA NANOCOMPOSITES USING ULTRASONIC IRRADIATION FOR BIOSENSOR APPLICATIONS”, Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 January 23-25, 2013 at The Tide Resort, Chonburi, Thailand.

PROCEEDINGS

PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL

CONFERENCE 2013 (PACCON2013)



January 23-25, 2013

Bangsaen Beach

THAILAND

SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES/MESOCELLULAR FOAM SILICA NANOCOMPOSITES USING ULTRASONIC IRRADIATION FOR BIOSENSOR APPLICATIONS

Nattawat Surathin¹, Joongjai Panpranot², Chanchana Thanachayanont³, Seeroong Prichanont^{1*}

¹ Chemical Engineering Research Unit for Value Adding of Bioresources, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Bangkok, 10330 Thailand

² Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Bangkok, 10330 Thailand

³ National metal and Materials Technology Center, 114 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Pathumthani, 12120 Thailand

* Author for correspondence; E-Mail: Seeroong.p@chula.ac.th, Tel. +66 22186860, Fax. +66 22 186877

Abstract: Mesocellular foam silica (MCF) is a porous material with unique properties such as large surface area, large pore volume, biocompatible, and modifiable surface. Gold nanoparticles (AuNPs) is conductive material commonly used in biosensors because of its good electron transfer and biocompatibility. Therefore, combination of two remarkable materials with immobilized enzyme for biosensor applications has high potential to improve sensor performances. The aim of this work was to study the synthesis of AuNPs/MCF nanocomposite for biosensor application. The experiments were divided into three parts. Firstly, MCF was synthesized using Pluronic 123 triblock copolymer (P123) as a template and tetraethyl orthosilicate (TEOS) as a silica source to give the MCF product with average pore diameters of 7.6 nm, surface area of 537.64 m²/g and pore volume 1.02 cm³/g. Secondly, The porous surface of modified MCF was refluxed in toluene solution at temperature of 100 °C using 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) to attach thiol functional group on porous surface of MCF for gold ion adsorption on MCF surface. Finally, gold nanoparticles were synthesized on MCF using ultrasonic hydrogen free radicals (H•) and hydroxyl free radicals (OH•) initiated by ultrasonic irradiation. These radicals acted as reducing equivalent converting Au³⁺ ion that prepared from chloroauric acid (HAuCl₄) to Au⁰ atom and AuNPs adhere on porous surfaces of MCF. AuNPs - MCF nanocomposite was used for enzyme immobilization. The existence of gold nanoparticles helps enhancing potentially the electron transfer for biosensor application.

Keywords Mesocellular foam silica; Gold nanoparticles; Ultrasonic irradiation; Biosensor

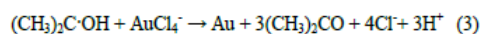
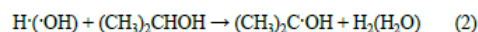
1. Introduction

Immobilization of enzymes has received significant attention due to its many advantages especially in enhancement of operational and storage stability of the enzymes. Various types of solid supports are used for enzyme immobilization such as zeolite, calcium carbonate, and mesoporous materials [1]. Among them, mesoporous silica materials have been proved to be effective for enzyme immobilization because of their high surface area, non-toxicity, and good biocompatibility [2].

Mesocellular foam silica (MCF) is a mesoporous silica materials with large surface area in the range of 500-1000 m²/g [3], and large pore volume 0.5-1.0 cm³/g [4] with surface functional group of silanol groups (Si-OH) [5]. Recently, MCF has been applied for immobilization of cholesteryl ester hydrolase (EC 3.1.1.13). The immobilized enzyme exhibited the ability to maintain its activity better than the free one [6]. Pandya et al. [7] also revealed that MCF is a promising material for immobilization of alpha-amylase due to its increased thermal stability, and tolerance towards pH and high substrate concentration. In addition, glucose oxidase was also found advantageously to be immobilized on the aminofunctionally modified surface of MCF since thermal stability and high catalytic activity for glucose oxidation could be achieved [8].

