



โพเทนทิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์

Potentiometric Biosensors

อรวรรณ ทิพย์มณี

Orawan Tipmanee

เลขหมู่	QD116.P68 1045 2544 ฉ.2
Bib Key	210605
	4 ส.ย. 2545

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

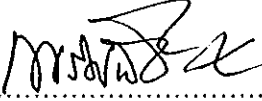
Master of Science Thesis in Analytical Chemistry

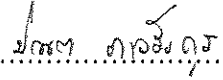
Prince of Songkla University

2544


ชื่อวิทยานิพนธ์ โฟเทนซีโอเมตริกไปโอเซนเซอร์
ผู้เขียน นางสาวอรวรรณ ทิพย์มณี
สาขาวิชา เคมีวิเคราะห์

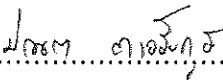
คณะกรรมการที่ปรึกษา

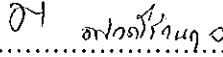

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)

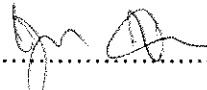

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปณิต ถาวรังกูร)

คณะกรรมการสอบ

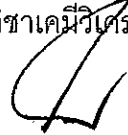

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปณิต ถาวรังกูร)


.....กรรมการ
(อาจารย์พรรณี อัสวตรีรัตน์กุล)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูศักดิ์ ลิ้มสกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎีคุณ)

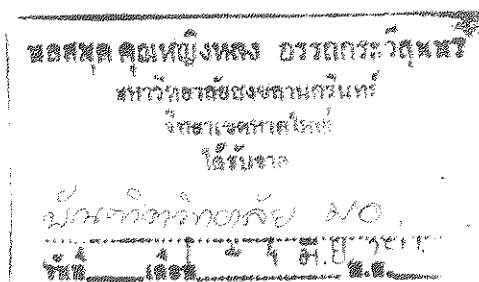
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ โฟเทนิโอเมตริกไปโอเซนเซอร์
ผู้เขียน นางสาวอรรณณ ทิพย์มณี
สาขาวิชา เคมีวิเคราะห์
ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

โฟเทนิโอเมตริกไปโอเซนเซอร์เป็นเทคนิควิเคราะห์ปริมาณสารที่อาศัยการวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออน โดยนำข้อดีของเทคนิคไปโอเซนเซอร์ เช่น มีความจำเพาะเจาะจงและไวต่อสารที่ต้องการวัด ตรวจวัดได้รวดเร็ว ราคาถูกและใช้งานง่าย มารวมกับข้อดีของเทคนิคโฟเทนิโอเมตริกคือมีความจำเพาะเจาะจงเฉพาะไอออน งานวิจัยนี้ศึกษาโฟเทนิโอเมตริกไปโอเซนเซอร์ที่ใช้กลาสพีเอซอเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ร่วมกับเอนไซม์ที่ถูกกักอยู่ในโพลีอะครีลาไมด์เจลในการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียและอะเซทิลโคลีน โดยพีเอซอเล็กโทรดจะวัดไฮโดรเจนไอออนที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียและอะเซทิลโคลีนโดยเอนไซม์ยูรีเอสและอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสตามลำดับ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เมทิลพาราไรออนและมาลาไรออน โดยอาศัยปฏิกิริยายับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียโดยเอนไซม์เมมเบรนอเล็กโทรด พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตอบสนองและลือคการีทิมของความเข้มข้นจะเป็นเชิงเส้นในช่วง 20 - 60 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีนโดยเอนไซม์รีแอกเตอร์จะมีช่วงเชิงเส้นที่ 10 - 100 มิลลิโมลาร์ โดยเอนไซม์เมมเบรนและเอนไซม์รีแอกเตอร์มีอายุการใช้งาน 2 และ 5 วัน ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง เมทิลพาราไรออนและมาลาไรออน จะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับลือคการีทิมของความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงในช่วง 10 - 40 และ 10 - 60 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ



Thesis Title Potentiometric Biosensors
Author Miss Orawan Tipmanee
Major Program Analytical Chemistry
Academic Year 2000

Abstract

Potentiometric Biosensor is a quantitative technique which is based on the measurement of the change in concentration of ions from the reaction. This sensor combines the advantages of a biosensor, such as specificity, sensitivity, speed, low-cost and easy to use, and the selectivity of particular ionic species of the potentiometric technique. This work focused on potentiometric biosensors that use a glass pH electrode as a transducer in combination with enzymes entrapped in polyacrylamide gel for the determination of urea or acetylcholine by the enzymes urease and acetylcholinesterase respectively. Organophosphorus insecticides, methyl parathion and malathion, were also analysed by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase.

The linear relationship between the change of potential and the log of urea concentration determined by the enzyme membrane electrode was between 20 - 60 mM. In the case of acetylcholine, the responses of the enzyme reactor was linear in the range of 10 - 100 mM. The lifetimes of the enzyme membrane and enzyme reactor were 2 and 5 days respectively. For the determination of the insecticides, methyl parathion and malathion, the linear relationship between the percentages of inhibition and the log of concentrations were 10 - 40 ppm and 10 - 60 ppm respectively.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยความสามารถของบุคคลหลายท่านด้วยกัน อันได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร. เพรศพิชญ์ คณาธารณา อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร. ปณต ภาวรัญจวน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับวิทยานิพนธ์นี้ตลอดมาตั้งแต่ต้นจนจบการศึกษา ผู้ทำวิทยานิพนธ์จึงขอกราบขอบพระคุณบุคคลทั้งสองท่านไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์พรณี อัสวตรีรัตนกุล ที่ได้ให้คำแนะนำบางประการ ตลอดจนบุคลากรของภาควิชาเคมีและฟิสิกส์ทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกและช่วยเหลือในเรื่องสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบคุณอาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้ความรู้ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะกรรมการควบคุมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ทุกท่านที่กรุณาเสนอแนะแก้ไขเพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์มีความถูกต้องสมบูรณ์มากขึ้น

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณต่อคุณพ่อ คุณแม่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) สำหรับทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนงานวิทยานิพนธ์บางส่วน และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนทำวิทยานิพนธ์บางส่วน และขอบคุณพี่ น้อง รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาปริญญาโทที่เป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมาจนสำเร็จ

อรวรรณ ทิพย์มณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	3
1.3 วัตถุประสงค์	8
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	9
1.5 ขอบเขตและวิธีดำเนินการ	9
2. วิธีการวิจัย	10
2.1 วัสดุและสารเคมี	10
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
2.2.1 อุปกรณ์ในระบบวิเคราะห์	11
2.2.2 อุปกรณ์อื่นๆ	11
2.3 หลักการวัดโดยเทคนิคโพเทนชิโอเมตริก	11
2.4 การตรึงเอนไซม์	14
2.5 ระบบการทดลองและการวิเคราะห์ผล	16
2.5.1 ระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์ยูเรีย	16
2.5.2 ระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์อะเซทิลโคลีน	18
2.5.3 ระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง	19
2.6 ลักษณะของสัญญาณการตอบสนอง	20
2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าและความเข้มข้นของสาร	22
	(6)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย	22
2.8.1 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด	23
2.8.2 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด เมื่อผ่านสารละลายแบบพัลส์	23
2.8.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์ เมมเบรนอิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย	24
2.8.4 ผลของอายุของเอนไซม์เมมเบรน	24
2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีน	25
2.9.1 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีน เอสเทอร์	25
2.9.2 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีน เอสเทอร์เมื่อผ่านสารละลายแบบพัลส์	26
2.9.3 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์	26
2.9.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์และความเข้มข้นของสารละลาย อะเซทิลโคลีน	26
2.9.5 ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์	27
2.9.6 ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์	27
2.9.7 ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์รีแอกเตอร์	27
2.10 การศึกษาการยับยั้งเนื่องจากยาฆ่าแมลง	28
2.10.1 ผลของ incubation time	28
2.10.2 ผลของปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ต่อการยับยั้ง	29
2.10.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย เมทิลพาราไทออนและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	29

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
2.10.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย มาลาไธออนและเปอร์เซนต์การยับยั้ง	30
3. ผลและการอภิปรายผล	31
3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย	31
3.1.1 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด	31
3.1.2 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดในลักษณะ ผ่านสารละลายแบบพัลส์	34
3.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรน อิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย	36
3.1.4 ผลของอายุของเอนไซม์เมมเบรน	39
3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีน	42
3.2.1 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีน เอสเทอร์เอส	42
3.2.2 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีน เอสเทอร์เอสในลักษณะผ่านสารละลายแบบพัลส์	45
3.2.3 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์เอส	48
3.2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์เอสและความเข้มข้นของสารละลาย อะเซทิลโคลีน	51
3.2.5 ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์	54
3.2.6 ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์	57
3.2.7 ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์รีแอกเตอร์	60
3.3 การศึกษาการยับยั้งเนื่องจากยาฆ่าแมลง	64
3.3.1 ผลของ incubation time	64
3.3.2 ผลของปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์เอส ต่อการยับยั้ง	66

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย เมทิลพาราไรบอนและเปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนอง ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	68
3.3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย มาลาไรบอนและเปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนอง ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	72
4. บทสรุป	76
บรรณานุกรม	80
ประวัติผู้เขียน	85

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. ช่วงเวลาต่างๆ และขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลง (สัญญาณการตอบสนอง) ของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบต่อเนื่องด้วย อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	32
2. ช่วงเวลาต่างๆ ของการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดในลักษณะ ผ่านสารละลายแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตร ต่อนาที	34
3. การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลาย ยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	37
4. การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลาย ยูเรียจากการใช้เอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมใหม่และทดลองซ้ำกับเอนไซม์เมมเบรน อันเดิมในวันที่ 2 และ 3	39
5. ช่วงเวลาต่างๆ และขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (สัญญาณการตอบสนอง) ของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน แบบต่อเนื่อง ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	44
6. ช่วงเวลาต่างๆ ของการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ในลักษณะผ่านแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	46
7. ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปในระบบไหลผ่าน	49
8. การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและความเข้มข้น ของสารละลายอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	51
9. ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	55

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
10. ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	58
11. สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่เตรียมในครั้งเดียวกันและต่างครั้งกัน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	61
12. ผลของ incubation time และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) ที่ถูกยับยั้งโดยสารละลายเมทิลพาราไรออนและมาลาไรออนที่มีความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน	64
13. ผลของปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสต่อเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) โดยผ่านสารละลายเมทิลพาราไรออนและมาลาไรออนที่มีความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที	66
14. เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) และความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบไหลผ่าน ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที	69
15. เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) และความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออน	71
16. เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบไหลผ่าน 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที	72
17. เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออน	74

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. เซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับวัดโดยเทคนิคโพเทนทิโอมेटริก	12
2. เอมไซม์อิเล็กโทรดที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย	15
3. ลักษณะชั้นของยูเรียเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด ยูเรียจะแพร่ผ่าน เซลล์โอสอะซีเตทเมมเบรนเข้าสู่ชั้นของเอนไซม์เจลและเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส	16
4. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์ยูเรีย	17
5. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์อะเซทิลโคลีน	18
6. สัญญาณการตอบสนองแบบคงที่	21
7. สัญญาณการตอบสนองแบบพัลส์	21
8. สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเมื่อผ่าน สารละลายยูเรียแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	32
9. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลือคการิทึมของ ความเข้มข้นของยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบต่อเนื่องด้วย อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	33
10. สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเมื่อผ่าน สารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	35
11. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลือคการิทึมของ ความเข้มข้นของยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	35
12. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลือคการิทึมของ ความเข้มข้นของยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	38

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
13. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลือคการิทึมของความเข้มข้นของยูเรีย เมื่อใช้เอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมใหม่และทำซ้ำกับเอนไซม์เมมเบรนอันเดิมในวันที่ 2 และ 3 โดยผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	40
14. สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	43
15. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	44
16. สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	46
17. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	47
18. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีนที่อัตราไหล 0.10, 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปในระบบไหลผ่าน	50
19. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปในระบบไหลผ่านด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	52
20. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรเท่ากันแต่มีขนาดต่างกัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	56

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
21. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการทิมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีอายุ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	59
22. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการทิมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่เตรียมจากเอนไซม์เจสในครั้งเดียวกัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	62
23. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการทิมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่เตรียมจากเอนไซม์เจสต่างครั้งกัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	63
24. ความสัมพันธ์ระหว่าง incubation time และเปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ส (%I) เมื่อยับยั้งด้วยสารละลายเมทิลพาราโรฮอนและมาลาโรฮอนที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน	65
25. ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ส (%I) และปริมาณของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์สภายในเอนไซม์รีแอกเตอร์ในปริมาณต่างๆ กัน เมื่อยับยั้งเอนไซม์ด้วยสารละลายเมทิลพาราโรฮอนและมาลาโรฮอนที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน และใช้ incubation time 30 นาที	67
26. ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราโรฮอน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที	70
27. ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราโรฮอน 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในล้านส่วน	71

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
28. ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาโรดอน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที	73
29. ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาโรดอน 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ส่วนในล้านส่วน	74

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

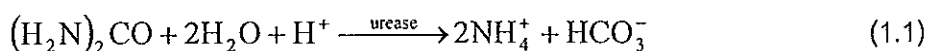
การตรวจวัดปริมาณสารมีจุดมุ่งหมายเพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หรือตัวแปรต่างๆทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตและเมื่อสิ้นสุดกระบวนการโดยมีการพัฒนาทั้งรูปแบบและวิธีการวิเคราะห์สำหรับการตรวจวัดตัวแปรทางเคมีมักอาศัยเครื่องมือต่างๆ เช่น แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) และสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการวิเคราะห์มักมีขั้นตอนมาก ใช้เวลาในการตรวจวัดนาน สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย สารตัวอย่างมักถูกทำลาย ผู้ปฏิบัติต้องมีความรู้ความชำนาญทั้งการเตรียมสารและการวิเคราะห์ (Jeanty and Marty, 1998) จึงมีผู้พยายามหาเทคนิคใหม่ๆเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ไบโอเซนเซอร์ (biosensors) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร โดยมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ.1962 (Eggins, 1996) เทคนิคนี้อาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างวัสดุชีวภาพ (biological material) กับทรานสดิวเซอร์ (transducer) วัสดุชีวภาพที่ใช้ในไบโอเซนเซอร์มีหลายประเภท เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ และจุลินทรีย์ โดยวัสดุชีวภาพจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (Eggins, 1996) สัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะตรวจจับโดยทรานสดิวเซอร์และถูกแปลงให้เป็นสัญญาณอิเล็กทรอนิกส์ที่สามารถนำไปแสดงผลต่อไป (Tran-Minh, 1993a) ดังนั้นทรานสดิวเซอร์ที่เลือกใช้จะต้องตอบสนองต่อสัญญาณที่เกิดขึ้นได้อย่างเหมาะสม ชนิดของทรานสดิวเซอร์ที่นิยมใช้ในระบบไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ เทอร์มิสเตอร์ (thermistor) ออปติคัล (optical) แอมเพโรเมตริก (amperometric) และโพเทนชิโอเมตริก (potentiometric) เป็นต้น (Turner, 1989)

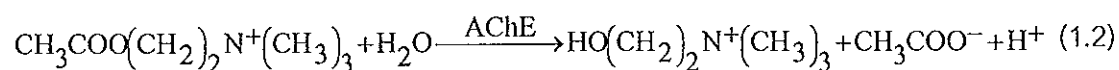
โพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิควิเคราะห์ปริมาณสารที่อาศัยหลักการการวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออน (Tran-Minh, 1993a) โดยนำข้อดีของเทคนิคไบโอเซนเซอร์คือ มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการวิเคราะห์ รวดเร็ว ราคาถูก และใช้งานง่าย มารวมกับข้อดีของเทคนิคโพเทนชิโอเมตริกคือมีความจำเพาะเจาะจงเฉพาะไอออน (Turner *et al* ., 1987)

งานวิจัยนี้ทดสอบการใช้เทคนิคโพเทนซิโอเมตริกในระบบไบโอเซนเซอร์ โดยใช้กลาสพีเอช อิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ เนื่องจากปฏิกิริยาหลายชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอช (ปริมาณไฮโดรเจนไอออน) (Eggins, 1996) ประกอบกับกลาสพีเอชอิเล็กโทรดมีความจำเพาะต่อ ไฮโดรเจนไอออน หาได้ง่ายและราคาไม่แพง สำหรับวัสดุชีวภาพจะใช้เอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์ มีความจำเพาะกับสับสเตรทและสามารถเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้น (ปราณี อานเป็รื่อง, 2535) โดยระบบโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เป็นกรณีศึกษาคือ ไบโอเซนเซอร์ สำหรับยูเรียและอะเซทิลโคลีนเนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารทั้งสองนี้จะมีการเปลี่ยนแปลง พีเอช

การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียโดยเอนไซม์ยูรีเอส (urease) (Eggenstein *et al.*, 1995) มีการใช้ไฮโดรเจนไอออน (H^+) และได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) และไฮโดรเจนคาร์บอเนต ไอออน (HCO_3^-) ดังปฏิกิริยา (1.1)



