



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนาขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ดัดแปรด้วยกราฟีนสำหรับการตรวจ
วิเคราะห์ราพามัยซิน
Development of graphene modified screen-printed electrode
for determination of rapamycin

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐนิชา ทองเชื้อ

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ดัดแปรด้วยกราฟีน

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ราพามัยซิน

Development of graphene modified screen-printed electrode for
determination of rapamycin

โดย

นางสาวณัฐนิชา ทองเชื้อ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

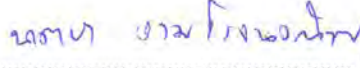
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

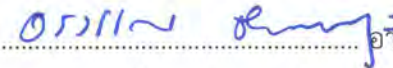
ปีการศึกษา 2559

โครงการ การพัฒนาข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ดัดแปรด้วยกราฟีนสำหรับการตรวจวิเคราะห์ราพามัยซิน
โดย นางสาวณัฐนิชา ทองเชื้อ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นัตยา งามโรจนวิชัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หม่อมหลวง ศิริพัศตร์ ไชยันต์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

Project Title Development of graphene modified screen-printed electrode
for determination of rapamycin

Student Name Miss Natnicha Thongchue Student ID 5633072623

Advisor Name Professor Orawon Chailapakul, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic
Year 2016

Abstract

This work describes the development of a graphene modified screen-printed carbon electrode (G/SPCE) for the determination of rapamycin. The electrochemical behaviors of both unmodified SPCE and G modified SPCE were investigated by cyclic voltammetry (CV) using standard ferri/ferrocyanide $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ solution. Interestingly, the G/SPCE can enhance the current response due to simple increase of the SPCE surface area. Moreover, our system can be used for quantitation of rapamycin by square-wave voltammetric method (SWV). The influences of experimental variables on the sensitivity of the proposed method, such as the effects of pH, type of electrolyte, organic to electrolyte ratio and interferences, were investigated. Under optimal conditions, the calibration curve of rapamycin was found in a range of 5 to 500 μM with a limit of detection ($S/N = 3$) of 2.72 μM and a limit of quantification ($S/N = 10$) of 9.05 μM . Finally, this novel electrochemical sensor was successfully applied for rapamycin evaluation in urine samples.

Keywords: Rapamycin, Graphene, Screen-Printed Electrode

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้
ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์
หม่อมหลวง ศิริพัศตร์ ไชยันต์ ที่สละเวลามาดูตรวจสอบแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มาก
ยิ่งขึ้น และให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบ

ขอขอบคุณ ดร. สุตเขต ไชโย นักวิจัยหลังปริญญาเอก ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความ
ช่วยเหลือ อีกทั้งยังให้กำลังใจตลอดในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกในหน่วยวิจัยเคมีไฟฟ้าและแสง (Electrochemistry and Optical
Spectroscopy Research Unit; EOSRU) ที่คอยให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ
ทางวิทยาศาสตร์ และการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่จะได้จากการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
1.4.1 เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า	2
1.4.1.1 ไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic Voltammetry; CV)	3
1.4.1.2 ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี (Differential-Pulse Voltammetry; DPV)	5
1.4.1.3 สแควร์เวฟโวลแทมเมตรี (Square-Wave Voltammetry; SWV)	6
1.4.2 เซลล์เคมีไฟฟ้าสำหรับหารวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี	8
1.4.3 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน	10
1.4.4 กราฟีน	10
1.4.5 ราพามัยซิน	11
1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
1.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนกราฟีน	12
1.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ราพามัยซิน	13

บทที่ 2 การทดลอง

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์	15
2.2 สารเคมี	15
2.3 ขั้นตอนการพิมพ์สกรีนชีวไฟฟ้า	16
2.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	17
2.4.1 สารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน (Britton-Robinson buffer solution; BRBS) ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 1.78 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร	17
2.4.2 สารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	18
2.4.3 สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต (Sodium perchlorate; NaClO ₄) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร	18
2.4.4 สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร	18
2.4.5 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 914 ไมโครลิตร	18
2.4.6 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	18
2.4.7 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	19
2.4.8 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	19
2.4.9 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH ต่าง ๆ ดังนี้ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 5.5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	19
2.4.10 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ดังนี้ 10:90, 40:60, 50:50, 60:40, และ 90:10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	19

2.4.11	สารละลายราพามัยซิน ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	20
2.4.12	สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (Potassium hexacyanoferrate (III); $K_3[Fe(CN)_6]$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต (Potassium nitrate; KNO_3) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	21
2.4.13	สารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร	21
2.4.14	สารละลายกรดยูริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร	21
2.4.15	สารละลายโดพามีนความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร	21
2.4.16	สารละลายกรดแอสคอร์บิก กรดยูริก และโดพามีนความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ใน เอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร	21
2.4.17	สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	22
2.4.18	สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	22
2.4.19	สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	22
2.5	การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน	23
2.5.1	การศึกษาชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งาน	23

2.5.2 การศึกษาชนิดสารละลายอิเล็กโทรไลต์	24
2.5.3 การศึกษา pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์	25
2.5.4 การศึกษาอัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์	26
2.5.5 การศึกษาชนิดของเทคนิค	26
2.6 การหาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน	28
2.6.1 ผลของ scan rate	28
2.6.2 การหาพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน	30
2.6.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง	31
2.6.4 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (Limit of quantification; LOQ)	32
2.6.5 ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ	32
2.6.6 ผลของตัวรบกวนต่าง ๆ	32
2.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างปัสสาวะ	33
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	35
3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน	35
3.1.1 ชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งาน	35
3.1.2 ลักษณะและสัณฐานพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน	36
3.1.3 ชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์	37
3.1.4 pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์	39
3.1.5 อัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์	41
3.1.6 ชนิดของเทคนิค	43
3.2 การหาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน	44
3.2.1 ผลของ scan rate	44
3.2.2 การหาพื้นที่ของขั้วไฟฟ้าใช้งาน	46
3.2.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง	50

3.2.4	ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (Limit of quantification; LOQ)	52
3.2.5	ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ	52
3.2.6	ผลของตัวรบกวนต่าง ๆ	53
3.2.7	การวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างจริง	54
บทที่ 4	สรุปผลการทดลอง	56
	เอกสารอ้างอิง	57
	ภาคผนวก	61
	ประวัติผู้วิจัย	66



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	20
2.2 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	20
2.3 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับ สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	22
2.4 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับ สารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	22
2.5 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับ สารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	23
2.6 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินด้วยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมตรี	23
2.7 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินด้วยเทคนิคดิฟเฟอเรน เชียลพัลส์โวลแทมเมตรี	27
2.8 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินด้วยเทคนิคสแควร์เวฟ โวลแทมเมตรี	27
2.9 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ราพามัยซินเพื่อศึกษาผลของ Scan rate ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี	29
2.10 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์ด้วยเทคนิค ไซคลิกโวลแทมเมตรี	30
2.11 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ในปัสสาวะ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร	33
3.1 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์ (n=10)	52
3.2 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ (n=10)	53
3.3 แสดงความเข้มข้น ค่าเฉลี่ย %Recovery และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของปริมาณราพามัยซินที่วิเคราะห์ได้ในปัสสาวะ	54
1ผ. แสดงค่าความแม่นยำที่ยอมรับได้	65
2ผ. แสดงค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้	65

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 เซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับโวลแทมเมตรี	3
1.2 สัญญาณศักย์ไฟฟ้าของไซคลิกโวลแทมเมตรี	4
1.3 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม	5
1.4 สัญญาณศักย์ไฟฟ้าของดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี	6
1.5 สัญญาณศักย์ไฟฟ้าของสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี	7
1.6 สแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมสำหรับการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ย้อนกลับได้ โดยเส้น A คือ กระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาไปข้างหน้า เส้น B คือ กระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาย้อนกลับ และเส้น C คือ กระแสไฟฟ้ารวม	7
1.7 ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง	9
1.8 ขั้วไฟฟ้าช่วย	9
1.9 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน	10
1.10 โครงสร้างของกราฟีน	11
1.11 โครงสร้างของราพามัยซิน	12
2.1 ลักษณะของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่เตรียมได้	17
3.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินบนขั้วไฟฟ้าใช้งานต่าง ๆ	35
3.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของอัตราส่วนกระแสไฟฟ้าราพามัยซินต่อสารละลายแบบลงค์	36
3.3 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 5000 เท่า ของ (ก) ขั้วไฟฟ้าคาร์บอน (ข) ขั้วไฟฟ้ากราฟีน	37
3.4 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ต่าง ๆ	38
3.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ราพามัยซินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ต่าง ๆ	38
3.6 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินใน 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตที่ pH ต่าง ๆ	39
3.7 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้า และค่าของศักย์ไฟฟ้าของการวิเคราะห์ราพามัยซินใน 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตที่ pH ต่าง ๆ	40
3.8 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินใน เอทานอล และ 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตที่อัตราส่วนต่าง ๆ	41

รูปที่	หน้า
3.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ร่าพามัยซินในสารละลาย อิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ ของเอทานอลต่อ 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอ เรต	42
3.10 ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมโมแกรม และสแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ ปริมาณร่าพามัยซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใน ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อ ร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4	43
3.11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ร่าพามัยซินด้วยเทคนิคต่าง ๆ	44
3.12 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณร่าพามัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ใน ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ที่มี Scan Rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 V/s	45
3.13 กราฟเชิงเส้นระหว่างรากที่สองของ Scan Rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ร่าพามัยซิน	45
3.14 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์ ความ เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอน ซึ่งมี Scan Rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 V/s	46
3.15 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์ ความ เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน ซึ่งมี Scan Rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 V/s	47
3.16 กราฟเชิงเส้นระหว่างรากที่สองของ Scan Rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอน	48
3.17 กราฟเชิงเส้นระหว่างรากที่สองของ Scan Rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์ที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน	48
3.18 สแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมของสารละลายร่าพามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ในร้อยละ 50 ของ เอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4	50
3.19 กราฟเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายร่าพามัยซินในร้อยละ 50 ของเอทา นอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 และ ค่าความสูงของพีคสัญญาณกระแสไฟฟ้า	51
3.20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ร่าพามัยซินและตัวรบกวน ต่าง ๆ	53

รูปที่

หน้า

- 1ผ. ไชคลิกโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 จำนวน 10 ครั้ง 61
- 2ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 61
- 3ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และ สารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 62
- 4ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และ สารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 62
- 5ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และ สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อ ร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 63
- 6ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของตัวอย่างที่ 1 ที่ไม่มี และมีสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 50, 250, และ 450 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียม เปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 63
- 7ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของตัวอย่างที่ 2 ที่ไม่มีและมีสารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 50, 250, และ 450 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลาย โซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 64
- 8ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของตัวอย่างที่ 3 ที่ไม่มีและมีสารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 50, 250, และ 450 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลาย โซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ราพามัยซิน (Rapamycin) เป็นยากดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressant) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ แต่ถ้าหากได้รับยาราพามัยซินในปริมาณที่มากเกินไป (150 มิลลิกรัม) จะส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะชั่วคราว (Atrial Fibrillation; AF)¹ อาจก่อให้เกิดอันตรายและนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ ดังนั้นวิธีทดสอบที่มีความไว ความจำเพาะ รวดเร็ว ง่ายต่อการใช้งาน และสามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างจริงได้ จึงมีความสำคัญและความจำเป็นอย่างมากสำหรับตรวจสอบ และติดตามปริมาณยาราพามัยซินในร่างกายของผู้ป่วยปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ

ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ทดสอบยาตัวนี้คือ ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับเครื่องตรวจวัดรังสีอัลตราไวโอเล็ต (High performance liquid chromatography-ultraviolet; HPLC-UV)^{2,3} ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับอิเล็กโตรสเปร์ย์ ไอออนไนเซชัน-แมสสเปกโตรเมตรี (High performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry; HPLC-ESI-MS)⁴ และไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับเครื่องตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (High performance liquid chromatography-electrochemical detector; HPLC-ECD)⁵ นอกจากนี้ยังสามารถใช้การทดสอบภูมิคุ้มกัน (Immunoassay)⁶ ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น ขั้นตอนในการวิเคราะห์ยุ่งยาก ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวัด ใช้สารตัวอย่างปริมาณมาก และเครื่องมือมีราคาแพง จากข้อจำกัดที่กล่าวมาข้างต้นนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาราพามัยซินให้เป็นวิธีที่ง่ายต่อการใช้งาน ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย และมีราคาถูก ดังนั้นเทคนิคที่ได้รับความสนใจในการพัฒนา คือ เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย วิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว ราคาถูก และขนาดเล็ก จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดยาราพามัยซินได้

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดจึงนำวัสดุขนาดนาโน (Nanomaterial) มาดัดแปรขั้วไฟฟ้า เช่น กราฟีน (Graphene; G), ท่อนาโนคาร์บอน (Carbonnanotube; CNT) และอนุภาคขนาดนาโน

ของโลหะ (Metal nanoparticles) ซึ่งกราฟีนได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการตัดแปรรูปไฟฟ้า เนื่องจากมีสมบัติที่ดี เช่น นำไฟฟ้าได้ดี มีพื้นที่ผิวมาก และมีความแข็งแรง เป็นต้น

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาวิธีการตรวจวัดราพามัยซินในยาด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยใช้ ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรรูปด้วยกราฟีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดให้มีความง่าย รวดเร็ว และราคาถูกลง และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดยารพามัยซินในตัวอย่างจริงได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. พัฒนาวิธีการตรวจวัดราพามัยซินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรรูปด้วยกราฟีน
2. นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรรูปด้วยกราฟีนที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดกับตัวอย่างจริง เช่น ปัสสาวะ เป็นต้น

1.3 ประโยชน์ที่จะได้จากการวิจัย

1. ได้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรรูปด้วยกราฟีนใช้วิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างจริง เช่น ปัสสาวะ เป็นต้น
2. ผู้วิจัยมีความเข้าใจ และประสบการณ์ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดราพามัยซินโดยใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรรูปด้วยกราฟีน อีกทั้งยังเรียนรู้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำงานวิจัย

1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า⁷

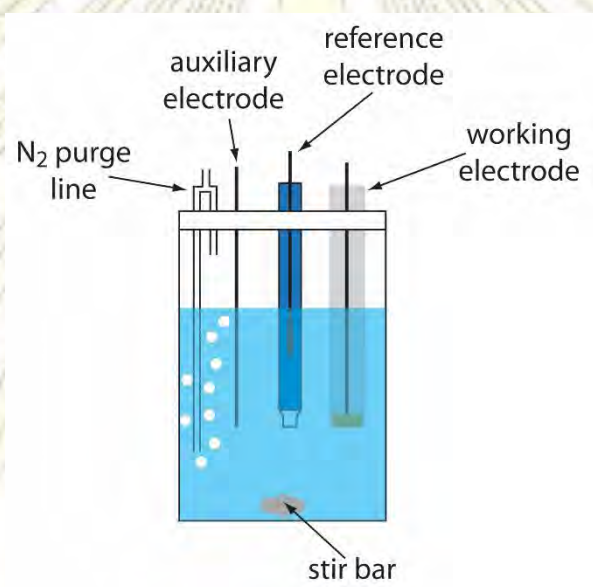
เทคนิคเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้าเป็นการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างไฟฟ้าและเคมี กล่าวคือ เป็นการวัดปริมาณไฟฟ้า เช่น กระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้า หรือประจุ และความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ทางเคมี การตรวจวัดทางไฟฟ้าสำหรับวัตถุประสงค์ทางการวิเคราะห์ถูกพบในการประยุกต์ใช้ได้ อย่างกว้างขวาง ประกอบด้วย การตรวจสอบทางสิ่งแวดล้อม ตรวจสอบคุณภาพอุตสาหกรรม และการวิเคราะห์ทางชีวการแพทย์

โดยการวัดทางเคมีอื่น ๆ จะศึกษาที่สารละลายทั้งหมด (Bulk solutions) แต่กระบวนการทางเคมีไฟฟ้าจะเกิดขึ้นที่ผิวสัมผัสของขั้วไฟฟ้าและสารละลาย ความแตกต่างระหว่างเทคนิคการวิเคราะห์ทางไฟฟ้า คือจะให้สัญญาณทางไฟฟ้าที่แตกต่างกันเพื่อหาปริมาณ โดยการวัดวิเคราะห์

เชิงไฟฟ้ามี 2 หลักการ คือ โปเทนซิโอเมตรี (Potentiometry) และโวลแทมเมตรี (Voltammetry)

(1.) โปเทนซิโอเมตรี (Potentiometry) คือ เทคนิคที่ไม่มีการเกิดกระแสไฟฟ้าที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า และเป็นการวัดศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

(2.) โวลแทมเมตรี (Voltammetry) คือ เทคนิคที่ศึกษาการถ่ายเทประจุ (Charge transfer) ที่เกิดขึ้นระหว่างผิวสัมผัสของขั้วไฟฟ้าและสารละลาย ซึ่งจะเกิดกระแสไฟฟ้า โดยเทคนิคนี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อตรวจวัดสารเคมีที่เป็นสารที่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้ (Electroactive species) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ หรือปฏิกิริยารีดักชัน – ออกซิเดชัน

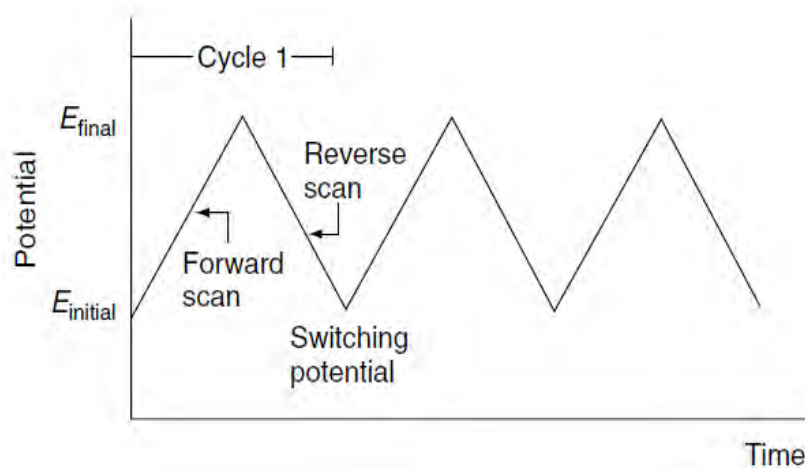


รูปที่ 1.1 เซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับโวลแทมเมตรี⁸

1.4.1.1 ไชคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic Voltammetry; CV)

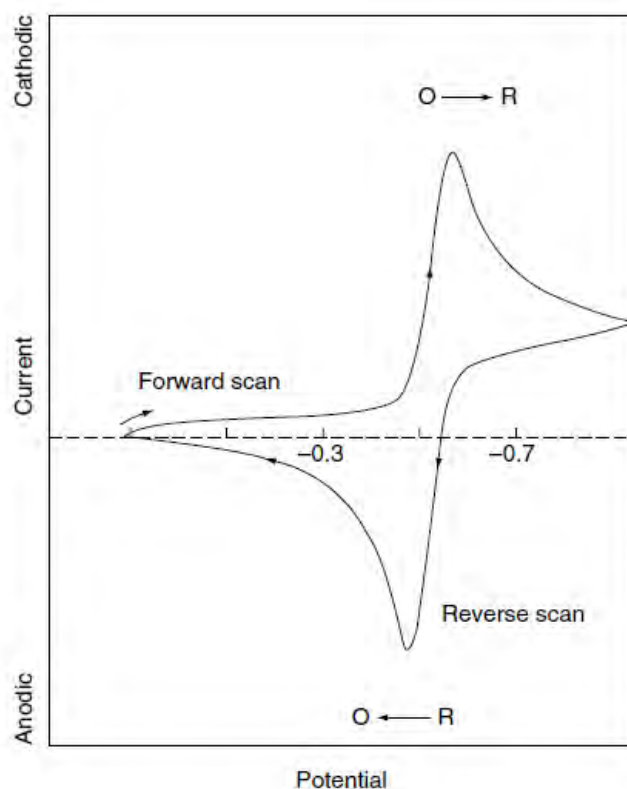
ไชคลิกโวลแทมเมตรี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสาร อีกทั้งยังให้ข้อมูลเกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกส์ของปฏิกิริยารีดอกซ์ และอัตราเร็วของปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน เทคนิคนี้มักเป็นการทดลองแรกในการศึกษาเชิงไฟฟ้า เนื่องจากเทคนิคนี้จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับศักย์ไฟฟารีดอกซ์ของสารที่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้ (Electroactive species) และผลของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในปฏิกิริยารีดอกซ์

ไซคลิกโวลแทมเมตรี เป็นการกวาดศักย์ไฟฟ้าแบบเส้นตรงที่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน โดยจะต้องไม่คนสารละลาย และสัญญาณศักย์ไฟฟ้าที่ได้เป็นรูปสามเหลี่ยม ดังแสดงในรูปที่ 1.2 ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการกวาดศักย์ไฟฟ้า ขณะที่กวาดศักย์ไฟฟ้า จะวัดกระแสไฟฟ้าจากการให้ศักย์ไฟฟ้า โดยจะเริ่มต้นที่ E_{initial} (ศักย์เริ่มต้น) กวาดศักย์ไปถึง E_{final} (ศักย์สุดท้าย) คือ การกวาดศักย์ไปข้าง (Forward scan) จากนั้นทำการกลับศักย์ไฟฟ้า (Switching potential) เพื่อให้เกิดการกวาดศักย์ย้อนกลับ (Reverse scan) ไปยังศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น เมื่อรวมกันของกวาดศักย์ไปข้างหน้ากับศักย์ย้อนกลับ คือ 1 วงจร โดยผลที่ได้จากกระแสไฟฟ้าและศักย์ไฟฟ้า คือไซคลิกโวลแทมโแกรม



รูปที่ 1.2 สัญญาณศักย์ไฟฟ้าของไซคลิกโวลแทมเมตรี

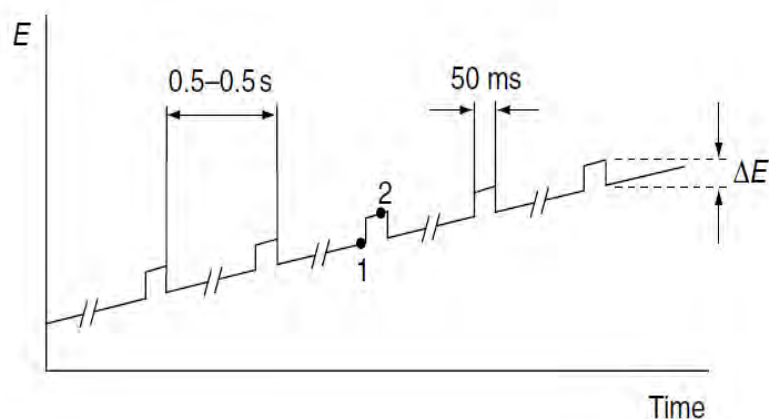
จากไซคลิกโวลแทมโแกรม ดังรูปที่ 1.3 เป็นผลของปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ย้อนกลับได้จากการกวาดศักย์ไฟฟ้าเพียงหนึ่งรอบ โดยเริ่มจากการกวาดศักย์ไฟฟ้าไปทางด้านลบ (Forward scan) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันก่อน คือ สาร O จะเป็นเกิดสาร R ซึ่งช่วงแรกจนกระทั่งศักย์ไฟฟ้ามีค่าใกล้กับศักย์ไฟฟ้ามาตรฐานของสารจะเกิดพีคกระแสไฟฟ้า เรียกว่า Cathodic peak จากนั้น Sweep potential กลับ ทำให้ทิศทางการกวาดศักย์ไฟฟ้าไปทางด้านบวก (Reverse scan) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เปลี่ยนจากสาร R เป็นสาร O จะได้พีคกระแสไฟฟ้าที่เป็น Anodic peak



รูปที่ 1.3 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรม

1.4.1.2 ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี (Differential-Pulse Voltammetry; DPV)

ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี เป็นเทคนิคที่จะกระตุ้นสัญญาณแบบพัลส์ หรือเพิ่มศักย์ไฟฟ้าคงที่ให้กับขั้วไฟฟ้าใช้งาน ซึ่งรับศักย์ไฟฟ้าปกติแบบลิเนียร์สแกนอยู่แล้ว โดยจะทำให้ฐานของแต่ละพัลส์จะเรียบและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรง แต่ส่วนของศักย์ที่เพิ่มขึ้น ขณะที่กระแสไฟฟ้าคงที่นั้น คือ พัลส์ และเกิดการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ โดยจะเกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้น ๆ ก่อนที่หยุดของปรอทจะหลุดจากปลายหลอดรูเล็ก ๆ และกระแสไฟฟ้าจะถูกวัด 2 ครั้งต่อ 1 หยุดปรอท คือ วัดครั้งแรก ก่อนการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าในแต่ละพัลส์ ที่ 1 และครั้งที่สองหลังจากครั้งแรกประมาณ 40 มิลลิวินาที ก่อนจะสิ้นสุดแต่ละพัลส์ ที่ 2 ซึ่งจะได้ค่าของผลต่างกระแสไฟฟ้าที่วัดได้จาก ($\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$) และจะได้สัญญาณศักย์ไฟฟ้า ดังรูปที่ 1.4

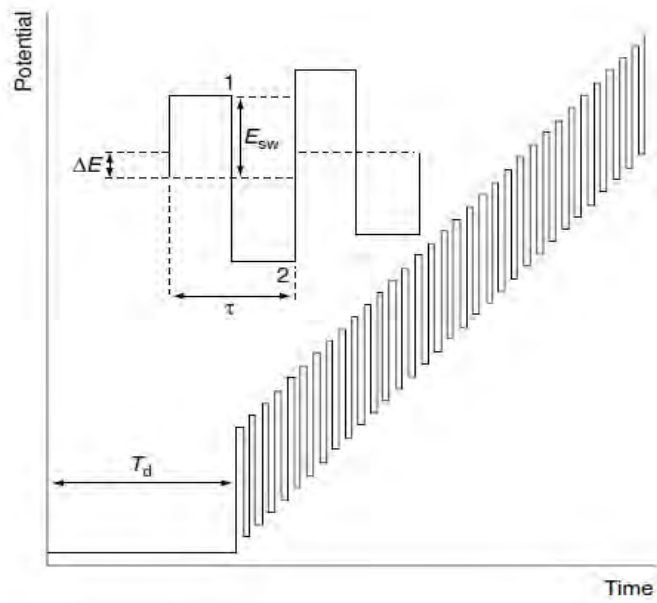


รูปที่ 1.4 สัญญาณศักย์ไฟฟ้าของดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี

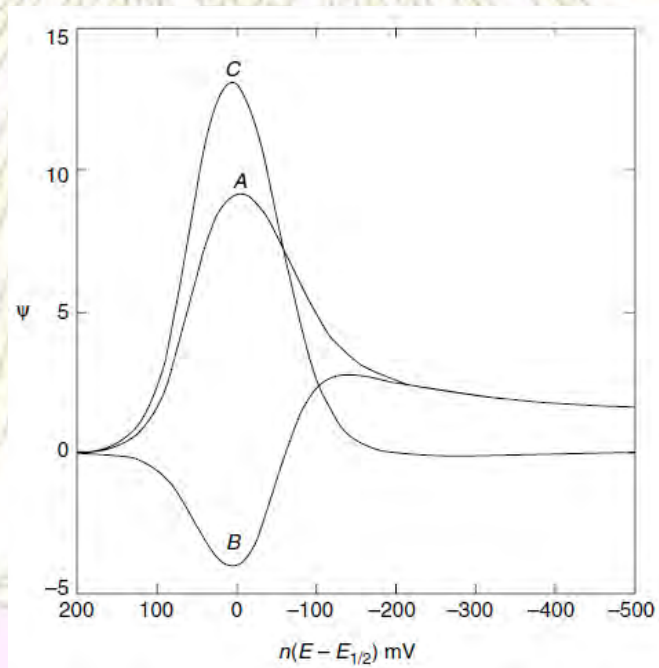
1.4.1.3 สแควร์เวฟโวลแทมเมตรี (Square-Wave Voltammetry; SWV)

สแควร์เวฟโวลแทมเมตรี เป็นเทคนิคหนึ่งของพัลส์โวลแทมเมตรี ซึ่งเทคนิคนี้จะให้สัญญาณ (ศักย์ไฟฟ้า) กระตุ้นกับชั่วไฟฟ้าในช่วงเวลาสั้น ๆ โดยจะต่างจากดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี คือให้สัญญาณกระตุ้นกับชั่วไฟฟ้าเป็นช่วง ๆ วิเคราะห์เสร็จสิ้นภายในหยุดปรอทหนึ่งหยุด มี scan rate ที่เร็ว และให้ค่า sensitivity ที่สูงกว่าอีกด้วย

สแควร์เวฟโวลแทมเมตรี เป็นเทคนิคที่มีรูปแบบคลื่นที่ประกอบด้วยคลื่นสี่เหลี่ยม สมมาตรถูกวางทับบนบันได ศักย์ไฟฟ้าจะให้กับชั่วไฟฟ้าใช้งาน และกระแสไฟฟ้าจะวัดสองครั้ง คือที่จุดสุดท้ายของการให้ศักย์ไปข้างหน้า (Forward pulse) ที่ t_1 และอีกครั้งที่จุดสุดท้ายของการให้ศักย์ย้อนกลับ (Reverse pulse) ที่ t_2 ดังรูปที่ 1.5 ซึ่งจะได้รูปคลื่นที่มีขนาดใหญ่ ศักย์ไฟฟ้าย้อนหลังทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของผลิตภัณฑ์ ความแตกต่างระหว่างการวัดทั้งสองจะถูกสร้างเป็นขั้นบันได ซึ่งผลของรูปร่างพีคโวลแทมโมแกรมจะสมมาตรและสอดคล้องกับครึ่งหนึ่งของศักย์ไฟฟ้า และกระแสไฟฟ้าจะเป็นสัดส่วนของความเข้มข้น ได้โวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.5 สัญญาณศักย์ไฟฟ้าของสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี



รูปที่ 1.6 สแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมสำหรับการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ย้อนกลับได้ โดยเส้น A คือกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาไปข้างหน้า เส้น B คือ กระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาย้อนกลับ และเส้น C คือ กระแสไฟฟ้ารวม

1.4.2 เซลล์เคมีไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี

เซลล์เคมีไฟฟ้า สามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ

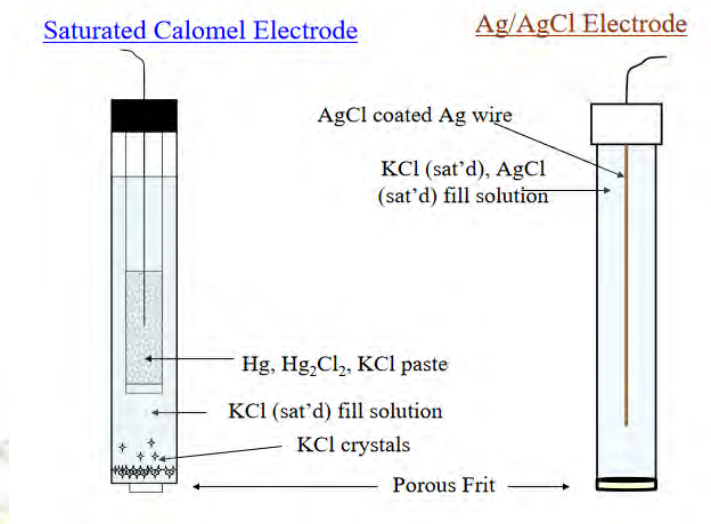
1. เซลล์กัลวานิก (Galvanic cell) คือเซลล์เคมีไฟฟ้าที่เปลี่ยนพลังงานเคมีเป็นพลังงานไฟฟ้า ซึ่งเกิดปฏิกิริยากันระหว่างสารเคมีในเซลล์ และสามารถเกิดขึ้นได้เอง
2. เซลล์อิเล็กโทรไลต์ (Electrolytic cell) คือเซลล์ไฟฟ้าที่ต้องให้ศักย์ไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานภายนอก เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ ซึ่งจะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ชนิด ได้แก่

ขั้วไฟฟ้าใช้งาน

ขั้วไฟฟ้าใช้งาน เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของเซลล์เคมีไฟฟ้า ผิวสัมผัส (Interface) ระหว่าง ขั้วไฟฟ้าใช้งานและสารละลาย คือพื้นที่เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอน การเลือกใช้วัสดุสำหรับขั้วไฟฟ้าใช้งานมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ ซึ่งวัสดุเหล่านั้นควรมีพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารที่จะวิเคราะห์ ว่องไว เสถียร มีความแม่นยำและความเที่ยง และมีช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้งานได้กว้าง (Potential window) อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงราคา ความแข็งแรง และความปลอดภัย

ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง เป็นขั้วไฟฟ้าที่มีความเสถียรและมีศักย์ไฟฟ้าคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่ขึ้นกับส่วนประกอบของสารที่จะวิเคราะห์ เนื่องจากทำหน้าที่อ้างอิงศักย์ไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าใช้งาน โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าใช้งานและเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงจะเป็นการตรวจวัดกระแสไฟฟ้าของสารที่จะวิเคราะห์ เช่น ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าคาโลเมล เป็นต้น



รูปที่ 1.7 ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง⁹

ขั้วไฟฟ้าช่วย

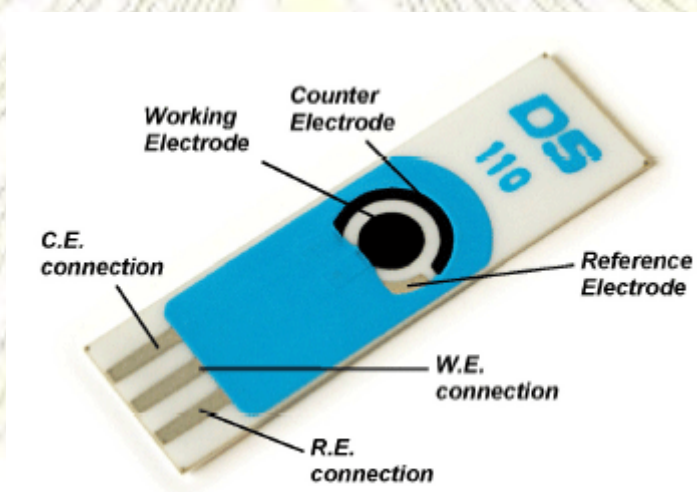
ขั้วไฟฟ้าช่วย ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในการถ่ายเทอิเล็กตรอน หรือกระแสจากขั้วไฟฟ้าใช้งาน เพื่อให้ครบวงจรไฟฟ้า ปฏิกิริยาครั้งที่ขั้วไฟฟ้าช่วยต้องไม่เปลี่ยนแปลง และรบกวนปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง ขั้วไฟฟ้าช่วยควรมีพื้นที่ผิวมาก เพื่อการนำไฟฟ้าที่ดี เช่น ขั้วไฟฟ้าแพลตตินัม และขั้วไฟฟ้าคาร์บอน



รูปที่ 1.8 ขั้วไฟฟ้าช่วย¹⁰

1.4.3 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน¹¹

ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน เป็นขั้วไฟฟ้าที่แบนราบบนวัสดุต่าง ๆ เช่น พลาสติก กระจก กระดาษ และ เซรามิก เป็นต้น ที่ถูกพิมพ์ด้วยหมึกหลากหลายชนิด เพื่อที่จะทำเป็นรับสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก คือ หมึกคาร์บอน หมึกของโลหะต่าง ๆ เช่น ทอง แพลตตินัม และเงิน ข้อดีของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่โดดเด่น คือ เตรียมง่าย พกพาได้ ราคาไม่แพงมาก และตรวจวัดได้ถูกต้อง เป็นต้น ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่สะดวก เนื่องจากขั้วไฟฟ้าทั้งสามประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าช่วยอยู่ในชิ้นเดียวกัน และที่สำคัญอย่างยิ่งของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน สามารถใช้แล้วทิ้งได้ ดังนั้น ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนจึงมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น เป็นตัวตรวจวัดทางสิ่งแวดล้อม วิจัยทางการแพทย์ซึ่งต้องการความสะดวก และงานวิจัยทางเคมี เป็นต้น

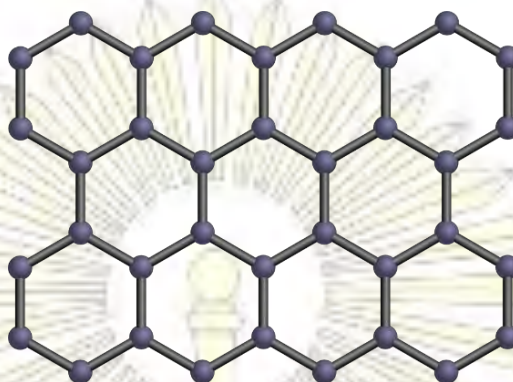


รูปที่ 1.9 ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน¹²

1.4.4 กราฟีน¹³

กราฟีนเป็นวัสดุคาร์บอนนาโนที่จัดเรียงตัวในระนาบสองมิติของอะตอมคาร์บอน และอะตอมคาร์บอนต่อกันในลักษณะรูปหกเหลี่ยม (Hexagonal) พันระและการจัดเรียงอิเล็กทรอนิกส์เป็นสาเหตุที่ทำให้กราฟีนมีสมบัติที่โดดเด่น คือ ค่าพื้นที่ผิว 2630 ตารางเมตร/กรัม ซึ่งเป็นสองเท่าของท่อคาร์บอนนาโนที่มีผนังเดี่ยว (Single-walled carbon nanotubes; SWCNT) มีความแข็งแรงเชิงกลสูงกว่าเหล็กเป็น 200 เท่า มีความยืดหยุ่นสูง และการนำไฟฟ้าได้ดีของกราฟีน เกิดขึ้นจากคาร์บอนแต่ละอะตอมที่อยู่ระนาบของกราฟีนมีไฮบริดเซชันเป็นแบบ sp^2 ซึ่งจะมีออร์บิทัลของ p เหลืออยู่ของแต่ละอะตอม

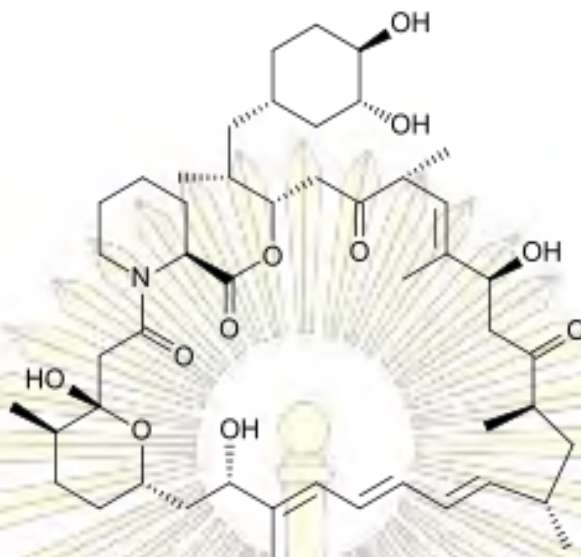
และถ้ามีหลายออร์บิทัลของหลายอะตอมอยู่ในระนาบเดียวกัน ก็จะทำให้อิเล็กตรอนเคลื่อนที่แบบคอนจุกเกตได้ ซึ่งจะเกิดการนำไฟฟ้าได้ดี