Although MCF has been reported as an excellent support for enzyme immobilization in terms of the ability to retain enzyme storage, and catalytic activity, the major drawback that bars MCF from its application in biosensors is its handicap in electron conduction. In order to overcome this problem, metal nanoparticles have been attached on the support surface for the enhancement of electron transfer [9]. Gold nanoparticles (AuNPs) are the most stable metal nanoparticles, of good electron conductivity, and high biocompatibility [10]. Fukuoaka et al. [11] synthesized AuNPs that embedded into mesoporous silica type MCM-41 with the pore diameter of 2.7 nm. Chen et al. [12] also successfully synthesized gold nanoparticles embedded into porous silica materials using ultrasonic irradiation technique, and found that the average diameter of AuNPs within the pores was 5.2 nm.

The principle of ultrasonic irradiation technique is applied in this paper to synthesize AuNPs on MCF. The ultrasonic wave causes the formation, growth and splitting of water bubbles into hydrogen radicals (H•), hydroxyl radicals (OH•), and the secondary reducing radical ((CH₃)₂C•OH) as described in equations (1) and (2). These radicals will act as reducing equivalents for the reduction of Au³⁺ ion from AuCl₄⁻ to Au⁰ atom. Subsequently, AuNPs will be adhered on porous surfaces of MCF as shown in equations (3) and (4).



In this paper, we present the synthesis and characterization of AuNPs/MCF nanocomposites using ultrasonic irradiation technique. AuNPs/MCF nanocomposites synthesized in this work will be further applied as a novel enzyme immobilization matrix for biosensor applications.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Hydrogen tetrachloroaurate (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), and Tetraethoxysilane (TEOS, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich. Pluronic P123 was procured from BASF. 1,3,5-Trimethylbenzene (TMB) was purchased from Suspelco. (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS) from Fluka. Hydrochloric acid from BHD laboratory supplies. Isopropanol 97%, and Toluene 97% were from Scitrader (Thailand). Deionized water was used in all experiments.

2.2 Syntheses of MCF

MCF was prepared by dissolving 2g of Pluronic P123 in 75 ml of 1.6 M HCl at 35-40 °C. Then 1 g of TMB was added, and mixed thoroughly by continuously constant stirring to homogeneity. Subsequently, 4.25 g of TEOS was added and the mixture was continuously stirred for 24 h at 40 °C. The mixing solution was then stirred at 120 °C for further 24 h. The occurred particles were then separated, washed with deionized water, and dried at ambient temperature of 30 °C. Residual water was removed from MCF by calcination at 500 °C for 6 h [13]. Pore sizes, surface area, and pore volumes of MCF were measured by N_2 -adsorption as described by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method using Micromeritics (ASAP 2020, USA). The synthesized MCF was also characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM).

2.3 Modification of MCF with aminopropyl groups

Modification of MCF was performed by dissolving 1g of MCF in 10 ml of toluene solution containing 1% APTS by stirring at ambient temperature for 10 minutes. The mixture was transferred into a Teflon bottle, then heated up to 100 °C and left under this condition for 24 h. Adsorption of APTS on the porous surface of MCF was expected to be occurred in this step. The modified MCF was thereafter filtered, washed once with dry toluene, and twice with dichloromethane before being dried at 120 °C for 2 h [13].

2.4 Synthesis of gold nanoparticles on modified MCF

1 g of the achieved modified MCF was immersed into 50 ml of an aqueous solution mixture of 0.8 mmol/l of chloroauric acid and 0.2 mol/l of isopropanol for 24 hr. The solution was subsequently purged with argon gas to eliminate the oxygen trace and then transferred to a tightly closed erlenmeyer flask. The flask was then placed onto a sonication bath (Crest ultrasonic, CP360, USA). An ultrasonic irradiation of 40 kHz (input power of 100 W) was applied for 120 min. The achieved nanocomposites were then filtered, and dried at 120 °C for 12 h [12].

3. Results and Discussion

Figure 1 shows the nitrogen adsorption-desorption isotherm which was used to investigate pore diameter, pore volume, and surface area of MCF by using Brunauer – Emmett - Teller (BET) method [14]. The results of structural properties of MCF are presented in Table 1.