ดังนั้นปริมาณไฮโดรเจนไอออนในสารละลายจะลดลงนั่นคือพีเอชเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีนโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase ; AChE) (Hendji *et al.*, 1993) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นโคลีน ($HO(CH_2)_2N^+(CH_3)_3$) และกรดอะซิติก (CH_3COOH) ซึ่งกรดอะซิติกจะแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออนทำให้พีเอช ของสารละลายลดลง ดังปฏิกิริยา



การพัฒนาไบโอเซนเซอร์นอกจากการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาแล้วยังสามารถใช้เอนไซม์ไบโอ เซนเซอร์ในการหาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบการตอบสนองของเอนไซม์ต่อ สับสเตรทก่อนและหลังจากการได้รับสารยับยั้ง (inhibitor) และในงานวิจัยนี้จะศึกษาโพเทนซิโอ เมตริกไบโอเซนเซอร์สำหรับยาฆ่าแมลงโดยใช้การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยยา ฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

1.2 การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันไบโอเซนเซอร์เป็นงานวิจัยชั้นนำในด้านเทคโนโลยีเซนเซอร์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการวิเคราะห์ ราคาไม่มากนักและง่ายในการใช้งาน (Eldefrawi,1993) จึงมีการนำไบโอเซนเซอร์ไปใช้ในงานด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Eggin,1996)

การจัดประเภทของไบโอเซนเซอร์อาจจะแบ่งตามชนิดของวัสดุชีวภาพ เช่น เอนไซม์เซนเซอร์ ไมโครเบียลเซนเซอร์ และไบโอแอฟฟินิตีเซนเซอร์ เป็นต้น หรือแบ่งตามประเภทของทรานสดิวเซอร์ เช่น คอนดักโตเมตริกไบโอเซนเซอร์ ออปติคัลไบโอเซนเซอร์ เทอร์โมเมตริกไบโอเซนเซอร์ พิโซอิเล็กตริกไบโอเซนเซอร์ แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์และโพเทนซิโอมेटริกไบโอเซนเซอร์ เป็นต้น (Tran-Minh,1993a)

โพเทนซิโอมेटริกไบโอเซนเซอร์ เป็นการนำข้อได้เปรียบของเทคนิคไบโอเซนเซอร์มารวมกับข้อได้เปรียบของเทคนิคโพเทนซิโอมेटริกทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์ปริมาณสารที่มีประสิทธิภาพสูง (Eldefrawi,1993) ทรานสดิวเซอร์แบบโพเทนซิโอมेटริกจะทำงานภายใต้สภาวะสมดุล โดยวัดความหนาแน่นของประจุที่ใช้เป็นสัญญาณซึ่งนำซึ่งสะสมอยู่บนผิวหน้าอิเล็กโทรด ประจุของไอออนทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรดทำงานเมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิงเปลี่ยนแปลงไป โดยค่าของศักย์ไฟฟ้า (E) จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไอออนในสภาวะสมดุลตามสมการเนินสต์ (Skoog and West,1963)

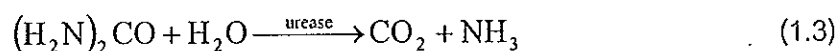
$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

โดย E^0 คือค่าศักย์ไฟฟ้ามาตรฐาน R เป็นค่าคงที่ของแก๊ส T คืออุณหภูมิ n คือจำนวนอิเล็กตรอนที่ถ่ายเทในระบบ F คือค่าคงที่ของฟาราเดย์ a_{ox} และ a_{red} แทนแอกติวิตีของตัวออกซิไดส์และตัวรีดิวซ์ในระบบ

โพเทนซิโอมेटริกทรานสดิวเซอร์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในทางด้านไบโอเซนเซอร์คือไอออนซีเลคที่ฟิสิกส์อิเล็กโทรดที่มีเมมเบรนเลือกผ่านทำหน้าที่คัดเลือกเฉพาะไอออนที่ต้องการ นอกจากกลาสที่ไอออนซีเลคที่ฟิสิกส์อิเล็กโทรดที่มีกลาสเมมเบรนคัดเลือกเฉพาะโปรตอนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายแล้วยังมีไอออนซีเลคที่ฟิสิกส์อิเล็กโทรดที่ใช้วัดปริมาณไอออนชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการพัฒนาเมมเบรนเลือกผ่านที่สามารถคัดเลือกเฉพาะไอออนเหล่านี้ ตัวอย่างของไอออนที่สามารถตรวจวัดได้ เช่น

Na^+ K^+ Ca^{2+} Li^+ NH_4^+ รวมทั้งไอออนลบบางชนิด ทำให้สามารถนำไอออนซีเลคที่ฟิเล็กโทรดไปใช้ในงานด้านไบโอเซนเซอร์ได้กว้างยิ่งขึ้น โดยทั่วไปไอออนซีเลคที่ฟิเล็กโทรดจะให้สัญญาณการตอบสนองที่มีความเป็นเชิงเส้นเมื่ออยู่ในรูปลอคการิทึมในช่วงความเข้มข้น 10^{-1} โมลาร์ ถึง 10^{-5} โมลาร์ (Turner *et al.*, 1987)

ตัวอย่างการใช้โพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์วิเคราะห์หาปริมาณสาร เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียในเลือดและปัสสาวะโดยใช้แอมโมเนียมซีเลคที่ฟิเล็กโทรดร่วมกับเอนไซม์ยูรีเอส โดยเซนเซอร์ชนิดนี้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรีย (ปฏิกิริยา 1.1) ในเซนเซอร์ดังกล่าวเอนไซม์ยูรีเอสถูกตรึงในโพลีอะคริลไมด์เจลที่หุ้มอยู่ที่หัวแอมโมเนียมซีเลคที่ฟิเล็กโทรด เอนไซม์เจลจะมีอายุการใช้งานประมาณ 2 สัปดาห์ (Guilbault *et al.*, 1969) แต่การใช้เอนไซม์เจลหุ้มที่หัวอิเล็กโทรดโดยตรงทำให้เกิดการสูญเสียเอนไซม์และเกิดการแตกของเจลในระหว่างการใช้งาน จึงได้แก้ปัญหาโดยใช้เซลโลเฟลนเมมเบรนคลุมทับเอนไซม์เจลก่อนที่จะนำไปหุ้มที่หัวอิเล็กโทรดทำให้ได้เซนเซอร์ที่มีความเสถียรยิ่งขึ้น สำหรับอายุการใช้งานของเอนไซม์เมมเบรนที่ปรับปรุงแล้วนี้อยู่ที่ประมาณ 3 สัปดาห์ (Guilbault and Montalvo, 1970) ปัญหาอีกประการหนึ่งของแอมโมเนียมซีเลคที่ฟิเล็กโทรดคือจะตอบสนองต่อไอออนชนิดอื่น เช่น โซเดียมและโพแทสเซียมไอออนที่มีอยู่ในเลือดและปัสสาวะ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้มีผู้พัฒนาแอมโมเนียเซนเซอร์ที่วัดแก๊สแอมโมเนียที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียโดยเอนไซม์ยูรีเอส ที่ค่าพีเอช 8.5 ดังปฏิกิริยา



เซนเซอร์ชนิดนี้เตรียมโดยตรึงเอนไซม์ยูรีเอสบนเมมเบรนของแอมโมเนียแก๊สเมมเบรนอิเล็กโทรด แต่เนื่องจากแก๊สแอมโมเนียแพร่ผ่านเมมเบรนได้ช้าทำให้ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ จึงมีผู้พัฒนาอิเล็กโทรดเป็นแบบช่องอากาศ (Guilbault and Tarp, 1974) โดยอิเล็กโทรดชนิดนี้ จะไม่มีเมมเบรนหุ้มอยู่ที่ส่วนหัวแต่จะมีช่องว่างคั่นกลางระหว่างสารละลายตัวอย่างและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ซึ่งได้แก่สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเคลือบอยู่ที่หัวอิเล็กโทรด แก๊สแอมโมเนียที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียจะแพร่ผ่านช่องว่างดังกล่าวมาสัมผัสกับหัวของอิเล็กโทรดโดยตรง ซึ่งการแพร่ของแก๊สแอมโมเนียในลักษณะดังกล่าวจะช่วยลดเวลาของการวิเคราะห์ให้เหลือ 2 - 4 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 2×10^{-2} โมลาร์ อย่างไรก็ตามค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ยูรีเอส

คือ 7 ในขณะที่แอมโมเนียแก๊สเมมเบรนอิเล็กโทรดมีค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ 8.5 ซึ่งหากระบบการวิเคราะห์เป็นแบบเอนไซม์อิเล็กโทรดพีเอชที่สูงนี้จะทำให้การตอบสนองของเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร จึงมีผู้พัฒนาระบบการวิเคราะห์แบบไหลผ่านที่ใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ (Johanson and Ögran, 1976) โดยตั้งเอนไซม์ยูรีเอสบนเม็ดแก้วหรือโพลีอะครีลาไมด์เจลแล้วบรรจุในคอลัมน์ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียจะเกิดขึ้นในเอนไซม์รีแอกเตอร์โดยผ่านสารละลายที่มีค่าพีเอช 7 ในปฏิกิริยานี้จะมีแอมโมเนียไอออนเกิดขึ้น (ปฏิกิริยา 1.1) จากนั้นให้แอมโมเนียไอออนทำปฏิกิริยากับสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์เกิดเป็นแก๊สแอมโมเนียและตรวจวัดด้วยแอมโมเนียแก๊สเมมเบรนอิเล็กโทรด เซนเซอร์ชนิดนี้ให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 5×10^{-5} ถึง 3×10^{-2} โมลาร์ ต่อมามีการพัฒนาระบบการวิเคราะห์เป็นแบบโฟลว์อินเจกชันและใช้ไดอะไลซิสเมมเบรนกำจัดสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่รบกวนสัญญาณการตอบสนอง (Gorton and Ögran, 1981) เซนเซอร์ชนิดนี้ให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 10^{-1} โมลาร์ และใช้สารตัวอย่างเพียง 100 ไมโครลิตร

นอกจากการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียแล้วยังมีการพัฒนาแอมโมเนียไอออนเอนไซม์อิเล็กโทรดสำหรับวัดปริมาณไลซีนในยาสชนิดต่างๆ เช่น ซัลโวโคลอน ไตรเมทาโบ โดยวัดปริมาณแอมโมเนียไอออนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลซีน (Saurina *et al.*, 1998) แอมโมเนียไอออนเอนไซม์อิเล็กโทรดชนิดนี้เตรียมโดยตั้งเอนไซม์ไลซีนออกซิเดสบนเมมเบรนแล้วนำไปหุ้มที่หัวแอมโมเนียซีเลคทีฟอิเล็กโทรดแล้วหุ้มทับด้วยไดอะไลซิสเมมเบรน เซนเซอร์ชนิดนี้ให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 3×10^{-5} ถึง 10^{-3} โมลาร์ แต่เนื่องจากเซนเซอร์ชนิดนี้ยังให้การตอบสนองต่อโมโนวาเลนต์แคทไอออนชนิดอื่นที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง จึงได้มีผู้ทดลองใช้เรซินแลกเปลี่ยนแคทไอออนเพื่อกำจัดไอออนรบกวนดังกล่าว (Saurina *et al.*, 1999) ทำให้ขีดจำกัดของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นและให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 6×10^{-6} ถึง 10^{-3} โมลาร์

ในทำนองเดียวกับยูเรียปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของครีเอตินินจะมีแอมโมเนียเกิดขึ้น จึงมีการใช้แอมโมเนียเอนไซม์อิเล็กโทรดในการหาปริมาณครีเอตินิน (Meyerhoff and Rechnitz, 1976) โดยตั้งเอนไซม์ครีเอตินเนสบนหัวแอมโมเนียแก๊สเมมเบรนอิเล็กโทรดแล้วหุ้มทับด้วยเซลโลเฟลนเมมเบรน เซนเซอร์ชนิดนี้จะให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 4.2×10^{-4} ถึง 8.9×10^{-3} โมลาร์ และมีอายุการใช้งาน 4 วัน อย่างไรก็ตามเซลโลเฟลนเมมเบรนมีรูพรุนขนาดเล็กทำให้การแพร่ผ่านของสารเป็นไปได้อย่างส่งผลให้การตอบสนองของเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร เพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงมีผู้พัฒนาระบบวิเคราะห์ที่ตรงเอนไซม์ครีเอตินเนสบนผิวหนังด้านในของท่อ

ไนลอนและใช้แอมโมเนียแก๊สเมมเบรนอิเล็กโทรดวัดปริมาณแอมโมเนียของสารละลายที่ไหลผ่านท่อไนลอน (Mascini and Palleschi, 1982) วิธีนี้ทำให้ขีดจำกัดในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นและให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 10^0 ถึง 10^2 โมลาร์ และท่อไนลอนที่มีเอนไซม์ครีเอทีนเนสเคลือบอยู่ที่ผิวด้านในจะมีอายุการใช้งาน 6 เดือน

แม้ว่าไอออนซีเลคทีฟอิเล็กโทรดจะมีเมมเบรนเลือกผ่านทำหน้าที่คัดเลือกเฉพาะไอออนที่ต้องการแต่เมมเบรนเลือกผ่านเหล่านี้จะไวต่อไอออนได้หลายตัว (ภวัชชัย ศรีวิบูลย์, 2535) ดังนั้นการใช้ไอออนซีเลคทีฟอิเล็กโทรดอาจจะได้รับผลการรบกวนเนื่องจากไอออนชนิดต่างๆที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีผู้นำกลาสพีเอซีอิเล็กโทรดมาทำหน้าที่เป็นทรานสดิวเซอร์ เนื่องจากกลาสพีเอซีอิเล็กโทรดเป็นอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะต่อไฮโดรเจนไอออนเท่านั้น อีกทั้งหาซื้อได้ง่ายและราคาไม่แพงจนเกินไป ดังนั้นในงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ใช้เทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์จึงนิยมใช้กลาสพีเอซีอิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ (Koncki *et al.*, 1999a ; Koncki *et al.*, 1999b) โดยมีการใช้กลาสพีเอซีอิเล็กโทรดในโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารชนิดต่างๆ เช่น RNA DNA กลูโคส กรดอะมิโน เพนนิซิลิน อะเซทิลโคลีน และยูเรีย เป็นต้น (Turner *et al.*, 1987)

งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้กลาสพีเอซีอิเล็กโทรดในระบบไบโอเซนเซอร์ โดยใช้หาปริมาณยูเรียและอะเซทิลโคลีนเป็นกรณีศึกษา เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไฮโดรเจนไอออนในสารละลายนั้นคือมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช และในกรณีของอะเซทิลโคลีนได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วย (Tran - Minh *et al.*, 1990)

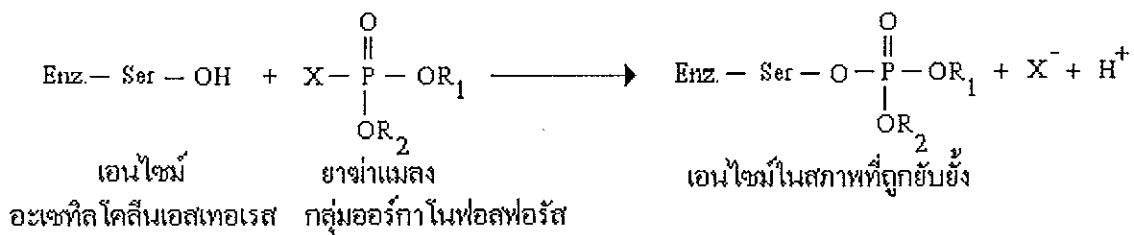
ยูเรีย (urea, H_2NCONH_2) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีผลลิซีขาวและมีชื่อทางเคมีว่าคาร์บาไมด์ ยูเรียส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ โดยจะมีไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ที่ถูกกำจัดออกทางผิวหนังหรือระบบย่อยอาหาร (Taylor and Vadgama, 1992) ในเลือดของคนปกติจะมีปริมาณยูเรียในช่วง 1.3 - 4.3 มิลลิโมลาร์ (Anderson and Cockayne, 1993) แต่ในกรณีที่เป็นโรคบางชนิดก็จะทำให้ปริมาณยูเรียในเลือดเปลี่ยนแปลงไป เช่น กรณีที่ตับทำงานผิดปกติจะทำให้การผลิตยูเรียน้อยกว่าปกติส่งผลให้ปริมาณยูเรียในเลือดมีค่าลดลง หรือในกรณีที่ไตทำงานผิดปกติก็จะทำให้ความสามารถในการกำจัดยูเรียออกจากร่างกายน้อยลงทำให้ปริมาณยูเรียในเลือดมีค่าสูงกว่าปกติ (Llenado and Rechnitz, 1974) ด้วยเหตุนี้ปริมาณยูเรียในเลือดจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำกรวิเคราะห์กันมากในด้านการแพทย์

หากพิจารณาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียด้วยเอนไซม์ยูรีเอสจะเห็นว่าปริมาณ