รูปที่ 1.10 โครงสร้างของกราไฟท์

1.4.5 ราพามัยซิน

ราพามัยซิน (Rapamycin) คือ ยาปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ (Macrolide) ที่กำเนิดมาจากแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซิส ไฮโกรสโคปิคัส (*Streptomyces hygroscopicus*)¹⁴ ซึ่งเดิมเคยใช้เป็นยาต้านเชื้อรา แต่ต่อมายาชนิดนี้ได้มีการพัฒนาเป็นยากดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressant)¹⁵ และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ รวมไปถึงสามารถใช้ในการรักษา มะเร็งได้¹⁶ เพราะยาชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งปากมดลูก¹⁷ มะเร็งเต้านม¹⁸ มะเร็งปอด¹⁹ และมะเร็งลำไส้²⁰ เป็นต้น ส่วนการใช้เป็นยากดภูมิคุ้มกันนั้นเนื่องจากมีคุณสมบัติในการป้องกันความไม่เข้ากันของการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อในสปีชีส์เดียวกัน และยังสามารถรักษาโรคต่อต้านภูมิตัวเองได้อีกด้วย²¹ ซึ่งกลไกการทำงานของตัวยารูปามัยซินคือ ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซีรีน/ทรีโอนีน ไคเนส (Serine/Threonine kinase) ส่งผลให้ไม่เกิดการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดทีเซลล์ (T lymphocyte) เนื่องจากไซโตไคน์ (Cytokine) ที่ไปกระตุ้นเม็ดเลือดขาวถูกยับยั้ง^{22,23} และยานี้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี (26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)²⁴



รูปที่ 1.11 โครงสร้างของราพามัยซิน

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนกราฟีน

ในปี 2012 Ping และคณะ²⁵ ตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก โดพามีน และกรดยูริกในคราวเดียวกัน โดยใช้ชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนกราฟีนที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งมีช่วงศักย์ไฟฟ้าที่กว้าง กระแสไฟฟ้าพื้นหลังที่ต่ำ และมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่เร็ว และงานวิจัยนี้ทดลองด้วยเทคนิคฟิสิกส์ เรนเซียลพัลส์โวลแทมเมตรี พบว่ามีความเป็นเส้นตรงของกรดแอสคอร์บิก โดพามีน และกรดยูริกในช่วง 4.0-4,500, 0.5-2,000 และ 0.8-2,500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก โดพามีน และกรดยูริก เท่ากับ 0.95, 0.12 และ 0.20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ อีกทั้งชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนกราฟีนยังให้ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ เสถียรกับสปีชีส์ที่จะตรวจวัด ความไว และความจำเพาะ ที่สำคัญงานวิจัยนี้ยังสามารถตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิดได้ในคราวเดียวกันได้จริงในสารตัวอย่างทางชีวภาพ

ในปี 2014 Antiochia และ Gorton²⁶ ได้ดัดแปรชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนกราฟีนด้วยพอลิเมอร์ ออสเมียม สำหรับตรวจวัดฟรุกโตส โดยงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่พัฒนาเซนเซอร์ทางชีวภาพ สำหรับตรวจวัดฟรุกโตสบนชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนกราฟีน พบว่า สามารถตรวจวัดฟรุกโตสในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.1-8 มิลลิโมลาร์ และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดฟรุกโตสอยู่ที่ 0.8

ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีความไวในการตรวจวัดฟลูออโรสโตนสูง เท่ากับ 2.15 ไมโครแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรและมิลลิโมลาร์ ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำที่ดี (%RSD เท่ากับ 1.9%) ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว (3 วินาที) และเสถียรใน 2 เดือน เมื่อเก็บในตู้แช่แข็ง อีกทั้งยังทดสอบกับตัวอย่างอาหาร และเปรียบเทียบกับชุดวัดเอนไซม์สเปกโตรโฟโตเมตริกทางการค้า

1.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ราพามัยซิน

ในปี 2000 Jones และคณะ²⁷ ศึกษาประสิทธิภาพของการทดสอบภูมิคุ้มกันด้วยเอนไซม์ไมโครพาร์ติเคิล (microparticle enzyme immunoassay; MEIA) และเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC/MS/MS และ HPLC-UV เพื่อวัดปริมาณราพามัยซินในเลือด พบว่า สามารถตรวจวัดราพามัยซินในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0 – 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถสรุปได้ว่า การทดสอบนี้ให้ค่าความแม่นยำเหมาะสมในทางการแพทย์

ในปี 2009 Mochizuki และคณะ⁵ ได้ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของยารพามัยซินในเลือด โดยใช้เทคนิค reversed-phase high performance liquid chromatography-electrochemical detector (HPLC-ECD) ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดราพามัยซินในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยงานวิจัยนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาด้วยยารพามัยซินในการปลูกถ่ายอวัยวะ

ในปี 2009 Bouzas และคณะ²⁸ ตรวจวัดความเข้มข้นของราพามัยซินในเลือดในผู้ป่วยที่ผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายตับและไต โดยใช้ Innofluor fluorescence polarization immunoassay (Innofluor FPIA) เปรียบเทียบกับการทดสอบภูมิคุ้มกันด้วยเอนไซม์ไมโครพาร์ติเคิล และ HPLC-UV พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์ที่ได้จากการทดสอบภูมิคุ้มกันและ HPLC ดังนั้น Innofluor FPIA ยังเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่ใช้ร่วมกับ MEIA สำหรับการตรวจวัดราพามัยซิน

ในปี 2013 Sobhani และคณะ²⁹ ได้ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของยารพามัยซินในเลือด โดยใช้เทคนิค reversed-phase high performance liquid chromatography-electrochemical detector (HPLC-ECD) ซึ่งสามารถตรวจวัดราพามัยซินในช่วงความเป็น

เส้นตรงที่ 0.025-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณอยู่ที่ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธีนี้ยังทำการทดลองที่ง่าย รวดเร็ว และมีความเที่ยงในการทำซ้ำอีกด้วย

ในปี 2015 Stanković และ Kalcher³⁰ ได้ตรวจวัดยารพามัยซินด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ขั้วไฟฟ้าโบรอนโดปโดมอนด์ ด้วยเทคนิคดิฟเฟอร์เรนเชียลสโวลแทมเมตรี ซึ่งเป็นครั้งแรกสำหรับการตรวจวัดยาชนิดนี้ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า พบว่ายารพามัยซินเกิดพีคของปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ +1.1 โวลต์ เมื่อใช้ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเป็น ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน pH 3 และยืนยันได้ว่าเป็น ปฏิกิริยาไม่ย้อนกลับของยารพามัยซิน สามารถตรวจวัดยารพามัยซินในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.5-19.5 ไมโครโมลาร์ มีค่าขีดจำกัดต่ำสุด 0.22 ไมโครโมลาร์ และสามารถตรวจวัดยารพามัยซินในสารตัวอย่างปัสสาวะและเลือดได้



บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เครื่องโพเทนชิโอสแตท (CHI 1234A) ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องชั่ง จากบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. พีเอชมิเตอร์ จากบริษัท Metrohm ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
4. ตู้อบ จากบริษัท Memmert ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ตู้ดูดความชื้น จากบริษัท Diligent ประเทศไทย
6. ตู้เย็น
7. แผ่นพอลิไวนิลคลอไรด์ (PVC)
8. บล็อกสกรีนข้าวและไม้ปาด
9. ไมโครปิเปต
10. ขวดกำหนดปริมาตร
11. ปีกเกอร์
12. แท่งแก้วคน
13. แผ่นพาราฟิล์ม

2.2 สารเคมี

1. หมึกกราฟีน (Graphene ink) จากบริษัท Gwent Group ประเทศอังกฤษ
2. หมึกคาร์บอน (Carbon ink) จากบริษัท Gwent Group ประเทศอังกฤษ
3. หมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (Silver/silver chloride ink; Ag/AgCl) จากบริษัท Gwent Group ประเทศอังกฤษ
4. อะซิโตน (Acetone; C_3H_6O) จากบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
5. เอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

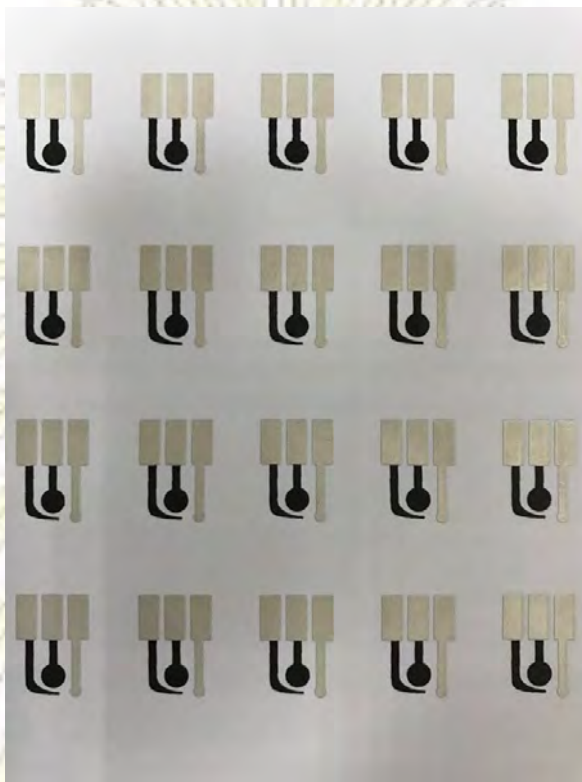
6. โซเดียมเปอร์คลอเรต (Sodium perchlorate; NaClO_4) จากบริษัท Fluka ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
7. กรดอะซิติก (Acetic acid; CH_3COOH) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
8. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid; H_3PO_4) จากบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
9. กรดบอริก (Boric acid; H_3BO_3) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
10. โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (III) (Potassium hexacyanoferrate(III); $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) จากบริษัท Riedel-de Haen ประเทศ Germany
11. โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium nitrate; KNO_3) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
12. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
14. ราพามัยซิน (Rapamycin) จากบริษัท Sigma-aldrich ประเทศเยอรมัน
15. กรดแอล-แอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) จากบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
16. กรดยูริก (Uric acid; $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$) จากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น
17. โดพามีนไฮโดรคลอริก (Dopamine hydrochloride; $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$) จากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. น้ำบริสุทธิ์ Milli-Q

2.3 ขั้นตอนการพิมพ์สกรีนข้าวไฟฟ้า

1. ตัดแผ่น PVC ให้ได้ขนาด 11.5 cm x 14.8 cm แล้วทำความสะอาดแผ่น PVC ด้วยเอทานอล ส่วนบล็อกสกรีนข้าวและไม่ปาดทำความสะอาดด้วยอะซิโตน ตากทิ้งไว้ให้แห้ง
2. สกรีนข้าวไฟฟ้าอ้างอิง โดยวางบล็อกสกรีนบนแผ่น PVC แล้วหยดหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คโลไรด์ลงบนบล็อกสกรีน แล้วสกรีนข้าวไฟฟ้า โดยปาดด้วยไม้ปาดจากบนลงล่าง 3 ครั้ง และนำแผ่น PVC ที่สกรีนหมึกแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดบล็อกสกรีนและไม้ปาดด้วยอะซิโตน
3. นำแผ่น PVC จากข้อ 2. มาสกรีนข้าวไฟฟ้าใช้งาน และข้าวไฟฟ้าช่วย โดยวางบล็อกสกรีนข้าวไฟฟ้าบนแผ่น PVC ให้ต่อตรงกับฐานที่เป็นตัวนำไฟฟ้า ซึ่งมีหมึกซิลเวอร์/ซิลเวอร์คโลไรด์ แล้วหยดหมึกกราฟีนหรือหมึกคาร์บอนลงบนบล็อกสกรีน แล้วสกรีนข้าวไฟฟ้า โดยปาดด้วยไม้

ปาดจากบนลงล่าง 3 ครั้ง และนำแผ่น PVC ที่สกรีนหมึกแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดบล็อกสกรีนและไม้ปาดด้วยอะซิโตน

4. การเก็บขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนจะเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 2.1 ลักษณะของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่เตรียมได้

2.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 สารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน (Britton-Robinson buffer solution; BRBS) ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 1.78 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.4.1.1 ตวงกรดอะซิติกเข้มข้น ปริมาตร 1.145 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.4.1.2 ตวงกรดฟอสฟอริกเข้มข้น ปริมาตร 1.369 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.4.1.3 ชั่งกรดบอริก 1.2382 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.4.1.4 นำสารละลายกรดอะซิติก ในข้อ 2.4.1.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลายกรดฟอสฟอริก ในข้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรและสารละลายกรดบอริก ในข้อ 2.4.1.3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q จนมี ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.4.2 สารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.4.2.1 นำสารละลายบัฟเฟอร์บริตตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 1.78 ใน ข้อ 2.4.1 มาปรับ pH ด้วยสารละลายกรดโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จนมีค่า pH 4

2.4.3 สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต (Sodium perchlorate; NaClO₄) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2.4.3.1 ชั่งโซเดียมเปอร์คลอเรต 3.5115 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q จนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2.4.4 สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ5.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

2.4.4.1 นำสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.5 ในข้อ 2.4.3 มาปรับ pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนมีค่า pH 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ5.0

2.4.5 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 914 ไมโครลิตร

2.4.5.1 ชั่งราพามัยซิน 0.0836 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมี ปริมาตร 914 ไมโครลิตร

2.4.6 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.4.6.1 นำสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในข้อ 2.4.5 มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.4.7 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายบัฟเฟอร์บริดตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

2.4.7.1 นำสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในข้อ 2.4.5 มาปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 245 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์บริดตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

2.4.8 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

2.4.8.1 นำสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในข้อ 2.4.5 มาปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 225 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์บริดตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

2.4.9 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH ต่าง ๆ ดังนี้ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 5.5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

2.4.9.1 นำสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในข้อ 2.4.5 มาปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 245 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH ต่าง ๆ ดังนี้ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ในข้อ 2.4.4 และ pH 5.5 ในข้อ 2.4.3 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

2.4.10 สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ดังนี้ 10:90, 40:60, 50:50, 60:40, และ 90:10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

อัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4	ปริมาณสารละลายราพามัยซิน 0.1 โมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสุทธิ (ไมโครลิตร)
10:90	5	45	450	500
40:60	5	195	300	500
50:50	5	245	250	500
60:40	5	295	200	500
90:10	5	445	50	500

2.4.11 สารละลายราพามัยซิน ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2.2 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ปริมาณสารละลายราพามัยซิน 1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสุทธิ (ไมโครลิตร)
5	2.5	247.5	250	500
10	5	245	250	500
50	25	225	250	500
100	50	200	250	500
150	75	175	250	500
200	100	150	250	500
250	125	125	250	500
300	150	100	250	500
350	175	75	250	500
400	200	50	250	500
450	225	25	250	500
500	250	0	250	500

2.4.12 สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (Potassium hexacyanoferrate (III); $K_3[Fe(CN)_6]$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต (Potassium nitrate; KNO_3) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

2.4.12.1 ชั่งโพแทสเซียมไนเตรต 0.2528 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q จนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2.4.12.2 ชั่งโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต 0.0329 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต จนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.4.12.3 นำสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ปริมาตร 1800 ไมโครลิตร

2.4.13 สารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.13.1 ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.0352 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.14 สารละลายกรดยูริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.14.1 ชั่งกรดยูริก 0.0336 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.15 สารละลายโดพามีนความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.15.1 ชั่งโดพามีน 0.0379 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.16 สารละลายกรดแอสคอร์บิก กรดยูริก และโดพามีนความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.16.1 นำสารละลายกรดแอสคอร์บิก กรดยูริก และโดพามีนความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในข้อ 2.4.13, 2.4.14 และ 2.4.15 ตามลำดับ มาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.4.17 สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2.3 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ปริมาณสารละลายราพามัยซิน 1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายกรดแอสคอร์บิก 1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสุทธิ (ไมโครลิตร)
125	62.5	62.5	250	500

2.4.18 สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2.4 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ปริมาณสารละลายราพามัยซิน 1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายกรดยูริก 1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาณสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสุทธิ (ไมโครลิตร)
125	62.5	62.5	250	500

2.4.19 สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนของเอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 50:50 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2.5 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมกับ สารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ปริมาตรสารละลาย ราพามัยซิน 1 มิลลิ โมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสารละลาย โดพามีน 1 มิลลิ โมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาตรเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสารละลาย โซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 (ไมโครลิตร)	ปริมาตร สุทธิ (ไมโครลิตร)
125	62.5	62.5	250	500

2.5 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.5.1 การศึกษาชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งาน

ชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งาน : คาร์บอน และกราไฟน

2.5.1.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม chi1232a

2.5.1.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอนหรือกราไฟน) โดยต่อขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท

2.5.1.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น cyclic voltammetry และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

พารามิเตอร์	การตั้งค่า
Init E (V)	0
High E (V)	1.5
Low (V)	0
Initial Scan Polarity	Positive
Scan Rate (V/s)	0.05
Sweep Segments	2
Sample Interval (V)	0.001
Quiet Time (s)	2
Sensitivity (A/V)	1×10^{-3}

- 2.5.1.4 หยตสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยตสารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้าทั้งสาม
- 2.5.1.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความสูงของพีค(กระแสไฟฟ้า)
- 2.5.1.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตทเพื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
- 2.5.1.7 ทำการทดลองตาม 2.5.1.1 – 2.5.1.6 ซ้ำโดยเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็น กราฟีนหรือคาร์บอน
- 2.5.1.8 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม และสรุปชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งานที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.5.2 การศึกษาชนิดสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์: สารละลายบัฟเฟอร์บริดตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

- 2.5.2.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม chi1232a
- 2.5.2.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน) โดยต่อขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท
- 2.5.2.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น cyclic voltammetry และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.6
- 2.5.2.4 หยตสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยตสารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้าทั้งสาม
- 2.5.2.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความสูงของพีค(กระแสไฟฟ้า)
- 2.5.2.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตทเพื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.5.2.7 ทำการทดลองตาม 2.5.2.1 – 2.5.2.6 ซ้ำโดยเปลี่ยนสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็นชนิดต่าง ๆ

2.5.2.8 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม และสรูปชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.5.3 การศึกษา pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์: สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1

โมลาร์ pH 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 5.5

2.5.3.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม chi1232a

2.5.3.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน) โดยต่อขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท

2.5.3.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น cyclic voltammetry และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.6

2.5.3.4 หยดสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH ต่าง ๆ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยดสารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้าทั้งสาม

2.5.3.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความสูงของพีค(กระแสไฟฟ้า)

2.5.3.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตทเพื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.5.3.7 ทำการทดลองตาม 2.5.3.1 – 2.5.3.6 ซ้ำโดยเปลี่ยนสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ pH ต่าง ๆ

2.5.3.8 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม และสรูป pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.5.4 การศึกษาอัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

อัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (เอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอ

เรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์): 10:90, 40:60, 50:50, 60:40 และ 90:10

2.5.4.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม
chi1232a

2.5.4.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน) โดยต่อ
ขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่อง
โพเทนชิโอสแตท

2.5.4.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น cyclic voltammetry และตั้ง
ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.6

2.5.4.4 หยดสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ของ
สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (เอทานอลต่อสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความ
เข้มข้น 0.1 โมลาร์) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยด
สารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้าทั้งสาม

2.5.4.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความ
สูงของพีค(กระแสไฟฟ้า)

2.5.4.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท
เพื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.5.4.7 ทำการทดลองตาม 2.5.4.1 – 2.5.4.6 ซ้ำโดยเปลี่ยนสารละลายราพามัยซินค
ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

2.5.4.8 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม และสรุปอัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่
เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.5.5 การศึกษาชนิดของเทคนิค