Table 1: Physical characteristics of MCF.

| Characteristics | MCF |
|--|-------|
| Pore diameter (nm) | 7.6 |
| Pore volume (cm^3/g) | 1.02 |
| Surface area (m^2/g) | 537.6 |

The MCF sample shows the characteristics of type IV isotherm with type H2 hysteresis loop according to the IUPAC classification at the relative pressure ranging from 0.4 to 1.0. The obtained material was therefore postulated to contain interconnecting channels with narrower windows and wide sections like as a bottleneck [15]. The results were similar to those recently reported by Na et al. [16] for the MCF materials with various pore sizes (4-18 nm).

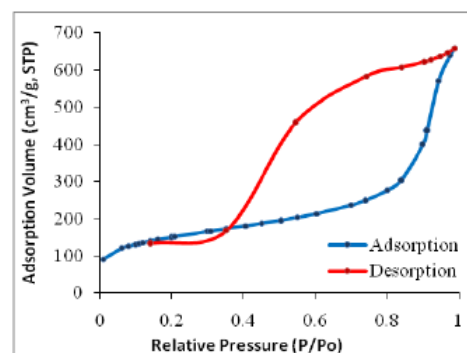


Fig. 1. Nitrogen adsorption – desorption isotherm of MCF.

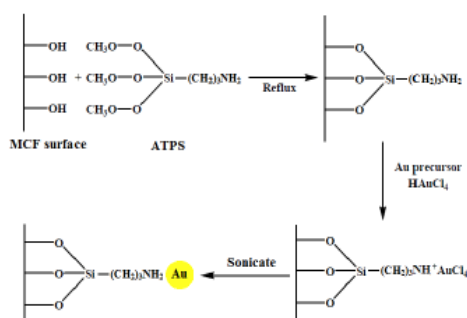


Fig. 2. Schematic diagram of the synthesized process of AuNPs/MCF nanocomposites by ultrasonication method.

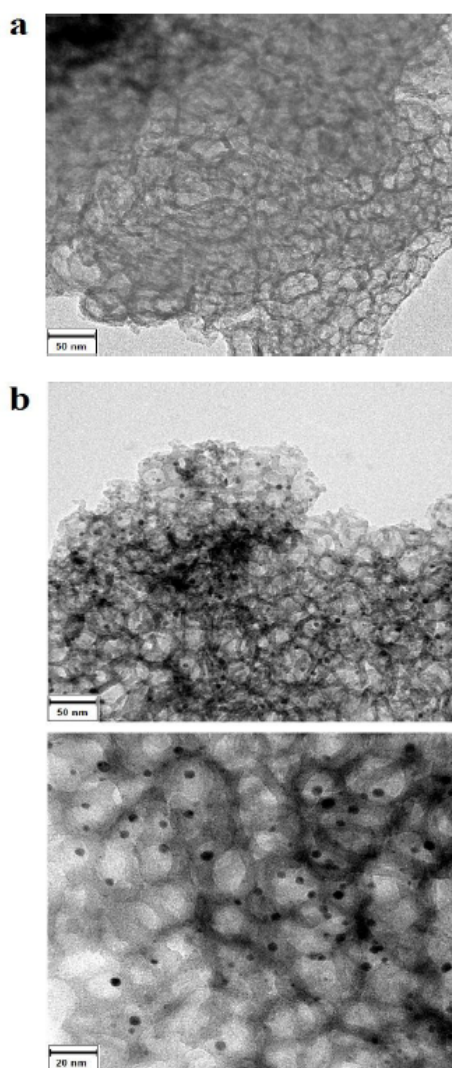


Fig. 3. TEM images of a) MCF b) AuNPs/MCF nanocomposites.

Figure 2 shows synthesizing step of AuNPs/MCF using ultrasonic irradiation technique. First, MCF was modified with APTS to attach a thiol functional group on its porous surface. Second, the modified MCF was immersed in hydrogen tetrachloroaurate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) which is a source of gold precursor generating AuCl_4^- ion that will be adsorbed on MCF surface. Finally, AuNPs were synthesized using ultrasonic irradiation with 40 kHz in isopropanol solution [12]. Free radicals that generated by the ultrasonic irradiation as described in equations (1) and (2) will reduce Au^{3+} ion to Au^0 atom, resulting in the adherence of AuNPs on porous surfaces of MCF.