ไฮโดรเจนไอออนในสารละลายจะลดลง (ปฏิกิริยาที่ 1.1) เป็นผลให้พีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสามารถตรวจวัดปริมาณยูเรียโดยใช้กลาสพีเอชอิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ ในงานวิจัยที่มีผู้ทำมาแล้วจะใช้การตรวจสอบค่าเอนไซม์ยูเรียเอสด้วยกลูตาไรลดีไฮด์กับพีเอชเซนซีทีฟเมมเบรนอิเล็กโทรด ยูเรียเซนเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะและมีความไววิเคราะห์ดี (Koncki *et al.*, 1999a ; Koncki *et al.*, 1999b) แต่ความแม่นยำของสัญญาณและอายุการใช้งานของเซนเซอร์ต่ำ เนื่องจากการสูญเสียเอนไซม์ในระหว่างการใช้งาน ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจสอบค่าจะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว แต่วิธีดังกล่าวจะรบกวนผิวหน้าของอิเล็กโทรดโดยตรง เอนไซม์บางส่วนสูญเสียความสามารถไประหว่างการตรวจสอบค่า (Kano *et al.*, 1994) นอกจากนี้ชั้นของเอนไซม์ที่อยู่บนเมมเบรนทำให้การแพร่ของไอออนผ่านเมมเบรนเข้าไปในอิเล็กโทรดเกิดได้น้อยลงทำให้สัญญาณการตอบสนองลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุให้ระบบไม่เสถียร (Ivnitskii and Rishpon, 1994) เพื่อลดปัญหาดังกล่าวงานวิจัยนี้จะทดลองตรึงเอนไซม์ยูเรียเอสในโพลีอะครีลาไมด์เจลบนแผ่นเมมเบรนซึ่งนำไปครอบที่หัวกลาสพีเอชอิเล็กโทรด โดยคาดว่าวิธีนี้จะลดการรบกวนการทำงานของอิเล็กโทรด

อะเซทิลโคลินเป็นสารอีกตัวหนึ่งที่ใช้เป็นกรณีศึกษา เนื่องจากอะเซทิลโคลินเป็นสารที่มีความสำคัญในระบบประสาท โดยจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทระหว่างเซลล์ประสาทซึ่งพบได้ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและที่ปลายเซลล์ประสาทส่วนที่จับกับกล้ามเนื้อ อะเซทิลโคลินจะทำหน้าที่ส่งสัญญาณประสาทจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปยังอีกเซลล์ประสาทหนึ่ง และภายหลังส่งสัญญาณประสาทอะเซทิลโคลินจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยมีเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (สุภาณี, 2540) ผลจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะได้โคลินและกรดอะซิติก (ปฏิกิริยาที่ 1.2) โดยปกติปริมาณอะเซทิลโคลินที่ตำแหน่งต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลางและปลายประสาทจะมีปริมาณต่างกัน เช่น ที่ปลายประสาทของกล้ามเนื้อช่องท้องจะมีปริมาณอะเซทิลโคลินในช่วง 0.8 - 3.0 มิลลิโมลาร์ (Bergmeyer, 1974) แต่ในกรณีที่เอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้ง เช่น ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมตจะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลินได้จึงทำให้ปริมาณอะเซทิลโคลินสูงกว่าระดับปกติ และจะมีผลไปขัดขวางการส่งสัญญาณประสาทที่จะเกิดขึ้นต่อไป ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการชัก เป็นอัมพาต และตายในที่สุด (สุภาณี, 2540) ด้วยเหตุนี้การตรวจวัดปริมาณอะเซทิลโคลินจึงมีความสำคัญ นอกจากศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลินโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสแล้วยังศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ด้วย โดยเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจะถูกยับยั้งได้ด้วยยาฆ่าแมลง

กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีขนาดและรูปร่างโมเลกุลเหมือนกับโมเลกุลของอะเซทิลโคลีน (Pryde, 1973) จึงสามารถเข้าจับที่บริเวณเร่งตรงตำแหน่ง serine OH group ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสแบบผันกลับไม่ได้ ดังปฏิกิริยา



การวิเคราะห์ปริมาณอะเซทิลโคลีนและศึกษาการยับยั้งเนื่องจากยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้วิธีการวัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ส่วนใหญ่จะตรวจสอบลิแกนด์เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสลงบนหัวกลาสพีเอชอิเล็กโทรดโดยตรงหรือตรวจสอบลิแกนด์เอนไซม์ลงในพอลิเมอร์เมมเบรนแล้วนำไปครอบที่หัวอิเล็กโทรด (Trojanowicz and Hitchmann, 1996 ; Tran-Minh, 1993b) แต่พบว่าความแม่นยำของสัญญาณและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์จะมีค่าลดลง อีกทั้งขีดจำกัดการแพร่ของไอออนระหว่างเอนไซม์เมมเบรนและอิเล็กโทรดจะทำให้ความไววิเคราะห์ลดลง

งานวิจัยนี้จึงนำระบบเอนไซม์รีแอกเตอร์มาใช้ร่วมกับระบบไหลผ่าน โดยคาดว่า การใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์จะทำให้ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์และการตอบสนองของสัญญาณมีความแม่นยำดีกว่าการใช้เอนไซม์อิเล็กโทรดหรือเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด อีกทั้งเป็นระบบที่ง่ายต่อการใช้และการดูแลรักษาและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิควิเคราะห์อื่นๆ ได้

1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์
3. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์
4. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้โพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์
5. ทดสอบโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ในปฏิกิริยาด้อย่างของยูเรียและอะเซทิลโคลีนซึ่ง

ในกรณีหลังจะศึกษาการยับยั้งเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับวัดปริมาณยาฆ่าแมลงในอนาคต

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงวิธีการตรึงเอนไซม์และปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์
2. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมและปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้เทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์
3. เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณที่สะดวกและรวดเร็ว
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยและปรับปรุงเทคนิคนี้เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

1.5 ขอบเขตและวิธีดำเนินการ

1. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการหาปริมาณสารโดยใช้เทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์
2. ศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์
3. ออกแบบการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์
4. ทำการทดลองและหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยพื้นฐานของระบบ
5. นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางเคมี
6. สรุปผลการทดลอง

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและสารเคมี

- เอนไซม์ยูรีเอส (Urease EC 3.5.1.5, 25,000 units/g solid, Type IV : from jack beans, U2000, Lot 97F7220 : Sigma, U.S.A.)
- เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase, Acetyl EC 3.1.1.7, 480 units/mg solid, Type VI-S : from electric eel, Lot 121H8065 : Sigma, U.S.A.)
- ยูเรีย (NH_2CONH_2 , AR Grade : Merck, Germany)
- อะเซทิลโคลีน ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- โซเดียมไนไตรต์ (NaN_3 , AR Grade : BDH, England)
- ไกลซีน ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$, AR Grade : Merck, Germany)
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AR Grade : Merck, Germany)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AR Grade : FERAK, Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH , AR Grade : Merck, Germany)
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl , AR Grade : BDH, England)
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl , AR Grade : Merck, Germany)
- แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AR Grade : Merck, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl , AR Grade : BDH, England)
- อะคริลาไมด์ ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, AR Grade : Riedel-de Haën, Germany)
- แอมโมเนียมเปอร์ออกโซไดซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, AR Grade : Merck, Germany)
- เมทิลลีนบีสอะคริลาไมด์ ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- เดตระเมทิลเอทิลลีนไดอะมีน ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- มาลาไรออน ($\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$, AR Grade : Alltech, Australia)
- เมทิลพาราไรออน ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{PS}$, AR Grade : Alltech, Australia)
- เซลลูโลสอะซิเตทเมมเบรน (cellulose acetate membrane, 0.45 ไมครอนเมตร, Sartorius AG, 37070 Goettingen, Germany)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ในระบบวิเคราะห์

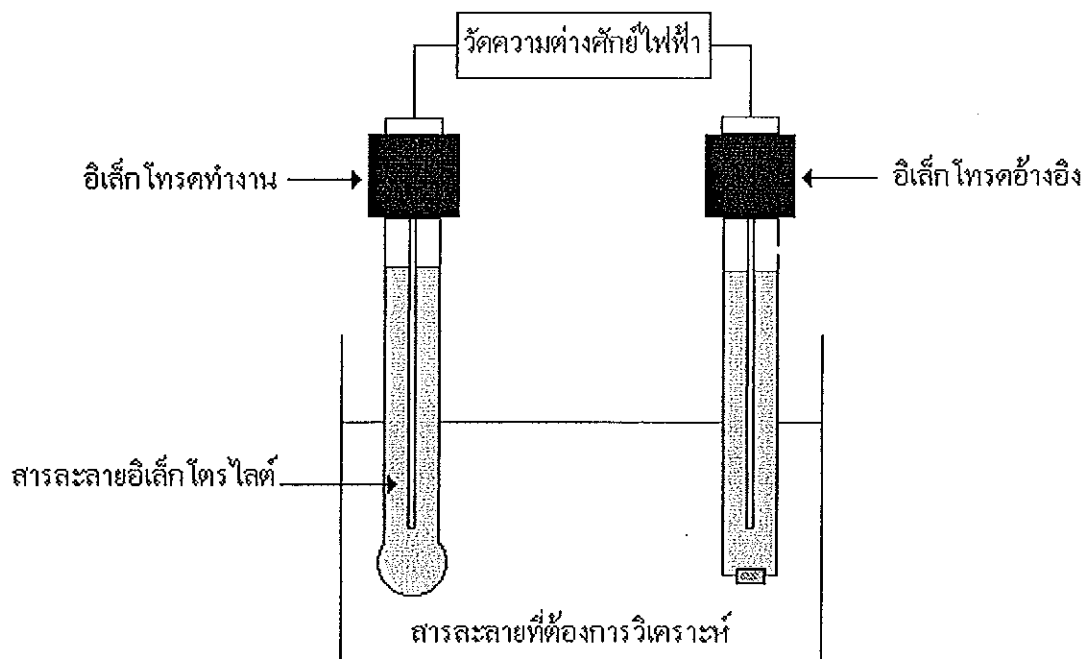
- เพอริสโตลติกปั๊มบี (Peristaltic pump, Miniplus 2, Gilson, France)
- เครื่องวิเคราะห์ไอออน F2 2F(PHM 250 Ion analyzer, Radiometer, France)
- กลาสพีเอชอิเล็กโทรด (pHG 201 pH Glass Electrode, Radiometer, France)
- อิเล็กโทรดอ้างอิงชนิด zg/zgCl (REF201 Reference Electrode, Radiometer Copenhagen, France)
- เครื่องบันทึกผล (Chart recorder, Single channel, Linear Instrument Company, U.S.z.)
- นาฬิกาจับเวลา

2.2.2 อุปกรณ์อื่นๆ

- เครื่องชั่ง
 - Mettler Model zE 260 Delta Range : Mettler, U.S.z.
 - d61FMettler P3 00 : Mettler, Switzerland
- เครื่องแก้ว (Plex)
- เทอร์โมมิเตอร์

2.3 หลักการวัดโดยเทคนิคโพเทนชิโอเมตริก

ในระบบโพเทนชิโอเมตริกข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณสารที่ต้องการวัดจะได้จากการวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรดสองอัน อุปกรณ์ที่จำเป็นประกอบด้วยไอออนซีล็คที่พอลิอิเล็กโทรดอิเล็กโทรดอ้างอิงและชุดเครื่องมือที่ใช้วัดความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วทั้งสอง ไอออนซีล็คที่พอลิอิเล็กโทรดจะเป็นอิเล็กโทรดทำงานที่ไวต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ ส่วนอิเล็กโทรดอ้างอิงจะไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของไอออนในสารละลายและมีค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ ในการวัดอิเล็กโทรดทั้งสองจะจุ่มอยู่ในสารละลายและเรียกระบบนี้ว่าเซลล์ไฟฟ้าเคมี (ภาพประกอบ 1) ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากอิเล็กโทรดทำงานเทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิงจะแปรผันกับความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย



ภาพประกอบ 1 เซลล์ไฟฟ้าเคมีสำหรับวัดโดยเทคนิคโพเทนชิโอเมตริก

ในงานวิจัยใช้อิเล็กโทรดทำงานชนิดกลาสพีเอชอิเล็กโทรดที่วัดเฉพาะไฮโดรเจนไอออน ค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จะเป็นผลจากการเกิดสมดุลของไฮโดรเจนไอออนที่ผิวแต่ละด้านของกลาสเมมเบรน นั่นคือระหว่างไฮโดรเจนไอออนในสารละลายอ้างอิงภายในอิเล็กโทรด (H^+ reference) และไฮโดรเจนไอออนในสารละลายที่ต้องการทดสอบ (H^+ test)

ที่สภาวะสมดุลค่าศักย์ไฟฟ้าที่รอยต่อทั้งสองด้านกลาสเมมเบรน (boundary potential) เป็นไปตามสมการเนิร์นสต์ (Nernst equation)

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+ \text{ test}}}{a_{H^+ \text{ reference}}} \quad (2.1)$$

โดย

E = ค่าศักย์ไฟฟ้า มีหน่วยเป็นโวลต์

R = ค่าคงที่ของแก๊ส = 8.314 จูล/โมล.เคลวิน

T = อุณหภูมิ มีหน่วยเป็นเคลวิน (K)

F = ค่าคงที่ของฟาราเดย์ = 96,500 คูลอมป์/โมล

$$a_{H^+} = \text{แอกติวิตีของไฮโดรเจนไอออน}$$

เนื่องจากสารละลายอ้างอิงภายในโกลาสที่เอชอีเล็กโทรดคือกรดไฮโดรคลอริกเจือจางที่มีแอกติวิตีของไฮโดรเจนไอออนคงที่ ส่วนของสมการที่เกี่ยวข้องกับแอกติวิตีของ H^+ reference จึงเป็นค่าคงที่ (K) ดังนั้นจึงเขียนสมการได้เป็น

$$E = \frac{RT}{F} \ln a_{H^+ \text{ test}} - K \quad (2.2)$$

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อแทนค่าตัวแปรต่างๆ และเปลี่ยนฟังก์ชันจากลอการิทึมฐานธรรมชาติเป็นฐานสิบ ทำให้ค่าคงที่เปลี่ยนจาก K เป็น K' และสมการเปลี่ยนเป็น

$$E = 0.059 \log a_{H^+ \text{ test}} - K' \quad (2.3)$$

เมื่อรวมกับศักย์ไฟฟ้าที่เกิดที่รอยต่อระหว่างสารละลายและอิเล็กโทรดอ้างอิงซึ่งเป็นค่าคงที่ ค่าศักย์ไฟฟ้าของเซลล์จึงเป็นไปตามสมการ

$$E = Q + 0.059 \log a_{H^+ \text{ test}} \quad (2.4)$$

โดย Q คือผลรวมของค่าคงที่ต่างๆ (Laitinen and Harris, 1975)

จะเห็นว่าค่าศักย์ไฟฟ้าของเซลล์ขึ้นอยู่กับแอกติวิตีของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นการวัดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าจะทำให้รู้ถึงการเปลี่ยนแปลงของแอกติวิตีได้

สมการข้างต้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าและแอกติวิตีแต่ในการวัดปริมาณสารสิ่งที่ต้องการคือความเข้มข้นของไอออน แอกติวิตีมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นตามสมการ

$$a_i = \gamma_i C_i \quad (2.5)$$

โดย

a_i = แอกติวิตีของไอออน i ในสารละลาย

C_i = ความเข้มข้นของไอออน i ในสารละลาย

γ_i = สัมประสิทธิ์แอกติวิตีของไอออน i

ในสารละลายที่เจือจางมากค่าสัมประสิทธิ์แอคติวิตี (activity coefficient) จะมีค่าเข้าใกล้หนึ่งทำให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับความเข้มข้น ดังนั้นการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าจึงใช้หาความเข้มข้นของไอออนในสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ได้ (Wang, 1984)

2.4 การตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์คือการทำให้เอนไซม์อยู่กับที่หรือจำกัดให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมขนาดเล็กโดยที่ยังคงคุณสมบัติของการเร่งปฏิกิริยาและสามารถนำมาใช้งานได้หลายครั้งหรืออย่างต่อเนื่อง ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการตรึงเอนไซม์แบบกัก (entrapping) โดยเอนไซม์จะถูกกักไว้ในช่องว่างของเมตริกซ์ของโพลีอะคริลาไมด์เจล การตรึงเอนไซม์ใช้วิธีที่ Stein และ Schwedt (1993) พบว่าเหมาะสมที่สุด โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.005 โมลาร์ พีเอช 7.40 สารละลายที่ใช้ตรึงเอนไซม์ประกอบด้วยสารละลายพอลิเมอร์ (อะคริลาไมด์โมโนเมอร์ 1.520 กรัม ผสมกับเมทิลลีนีสอะคริลาไมด์ 80 มิลลิกรัม ละลายใน 2.0 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และสารละลายเอนไซม์ (เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส 1 มิลลิกรัม (480 ยูนิต) หรือเอนไซม์ยูรีเอส 9.6 มิลลิกรัม (240 ยูนิต) ละลายใน 2.0 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ในการเตรียมเอนไซม์เจลแต่ละครั้งใช้สารละลายพอลิเมอร์ 125 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ 250 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 125 ไมโครลิตร คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน 30 วินาที หลังจากนั้นเติมเตตระเมทิลเอทิลลีนไดอะมีน 1 ไมโครลิตร และ 10 เปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียมเปอร์ออกไซด์โซลเฟต 4 ไมโครลิตร คนต่อเป็นเวลา 10 วินาที โดยสภาวะนี้จะทำให้ได้เอนไซม์เจลที่เหมาะสมในการใช้งาน เนื่องจากเอนไซม์ในเจลจะมีแอคติวิตีใกล้เคียงกับตอนที่ยังไม่ถูกตรึงทำให้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดี อีกทั้งเจลที่ได้จะมีขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับโมเลกุลของสับสเตรทจะผ่านเข้ามาจับกับเอนไซม์ที่อยู่ในเจลได้ และเจลที่ได้ยังมีอายุการใช้งานนานกว่าที่สภาวะอื่นอีกด้วย (Stein and Schwedt, 1993)