ชนิดของเทคนิค: ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี และสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี

2.5.5.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม
chi1232a

2.5.5.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน) โดยต่อขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท

2.5.5.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น differential pulse voltammetry หรือ square wave voltammetry และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.7 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินด้วยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี

พารามิเตอร์	การตั้งค่า
Init E (V)	0
Final E (V)	1.5
Incr E (V)	0.004
Amplitude (V)	0.05
Pulse Width (sec)	0.05
Sampling Width (sec)	0.0166667
Pulse Period (sec)	0.5
Quiet Time (sec)	2
Sensitivity (A/V)	1×10^{-3}

ตารางที่ 2.8 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินด้วยเทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี

พารามิเตอร์	การตั้งค่า
Initial E (V)	0
Final E (V)	1.5
Incr E (V)	0.004
Amplitude (V)	0.025
Frequency (Hz)	10
Quiet Time (sec)	2
Sensitivity (A/V)	1×10^{-3}

- 2.5.5.4 หยตสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ของ สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยตสารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้า ทั้งสาม
- 2.5.5.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้โวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความสูงของ พีค(กระแสไฟฟ้า)
- 2.5.5.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท เพื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
- 2.5.5.7 ทำการทดลองตาม 2.5.5.1 – 2.5.5.6 ซ้ำโดยเปลี่ยนเทคนิคที่จะใช้ในการ ทดลอง
- 2.5.5.8 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม และสรุปชนิดของเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการ วิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.6 การหาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

2.6.1 ผลของ scan rate

- 2.6.1.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม chi1232a
- 2.6.1.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน) โดยต่อ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่อง โพเทนชิโอสแตท
- 2.6.1.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น cyclic voltammetry และตั้ง ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์รากพามัยซินเพื่อศึกษาผลของ scan rate ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

พารามิเตอร์	การตั้งค่า
Init E (V)	0
High E (V)	1.5
Low (V)	0
Initial Scan Polarity	Positive
Scan Rate (V/s)	0.02*
Sweep Segments	2
Sample Interval (V)	0.001
Quiet Time (s)	2
Sensitivity (A/V)	1×10^{-3}

หมายเหตุ * คือค่า scan rate ที่สามารถปรับเปลี่ยนได้ และในงานวิจัยนี้ทำการทดลอง 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 V/s

2.6.1.4 หยดสารละลายรากพามัยซิน ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 2.4.8 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยดสารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้าทั้งสาม

2.6.1.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความสูงของพีค(กระแสไฟฟ้า)

2.6.1.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท และทำการทดลองตาม 2.6.1.1 – 2.6.1.5 โดยเปลี่ยนค่าพารามิเตอร์ของ scan rate เป็น 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 V/s ตามลำดับ

2.6.1.7 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม สร้างกราฟเชิงเส้นระหว่างรากที่สองของ scan rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสรุปผลของ scan rate ว่าพื้นที่ผิวของขั้วเป็น diffusion หรือ adsorption

2.6.2 การหาพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน

2.6.2.1 เปิดคอมพิวเตอร์ ต่อเครื่องโพเทนชิโอสแตทกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม chi1232a

2.6.2.2 ต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ต้องการทดสอบ (ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอนหรือกราไฟท์) โดยต่อขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าช่วย และขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท

2.6.2.3 เลือกเทคนิคที่ใช้ในการทดลองเป็น cyclic voltammetry และตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

พารามิเตอร์	การตั้งค่า
Init E (V)	0
High E (V)	1
Low (V)	-0.7
Initial Scan Polarity	Negative
Scan Rate (V/s)	0.02*
Sweep Segments	4
Sample Interval (V)	0.001
Quiet Time (s)	2
Sensitivity (A/V)	1×10^{-3}

หมายเหตุ * คือค่า scan rate ที่สามารถปรับเปลี่ยนได้ และในงานวิจัยนี้ทำการทดลอง 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 V/s

2.6.2.4 หยดสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 2.4.12 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยหยดสารละลายให้ครอบคลุมบริเวณขั้วไฟฟ้าทั้งสาม

2.6.2.5 กด Run เพื่อเริ่มการทดลอง จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรม บันทึก และวัดความสูงของพีค(กระแสไฟฟ้า)

2.6.2.6 เปลี่ยนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนใหม่ที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีนหรือคาร์บอนที่ต่อเข้ากับสายไฟที่ต่อกับเครื่องโพเทนชิโอสแตท และทำการทดลองตาม 2.6.1.1 – 2.6.1.5 ซ้ำอีกครั้ง

2.6.2.7 เปรียบเทียบโวลแทมโมแกรม สร้างกราฟเชิงเส้นระหว่างรากที่สองของ Scan Rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชัน และคำนวณหาพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน โดยแทนค่าความชันที่ได้จากกราฟในสมการ

$$I_p = 2.69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} C v^{1/2}$$

$$I_p / v^{1/2} = \text{Slope} = 2.69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} C$$

$$A = \text{Slope} / (2.69 \times 10^5 D^{1/2} n^{3/2} C)$$

I_p คือ กระแสไฟฟ้า (แอมแปร์)

v คือ Scan Rate (โวลต์ต่อวินาที)

A คือ พื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Active Surface Area, ตารางเซนติเมตร)

D คือ ค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient of Fe, 7.6×10^{-6} ตารางเซนติเมตรต่อวินาที)

n คือ จำนวนอิเล็กตรอนที่ถ่ายเท (number of transfer electron, 1)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (Concentration of $K_3[Fe(CN)_6]$, 1×10^{-6} โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

2.6.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Calibration curve)

2.6.3.1 วิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากข้อ 2.4.10 โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry โดยแต่ละความเข้มข้นทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.6.3.2 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายราพามัยซินและค่าความสูงของพีคสัญญาณกระแสไฟฟ้า เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรง สมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2)

2.6.4 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (Limit of quantification; LOQ)

2.6.4.1 วิเคราะห์สารละลายแบลนด์ (Blank) ซึ่งในงานวิจัยนี้สารละลายแบลนด์ คือ ร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry และทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง

2.6.4.2 วัดกระแสที่ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดพีคสัญญาณของราพามัยซิน นำกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ไปคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วแทนค่าในสูตร

$$\text{LOD} = 3\text{SD}/\text{slope of calibration curve}$$

$$\text{LOQ} = 10\text{SD}/\text{slope of calibration curve}$$

โดย SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าที่วัดได้

2.6.5 ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ

2.6.5.1 วิเคราะห์สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry และทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง

2.6.5.2 วัดกระแสที่ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดพีคสัญญาณของราพามัยซิน นำกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นราพามัยซิน และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.6.6 ผลของตัวรบกวนต่าง ๆ

ตัวรบกวน: กรดแอสคอร์บิก กรดยูริก และโดพามีน

2.6.6.1 วิเคราะห์สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ผสมกับสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 2.4.17 โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และ

เลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.6.6.2 วิเคราะห์สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ผสมกับสารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 2.4.18 โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.6.6.3 วิเคราะห์สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ผสมกับสารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ในร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 2.4.19 โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.6.6.4 เปรียบเทียบความเข้มข้นของราพามัยซินในสารละลายราพามัยซินที่ไม่มีตัวรบกวนกับสารละลายราพามัยซินที่มีตัวรบกวน

2.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างปัสสาวะ

เตรียมสารละลายราพามัยซินในตัวอย่างปัสสาวะ โดยปิเปตสารละลายดังในตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 การเตรียมสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ในปัสสาวะ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ความเข้มข้นที่เติมลงไป (ไมโครโมลาร์)	ปริมาตรสารละลายราพามัยซิน 1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาตรเอทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 (ไมโครลิตร)	ปริมาตรปัสสาวะ (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสุทธิ (ไมโครลิตร)
0	0	250	150	100	500

50	25	225	150	100	500
250	125	125	150	100	500
450	225	25	150	100	500

2.6.7.1 วิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากข้อ 2.6.6.1 โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry โดยแต่ละความเข้มข้นทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.6.7.2 วิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากข้อ 2.6.6.1 โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 2.5.5 และเลือกเทคนิคในการทดลองเป็น square wave voltammetry โดยแต่ละความเข้มข้นทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณความเข้มข้นของราพามัยซินในสารละลายตัวอย่าง ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ และร้อยละการคืนกลับ



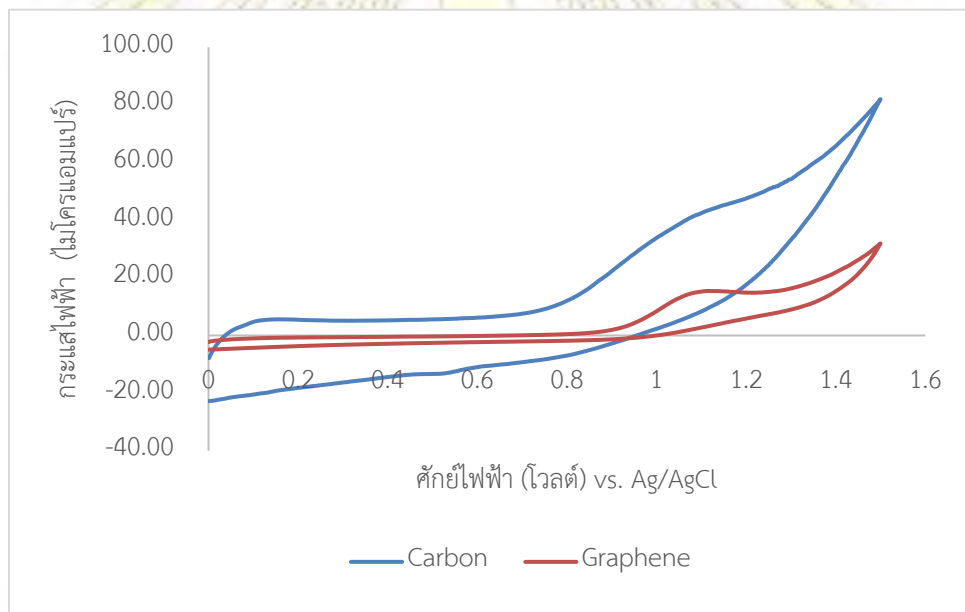
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

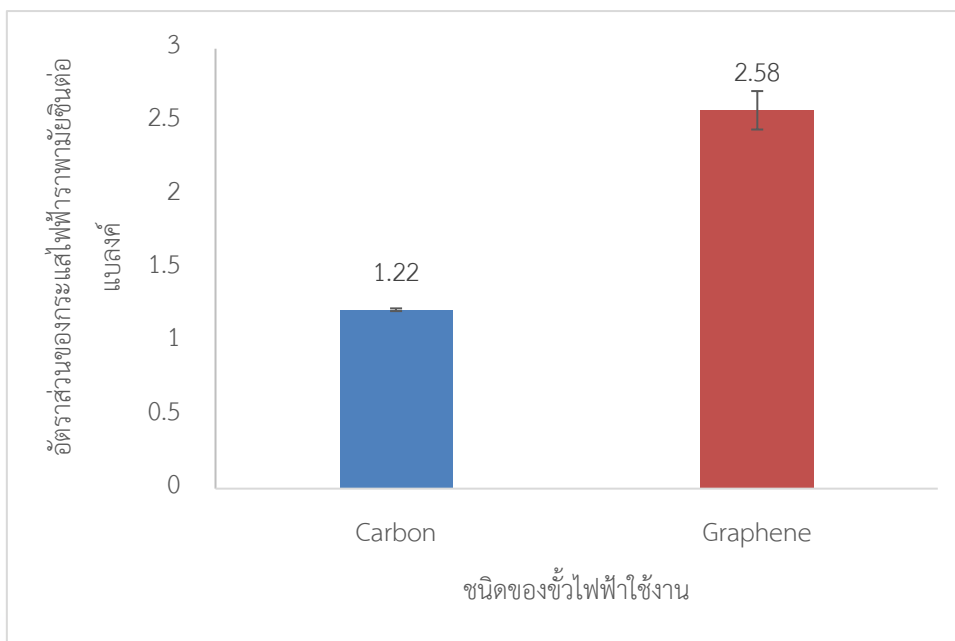
3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

3.1.1 ชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งาน

ผู้วิจัยทำการทดลองเลือกชนิดของขั้วไฟฟ้าใช้งานอยู่ 2 ชนิด คือ คาร์บอน และกราฟีน โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูป 3.1



รูปที่ 3.1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินบนขั้วไฟฟ้าใช้งานต่าง ๆ

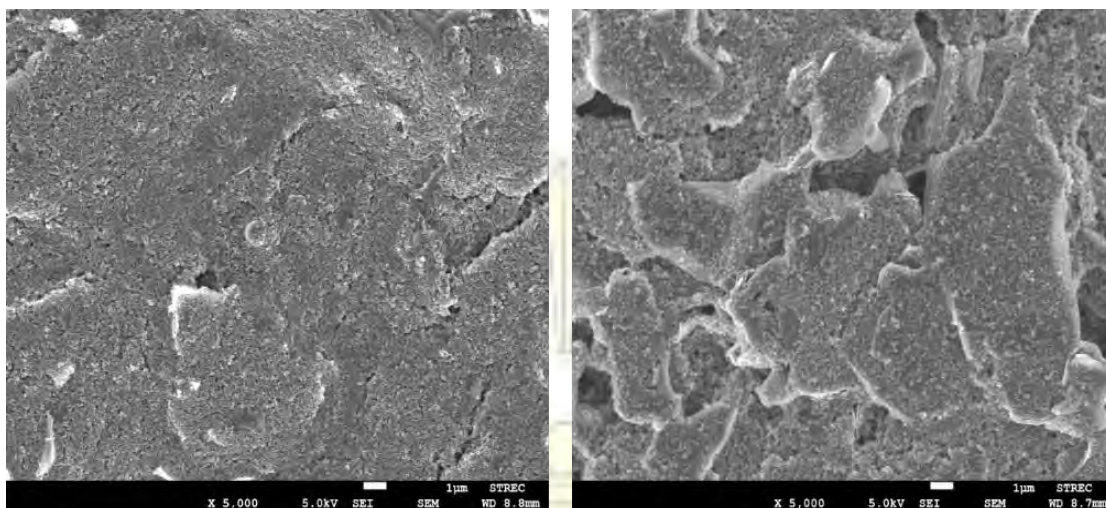


รูปที่ 3.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของอัตราส่วนกระแสไฟฟ้าที่ปล่อยคาร์บอนต่อแอมแปร์

เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอนกับกราฟีนจากไซคลิกโวลแทมโมแกรม ดังรูปที่ 3.1 พบว่า การวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่ใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีนมีเส้นฐาน (Baseline) มีต่ำกว่าขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอน และจากรูปที่ 3.2 การวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่ใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีนให้สัญญาณกระแสไฟฟ้าที่สูงกว่าขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอน เนื่องจากขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีนมีพื้นที่ผิวมากกว่า ทำให้สัญญาณไฟฟ้าสูงกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน

3.1.2 ลักษณะและสัญญาณพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน

วิเคราะห์ลักษณะ และสัญญาณจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดภาพของพื้นที่ผิวขั้วไฟฟ้าใช้งานคาร์บอน และกราฟีน



(ก)

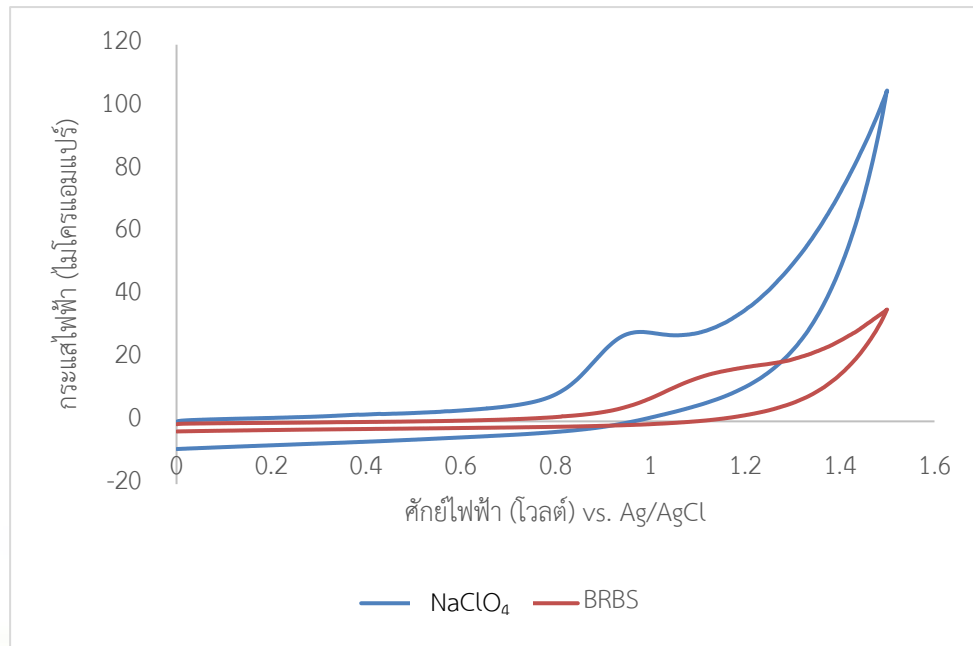
(ข)

รูปที่ 3.3 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 5000 เท่า ของ (ก) ขั้วไฟฟ้าคาร์บอน (ข) ขั้วไฟฟ้ากราฟีน

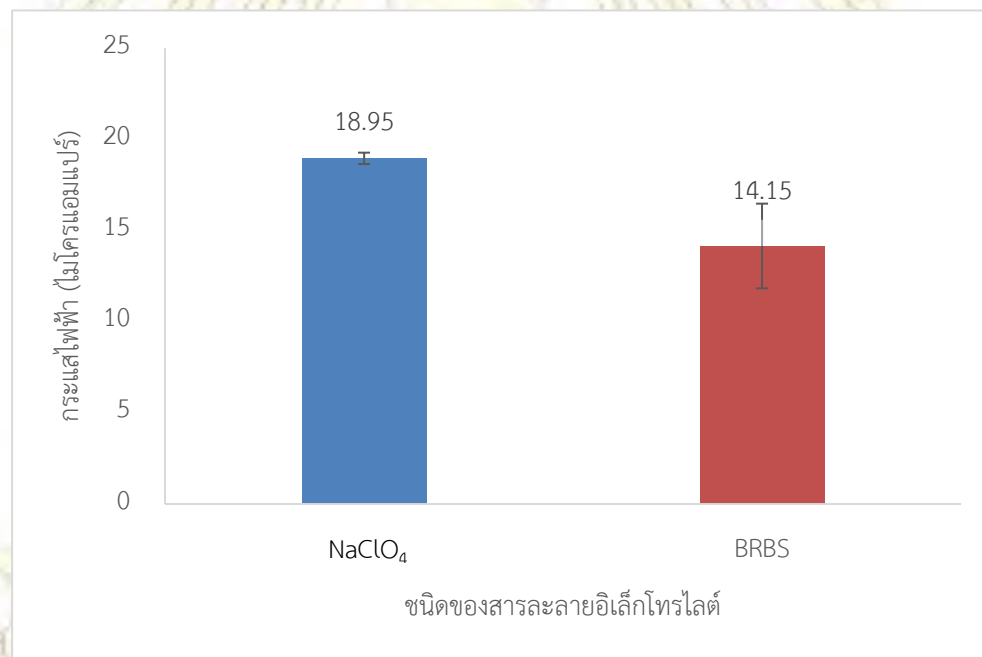
จากรูปที่ 3.3 จะพบว่า (ก) มีลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระ และไม่มีการซ้อนทับกันของชั้น ส่วน (ข) ซึ่งเป็นของขั้วไฟฟ้ากราฟีน มีลักษณะเป็นแผ่นที่ซ้อนทับกันหลาย ๆ ชั้น จึงทำให้มีพื้นที่ผิวมากกว่าคาร์บอน ส่งผลให้มีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดีกว่า