Figure 3 shows TEM images of the synthesized MCF before and after adding gold nanoparticles. In Figure 3a shows cells of the framed structure which is the structural characteristics of MCF [16]. Mesostructure of MCF is favorable to be used for immobilization of enzyme since large spherical cells of 7.6 nm are big enough to accommodate the immobilized enzyme such as horseradish peroxidase and acetylcholinesterase with approximate size of 6.4x3.7 nm [13] and 4.5 x 6.0 x 6.5 nm [17], respectively. These two enzymes are targeted biosensors for detecting phenol and pesticide compounds. In addition, the structural narrow windows prevent the leaching of enzyme [16]. Figure 3b shows TEM images of MCF after AuNPs synthesis using ultrasonication with 40 kHz for 120 mins. AuNPs were found homogeneously distributed throughout the surface of MCF. The average size of gold nanoparticles was ≈ 5 nm which is consistent with the results of Chen et al. [12] that synthesized AuNPs on mesoporous silica type SiO_2 by using ultrasonication technique with AuNPs products of 5.2 nm in size. The results indicate that AuNPs attach at the edges of MCF pores structure.

4. Conclusions

AuNPs/MCF nanocomposites were successfully synthesized using ultrasonic irradiation. The based MCF were of the average pore diameter of 7.6 nm, pore volume 1.02 cm^3/g , and surface area 537.6 m^2/g . AuNPs of approximate particle diameter of 5 nm were found homogeneously attached at ultrasonic at the edges of MCF pore structure after 120 mins of ultrasonic irradiation. AuNPs/MCF nanocomposites will be further applied for enzyme immobilization for biosensor applications.

Acknowledgements

This work was supported by Integrated Innovation Academic Center : IIAC Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project.

Partially supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (FW0660I).

References

- [1] M. Indraneil, *Mesoporous Materials for Dental and Biotechnological applications, Curcumin Polymers and Enzymatic Saccharification of Biomass*, Licentiate Thesis, Drexel University, (2009).
- [2] H. Takahashi, R&D Review of Toyota CRDL 35 (2000) 12.
- [3] E.M. Johansson Samoson, *Controlling the pore size and morphology of mesoporous silica*, Licentiate Thesis, Linköping University, (2010).
- [4] K. Michal and J. Mieten, *Surface and structural properties of modified porous silicas*. Department of chemistry, Kent state University, Kent, Ohio (1998).
- [5] L.T. Zhuravlev, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspect*. 173 (2000) 1-38.
- [6] T. Orita, M. Tomita, T. Nishida, and K. kato, *Materials Science and Engineering*. 238 (2012) 718-724.
- [7] H.P. Pandya, V.R. Jasra, B.L. Newalkar, N.P. Bhatt, *Microporous and Mesoporous Materials*. 77 (2005) 67-77.
- [8] X. Zhang, R.F. Guan, D.Q. Wu, K.Y. Chan, *J. Mol. Cata, B:Enzym*. 33 (2005) 43.
- [9] J. Chen, Y. Miao, N. He, X. Wu, S. Li, *Biotechnology Advances*. 22 (2004) 505-518.
- [10] D.C. Marie and A. Didier, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293-346.
- [11] A. Fukuoka, H. Araki, Y. Sakamoto, N. Sugimoto, H. Tsukada, Y. Kumai, Y. Akimoto, M. Ichikawa, *Nano Lett.* 2002, 2, 793-795.
- [12] A. chen, W.P. Cai, C.H. Liang, and L.D. Zhang, *Materials Research Bulletin*. 36 (2001) 335-342.
- [13] C. Wilaiwan, *The immobilization of horseradish peroxidase on Ag/mesoporous silica nanocomposite*, Licentiate Thesis, Chulalongkorn University, (2008).
- [14] T. Hyeon, M. Fang, and K.S. Suslick, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5492.
- [15] C.B. James, *Surface Area and Porosity Determinations by Physisorption Measurements and Theory*, Elsevier. (2006) 5492. 28-49.
- [16] N. Wei, W. Qi, S. He, and N.R. Zuo, *J. Porous Mater.* (2012).
- [17] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* 253 (1991) 872-879.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐวัตร สุรทิน เกิดเมื่อวันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2532 ในจังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นมัธยมปลาย จากโรงเรียนรัตนธานีเบสร์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2550 หลังจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปี พ.ศ. 2554 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตร มหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2554