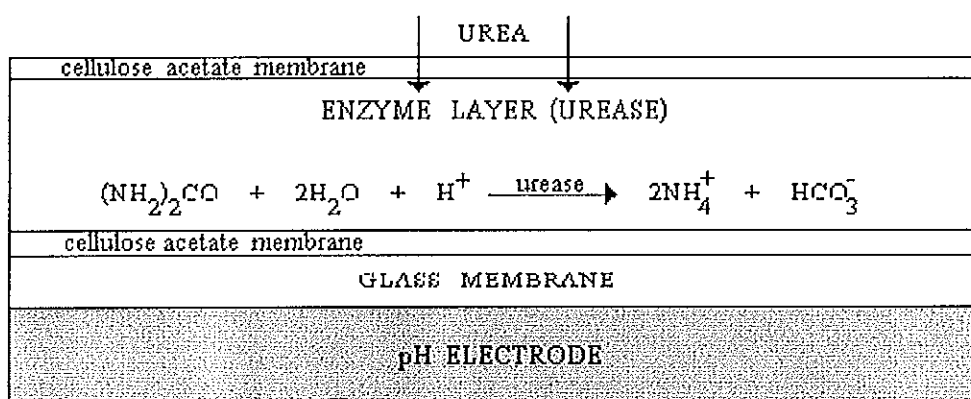
ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียจะเตรียมเซนเซอร์ในลักษณะเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด โดยหยดสารละลายผสมพอลิเมอร์-เอนไซม์ยูรีเอส 250 ไมโครลิตร ลงบนเซลล์ลูโลสอะซิเตทเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว แล้วปิดทับด้วยเซลล์ลูโลสอะซิเตทเมมเบรน ทิ้งไว้ 30 นาที ให้เจลแห้งตัว ในการเตรียมหนึ่งครั้ง (500 ไมโครลิตร) จะได้เอนไซม์เมมเบรนสองชั้น แต่ละชั้นจะมีเอนไซม์ยูรีเอส 30 ยูนิต เมื่อใช้งานจะนำเอนไซม์เมมเบรนนี้ไปหุ้มที่หัวกลาสพีเอชอิเล็กโทรดโดยใช้วงแหวน (o-ring) เป็นตัวยึด (ภาพประกอบ 2)

2.5 ระบบการทดลองและการวิเคราะห์ผล

2.5.1 ระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์ยูเรีย

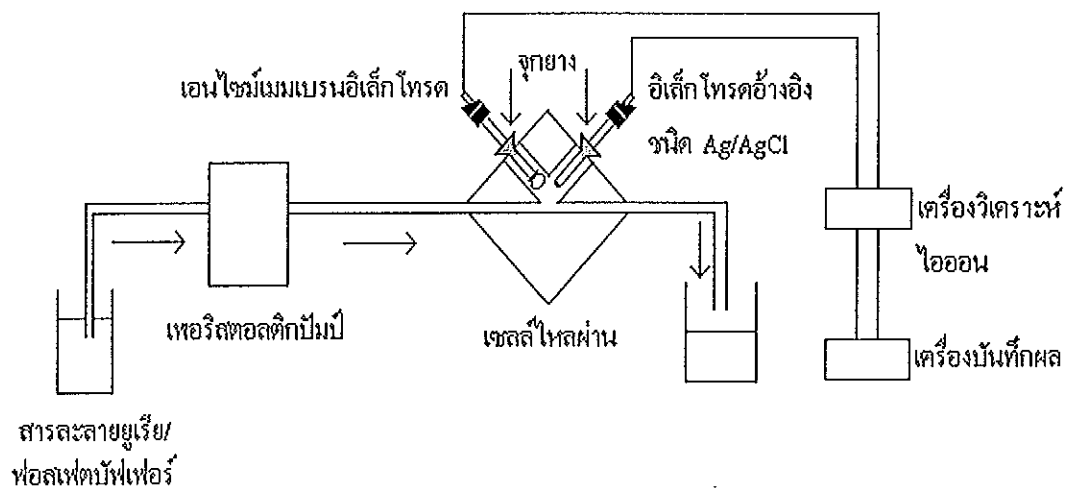
การทำงานของยูเรียเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดอาศัยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียโดยเอนไซม์ยูรีเอส ทำให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายเปลี่ยนไป ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยกลาสพีเอชอิเล็กโทรดโดยอาศัยหลักการโพเทนชิโอเมตริก

เมื่อสารละลายยูเรียเคลื่อนที่ผ่านผิวของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด ยูเรียจะแพร่ผ่านเซลลูโลสอะซิเตทเมมเบรนเข้าสู่ชั้นของเอนไซม์เจลและเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ภาพประกอบ 3) ทำให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายลดลงเนื่องจากการใช้ไฮโดรเจนไอออนในปฏิกิริยาดังกล่าว ปริมาณไฮโดรเจนไอออนที่ลดลงนี้ตรวจวัดได้ในรูปของการลดลงของความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างกลาสพีเอชอิเล็กโทรดและอิเล็กโทรดอ้างอิง



ภาพประกอบ 3 ลักษณะชั้นของยูเรียเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด ยูเรียจะแพร่ผ่านเซลลูโลสอะซิเตทเมมเบรนเข้าสู่ชั้นของเอนไซม์เจลและเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

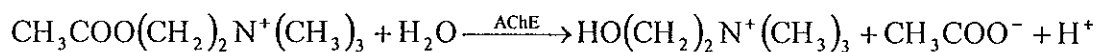
ภาพประกอบ 4 แสดงระบบไหลผ่านที่ใช้ในเทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไปโอเซนเซอร์เพอร์สโตลติกปั๊มจะนำสารละลายไปยังเซลล์ไหลผ่าน (flow cell) ที่ทำจากเพอร์สเปกขนาด $5.20 \times 5.25 \times 1.90$ ซม³ เอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและอิเล็กโทรดอ้างอิงที่สอดอยู่ในแนวกึ่งกลางของจุกยางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.80 ซม จะเสียบแน่นอยู่ในช่องของเซลล์ไหลผ่าน โดยอิเล็กโทรดทั้งสองอยู่ในแนวตั้งฉากกัน ปริมาตรของสารละลายที่หัวอิเล็กโทรดทั้งสองคือ 3.0 มิลลิลิตร หากสารละลายตัวอย่างมียูเรีย เอนไซม์ในเจลจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียทำให้ปริมาณไฮโดรเจนไอออนในสารละลายลดลง เครื่องวิเคราะห์ที่ไอออนจะแสดงผลการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในรูปของการลดลงของความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างกลาสที่เอชอิเล็กโทรดและอิเล็กโทรดอ้างอิงและการเปลี่ยนแปลงนี้จะถูกบันทึกโดยเครื่องบันทึกผล



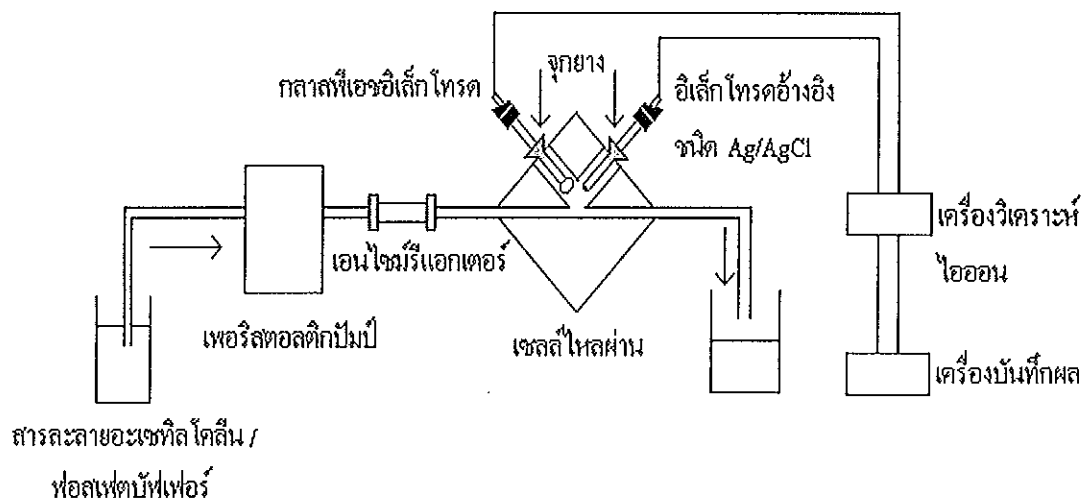
ภาพประกอบ 4 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์ยูเรีย

2.5.2 ระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์อะเซทิลโคลีน

ในการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีนใช้ระบบไหลผ่านระบบเดียวกับการวิเคราะห์ยูเรีย ต่างกันเฉพาะตำแหน่งของเอนไซม์เจด ในระบบนี้เอนไซม์เจดที่บรรจุอยู่ในเอนไซม์แคปซูลจะอยู่ก่อนที่จะถึงเซลล์ไหลผ่าน (ภาพประกอบ 5) เมื่อสารละลายที่มีอะเซทิลโคลีนผ่านเข้ามาในระบบจนถึงเอนไซม์แคปซูล เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีนทำให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายเพิ่มขึ้น ดังปฏิกิริยา



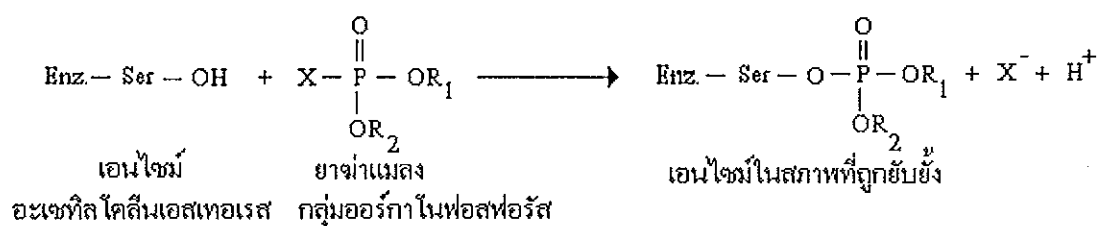
การเปลี่ยนแปลงนี้ตรวจวัดได้ในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นของกลาสพีเอช อิเล็กโทรดเทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิง



ภาพประกอบ 5 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์อะเซทิลโคลีน

2.5.3 ระบบไหลผ่านสำหรับวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง

การศึกษาในส่วนนี้จะทดสอบระบบไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ ระบบไหลผ่านที่ใช้เป็นระบบเดียวกับการวิเคราะห์อะเซทิลโคลีน ขั้นตอนการวิเคราะห์เริ่มโดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนไปยังเอนไซม์แอ็กเตอร์ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีนทำให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายเพิ่มขึ้น วัดการตอบสนองนี้ในรูปของค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างกลาสที่เอชอีเล็กโทรดและอีเล็กโทรดอ้างอิงที่เพิ่มขึ้น จากนั้นผ่านสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มียาฆ่าแมลงไปยังเอนไซม์แอ็กเตอร์แล้วหยุดการไหล (incubated) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์มีเวลาจับตัวกับยาฆ่าแมลงเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับยาฆ่าแมลงทำให้เอนไซม์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่ว่องไว (inactive phosphorylated) ดังปฏิกิริยา



สุดท้ายจึงผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนไปยังเอนไซม์แอ็กเตอร์และตรวจวัดการตอบสนองอีกครั้ง เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าของความต่างศักย์ไฟฟ้าก่อนและหลังผ่านยาฆ่าแมลงในรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%I) ดังสมการ (Tran - Minh, 1993a)

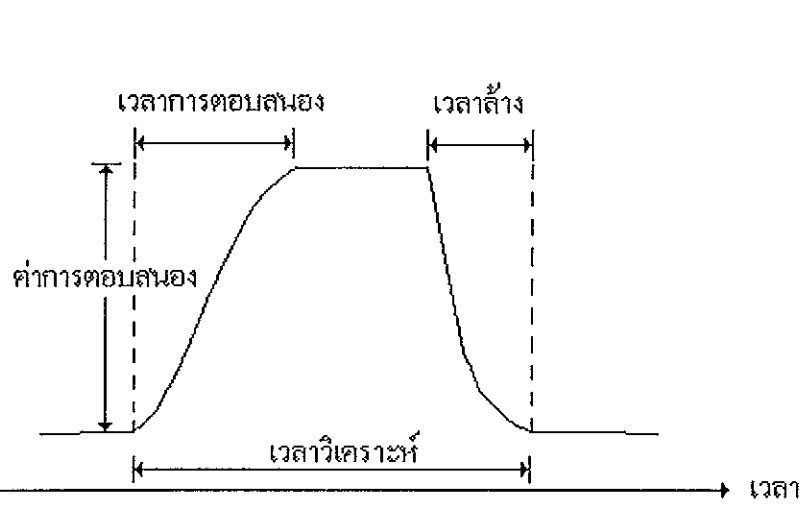
$$\%I = \frac{E_0 - E_1}{E_0} \times 100 \quad (2.6)$$

โดย E_0 และ E_1 คือสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสต่ออะเซทิลโคลีนก่อนและหลังการผ่านยาฆ่าแมลงตามลำดับ

2.6 ลักษณะของสัญญาณการตอบสนอง

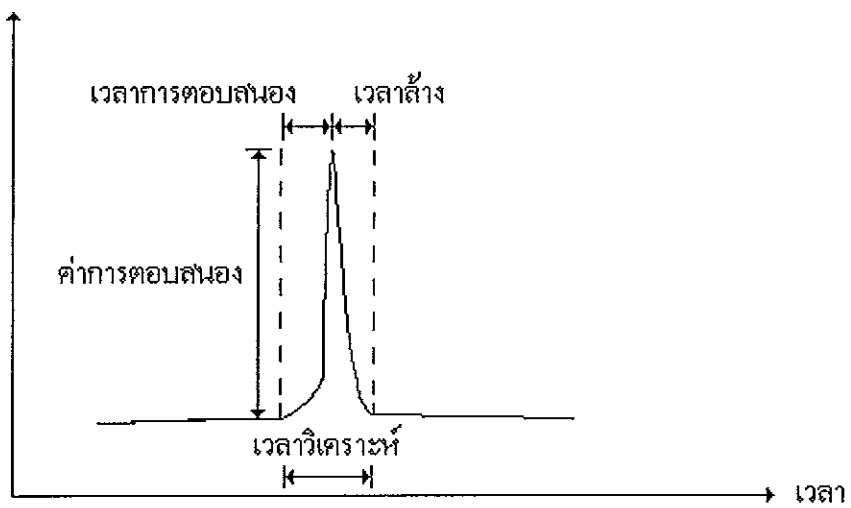
ในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของเอนไซม์สภาวะตรึง (immobilized enzyme) ในระบบใดๆมักจะเริ่มต้นด้วยการผ่านสารละลายสับสเตอร์เข้าไปในระบบอย่างต่อเนื่องและตรวจวัดสัญญาณการตอบสนองที่เกิดขึ้นจนกระทั่งสัญญาณการตอบสนองคงที่ (ภาพประกอบ 6) แล้วจึงผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับช่วงเวลาต่างๆ ที่จะใช้ในการปรับปรุงระบบต่อไป จากสัญญาณดังกล่าวจะได้ค่าเวลาการตอบสนอง (response time) ซึ่งเป็นช่วงเวลาระหว่างการเริ่มเกิดสัญญาณจนสัญญาณมีค่าคงที่ เวลาที่ใช้ในการล้างระบบเพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ (washout time) และเวลาวิเคราะห์ (analysis time) ซึ่งหมายถึงเวลาดังแต่เริ่มมีการตอบสนองจนกระทั่งสัญญาณกลับสู่เบสไลน์ โดยค่าการตอบสนอง (response) ของระบบนี้กำหนดให้เป็นค่าความแตกต่างระหว่างเบสไลน์และการตอบสนองที่มากที่สุด ถึงแม้ว่าการผ่านสารละลายดังกล่าวจะให้ค่าการตอบสนองที่มากที่สุดแต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานมาก โดยจะใช้เวลา 21 - 34 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่างในกรณีวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียและ 26 - 38 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่างในกรณีวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีน ดังนั้นเพื่อลดปริมาณสารละลายและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้น้อยลงจึงปรับปรุงลักษณะการผ่านสารละลายให้เป็นแบบพัลส์ โดยผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นช่วงสั้นๆเข้าไปในระบบไหลผ่านที่มีการผ่านสารละลายบัฟเฟอร์อย่างต่อเนื่อง โดยเลือกช่วงเวลาของการผ่านสารตัวอย่างให้อยู่ในช่วงของเวลาการตอบสนองของการผ่านสารละลายแบบคงที่ ลักษณะของสัญญาณการตอบสนองแบบพัลส์แสดงในภาพประกอบ 7 ช่วงเวลาต่างๆของระบบนี้ประกอบด้วยเวลาการตอบสนองคือช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มเกิดสัญญาณจนสัญญาณมีค่ามากที่สุด (peak) เวลาที่ใช้ในการล้างคือช่วงเวลาที่ใช้ในการทำให้สัญญาณลดลงกลับสู่เบสไลน์ เวลาการวิเคราะห์คือเวลาที่ใช้ตั้งแต่เอนไซม์เริ่มตอบสนองจนสัญญาณกลับสู่เบสไลน์ โดยค่าการตอบสนองคือค่าระหว่างเบสไลน์และการตอบสนองที่สูงที่สุด