3.1.3 ชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ผู้วิจัยทำการทดลองเลือกชนิดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์อยู่ 2 ชนิด คือ ของสารละลายบัฟเฟอร์ บริตตันโรบินสัน (Britton-Robinson buffer solution; BRBS) ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 และ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต (Sodium perchlorate; NaClO_4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณรพามัยซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูป 3.4



รูปที่ 3.4 ซีกคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามัยซินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ต่าง ๆ

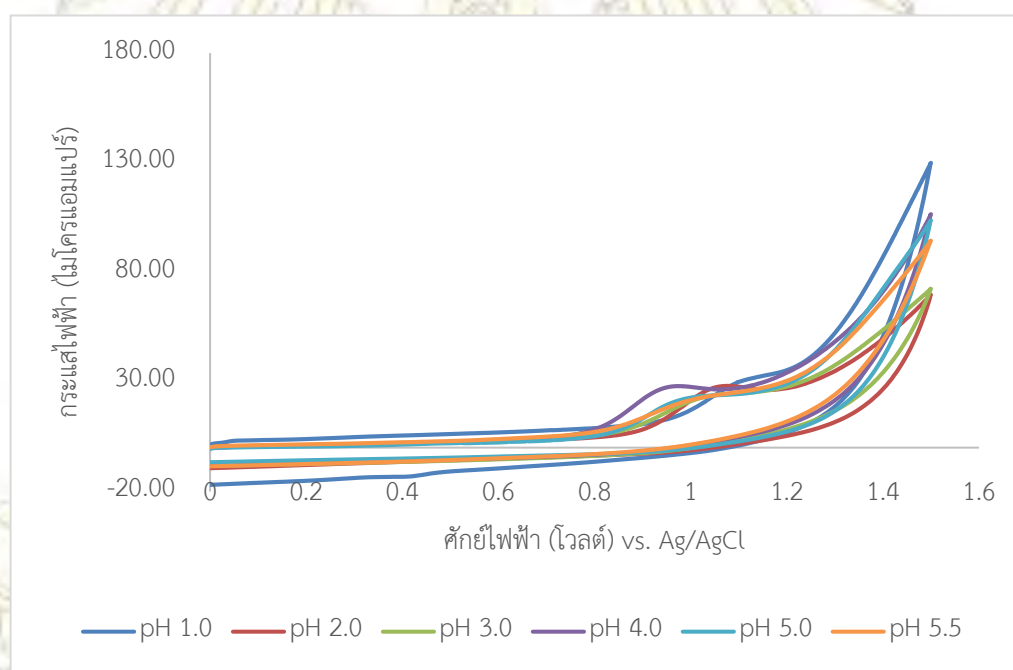


รูปที่ 3.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์พาราเซตามัยซินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ต่าง ๆ

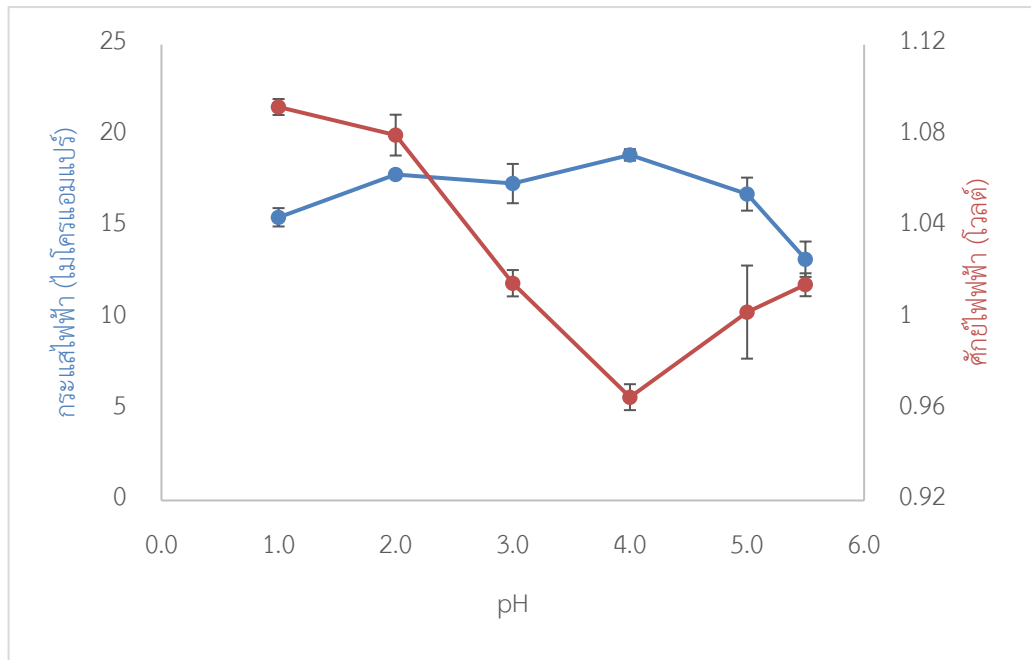
เมื่อเปรียบเทียบสารละลายอิเล็กโทรไลต์กันระหว่าง สารละลายบัฟเฟอร์บริตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 และ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 จากรูปที่ 3.5 พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ให้สัญญาณกระแสไฟฟ้าที่สูงกว่าราพามัยซินในสารละลาย บัฟเฟอร์บริตันโรบินสัน ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 4 จากการทบทวนวรรณกรรมเบื้องต้น นิยมใช้เปอร์คลอเรตในการวิเคราะห์ราพามัยซิน เพราะว่าเปอร์คลอเรตจะช่วยให้ปฏิกิริยารีดอกซ์เกิดได้เร็วขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์

3.1.4 pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ผู้วิจัยทำการทดลอง ศึกษา pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยใช้สารละลายโซเดียม เปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งทดลองที่ pH ต่าง ๆ ดังนี้ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 5.5 โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิ โมลาร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูป 3.6



รูปที่ 3.6 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินใน 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตที่ pH ต่าง ๆ

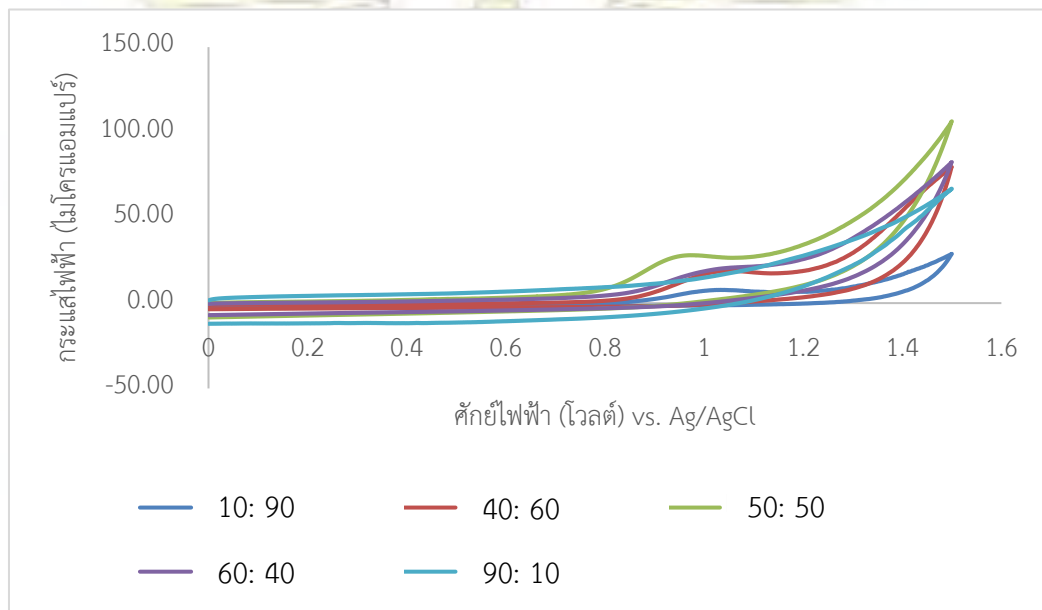


รูปที่ 3.7 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของอิสระไฟฟ้า และค่าของศักย์ไฟฟ้าของการวิเคราะห์ราพามัยซินใน 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตที่ pH ต่าง ๆ

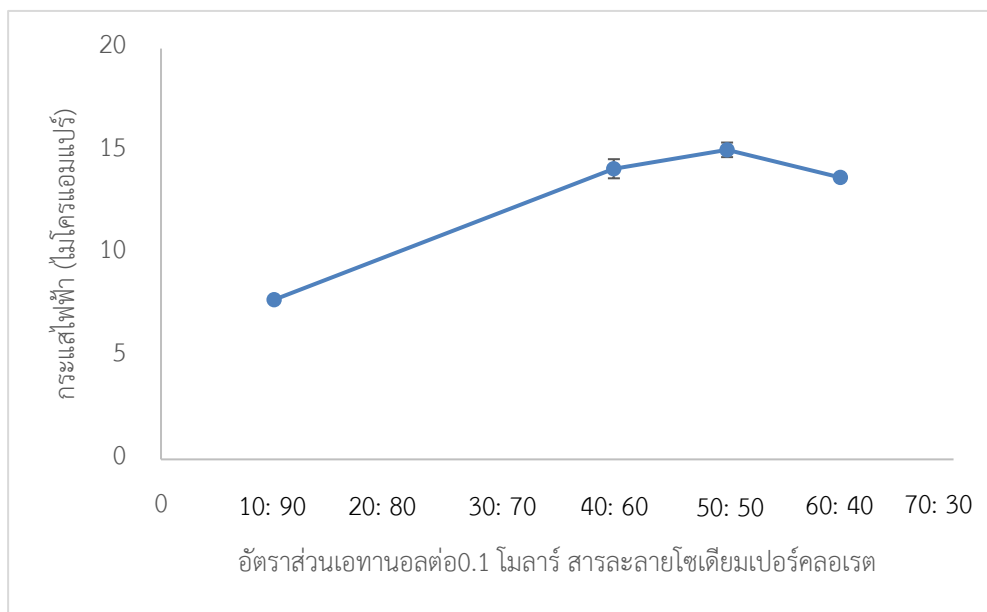
จากรูปที่ 3.7 พบว่า ค่า pH ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 1.0 ถึง 4.0 จะมีพีคเกิดขึ้นที่ค่าศักย์ไฟฟ้าลดลง และเมื่อมีค่า pH เป็น 5.0 และ 5.5 จะมีพีคเกิดขึ้นที่ค่าศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และ pH ที่ทำให้ศักย์ไฟฟ้าต่ำสุด คือ pH 4 เนื่องจากการที่ใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำ แสดงว่า ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็ว ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็ว จึงไม่จำเป็นต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าที่สูง และค่าอิสระไฟฟ้ามีเพิ่มขึ้นเมื่อมีค่า pH เพิ่มขึ้นในช่วง pH 1.0 ถึง 4.0 และมีค่าอิสระไฟฟ้าสูงสุดที่ pH 4 และมีค่าอิสระไฟฟ้าลดลงที่ pH 5.0 ถึง 5.5 ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์

3.1.5 อัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ผู้วิจัยทำการทดลอง ศึกษาอัตราส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยใช้เอทานอลและ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่ง ทดลองที่อัตราส่วนของเอทานอลต่อ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ต่าง ๆ ดังนี้ 10:90, 40:60, 50:50, 60:40, และ 90:10 โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่ มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูป 3.8



รูปที่ 3.8 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในเอทานอล และ 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรตที่อัตราส่วนต่าง ๆ

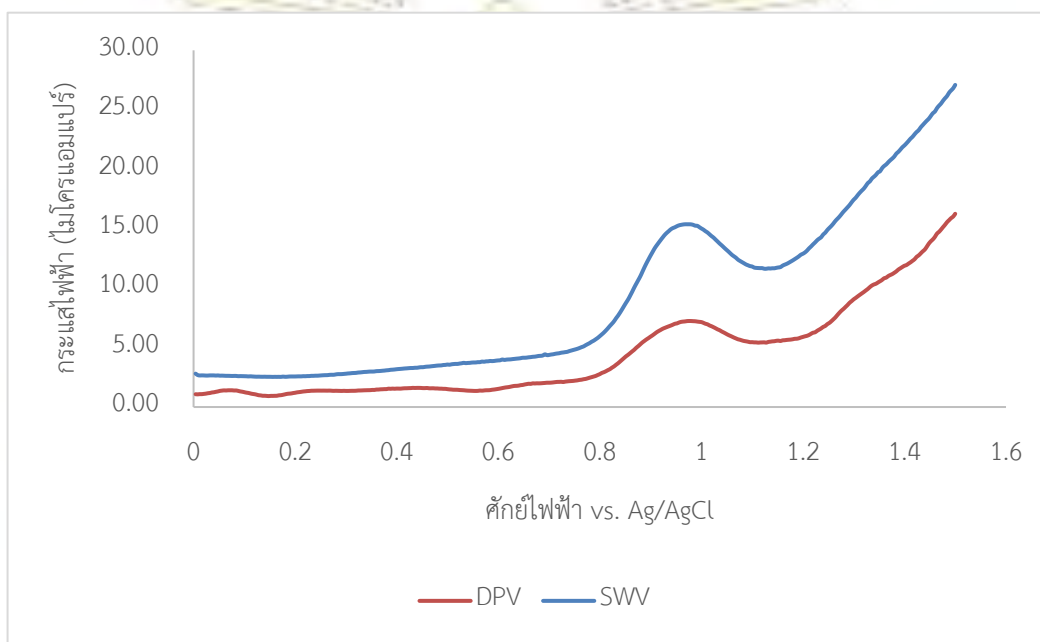


รูปที่ 3.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ราพามัยซินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ ของเอทานอลต่อ 0.1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต

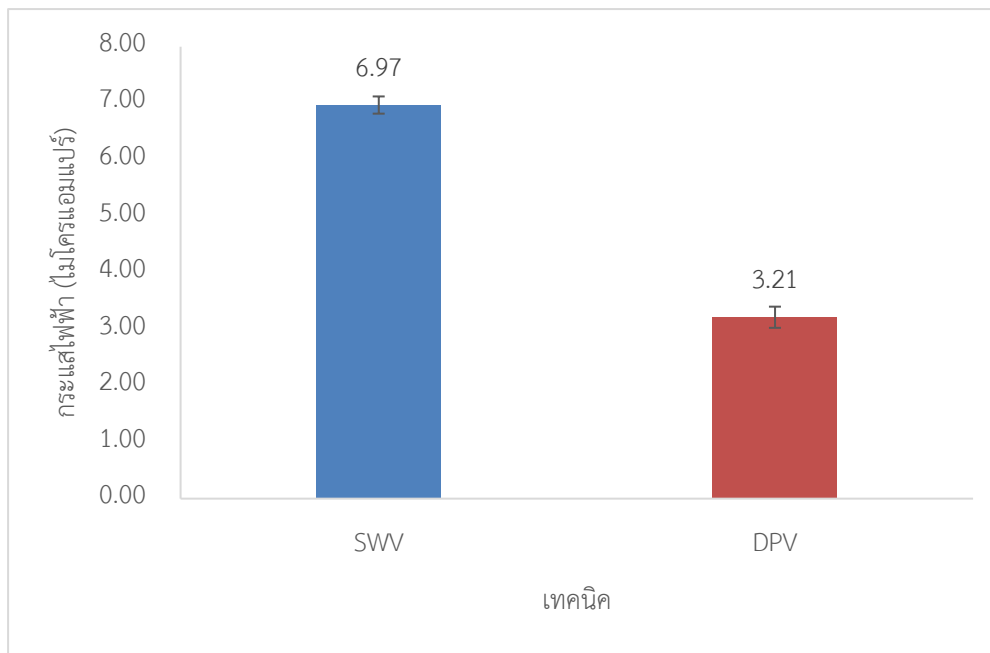
จากกราฟ รูปที่ 3.9 พบว่า สารละลายราพามัยซินในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เป็นอัตราส่วนของเอทานอลและสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในช่วงร้อยละ 10 ต่อร้อยละ 90 ถึง ร้อยละ 50 ต่อร้อยละ 50 ทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นและร้อยละ 50 ต่อร้อยละ 50 ให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่สูงที่สุด เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายของราพามัยซิน ถ้าเอทานอลมากขึ้น ทำให้ราพามัยซินละลายได้มากขึ้น ทำให้สัญญาณทางไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และเมื่ออัตราส่วนร้อยละ 60 ต่อร้อยละ 40 ให้ค่ากระแสไฟฟ้าต่ำลง เพราะว่า เอทานอลไม่นำไฟฟ้า และมีความต้านมากจึงทำให้สัญญาณทางไฟฟ้าลดลง และไม่สามารถวัดค่ากระแสไฟฟ้าได้ในร้อยละ 90 ต่อร้อยละ 10 ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายอิเล็กโทรไลต์เป็น ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4

3.1.6 ชนิดของเทคนิค

ผู้วิจัยทำการทดลองเลือกชนิดของเทคนิคอยู่ 2 ชนิด คือ ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตรี (Differential Pulse Voltammetry) และสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี (Square Wave Voltammetry) โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใน ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อ ร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ได้โวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 ดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมโมแกรม และสแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใน ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อ ร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



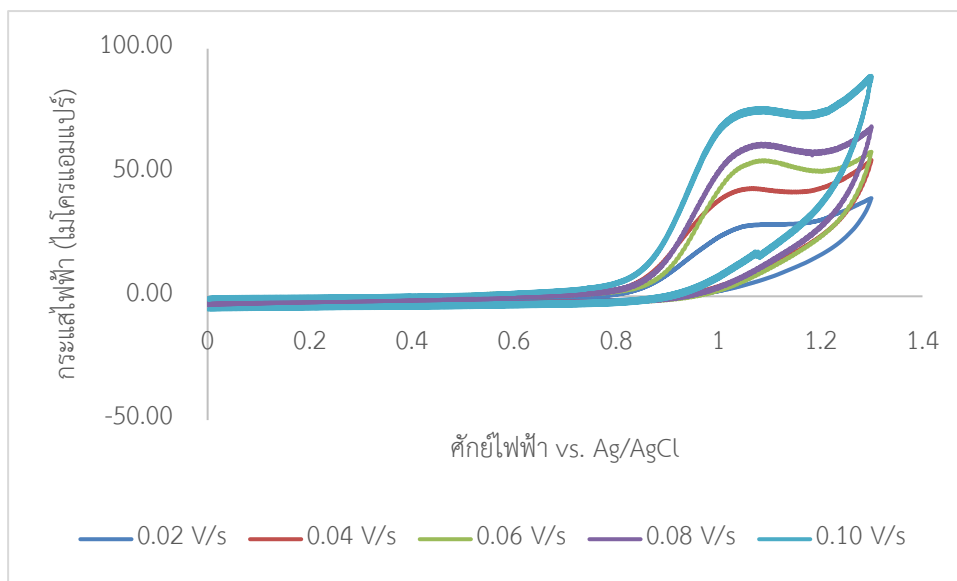
รูปที่ 3.11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ราพามัยซินด้วยเทคนิคต่าง ๆ

จากโวลแทมโมแกรมในรูปที่ 3.10 พบว่าเทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรีมีเส้นฐาน (Baseline) ที่เรียกว่าเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลโวลแทมเมตรี อีกทั้งยังให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่สูงกว่าอีกด้วยดังในกราฟรูปที่ 3.11 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกเทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรีในการหาปริมาณราพามัยซิน

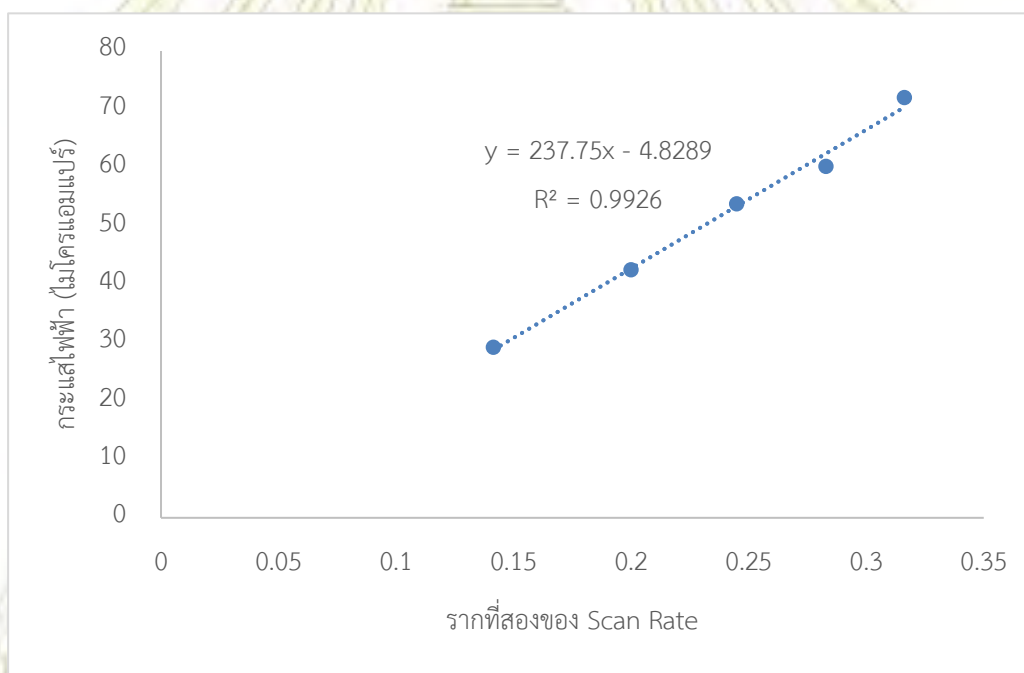
3.2 การหาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน

3.2.1 ผลของ scan rate

ผู้วิจัยทำการทดลองผลของ scan rate โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ใน ร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อ ร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี scan rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 V/s ได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ที่มี scan rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 V/s

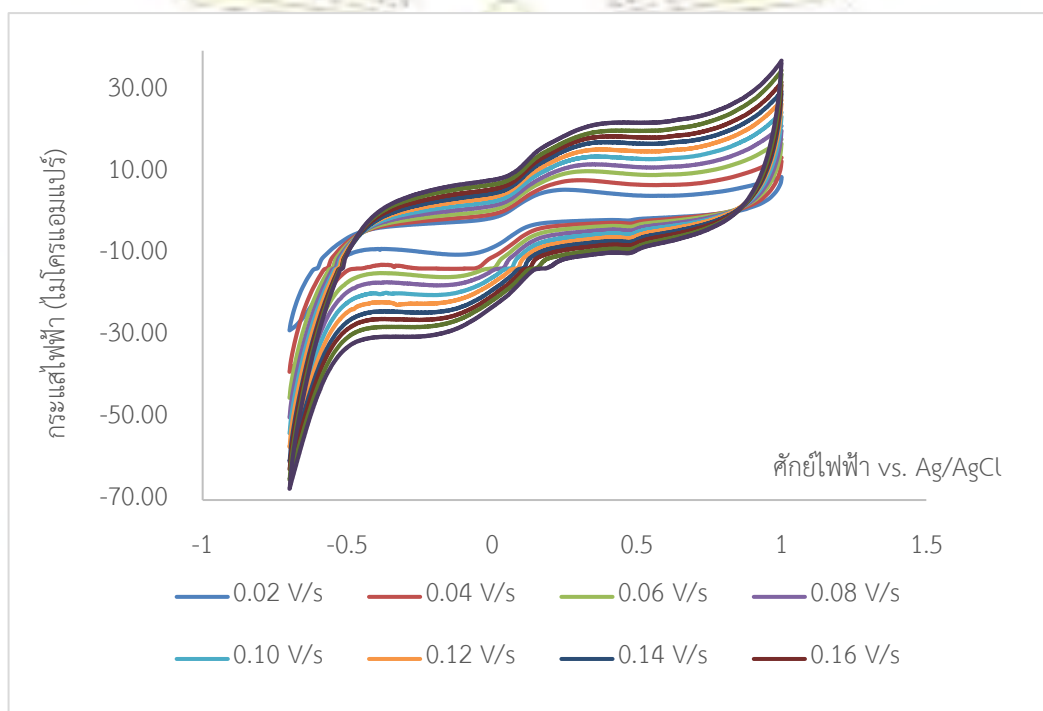


รูปที่ 3.13 กราฟเชิงเส้นระหว่างรากที่สองของ scan rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชันของราพามัยซิน

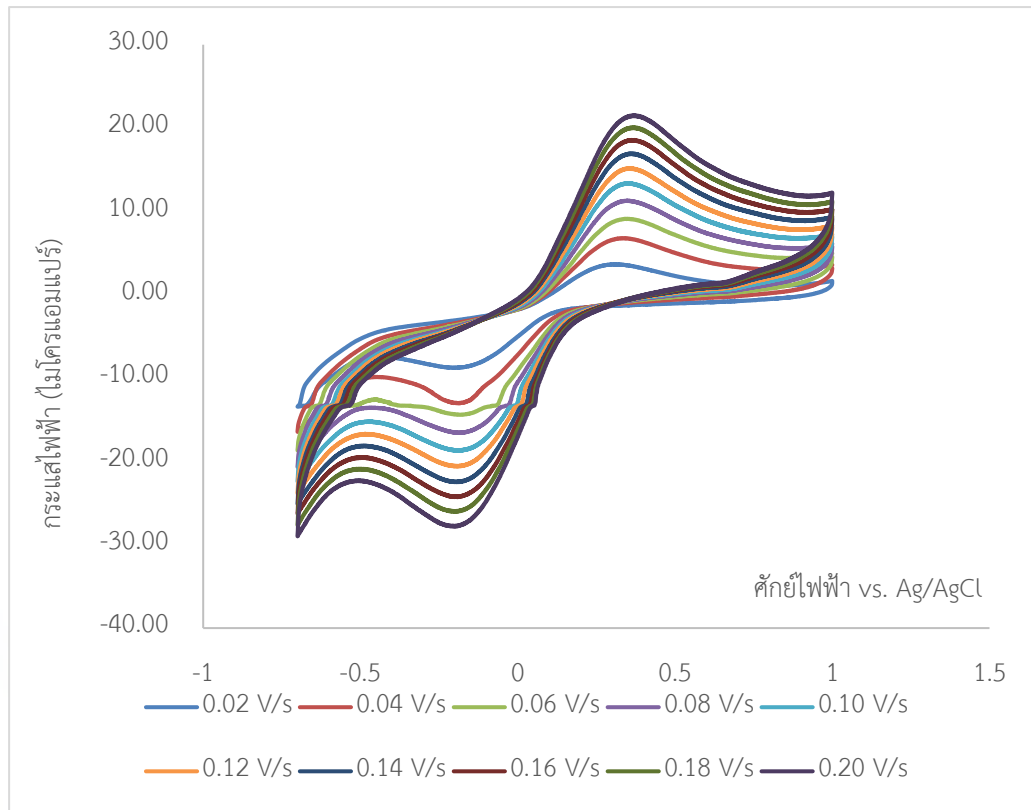
จากกราฟเชิงเส้นในรูปที่ 3.13 พบว่า ค่ากระแสไฟฟ้าของราพามัยซินเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อรากที่สองของ scan rate เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันของราพามัยซินบนผิวของขั้วไฟฟ้าเป็นแบบการแพร่

3.2.2 การหาพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน

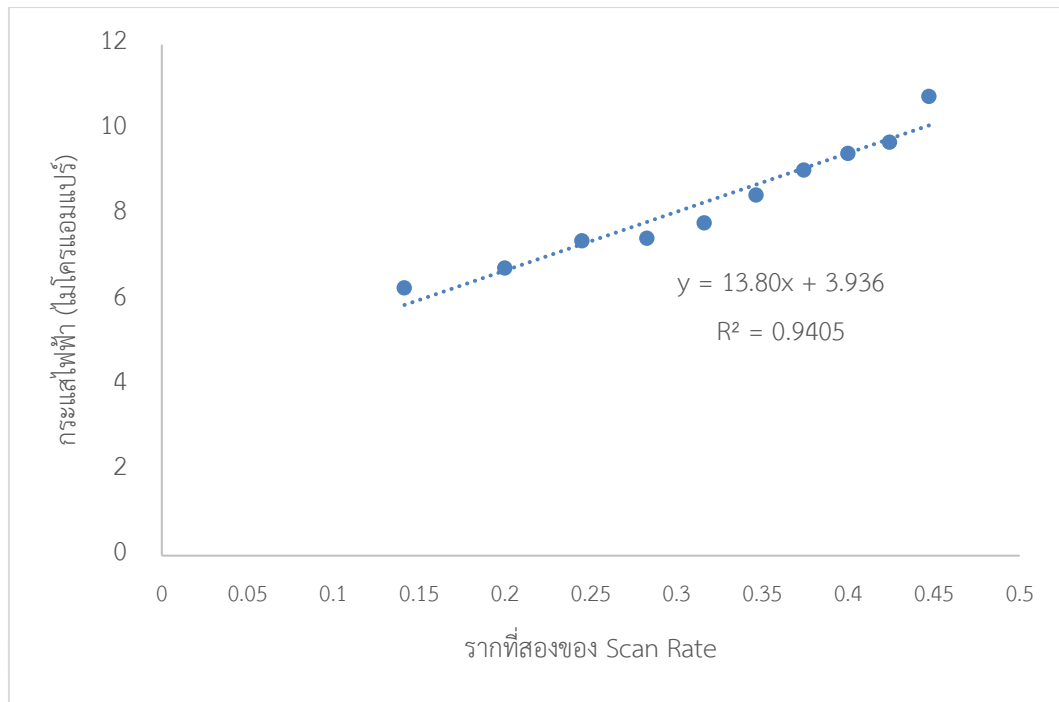
ผู้วิจัยทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งานที่เป็นคาร์บอนกับกราฟีน โดยทำการวิเคราะห์สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีที่มี scan rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 V/s ได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 3.14 และ 3.15



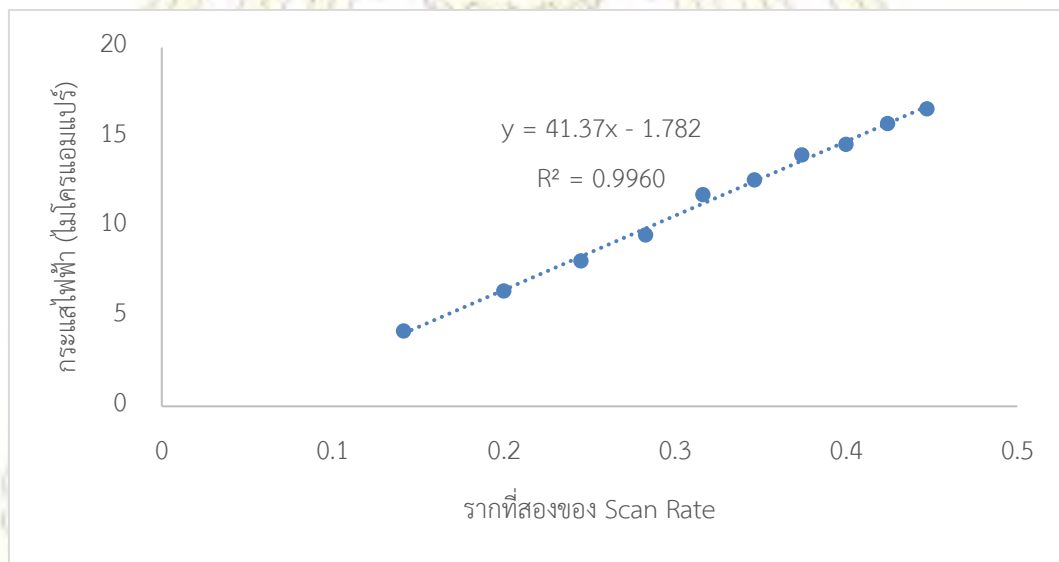
รูปที่ 3.14 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอน ซึ่งมี scan rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 V/s



รูปที่ 3.15 ซิกนัลโวลแทมโมแกรมของการวิเคราะห์สารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้หัวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีหัวไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน ซึ่งมี scan rate เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 V/s



รูปที่ 3.16 กราฟเชิงเส้นระหว่างราคาสองของ scan rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชันของโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นคาร์บอน



รูปที่ 3.17 กราฟเชิงเส้นระหว่างราคาสองของ scan rate และกระแสไฟฟ้าของปฏิกิริยาออกซิเดชันของโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นกราฟีน

จากกราฟเชิงเส้นดังแสดงในรูปที่ 3.16 และ 3.17 นำความชันจากสมการเชิงเส้นมาคำนวณหาพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งานระหว่างคาร์บอนกับกราฟีน โดยนำมาแทนค่าในสมการ

$$I_p = 2.69 \times 10^5 AD^{1/2} n^{3/2} C v^{1/2}$$

$$I_p / v^{1/2} = \text{Slope} = 2.69 \times 10^5 AD^{1/2} n^{3/2} C$$

$$A = \text{Slope} / (2.69 \times 10^5 D^{1/2} n^{3/2} C)$$

I_p คือ กระแสไฟฟ้า (แอมแปร์)

v คือ Scan Rate (โวลต์ต่อวินาที)

A คือ พื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Active Surface Area, ตารางเซนติเมตร)

D คือ ค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient of Fe, 7.6×10^{-6} ตารางเซนติเมตรต่อวินาที)

n คือ จำนวนอิเล็กตรอนที่ถ่ายเท (number of transfer electron, 1)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (Concentration of $K_3[Fe(CN)_6]$, 1×10^{-6} โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

$$\text{คาร์บอน; } A = (13.80 \times 10^{-6}) / [2.69 \times 10^5 (7.6 \times 10^{-6})^{1/2} (1)^{3/2} (1 \times 10^{-6})]$$

$$A = 0.0186 \text{ ตารางเซนติเมตร}$$

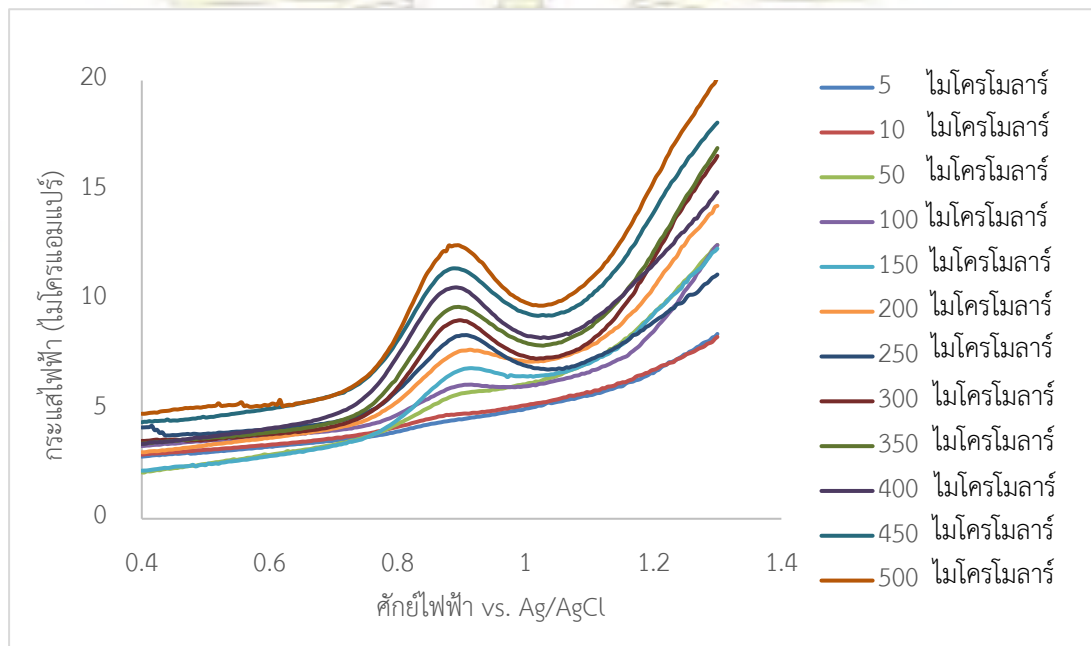
$$\text{กราฟีน; } A = (41.37 \times 10^{-6}) / [2.69 \times 10^5 (7.6 \times 10^{-6})^{1/2} (1)^{3/2} (1 \times 10^{-6})]$$

$$A = 0.0558 \text{ ตารางเซนติเมตร}$$

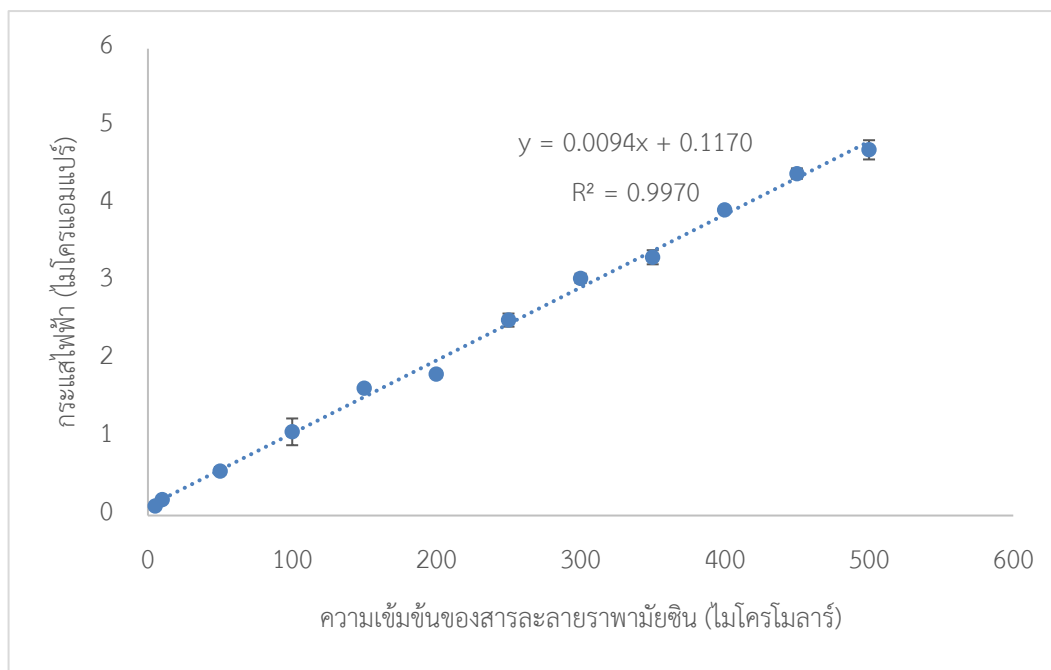
พบว่า พื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งานที่เป็นคาร์บอน มีค่าเท่ากับ 0.0186 ตารางเซนติเมตร และพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งานที่เป็นกราฟีน มีค่าเท่ากับ 0.0558 ตารางเซนติเมตร ซึ่งมีค่ามากกว่าของคาร์บอน ดังนั้นจึงเลือกใช้ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่เป็นกราฟีน เนื่องจากขั้วไฟฟ้าใช้งานที่มีพื้นที่ผิวมากกว่าจะถ่ายเทอิเล็กตรอนและมีการนำไฟฟ้าได้ดีกว่า

3.2.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Calibration curve)

วิเคราะห์สารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลและร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 ด้วยสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรด้วยกราฟีน ได้สแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมดังรูป 3.18 และสามารถสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายราพามัยซินและค่าความสูงของพีคสัญญาณกระแสไฟฟ้าดังรูป 3.19