การตอบสนองของเอนไซม์



ภาพประกอบ 6 สัญญาณการตอบสนองแบบคงที่

การตอบสนองของเอนไซม์



ภาพประกอบ 7 สัญญาณการตอบสนองแบบพัลส์

2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าและความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์

การหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรในการทดลอง พิจารณาได้จากสมการที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรนั้นๆ จากสมการศักย์ไฟฟ้าของเซลล์ที่ใช้วัดไฮโดรเจนไอออน (สมการ 2.4)

$$E = Q + 0.059 \log a_{H^+_{test}}$$

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับสมการเชิงเส้น

$$y = mx + c \quad (2.7)$$

โดย

$$y = \text{ค่าการตอบสนอง}$$

$$m = \text{ความชัน}$$

$$x = \text{ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์}$$

$$c = \text{จุดตัดของกราฟ}$$

จะเห็นว่าหากเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้า (E เป็น y) และลอการิทึมของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ($\log a_i$ เป็น x) จะได้กราฟเส้นตรงมีค่าความไววิเคราะห์หรือความชัน (m) 59 มิลลิโวลต์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ผลการทดลองจึงเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าและลอการิทึมของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์

2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง 2.8.1 - 2.8.4 คือ

- อัตราไหล	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	0.050	โมลาร์ (พีเอช 7.00)
- อุณหภูมิขณะทดลอง	25 ± 1	องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลายยูเรียในฟอสเฟตบัฟเฟอร์	0.05	โมลาร์ พีเอช 7.00

2.8.1 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด

ในการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดต่อสับสเตรทในขั้นแรกจะใช้วิธีการผ่านสารละลายยูเรียเข้าไปในระบบอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มจากการผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วจึงผ่านสารละลายยูเรียจนกระทั่งสัญญาณการตอบสนองคงที่แล้วจึงผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ (ภาพประกอบ 6) พิจารณารายละเอียดของช่วงเวลาการตอบสนอง เวลาล้าง เวลาวิเคราะห์ และสัญญาณการตอบสนองโดยใช้สารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์

2.8.2 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเมื่อผ่านสารละลายแบบพัลส์

การวัดสัญญาณการตอบสนองคงที่ของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดในการทดลอง 2.8.1 นั้น ต้องใช้สารละลายยูเรีย 4.0 - 4.5 มิลลิลิตร และใช้เวลา 21 - 34 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง เพื่อลดปริมาณของสารละลายและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้น้อยลงจึงเปลี่ยนลักษณะการผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นแบบพัลส์นั่นคือผ่านสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์เป็นช่วงๆ สลับกับการผ่านสารละลายบัพเฟอร์ เริ่มจากการผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วจึงผ่านสารละลายยูเรียเป็นเวลา 3 นาที (1.5 มิลลิลิตร) จากนั้นผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์ซ้ำเพื่อให้สัญญาณกลับมาที่เบสไลน์เหมือนเดิม โดยทำการทดลองกับสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ นำสัญญาณการตอบสนองที่บันทึกได้มาพิจารณารายละเอียดต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลอง 2.8.1 ที่เลือกใช้เวลา 3 นาทีเนื่องจากเป็นช่วงเวลาเฉลี่ยของการตอบสนองต่อยูเรียความเข้มข้นต่างๆ ของการทดลอง 2.8.1 และเมื่อทดลองผ่านสารละลายปริมาตรนี้พบว่าสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดมีค่าสูงและใช้เวลาวิเคราะห์ไม่นานนัก

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณทุกครั้งจะต้องนำผลการทดลองของชุดการทดลองที่ได้มาประเมินค่าและอธิบายผลที่ได้โดยอาศัยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้มาร่วมพิจารณา

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็นค่าที่ใช้แสดงความเที่ยงของการทดลองที่ทำซ้ำกันหลายๆ ครั้ง ซึ่งถ้ามีค่าต่ำแสดงว่าการทดลองนั้นมีความเที่ยงสูง (สุรศักดิ์, 2538)

ความไววิเคราะห์คือความชันของกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตอบสนองและความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Tran-Minh, 1993a)

ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดคือความเข้มข้นต่ำสุดที่ควรตรวจวัดได้ โดยในการวิเคราะห์ผลจะหมายถึงปริมาณสารที่สามารถให้สัญญาณการตอบสนองของพีคสูงเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวน (Eggins, 1996)

ช่วงการตอบสนองเชิงเส้นคือช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีความ

สัมพันธ์เป็นเชิงเส้นกับสัญญาณการตอบสนอง (Eggins, 1996)

สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสองคือค่าที่ใช้วัดความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรว่ามีความสัมพันธ์กันในลักษณะเชิงเส้นมากน้อยเพียงใดโดยจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 (Miller and Miller, 1993)

นอกจากพารามิเตอร์ดังกล่าวข้างต้น ในการพิจารณาสัญญาณการตอบสนองที่ได้ยังต้องพิจารณาถึงค่าความสูงของสัญญาณ ความกว้างของสัญญาณ เวลาวิเคราะห์ เป็นต้น

2.8.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและ ความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างใด ๆ สารตัวอย่างควรมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้ผลการตอบสนองเชิงเส้น ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเป็นเชิงเส้นจะคำนวณได้ง่ายและให้ค่าการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแน่นอน ในการศึกษาเพื่อหาช่วงการตอบสนองดังกล่าวใช้สารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 180 และ 200 มิลลิโมลาร์ โดยผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เข้าไปในระบบวัดเพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ และแต่ละความเข้มข้นของสารละลายยูเรียจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พิจารณาชวงความเป็นเชิงเส้น และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

2.8.4 ผลของอายุของเอนไซม์เมมเบรน

แม้ว่าเทคนิคไบโอเซนเซอร์จะมีข้อดีหลายประการแต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องอายุการใช้งานของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีนซึ่งจะถูกทำลายสภาพธรรมชาติได้โดยสารเคมีและสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น (สุนันทา, 2535) นั่นคือเมื่อใช้เอนไซม์เป็นเวลานานความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงทำให้สัญญาณการตอบสนองลดลง จึงได้ศึกษาผลของอายุของเอนไซม์เมมเบรนในการตอบสนองต่อสารละลายยูเรีย ในการทดลองนี้ใช้วิธีผ่านสารละลายแบบพัลส์และใช้สารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมขึ้นมาใหม่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเก็บเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดไว้ในเซลล์ไหลผ่านที่มีบัพเฟอร์อยู่เต็ม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30 องศาเซลเซียส) ทดลองซ้ำกับเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดอันเดิมในวันที่ 2 และ 3 เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนอง และค่าความไววิเคราะห์

2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีน

จากการศึกษาเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดสำหรับยูเรีย (2.8) พบว่าข้อจำกัดหนึ่งคือหลังจากนำเมมเบรนเจลไปหุ้มที่หัวอิเล็กโทรดแล้วหากแกะออกมาเพื่อนำไปเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสม (4 องศาเซลเซียส) จะทำให้เมมเบรนเจลแตกและไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ดังนั้นในการวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณอะเซทิลโคลีนจึงได้ปรับปรุงระบบโดยเปลี่ยนจากการตรึงเอนไซม์ในเจลบนเมมเบรนมาเป็นการตรึงเอนไซม์ในเจลและบรรจุในคอลัมน์ เนื่องจากเมื่อไม่ใช้งานสามารถถอดออกจากระบบไหลผ่านไปเก็บในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมเฮกซะไฮดรอกซีแอนติโมนี 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ไม่ให้สูญเสียแอกติวิตีไปในเวลารวดเร็ว (ปราณี, 2535) ดังนั้นการใช้เอนไซม์คอลัมน์น่าจะช่วยให้อายุการใช้งานของเอนไซม์เจลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการตัดปัญหาที่เอนไซม์เมมเบรนไปรบกวนผิวหน้าของอิเล็กโทรดอีกด้วย

ในการทดลองเมื่อผ่านสารละลายสับสเตรทเอนไซม์คอลัมน์จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์รีแอกเตอร์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีนโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

สภาวะที่ใช้ในการทดลองที่ 2.9.1 - 2.9.7 คือ

- อัตราไหลของการทดลอง	2.9.1 - 2.9.2	0.50	มิลลิลิตรต่อนาที
	2.9.4 - 2.9.7	0.25	มิลลิลิตรต่อนาที
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์		0.005	โมลาร์ (พีเอช 7.20)
- อุณหภูมิขณะทดลอง		25 ± 1	องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลายอะเซทิลโคลีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์		0.005	โมลาร์ พีเอช 7.20
- การทดลอง 2.9.2 - 2.9.7 จะผ่านสารละลายแบบพัลส์		1.5	มิลลิลิตร

2.9.1 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

เนื่องจากการทดลองในส่วนนี้ใช้เอนไซม์ - สับสเตรท คนละชนิดกับในข้อ 2.8 และยังคงเปลี่ยนจากเอนไซม์เมมเบรนมาเอนไซม์รีแอกเตอร์ ดังนั้นจึงต้องเริ่มศึกษาการตอบสนองในลักษณะเดียวกับกรณีของยูเรีย โดยศึกษาการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสต่ออะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ การทดลองแต่ละความเข้มข้นเริ่มด้วยการผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วจึงผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนจนกระทั่งสัญญาณการตอบสนองคงที่หลังจากนั้นจึงผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ พิจารณาช่วงเวลาการตอบสนอง เวลาว่าง เวลาวิเคราะห์

และสัญญาณการตอบสนอง

2.9.2 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อผ่านสารละลายแบบพัลส์

ในการวัดสัญญาณการตอบสนองของคั้งที่ของเอนไซม์รีแอกเตอร์ (2.9.1) พบว่าปริมาณสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ใช้และเวลาการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงปรับปรุงวิธีการผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นแบบพัลส์ซึ่งจะให้สัญญาณการตอบสนองแบบพีค (peak) ในการผ่านสารละลายแบบพัลส์นี้เริ่มโดยผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วจึงผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนเป็นเวลา 3 นาที (1.5 มิลลิลิตร) จากนั้นผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซ้ำเพื่อให้สัญญาณกลับมาที่เบสไลน์เหมือนเดิม ช่วงเวลาการผ่านสารละลายนี้เลือกให้อยู่ในช่วงเวลาการตอบสนองของการทดลอง 2.9.1 นอกจากนี้พบว่าปริมาณการผ่านสารละลายปริมาตรนี้ให้สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่สูงและใช้เวลาไม่นานนัก ทำการทดลองกับสารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ พิจารณารายละเอียดต่างๆ ของสัญญาณเช่นเดียวกับการทดลอง 2.9.1

2.9.3 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

อัตราไหลของสารละลายที่เหมาะสมจะทำให้สารละลายสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ภายในเอนไซม์รีแอกเตอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ค่าการตอบสนองของเอนไซม์มีค่าสูง จึงได้ทดลองหาอัตราไหลที่เหมาะสมโดยใช้สารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยที่แต่ละความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีนจะผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วจึงผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน์ ผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ละความเข้มข้นจนครบชุดที่อัตราไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วจึงเปลี่ยนอัตราไหลเป็น 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์และเวลาวิเคราะห์ของแต่ละอัตราไหล

2.9.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีน

เช่นเดียวกับกรณีวิเคราะห์ปริมาณยูเรียการทราบช่วงความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นจะทำให้การคำนวณทำได้ง่ายและให้ค่าการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแน่นอน จากการทดลองใน 2.9.3 พบว่าอัตราไหลที่เหมาะสมคือ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ดังนั้นจากการทดลองนี้เป็นต้นไปจึงใช้อัตราไหลในการผ่านสารละลาย 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที โดยที่แต่ละความ

เข้มข้นของอะเซทิลโคลีนจะผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลนแล้วจึงผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้สัญญาณกลับสู่เบสไลน การศึกษาเพื่อหาช่วงการตอบสนองเชิงเส้นนี้ใช้สารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 และ 200 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนทำซ้ำ 3 ครั้ง พิจารณาวงความเป็นเชิงเส้น และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

2.9.5 ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์

ขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของสารสับเตรทกับเอนไซม์ สำหรับปริมาตรเดียวกันเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดยาวและเล็กจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารตัวอย่างกับเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่และสั้น ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ในการทดลองนี้เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตร 0.59 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 อัน อันแรกมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.50 เซนติเมตร ยาว 3.01 เซนติเมตร อันที่สองมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.38 เซนติเมตร ยาว 5.20 เซนติเมตร และใช้สารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ พิจารณขนาดของสัญญาณการตอบสนอง และค่าความไววิเคราะห์

2.9.6 ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์

ศึกษาผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีต่อการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้สารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ทดลองซ้ำกับเอนไซม์รีแอกเตอร์อันเดิมในวันที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 โดยเมื่อไม่ได้ใช้งานจะเก็บเอนไซม์รีแอกเตอร์ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีโซเดียมเฮไซด 0.02 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พิจารณาสัญญาณการตอบสนอง และค่าความไววิเคราะห์

2.9.7 ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์รีแอกเตอร์

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่อยู่ในเอนไซม์รีแอกเตอร์และในการเตรียมเอนไซม์รีแอกเตอร์แต่ละครั้งนั้นอาจมีความแตกต่างกันจนทำให้การตอบสนองแตกต่างกัน ในการทดสอบปัจจัยดังกล่าวแบ่งการทดสอบเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้รีแอกเตอร์ 3 อัน ที่มีเอนไซม์เจลที่เตรียมในครั้งเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าวิธีการเตรียมเจลที่ใช้สามารถทำให้เอนไซม์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและให้การตอบสนองที่เหมือนกันได้หรือไม่ อีกส่วนหนึ่งใช้รีแอกเตอร์ 3 อัน ที่มีเอนไซม์เจลที่เตรียมต่างครั้งกันเพื่อดู

ความเที่ยงของวิธีการเตรียมว่าจะทำซ้ำจนได้เจลที่ให้สัญญาณการตอบสนองเท่ากันได้หรือไม่ โดยรีแอกเตอร์ทุกอันจะมีปริมาตรเท่ากัน (0.59 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ทดสอบโดยใช้สารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ จากการใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์แต่ละอันจะพิจารณาถึงสัญญาณการตอบสนอง และค่าความไววิเคราะห์

2.10 การศึกษาการยับยั้งเนื่องจากยาฆ่าแมลง

สภาวะที่ใช้ในการทดลองที่ 2.10.1 - 2.10.4 คือ

- อัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที
- ฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.005 โมลาร์ (พีเอช 7.20)
- อุณหภูมิขณะทดลอง 25 ± 1 องศาเซลเซียส
- ผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร

2.10.1 ผลของ incubation time

เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจะถูกยับยั้งได้ด้วยยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟอรัส (Pryde, 1973) โดยระยะเวลาที่เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจับกับยาฆ่าแมลง (incubation time) จะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังนั้นการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่เอนไซม์จับกับยาฆ่าแมลงจึงมีความสำคัญ ในการทดสอบการยับยั้งนี้ใช้สารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าที่ความเข้มข้นนี้ค่าการตอบสนองของเอนไซม์มีค่าสูงและหลังจากผ่านยาฆ่าแมลงแล้วยังสามารถตรวจวัดสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์ได้ สำหรับยาฆ่าแมลงที่ใช้เป็นกรณีศึกษาคือสารละลายเมทิลพาราโรดอนและมาลาโรดอนเนื่องจากเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟอรัสที่นิยมใช้กันมาก (Pryde, 1973 ; สุภาณี, 2540) และเลือกใช้ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ แต่จะไม่ยับยั้งทั้งหมดทำให้ยังสามารถวัดสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์ได้ ในการทดลองแต่ละชุดจะเริ่มโดยผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์แล้วผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร ก่อนที่จะผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์อีกครั้งเพื่อให้สัญญาณกลับมาที่เบสไลน์หลังจากนั้นผ่านสารละลายเมทิลพาราโรดอนหรือมาลาโรดอนเข้าไปในระบบ 1.25 มิลลิลิตร (5 นาที) เมื่อสารละลายเมทิลพาราโรดอนหรือมาลาโรดอนเคลื่อนที่เข้าไปอยู่เต็มเอนไซม์รีแอกเตอร์หยุดระบบการไหลเป็นเวลา 10, 20, 30, 40, 50 หรือ 60 นาที แล้วจึงผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์อีกครั้งจากนั้นผ่าน

สารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์อีกครั้งนำค่าการตอบสนองที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (ดู 2.5.3) พิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากการใช้ incubation time ที่ต่างกัน

ขั้นตอนการทดสอบการยับยั้ง

ผลการทดลองในส่วนนี้พบว่า incubation time ที่เหมาะสมคือ 30 นาที ดังนั้นในทุกการทดลองต่อจากนี้ (2.10.2 - 2.10.4) การทดสอบการยับยั้งของยาฆ่าแมลงต่อเอนไซม์รีแอกเตอร์จะเริ่มโดยผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์จนได้เบสไลน์แล้วผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 100 มิลลิโมลาร์ แบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์อีกครั้งจนสัญญาณกลับสู่เบสไลน์จากนั้นผ่านสารละลายเมทิลพาราไรออนหรือมาลาไรออนเข้าไปในระบบ 1.25 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายเมทิลพาราไรออนหรือมาลาไรออนเคลื่อนที่เข้าไปอยู่เต็มเอนไซม์รีแอกเตอร์หยุดระบบการไหลเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงผ่านฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อให้ได้เบสไลน์อีกครั้งจากนั้นผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์อีกครั้งนำค่าการตอบสนองที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

2.10.2 ผลของปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ต่อการยับยั้ง

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดที่บริเวณเร่ง (active site) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะเกิดขึ้นเมื่อสารยับยั้งจับตัวกับเอนไซม์ที่บริเวณดังกล่าวทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ (Pryde, 1973) แต่ถ้าเอนไซม์มีปริมาณมากจะมีเอนไซม์บางส่วนที่ไม่ถูกยับยั้งและสามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ ดังนั้นหากปริมาณเอนไซม์มากเกินไปผลจากการยับยั้งอาจจะเห็นได้ไม่ชัดเจน ในทางตรงกันข้ามหากปริมาณเอนไซม์น้อยเกินไปสารยับยั้งเพียงเล็กน้อยก็อาจจะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งได้ทั้งหมดทำให้ไม่สามารถบอกถึงปริมาณของสารยับยั้ง ดังนั้นจึงควรต้องหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม ในการทดลองเตรียมเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์แตกต่างกัน 4 อัน คือมีเอนไซม์ 20, 40, 60 และ 120 ยูนิต ยาฆ่าแมลงที่ใช้คือสารละลายเมทิลพาราไรออนและมาลาไรออนที่มีความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน ดำเนินการตามขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งและนำสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากรีแอกเตอร์ที่มีปริมาณเอนไซม์ต่างกันมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาณเอนไซม์ต่างกัน

2.10.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออนและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

สารที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์หากมีปริมาณมากก็น่าจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากเช่นกัน พิจารณาผลของสารละลายเมทิลพาราไรออนที่ความเข้มข้น 0.02, 1, 5, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ส่วนในล้านส่วน ต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการตอบสนอง

ดำเนินการตามขั้นตอนการทดสอบการยับยั้ง จากผลการทดลองพบว่าสารละลายเมทิลพาราไรออนที่ช่วงความเข้มข้น 10 - 40 ส่วนในล้านส่วนให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็นเชิงเส้น ดังนั้นจึงทดลองช่วงความเข้มข้นนี้ซ้ำเพื่อยืนยันผล พิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ชีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และค่าความไววิเคราะห์

2.10.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออนและเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

เช่นเดียวกับกรณีของสารละลายเมทิลพาราไรออนจึงพิจารณาผลของสารละลายมาลาไรออนที่ความเข้มข้น 0.02, 1, 5, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 ส่วนในล้านส่วนต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดำเนินการตามขั้นตอนการทดสอบการยับยั้ง จากผลการทดลองพบว่าสารละลายมาลาไรออนที่ช่วงความเข้มข้น 10 - 60 ส่วนในล้านส่วน ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็นเชิงเส้น จึงทดลองซ้ำสำหรับช่วงความเข้มข้นนี้เพื่อยืนยันผล พิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ชีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และค่าความไววิเคราะห์

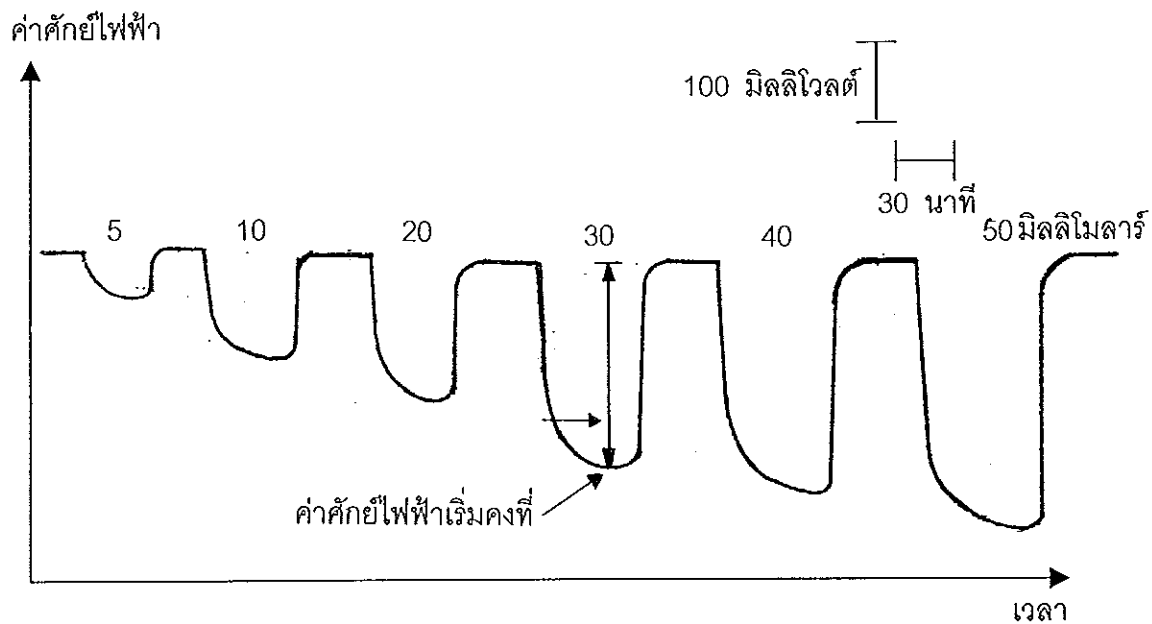
บทที่ 3

ผลและการอภิปรายผล

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย

3.1.1 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด

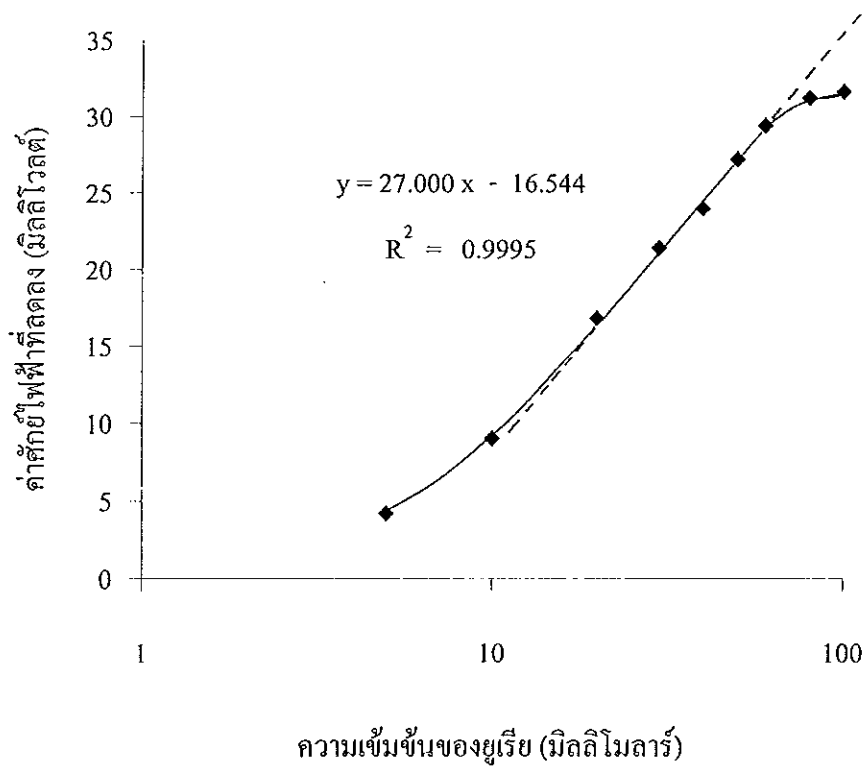
ภาพประกอบ 8 แสดงลักษณะการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดต่อการผ่านสารละลายยูเรียอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากผ่านสารละลายยูเรียเข้าไปในระบบวิเคราะห์ ต้องใช้เวลาประมาณ 8-9 นาที จึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ โดยค่าศักย์ไฟฟ้าจะลดลงเมื่อเอนไซม์เริ่มตอบสนอง ระยะเวลานี้คือเวลาที่สารละลายใช้ในการเคลื่อนที่ในระบบไหลผ่านจนถึงเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดรวมกับเวลาที่ยูเรียแพร่ผ่านเมมเบรนจนเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หลังจากนั้นอีก 2-5 นาที (ขึ้นกับความเข้มข้นของยูเรีย (ตาราง 1)) สัญญาณจะเข้าสู่สภาวะคงที่ ช่วงเวลานี้คือเวลาการตอบสนอง จากนั้นจึงผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลังจากผ่านบัฟเฟอร์ต้องใช้เวลา 8-9 นาที เช่นกัน สัญญาณจึงเริ่มกลับคืนสู่เบสไลน์ เวลาช่วงนี้คือเวลาที่บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ถึงเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด หลังจากนั้นสัญญาณจะกลับสู่เบสไลน์ภายใน 5-11 นาที (เวลาดำง) โดยเวลาในการล้างจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายยูเรียสูงขึ้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงๆมีปริมาณสารละลายยูเรียแพร่ผ่านเอนไซม์เมมเบรนมากจึงต้องใช้เวลามากจึงจะสามารถล้างสารละลายยูเรียได้หมด ดังนั้นการผ่านสารละลายยูเรียแบบคงที่นี้จะใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 21-34 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง สำหรับขนาดของสัญญาณการตอบสนองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายยูเรียเพิ่มขึ้นสัญญาณการตอบสนองก็จะเพิ่มขึ้น (ค่าศักย์ไฟฟ้าลดลงมากขึ้น) ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสถ้าความเข้มข้นมากก็จะมีการใช้ปริมาณไฮโดรเจนไอออนมาก และจากภาพประกอบ 9 จะเห็นว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายยูเรียที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นคือ 20-60 มิลลิโมลาร์ โดยมีความไววิเคราะห์ 27 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น และมีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง 0.9995



ภาพประกอบ 8 สัญญาณการตอบสนองของเซนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง 1 ช่วงเวลาต่างๆและขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลง (สัญญาณการตอบสนอง) ของเซนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของยูเรีย (มิลลิโมลาร์)	เวลาการตอบสนอง (นาที.วินาที)	เวลาล้าง (นาที.วินาที)	เวลาวิเคราะห์ (นาที.วินาที)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลง (มิลลิโมลาร์)
5	1.48	5.02	20.56	6.2
10	1.58	6.24	22.34	14.4
20	2.05	7.13	23.46	18.6
30	2.24	7.52	24.08	23.4
40	2.48	8.12	27.18	26.5
50	3.04	8.50	28.18	29.4
60	3.14	10.00	30.28	31.5
80	3.35	10.25	31.23	33.4
100	4.30	10.50	33.36	34.6



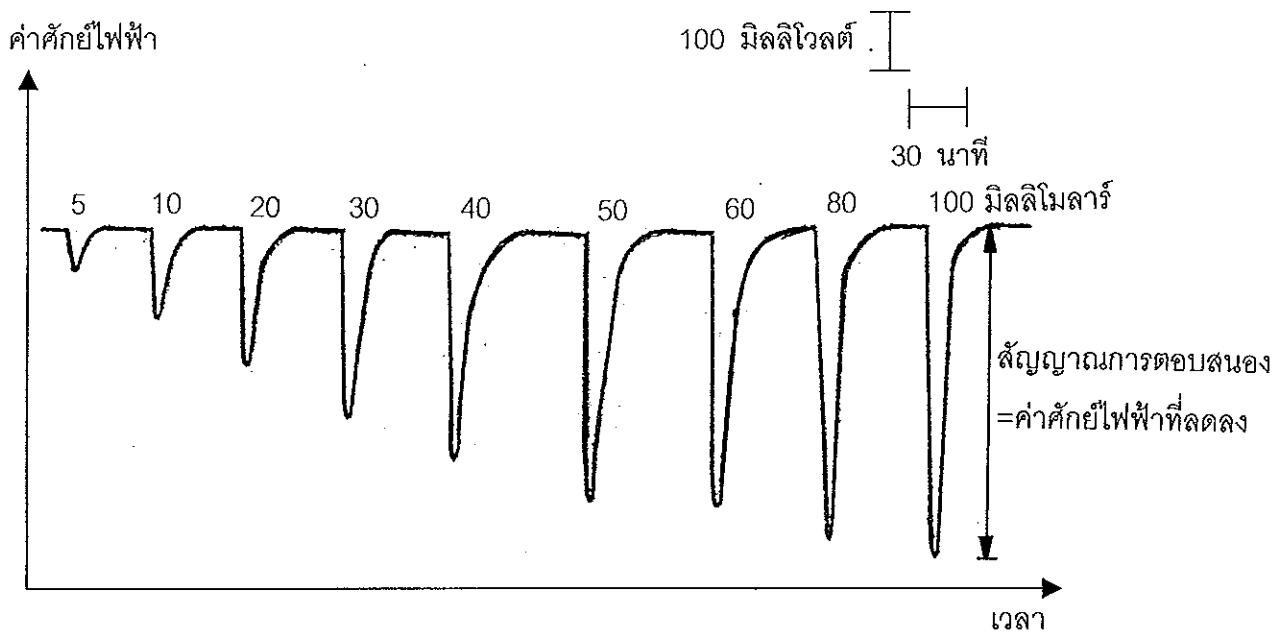
ภาพประกอบ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลือคการิทึมของความเข้มข้นของยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

3.1.2 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดในลักษณะผ่านสารละลายแบบพัลส์

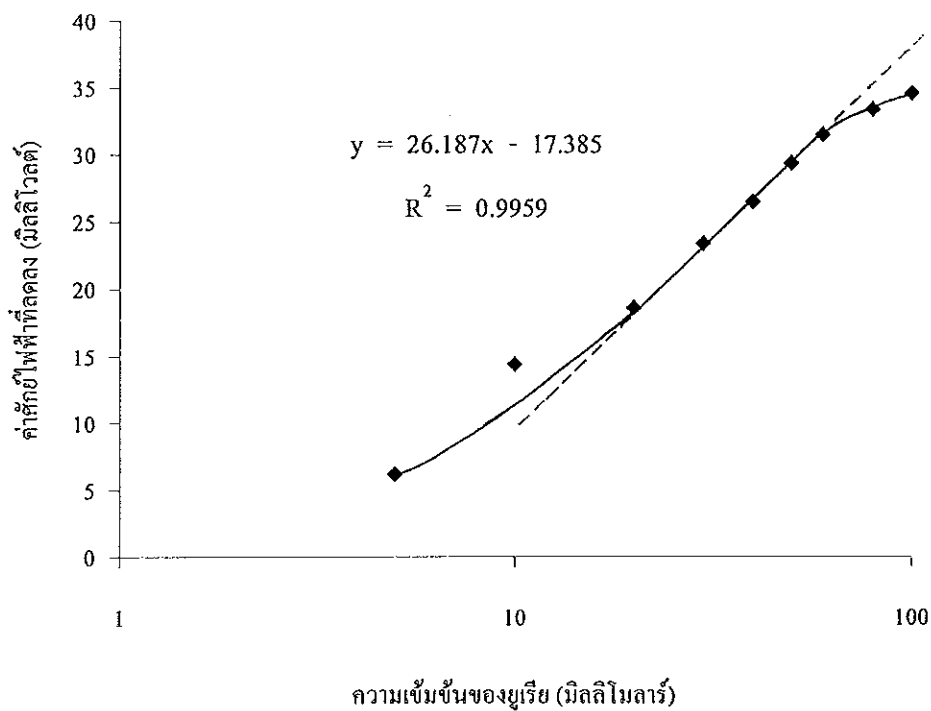
ในการวัดสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดแบบคงที่จะใช้สารละลายยูเรีย 4.0 - 4.5 มิลลิลิตร และใช้เวลาวิเคราะห์ 21 - 34 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง เพื่อลดปริมาณของสารและเวลาที่ใช้ให้น้อยลงจึงเปลี่ยนลักษณะการผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นแบบพัลส์ โดยผ่านสารละลายยูเรียเป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที จะได้สัญญาณการตอบสนองดังแสดงในภาพประกอบ 10 โดยมีเวลาการตอบสนอง 2 - 4 นาที และใช้เวลา 6 - 15 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง (ตาราง 2) ภาพประกอบ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตอบสนองและความเข้มข้นของยูเรีย โดยขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายยูเรียเพิ่มขึ้น ช่วงความเข้มข้นของสารละลายยูเรียที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นคือ 20 - 60 มิลลิโมลาร์ และความไววิเคราะห์ของระบบนี้คือ 26 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง 0.9959