รูปที่ 3.18 สแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



รูปที่ 3.19 กราฟเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายราพามัยซินในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 และค่าความสูงของพีคสัญญาณกระแสไฟฟ้า

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน จากนั้นทำการทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยการเตรียมสารละลายราพามัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และนำสารละลายที่เตรียมทุกความเข้มข้นมาวิเคราะห์หาปริมาณของราพามัยซินด้วยเทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี โดยใช้ค่าความสูงสัญญาณของพีคกระแสไฟฟ้าเทียบกับความเข้มข้นของราพามัยซินหน่วยไมโครโมลาร์ และทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น นำค่าเฉลี่ยของกระแสไฟฟ้ามาสร้างกราฟเชิงเส้นโดยใช้ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้มาสร้างเป็นแกน y และปริมาณความเข้มข้นของราพามัยซินหน่วยไมโครโมลาร์มาสร้างเป็นแกน x

จากกราฟเชิงเส้นพบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นสารละลายราพามัยซินที่สามารถตรวจวัดได้คือ 5 ไมโครโมลาร์ ถึง 500 ไมโครโมลาร์ โดยแสดงสแควร์เวฟโวลแทมโมแกรมในรูปที่ 3.18 และกราฟเชิงเส้นโดยใช้ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้มาสร้างเป็นแกน y และปริมาณความเข้มข้นของราพามัยซินหน่วยไมโครโมลาร์มาสร้างเป็นแกน x และจากกราฟเชิงเส้นมีค่า R^2 เป็น 0.9970

3.2.4 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (Limit of quantification; LOQ)

วิเคราะห์สารละลายแบลงค์ (Blank) ร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของสารละลายไซโตซีมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ด้วยเทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี และทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง วัดสัญญาณของกระแสไฟฟ้า ได้ค่ากระแสไฟฟ้า และคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 3.1 สามารถนำไปคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดได้เท่ากับ 2.72 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณได้เท่ากับ 9.05 ไมโครโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา³⁰ ซึ่งค่าที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมา แต่งานวิจัยนี้เกิดสัญญาณพีคกระแสไฟฟ้าของราพามัยซินที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่างานวิจัยก่อนหน้า เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เร็วกว่า จึงทำให้วิเคราะห์ได้เร็วกว่า และใช้ไฟฟ้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีขนาดเล็ก และมีราคาที่ถูกกว่า

ตารางที่ 3.1 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์ (n=10)

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์)	ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์)
1	0.06266	6	0.04548
2	0.05984	7	0.06849
3	0.06979	8	0.06324
4	0.06688	9	0.06243
5	0.06590	10	0.04657
ค่าเฉลี่ย (\bar{x})			0.06113
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)			0.008512

3.2.5 ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ

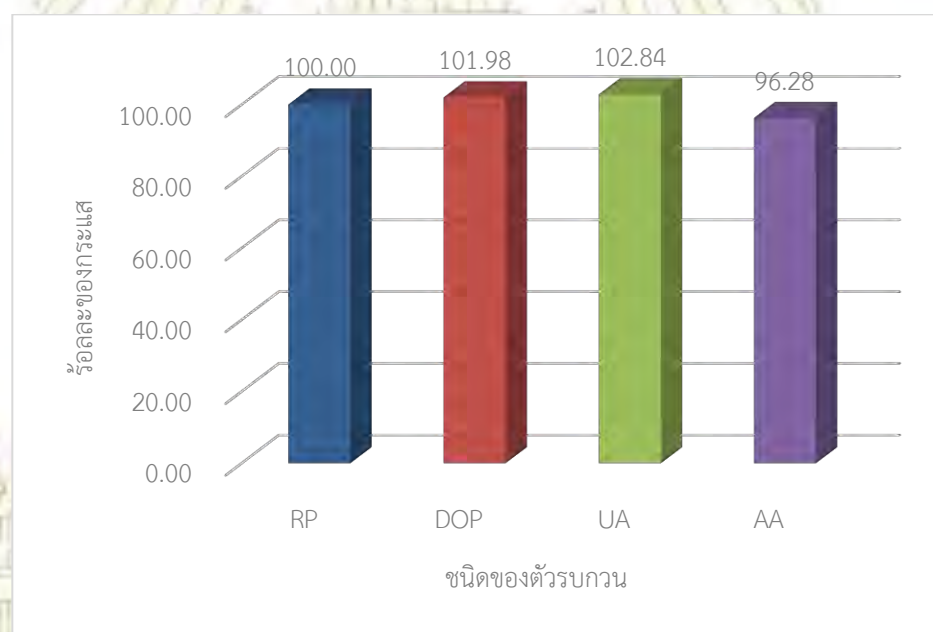
วิเคราะห์ปริมาณสารละลายราพามัยซินที่ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง และคำนวณหาค่า %RSD ได้เท่ากับ 3.52 ซึ่งค่าที่ได้เป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ ดังนั้นวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความเที่ยงสูงในการวิเคราะห์ซ้ำ

ตารางที่ 3.2 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์สารละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ (n=10)

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์)	ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า (ไมโครแอมแปร์)
1	3.473	6	3.559
2	3.764	7	3.527
3	3.503	8	3.831
4	3.612	9	3.489
5	3.563	10	3.737
		ค่าเฉลี่ย (\bar{x})	3.606
		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	0.1270

3.2.6 ผลของตัวรบกวนต่าง ๆ

วิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซินที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และเติมตัวรบกวนต่าง ๆ (กรดแอสคอร์บิก กรดยูริก และโดพามีน) เพื่อตรวจสอบว่าตัวรบกวนเหล่านั้นมีผลกระทบต่อความสูงของพีคกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการวิเคราะห์ราพามัยซิน



รูปที่ 3.20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าของกระแสไฟฟ้าของการวิเคราะห์ราพามัยซินและตัวรบกวนต่าง ๆ

พบว่าความเข้มข้นของตัวบวกรวมที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินคือ 125 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีค่าอัตราส่วนของตัวบวกรวมต่อราพามัยซิน เท่ากับ 0.5 เท่า จากกราฟจะเห็นว่าร้อยละของกระแสที่มีตัวบวกรวมเป็นกรดแอสคอร์บิกจะให้ค่าที่น้อยกว่าของร้อยละของกระแสที่ไม่มีตัวบวกรวม ส่วนร้อยละของกระแสที่มีตัวบวกรวมเป็นกรดยูริก และโดพามีนจะให้ค่าที่สูงกว่าของร้อยละของกระแสที่ไม่มีตัวบวกรวม

3.2.7 การวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างจริง

ตัวอย่างที่เลือกทำการวิเคราะห์ในงานวิจัย คือ ปัสสาวะ ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานราพามัยซินลงไปในตัวอย่งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 3.3 แสดงความเข้มข้น ค่าเฉลี่ย %Recovery และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของปริมาณราพามัยซินที่วิเคราะห์ได้ในปัสสาวะ

ปัสสาวะ	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานราพามัยซินที่เติม (ไมโครโมลาร์)	ความเข้มข้นที่พบ (ไมโครโมลาร์)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่พบ ($\bar{x} \pm SD$) (ไมโครโมลาร์)	ค่าเฉลี่ย %Recovery	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
ตัวอย่างที่ 1	50	61.83	60.49 ± 5.00	120.97	8.26
		54.96			
		64.67			
	250	239.57	244.35 ± 5.01	97.74	2.05
		249.57			
		243.91			
	450	461.09	456.23 ± 10.55	101.38	2.31
		463.49			
		444.13			
ตัวอย่างที่ 2	50	49.53	52.00 ± 2.14	103.99	4.11
		53.14			
		53.32			
	250	256.07	251.05 ± 10.11	100.42	4.03
		257.68			
		239.41			

	450	455.55 442.91 449.13	449.19 ± 6.32	99.82	1.41
ตัวอย่างที่ 3	50	46.67	47.59 ± 0.83	95.18	1.74
		48.28			
		47.81			
	250	249.52	247.98 ± 1.85	99.19	0.74
		248.47			
		245.93			
	450	443.90	451.44 ± 6.63	100.32	1.47
		454.05			
		456.37			

จากการวิเคราะห์ปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างจริง พบว่า เมื่อคำนวณหาค่า %Recovery และค่า %RSD ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และค่าที่ได้ คือ % Recovery มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 95.18 – 103.99 % และ %RSD อยู่ในช่วง 0.74 – 4.11 % ซึ่งค่าที่ได้เป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ เนื่องจากมีความแม่นยำและความเที่ยงสูง ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซินนี้เป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดหาปริมาณราพามัยซินในตัวอย่างจริงได้ เว้นแต่ที่ปัสสาวะตัวอย่างที่ 1 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ที่มี % Recovery มีค่า 120.97 % และ %RSD มีค่า 8.26 % ซึ่งเป็นความคลาดเคลื่อนในเชิงบวก อาจเกิดจากมีตัวรบกวนในปัสสาวะที่สูงเกินไปจึงทำให้ได้ค่ากระแสไฟฟ้าสูง และเมื่อคำนวณความเข้มข้นก็จะได้ค่าที่สูงไปด้วย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ใช้ข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรด้วยกราฟีนสำหรับการตรวจวิเคราะห์ราพามัยซิน โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน และการหาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน ส่วนแรกเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน พบว่า ข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีข้าวไฟฟ้าใช้งาน เป็นกราฟีน และใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ เป็นร้อยละ 50 ของเอทานอล และร้อยละ 50 ของ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.0 โดยใช้เทคนิคสแควร์เวฟโวลแทม เมตรี จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน ส่วนสุดท้ายคือการหา ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณราพามัยซิน พบว่า มีข้าวไฟฟ้าใช้งานเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันของราพามัยซินบนผิวของข้าวไฟฟ้าเป็นแบบการแพร่ ในส่วนของการศึกษาหาพื้นที่ผิวของ ข้าวไฟฟ้างานคาร์บอน และกราฟีน มีค่าเท่ากับ 0.0186 และ 0.0558 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสมจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ราพามัยซินและกระแสไฟฟ้า ได้ช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 5 ถึง 500 ไมโครโมลาร์ และค่าสัมประสิทธิ์ การตัดสิ้นใจ (R^2) มีค่า 0.9970 นอกจากนี้มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดราพามัยซินเท่ากับ 2.72 ไมโครโมลาร์ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณราพามัยซินเท่ากับ 9.05 ไมโครโมลาร์ สำหรับการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำที่ความเข้มข้นของราพามัยซินที่ 400 ไมโครโมลาร์ มี ค่า %RSD เท่ากับ 3.52% การศึกษาตัวรบกวนต่าง ๆ ที่สามารถพบในตัวอย่างจริงได้ ได้แก่ กรด แอสคอร์บิก กรดยูริก และโดพามีนที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ราพามัยซิน พบว่าที่ความเข้มข้นของตัว รบกวนเท่ากับ 0.5 เท่ายังสามารถให้ผลในการวิเคราะห์ราพามัยซินได้ถูกต้อง

ในลำดับสุดท้ายนำข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัดแปรด้วยกราฟีนไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ ราพามัยซินในตัวอย่างปัสสาวะได้ ซึ่งให้ค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 95.18 – 120.97% และค่า ความเที่ยงอยู่ในช่วง 0.74 – 8.26% ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถยอมรับได้ ดังนั้นข้าวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ตัด แปรด้วยกราฟีนนี้เป็นข้าวไฟฟ้าที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ราพามัยซิน และยังพกพาได้ วิเคราะห์ ได้รวดเร็ว ใช้งานง่าย ใช้ปริมาณสารน้อย และราคาถูก

เอกสารอ้างอิง

1. TM Wyeth. 2014. Rapamune. [ออนไลน์] แหล่งที่มา http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10017036/f/201410/Rapamune_0.pdf (สืบค้นเมื่อ 18 เมษายน 2560)
2. Yatscoff, R. W.; Faraci, C.; Bolingbroke, P. Measurements of Rapamycine in Whole Blood using Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Ther. Drug Monit.* **1992**, *14*, 138-141.
3. Napoli, K. L.; Kahan, B. D. Sample Clean-up and High-Performance Liquid Chromatographic Techniques for Measurements of Whole Blood Rapamycin Concentrations. *J. Chromatogr. B.* **1994**, *654*, 111-120.
4. Kirchner, G. I.; Vidal, C.; Jacobsen, W.; Franzke, A.; Hallensleben, K.; Christians, U.; Sewing, K. F. Simultaneous on-Line Extraction and Analysis of Sirolimus (Rapamycin) and Ciclosporin in Blood by Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **1999**, *721*, 285-294.
5. Mochizuki, N.; Suka, E.; Matsumoto, K.; Akimoto, O.; Ohno, K.; Shimamura, T.; Furukawa, H.; Todo, S.; Kishino, S. Liquid Chromatographic Method for the Determination of Sirolimus in Blood using Electrochemical Detection. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 267-272.
6. Wilson, D.; Johnston, F.; Holt, D.; Moreton, M.; Engelmayer, J.; Gaulier, J. M.; Luthe, H.; Marquet, P.; Moscato, D.; Oellerich, M.; Mosso, R.; Streit, F.; Brunet, M.; Fillee, C.; Schmid, R.; Wallemacq, P.; Barnes, G. Multi-Center Evaluation of Analytical Performance of Themicroparticle Enzyme Immunoassay for Sirolimus. *Clin. Biochem.* **2006**, *39*, 378-386.
7. Wang, J. Analytical Electrochemistry. *Wiley-VCH.* **2006**, *3*.
8. LibreTexts libraries. 2017. Voltammetric Methods. [ออนไลน์] แหล่งที่มา [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods) (สืบค้นเมื่อ 19 เมษายน 2560)

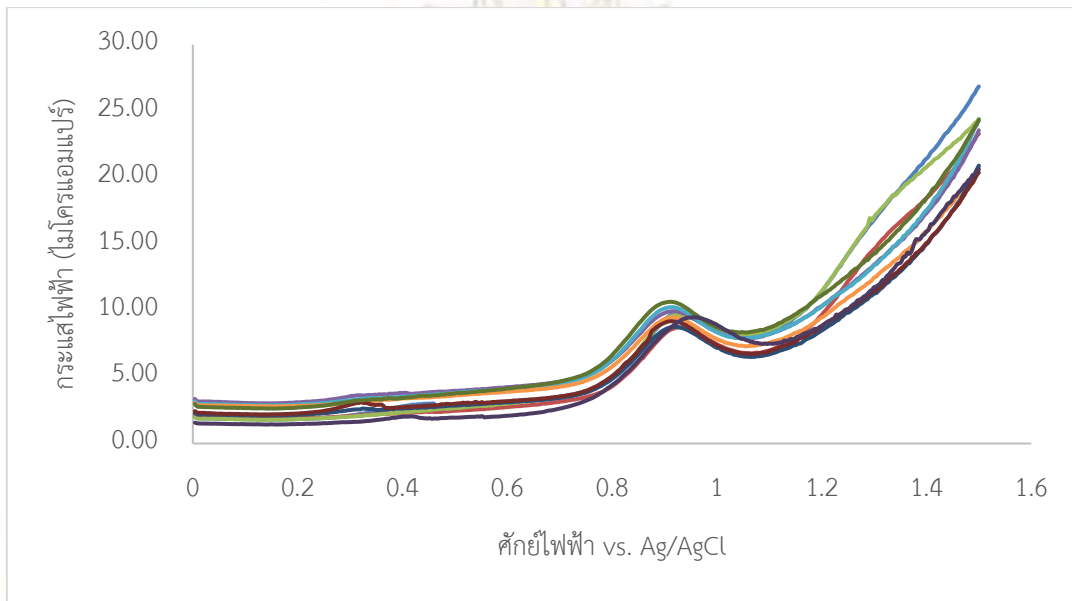
9. LibreTexts libraries. 2017. Reference electrodes. [ออนไลน์] แหล่งที่มา https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3APotentiometry/03_Potentiometric_Theory/04_Reference_Electrodes (สืบค้นเมื่อ 16 เมษายน 2560)
10. BASi. 2017. Platinum Wire Auxiliary Electrodes. [ออนไลน์] แหล่งที่มา <https://www.basinc.com/products/ec/auxele> (สืบค้นเมื่อ 16 เมษายน 2560)
11. ดร. ปริญา มาสวัสดิ์. 2550. ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน. [ออนไลน์] แหล่งที่มา www.sci.nu.ac.th/rs/upload/s/2550010001nation33.pdf (สืบค้นเมื่อ 16 เมษายน 2560)
12. DropSens. 2017. Screen-printed electrodes. [ออนไลน์] แหล่งที่มา http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html (สืบค้นเมื่อ 16 เมษายน 2560)
13. Pumera, M.; Ambrosi, A.; Bonanni, A.; Chng, E. L. K.; Poh, H. L. Graphene for Electrochemical Sensing and Biosensing. *Trends. Anal. Chem.* **2010**, *29*, 954-965.
14. Vezina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic. I. Taxonomy of the Producing Streptomyceete and Isolation of the Active Principle. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1975**, *28 (10)*, 721-726.
15. Abraham, R. T.; Wiederrecht, G. J. Immunopharmacology of Rapamycin. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 483-510.
16. Sabatini, D. M. mTOR and Cancer: Insights into a Complex Relationship. *Nat. Rev. Cancer.* **2006**, *6*, 729-734.
17. Ji, J.; Zheng, P. S. Activation of mTOR Signaling Pathway Contributes to Survival of Cervical Cancer Cells. *Gynecol. Oncol.* **2010**, *117*, 103-108.
18. Noh, W. C.; Mondesire, W. H.; Peng, J.; Jian, W.; Zhang, H.; Dong, J.; Mills, G. B.; Hung, M. C.; Bernstam, F. M. Determinants of Rapamycin Sensitivity in Breast Cancer Cells. *Clin. Cancer. Res.* **2004**, *10*, 1013-1023.
19. Marinov, M.; Fischer, B.; Arcaro, A. Targeting mTOR Signaling in Lung Cancer. *Crit. Rev. Oncol, Hematol.* **2007**, *63*, 172-182.

20. Gulhati, P.; Cai, Q.; Li, J.; Liu, J.; Rychahou, P. G.; Qiu, S.; Lee, E. Y.; Silva, S. R.; Bowen, K. A.; Gao, T.; Evers, B. M. Targeted Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Inhibits Tumorigenesis of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7207-7216.
21. Kelly, P. A.; Gruber, S. A.; Behbod, F.; Kahan, B. D. Sirolimus, a New, Potent Immunosuppressive Agent. *Pharmacotherapy.* **1997**, *17* (6), 1148-1156.
22. Jozwiak, J.; Jozwiak, S.; Oldak, M. Molecular Activity of Sirolimus and Its Possible Application in Tuberous Sclerosis Treatment. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 160-180.
23. Mondino, A.; Mueller, D. L. mTOR at the Crossroads of T Cell Proliferation and Tolerance. *Semin. Immunol.* **2007**, *19* (3), 162-172.
24. Simamora, P.; Alvarez, J. M.; Yalkowsky, S. H. Solubilization of Rapamycin. *Int. J. Pharm.* **2001**, *213*, 25-29.
25. Ping, J.; Wu, J.; Wang, Y.; Ying, Y. Simultaneous Determination of Ascorbic acid, Dopamine and Uric Acid using High-Performance Screen-Printed Graphene Electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 70-76.
26. Antiochia, R.; Gorton, Lo. A new osmium-polymer modified screen-printed graphene electrode for fructose detection. *Sens. Actuator B-Chem.* **2014**, *195*, 287-293.
27. Jones, K.; Lajevard, S, S.; Lee, T.; Horwatt, R.; Hick, D.; Johnston, A.; Holt, DW. An Immunoassay for the Measurement of Sirolimus. *Clin. Ther.* **2000**, *22*, 49-61.
28. Bouzas, L.; Hermida, J.; Tutor, JC. Determination of Blood Sirolimus Concentrations in Liver and Kidney Transplant Recipients using the Innofluor Fluorescence Polarization Immunoassay: Comparison with the Microparticle Enzyme Immunoassay and High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Method. *Ups. J. Med. Sci.* **2009**, *114*(1), 55-61.
29. Sobhani, H.; Shafaati, A.; Varcheh, N, N.; Aboofazeli, R. A Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Rapamycin. *IJPR.* **2013**, *12*, 77-81.