ตาราง 2 ช่วงเวลาต่างๆ ของการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดในลักษณะผ่านสารละลายแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของยูเรีย (มิลลิโมลาร์)	เวลาการตอบสนอง (นาที.วินาที)	เวลาวิเคราะห์ (นาที.วินาที)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลง (มิลลิโวลต์)
5	1.32	6.26	4.2
10	1.40	7.42	9.0
20	2.00	8.24	16.8
30	2.08	9.10	21.4
40	2.38	10.27	24.0
50	2.54	11.17	27.2
60	3.09	12.11	29.4
80	3.18	13.06	31.2
100	4.26	15.00	31.6



ภาพประกอบ 10 สัญญาณการตอบสนองของเฮนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพประกอบ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลอการิทึมของความเข้มข้นของยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

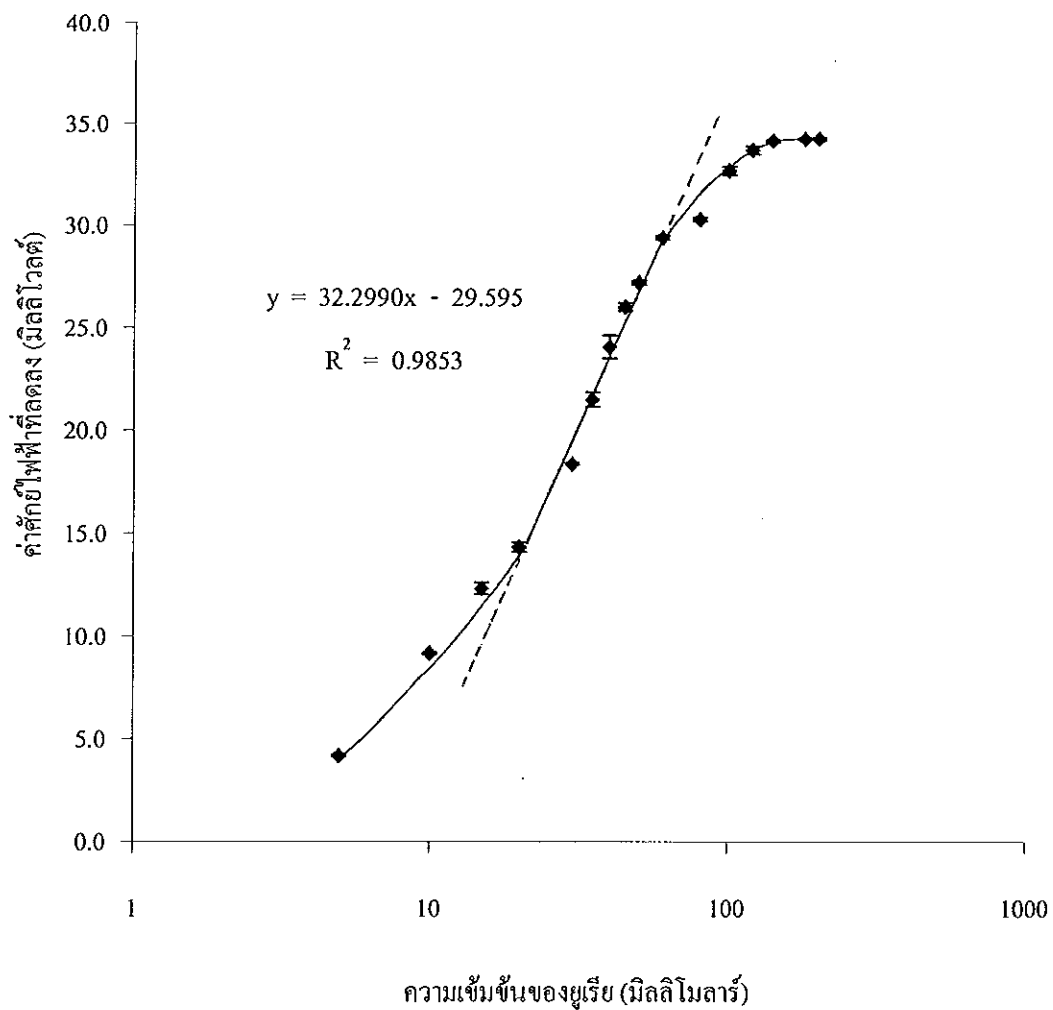
จากการเปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบคงที่และแบบพัลส์ (ภาพประกอบ 9 และ 11) พบว่าการผ่านสารละลายทั้งสองแบบจะมีช่วงความเข้มข้นของสารละลายยูเรียที่ทำให้การตอบสนองเชิงเส้นเหมือนกันคือ 20 - 60 มิลลิโมลาร์ โดยการผ่านสารละลายแบบต่อเนื่องจะมีค่าความไววิเคราะห์สูงกว่าการผ่านสารละลายแบบพัลส์ 4 เปอร์เซ็นต์ แต่จะใช้ปริมาณสารละลายยูเรียและเวลาวิเคราะห์มากกว่า ดังนั้นเพื่อลดปริมาณของสารละลายและเวลาการวิเคราะห์ให้น้อยลงจึงเลือกผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที สำหรับการทดลองต่อไป

3.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย

การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดต่อสารละลายยูเรียความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตาราง 3 และภาพประกอบ 12 พบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดคือ 20 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของสารละลายยูเรียที่ให้ค่าการตอบสนองเชิงเส้นอยู่ในช่วง 20 - 60 มิลลิโมลาร์ เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 60 มิลลิโมลาร์ ค่าความไววิเคราะห์จะลดลงเนื่องจากปริมาณของสารละลายยูเรียมีมากเกินไปเกินความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ยูรีเอส ทำให้ค่าสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเพิ่มขึ้นจากการใช้สารละลายยูเรียที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เพียงเล็กน้อยและเข้าสู่ค่าคงที่ ดังนั้นจึงเลือกช่วงความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย 20 - 60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่วัดปริมาณยูเรียได้ง่ายและแน่นอนเหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

ตาราง 3 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย
เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50
มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของยูเรีย (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลง (มิลลิโวลต์)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
5	4.1	4.2	4.2	4.2	0.1
10	9.1	9.2	9.2	9.2	0.1
15	12.5	12.5	12.0	12.3	0.3
20	14.6	14.2	14.2	14.3	0.2
30	18.4	18.3	18.4	18.4	0.1
35	21.4	21.9	21.2	21.5	0.4
40	24.6	23.5	24.1	24.1	0.6
45	26.2	25.8	26.0	26.0	0.2
50	27.1	27.3	27.2	27.2	0.1
60	29.5	29.3	29.4	29.4	0.1
80	30.2	30.4	30.3	30.3	0.1
100	32.9	32.5	32.7	32.7	0.2
120	33.9	33.5	33.7	33.7	0.2
140	34.2	34.1	34.2	34.2	0.1
180	34.3	34.2	34.3	34.3	0.1
200	34.2	34.3	34.3	34.3	0.1



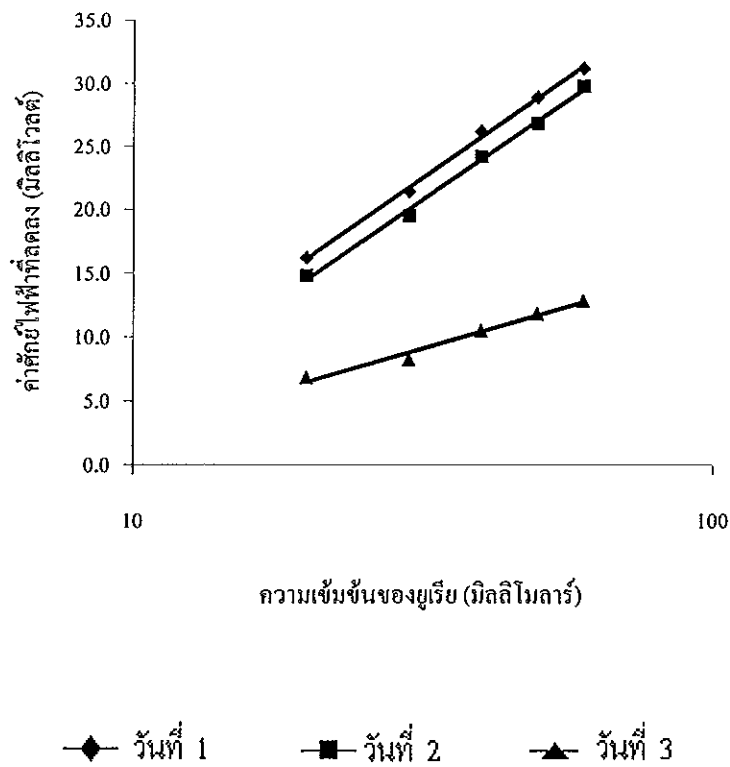
ภาพประกอบ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและลอการิทึมของความเข้มข้นของสารละลายยูเรีย เมื่อผ่านสารละลายยูเรียแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

3.1.4 ผลของอายุของเอนไซม์เมมเบรน

เมื่อผ่านสารละลายยูเรียความเข้มข้นต่างๆเข้าไปในระบบที่ใช้เอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมใหม่และทดลองซ้ำกับเอนไซม์เมมเบรนอันเดิมในวันที่ 2 และ 3 พบว่าสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนจะลดลงเมื่ออายุการใช้งานเพิ่มขึ้น (ตาราง 4 ภาพประกอบ 13) เมื่อพิจารณาค่าความไววิเคราะห์จะเห็นว่าวันที่ 2 ค่าความไววิเคราะห์จะต่ำกว่าวันที่ 1 1.3 เปอร์เซ็นต์ แต่ในวันที่ 3 ค่าความไววิเคราะห์จะต่ำกว่าวันแรกถึง 59 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือเอนไซม์เมมเบรนมีอายุการใช้งานเพียง 2 วัน อายุการใช้งานซึ่งค่อนข้างสั้นนี้อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากระยะเวลาการใช้งานของเอนไซม์มากขึ้นทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลง หรืออาจจะเป็นผลจากการสูญหายของเอนไซม์ที่เกิดจากการแตกของเจลในระหว่างใช้งาน รวมทั้งจากการเก็บเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดไว้ในเซลล์ไหลผ่าน (ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ยูเรียม) ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30 องศาเซลเซียส) ซึ่งความร้อนจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลาย ส่งผลทำให้แอกติวิตีลดลง (สุนันทา, 2535)

ตาราง 4 การตอบสนองของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและความเข้มข้นของสารละลายยูเรียจากการใช้เอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมใหม่และทดลองซ้ำกับเอนไซม์เมมเบรนอันเดิม ในวันที่ 2 และ 3

ความเข้มข้นของยูเรีย (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลง (มิลลิโวลต์)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
20	16.2	14.8	6.8
30	21.4	19.5	8.2
40	26.2	24.2	10.5
50	28.9	26.8	11.8
60	31.2	29.8	12.8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อลิออกซิเจนของมิลลิโมลาร์)	31.9541	31.5281	13.0967
สัมประสิทธิ์การคลอเยนเงิน ยกกำลังสอง	0.9975	0.9960	0.9811



ภาพประกอบ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงและล้อยคาริเทียมของความเข้มข้นของสารละลายยีสต์ เมื่อใช้เอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมใหม่และทำซ้ำกับเอนไซม์เมมเบรนอันเดิมในวันที่ 2 และ 3 โดยผ่านสารละลายยีสต์แบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นว่าเทคนิคโพเทนชิโอมิเตอร์กับไอเซนเซอร์ที่ใช้ เอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดมีค่าการตอบสนองเชิงเส้นในช่วง 20 - 60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งน่าจะใช้ วิเคราะห์หาปริมาณยูเรียในช่วงนี้ได้ ในขณะที่ตัวอย่างมีความเข้มข้นของยูเรียมากกว่า 60 มิลลิโมลาร์สามารถทำให้ตัวอย่างเจือจางลงเพื่อให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ แต่ถ้าตัวอย่างมี ปริมาณยูเรียน้อยกว่าขีดจำกัดต่ำสุด (20 มิลลิโมลาร์) เช่นในเลือดของคนปกติจะมีปริมาณ ยูเรียในช่วง 1.3 - 4.3 มิลลิโมลาร์ (Anderson and Cockayne, 1993) ระบบไอเซนเซอร์ นี้จะตรวจวัดไม่ได้ ดังนั้นหากต้องการที่จะใช้ระบบนี้วิเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวจะต้องมีการปรับ ประจุเพื่อเพิ่มขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด วิธีหนึ่งคือการเตรียมเอนไซม์เมมเบรนให้มีความ หนาลดลง (จากเดิมเอนไซม์เมมเบรนที่เตรียมมีความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร) เนื่องจาก การใช้เอนไซม์เมมเบรนที่บางลงไปหุ้มที่หัวพีเอซีอิเล็กโทรดน่าจะช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการ แพร่ของสารละลายยูเรียให้ดีขึ้น ทำให้มีการแลกเปลี่ยนของไฮโดรเจนไอออนระหว่างสารละลาย และภายในอิเล็กโทรดได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งน่าจะทำให้เอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดตรวจวัดสารละลาย ยูเรียในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงได้

เมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์ของระบบโพเทนชิโอมิเตอร์ซึ่งควรจะมีค่าตามสมการ เนินสต์ (59 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้นของสาร ที่ 25 องศาเซลเซียส) พบว่าค่าความไว วิเคราะห์ของเมมเบรนเอนไซม์อิเล็กโทรดที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณยูเรียมีค่าเพียง 32 มิลลิโวลต์ ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น (ภาพประกอบ 12) ซึ่งน้อยกว่าจากสมการเนินสต์ 46 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของอิเล็กโทรดในระบบไหลผ่านแบบพัลส์โดยไม่มีเอนไซม์ เมมเบรน พบว่าความไววิเคราะห์มีค่า 53 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น ต่ำกว่า ทฤษฎีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็นของ เอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเป็นผลมาจากตัวเอนไซม์เมมเบรนที่มีประสิทธิภาพของการทำให้เกิด ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ยูรีเอสที่น้อย เกินไปและ/หรือการที่โมเลกุลของยูเรียไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาทั้งหมด

เนื่องจากการตอบสนองของระบบโพเทนชิโอมิเตอร์มีความสัมพันธ์กับค่าล็อกการิทึม ของความเข้มข้น นั่นหมายความว่าที่ความไววิเคราะห์ 32 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้นหากค่าการตอบสนองคลาดเคลื่อนไปเพียง 1 มิลลิโวลต์ จะทำให้การตรวจวัดปริมาณสาร คลาดเคลื่อนไป 7.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณสารให้มีความถูกต้องขึ้นจำเป็น จะต้องปรับปรุงระบบการทดลองเพื่อให้มีความไววิเคราะห์มากขึ้น เช่น เพิ่มปริมาณเอนไซม์ และ/หรือเปลี่ยนลักษณะของระบบจากระบบเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดเป็นเอนไซม์รีแอกเตอร์

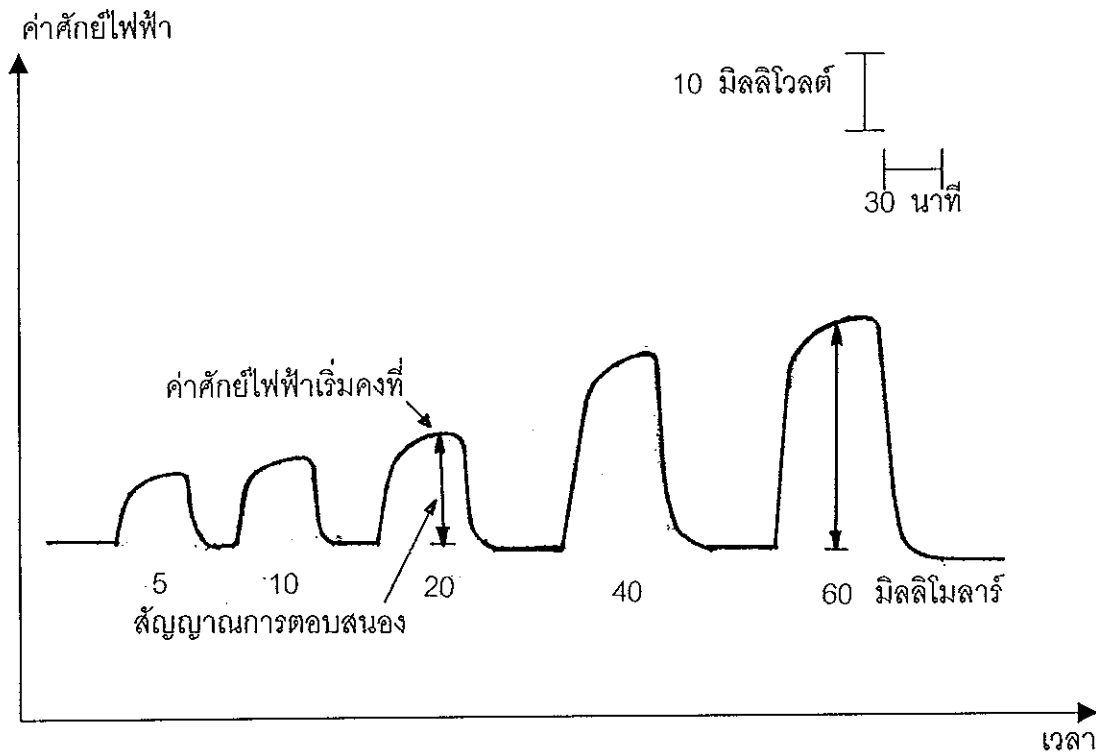
เพราะการใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์จะสามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์รวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารละลายยูเรียกับเอนไซม์เจล ทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดได้มากขึ้น ขนาดของสัญญาณการตอบสนองและความไววิเคราะห์ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้การใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์อาจจะช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับการเก็บเอนไซม์เจลได้ด้วย เนื่องจากสามารถถอดออกจากระบบไหลผ่านและนำมาเก็บในตู้เย็นได้โดยไม่รบกวนระบบวิเคราะห์เหมือนกับในระบบเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งอาจจะช่วยให้อายุการใช้งานของเอนไซม์เจลเพิ่มขึ้น