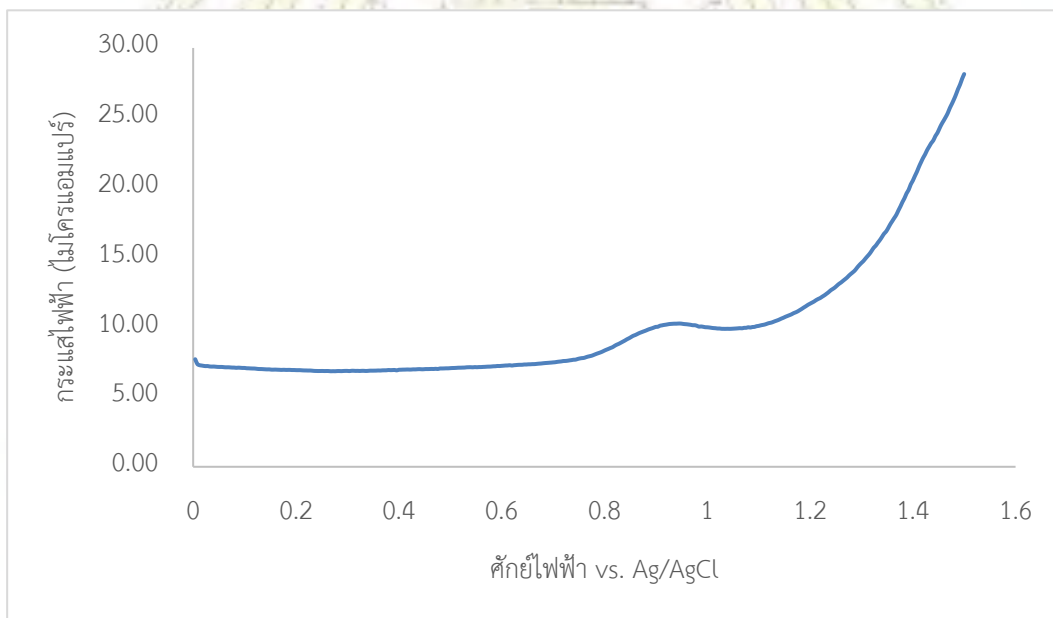
30. Stanković, D, M.; Kalcher, K. The Immunosuppressive Drug – Rapamycin – Electroanalytical Sensing Using Boron- Dopped Daimond Electrode. *Electrochim. Acta.* **2015**, *168*, 76-81.



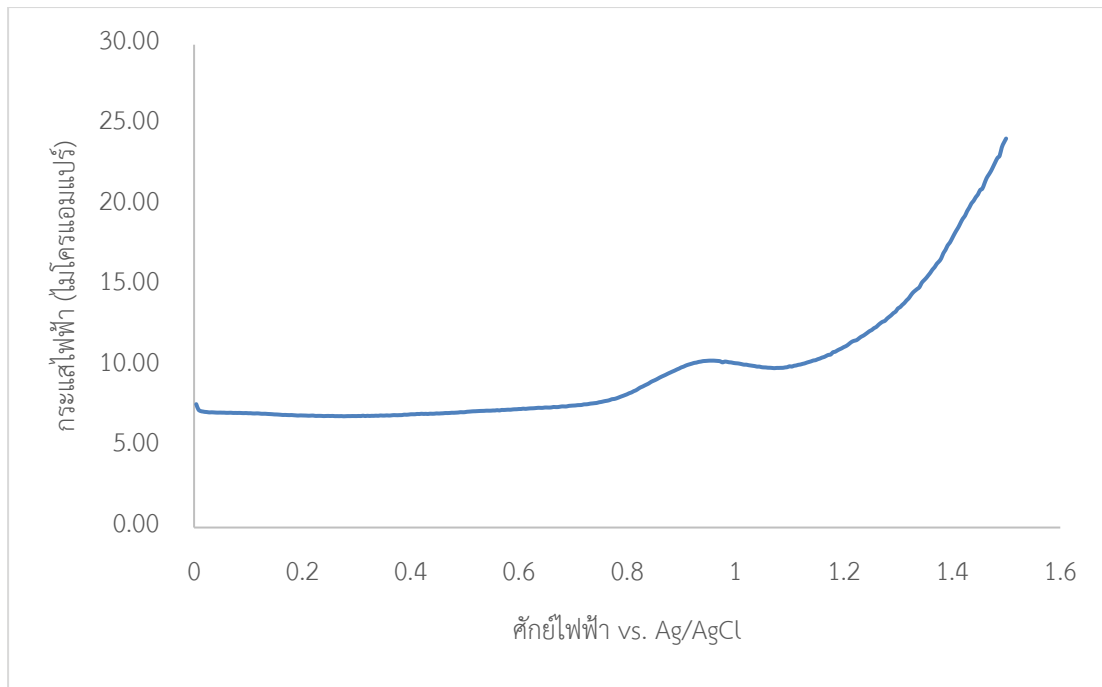
ภาคผนวก



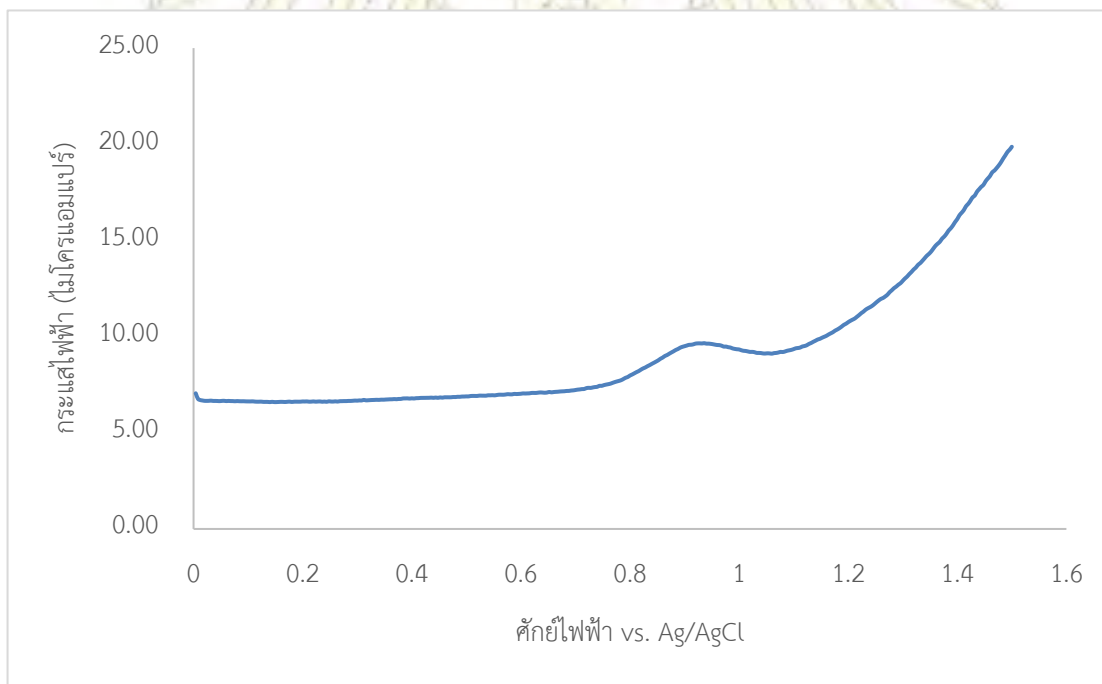
รูปที่ 1ผ. ไชคลิกโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4 จำนวน 10 ครั้ง



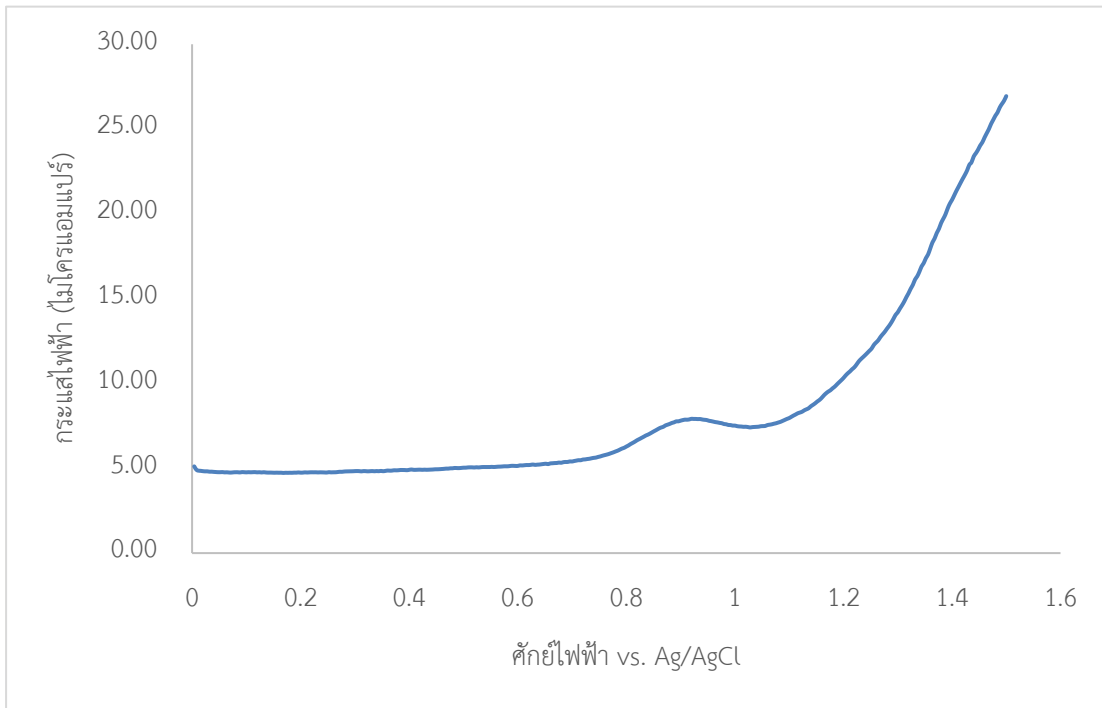
รูปที่ 2ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



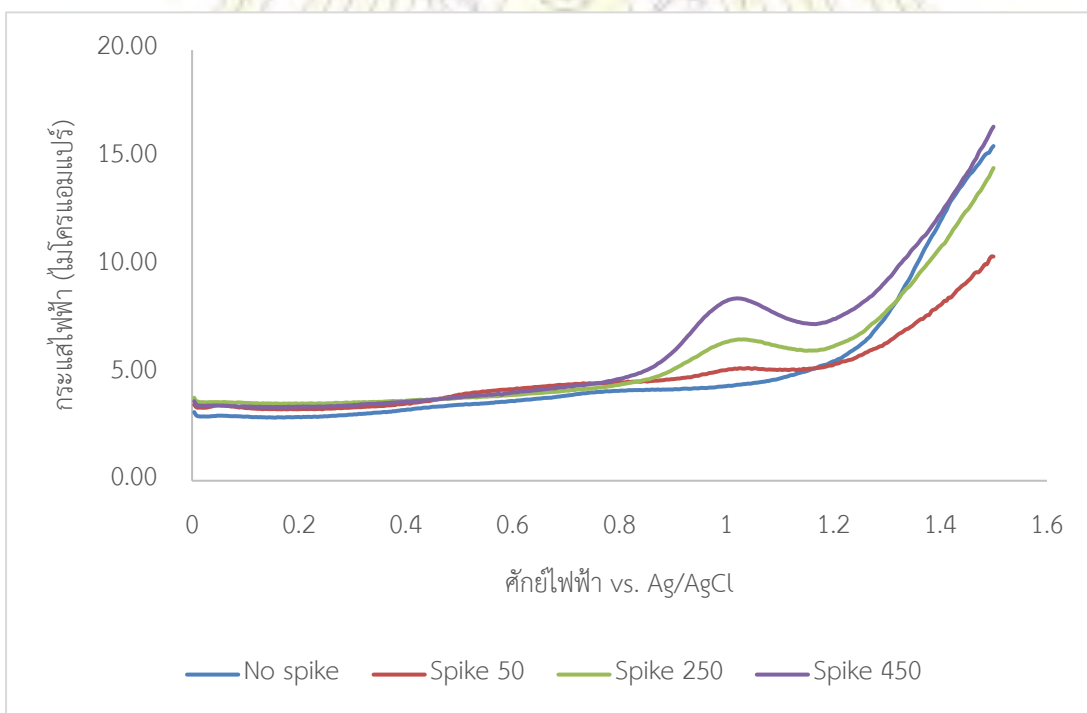
รูปที่ 3ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายรามา้ยชินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และ สารละลายโดพามีน ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



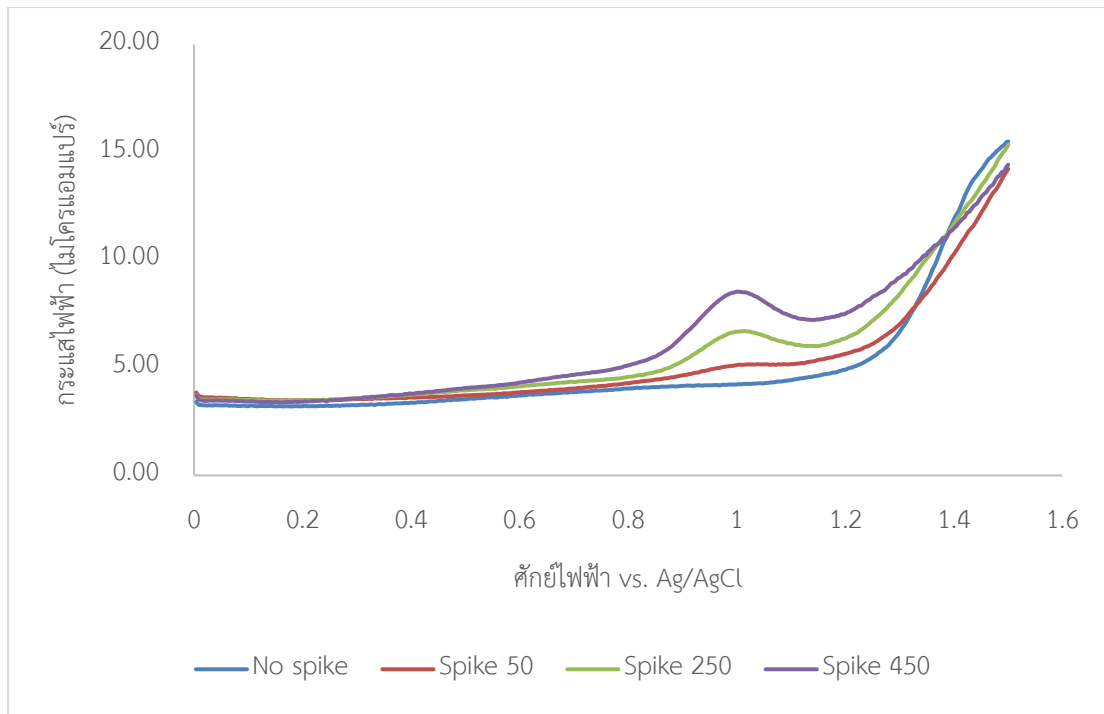
รูปที่ 4ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายรามา้ยชินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และ สารละลายกรดยูริก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของ สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



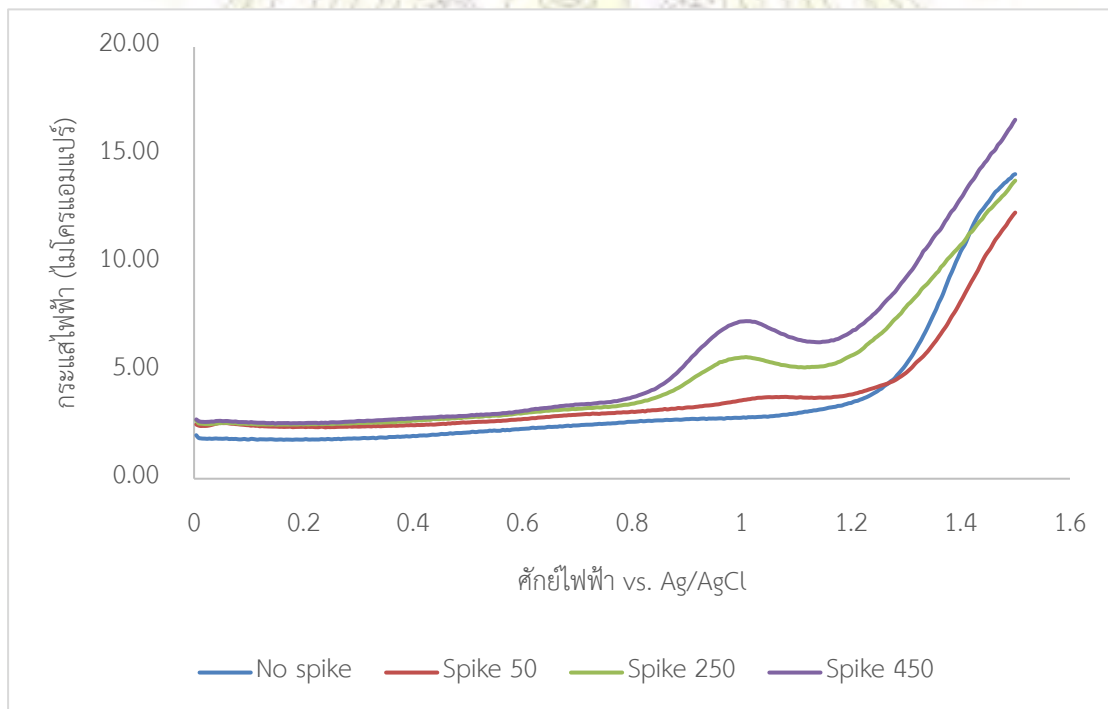
รูปที่ 5ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ และสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



รูปที่ 6ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของตัวอย่างที่ 1 ที่ไม่มี และมีสารละลายราพามัยซินความเข้มข้น 50, 250, และ 450 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



รูปที่ 7ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของตัวอย่างที่ 2 ที่ไม่มีและมีส่วนละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 50, 250, และ 450 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4



รูปที่ 8ผ. สแควร์เวฟโวลแทมเมตรีของตัวอย่างที่ 3 ที่ไม่มีและมีส่วนละลายราพามัยซิน ความเข้มข้น 50, 250, และ 450 ไมโครโมลาร์ในร้อยละ 50 ของเอทานอลต่อร้อยละ 50 ของสารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4

ตารางที่ 1ผ. แสดงค่าความแม่นยำที่ยอมรับได้

ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของ % recovery
100%	98-102
10%	98-102
1%	97-103
0.1%	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

ตารางที่ 2ผ. แสดงค่าความเที่ยงที่ยอมรับได้

ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของ % recovery
100%	± 1.3
10%	± 2.7
1%	± 2.8
0.1%	± 3.7
100 ppm	± 5.3
10 ppm	± 7.3
1 ppm	± 11
100 ppb	± 15
10 ppb	± 21
1 ppb	± 30

ที่มา: AOAC manual for Peer Verified Methods program, VA, Nov 1993

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฐนิชา ทองเชื้อ เกิดเมื่อวันที่ 16 เดือนกันยายน พ.ศ.2537 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนมัธยมสาธิตมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 95 หมู่ 13 ตำบลทุ่งหลวง อำเภอคีรีมาศ จังหวัดสุโขทัย รหัสไปรษณีย์ 64160 อีเมล natnichath1994@gmail.com