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีน

3.2.1 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

ในการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีนโดยมีเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเริ่มต้นด้วยการศึกษาการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ภาพประกอบ 14 แสดงลักษณะการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสต่อการผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าต้องใช้เวลาประมาณ 6 - 7 นาที หลังจากผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนเข้าไปในระบบวิเคราะห์ จึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ โดยค่าศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นเมื่อเอนไซม์เริ่มตอบสนอง ระยะเวลานี้เป็นผลรวมระหว่างเวลาที่สารละลายเคลื่อนที่เข้าไปในระบบไหลผ่านรวมกับเวลาที่อะเซทิลโคลีนแพร่ผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์จนเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและเวลาที่สารละลายเคลื่อนที่ต่อไปยังอิเล็กทรอนิกส์ หลังจากนั้นอีก 1 - 4 นาที (ขึ้นกับความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน (ตาราง 5)) สัญญาณจะเข้าสู่สภาวะคงที่ ช่วงเวลานี้คือเวลาการตอบสนอง จากนั้นจึงผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลังจากผ่านบัฟเฟอร์ 6 - 7 นาที สัญญาณจะเริ่มมีการกลับคืนสู่เบสไลน์ ทั้งนี้เนื่องจากบัฟเฟอร์ใช้เวลาช่วงหนึ่งจึงจะเคลื่อนที่ถึงเอนไซม์รีแอกเตอร์และอิเล็กทรอนิกส์ สัญญาณจะกลับสู่เบสไลน์ภายใน 9 - 12 นาที (เวลาล้าง) โดยเวลาในการล้างเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนสูงขึ้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงๆมีปริมาณสารละลายอะเซทิลโคลีนแพร่ผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์มากจึงต้องใช้เวลามากจึงจะสามารถล้างสารละลายอะเซทิลโคลีนได้หมด ดังนั้นการผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบคงที่นี้จะใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 26 - 38 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง สำหรับขนาดของสัญญาณการตอบสนองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้นสัญญาณการตอบสนองก็จะเพิ่มขึ้น (ค่าศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นมากขึ้น) และจากภาพประกอบ 15 จะเห็นว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นคือ 10 - 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่า

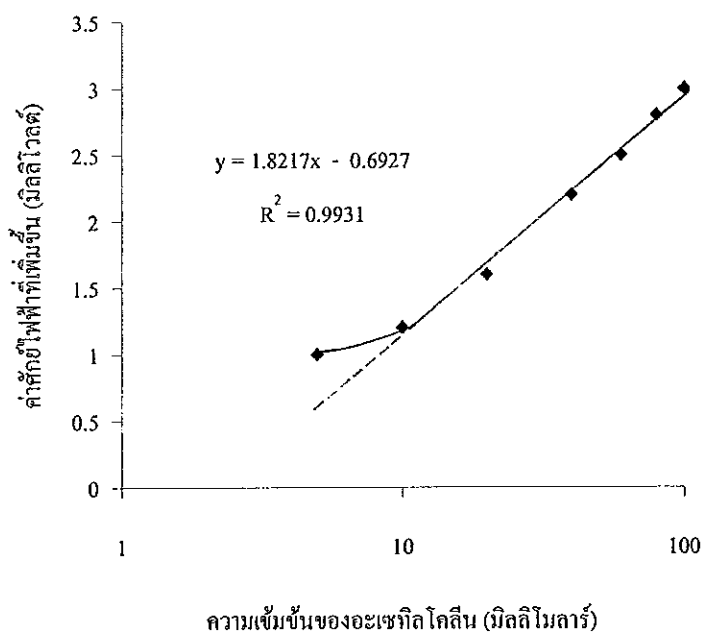
ความไววิเคราะห์เท่ากับ 1.8 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น และมีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง 0.9931



ภาพประกอบ 14 สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตร

ตาราง 5 ช่วงเวลาต่างๆ และขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (สัญญาณการตอบสนอง) ของ เอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบ ต่อเนื่อง ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน (มิลลิโมลาร์)	เวลาการตอบสนอง (นาทิจวินาที)	เวลาดำง (นาทิจวินาที)	เวลาวิเคราะห์ (นาทิจวินาที)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์)
5	1.12	8.30	26.06	1.0
10	2.08	8.45	28.06	1.2
20	2.15	9.02	29.17	1.6
40	2.24	10.42	31.02	2.2
60	3.07	11.12	34.27	2.5
80	3.39	11.48	37.39	2.8
100	3.42	12.25	38.03	3.0



ภาพประกอบ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลอการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบต่อเนื่องด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

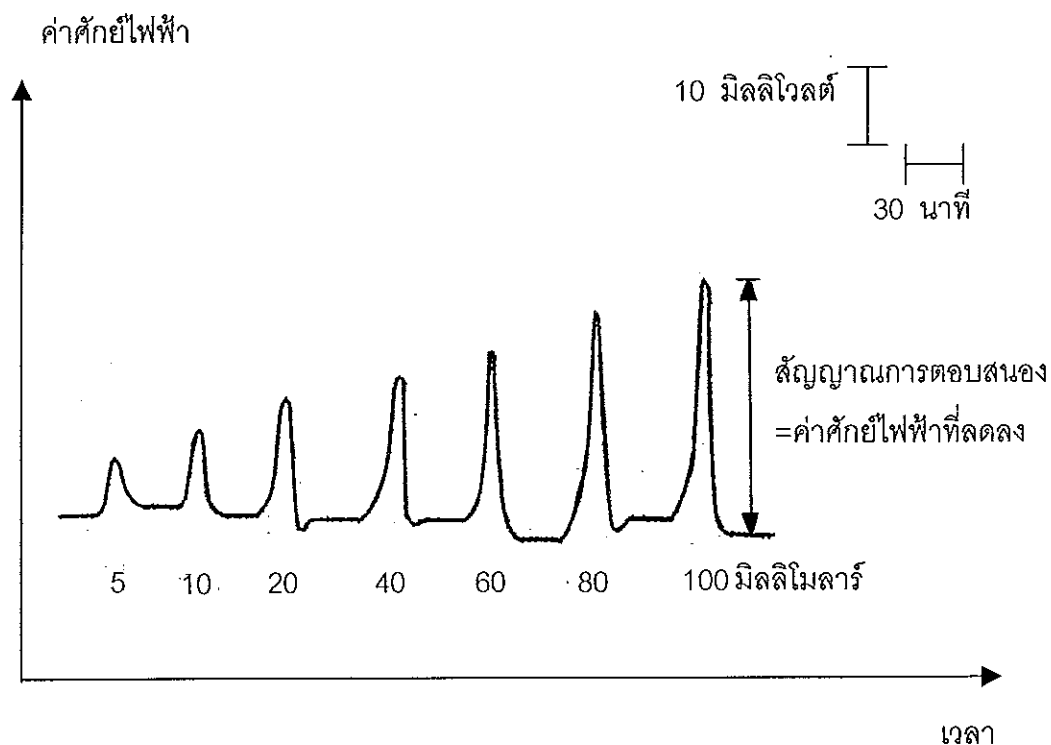
3.2.2 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในลักษณะผ่านสารละลายแบบพัลส์

เมื่อวัดสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

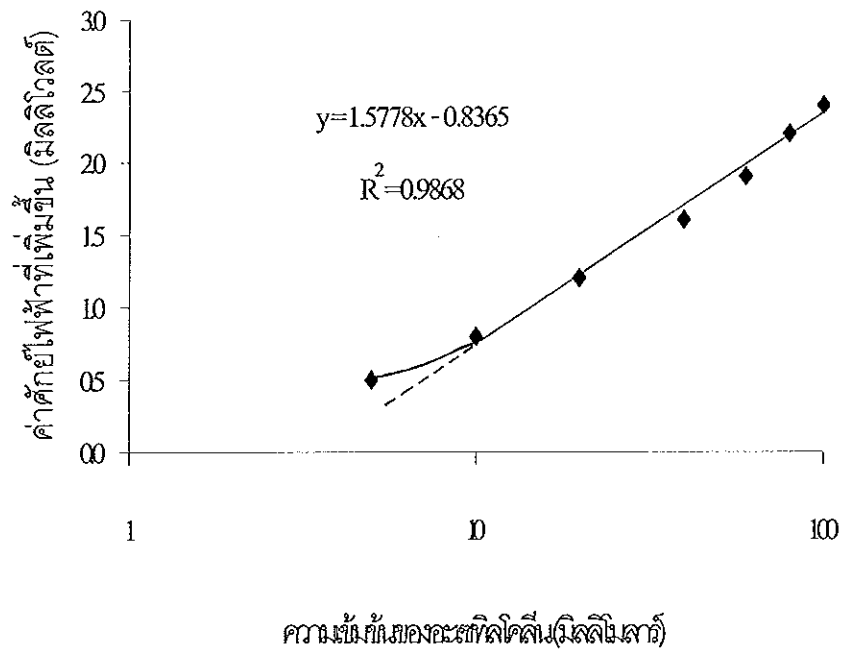
แบบคงที่จะให้สารละลายอะเซทิลโคลีน 3.0 - 3.5 มิลลิลิตร และใช้เวลาวิเคราะห์ 26 - 38 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง เพื่อลดปริมาณของสารและเวลาที่ใช้น้อยลงจึงเปลี่ยนลักษณะการผ่านสารละลายตัวอย่างเป็นแบบพัลส์ โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนเป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเมื่อเวลาประมาณ 6 - 7 นาที ใช้เวลาการตอบสนอง 1 - 4 นาที โดยใช้เวลา 9 - 14 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง (ตาราง 6) จากผลการทดลองพบว่าสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้น (ตาราง 6 และภาพประกอบ 16) ช่วงความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นคือ 10 - 100 มิลลิโมลาร์ และความไววิเคราะห์ของระบบนี้คือ 1.4 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง 0.9863 (ภาพประกอบ 17) จากการเปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในลักษณะผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบต่อเนื่องและแบบพัลส์ พบว่าการผ่านสารละลายทั้งสองแบบจะมีช่วงความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นเหมือนกันคือ 10 - 100 มิลลิโมลาร์ โดยจะมีค่าความไววิเคราะห์ใกล้เคียงกัน แต่การผ่านสารละลายแบบต่อเนื่องจะใช้ปริมาณสารละลายอะเซทิลโคลีนและเวลาการวิเคราะห์มากกว่าการผ่านสารละลายแบบพัลส์ ดังนั้นเพื่อลดปริมาณของสารละลายและเวลาวิเคราะห์ให้น้อยลงจึงเลือกผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที

ตาราง 6 ช่วงเวลาต่างๆ ของการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในลักษณะผ่านแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน (มิลลิโมลาร์)	เวลาการตอบสนอง (นาที.วินาที)	เวลาวิเคราะห์ (นาที.วินาที)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์)
5	1.26	9.19	0.5
10	1.48	9.59	0.8
20	2.02	10.49	1.2
40	2.21	11.34	1.4
60	2.48	12.00	1.7
80	3.12	13.47	2.0
100	3.34	14.16	2.2



ภาพประกอบ 16 สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพประกอบ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการที่มของความเข้มของอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ เป็นเวลา 3 นาที ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2.3 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

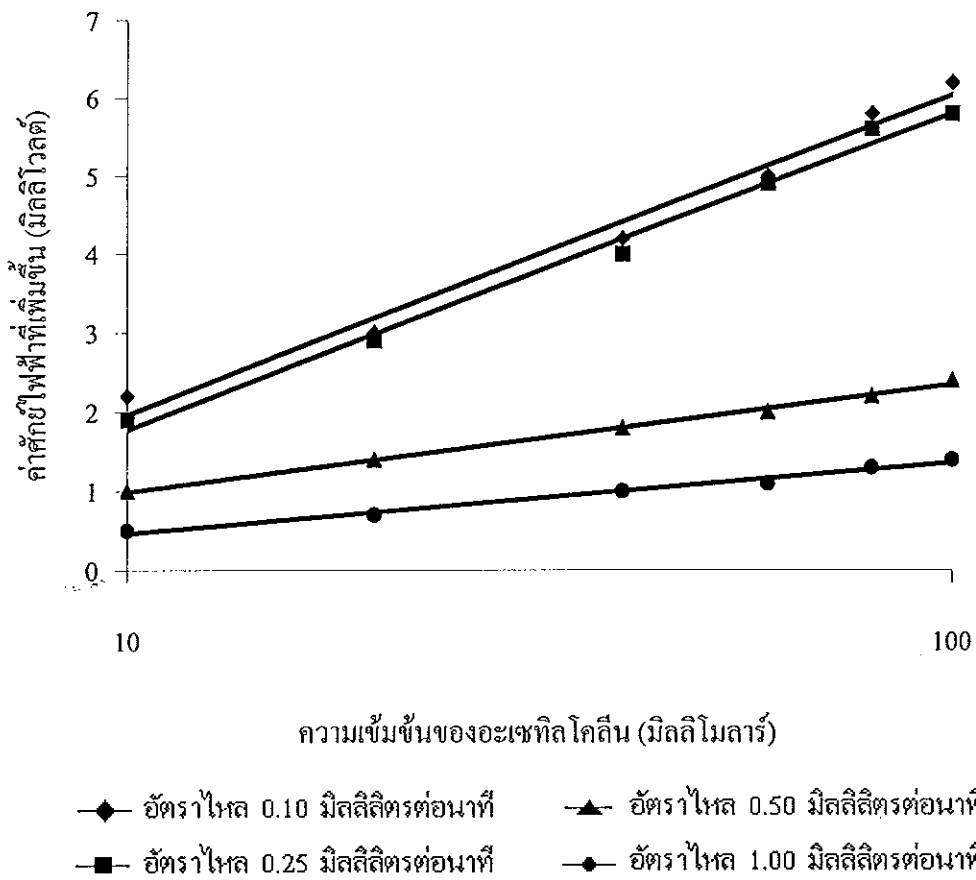
อัตราไหลเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสัญญาณการตอบสนองโดยจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะการแพร่และช่วงเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ภายในเอนไซม์รีแอกเตอร์และเซลล์ไหลผ่านอัตราไหลที่ช้าจะทำให้สารตัวอย่างมีเวลาอยู่ในเอนไซม์รีแอกเตอร์นาน ทำให้มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาได้มากขึ้น ในขณะที่อัตราไหลที่ช้าเกินไปจะเกิดผลของการแพร่ในลักษณะตามยาว (longitudinal) โดยสารจะแพร่จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังความเข้มข้นต่ำ (แม้น และ อมร, 2535) ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ส่วนอัตราไหลที่เร็วเกินไปจะทำให้ช่วงเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเอนไซม์รีแอกเตอร์สั้นมีผลให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อย

สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อสารละลายอะเซทิลโคลีนที่มีปริมาตรเท่ากัน (1.5 มิลลิลิตร) แต่อัตราไหลต่างกันแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 18 จะเห็นว่าสัญญาณการตอบสนอง (การเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้า) จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราไหลลดลง โดยที่อัตราไหล 0.10 และ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายอะเซทิลโคลีนจะไหลผ่านเอนไซม์รีแอกเตอร์อย่างช้าๆทำให้สารละลายมีเวลาอยู่ในรีแอกเตอร์นานทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากจึงได้สัญญาณการตอบสนองที่สูง แต่ที่อัตราไหล 0.50 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที การตอบสนองจะต่ำกว่ามาก ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากสารละลายอยู่ในรีแอกเตอร์ได้ไม่นานนักทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้น้อย และอัตราไหลที่ค่อนข้างเร็วนี้อาจจะทำให้เอนไซม์เจลอัดตัวกันแน่นทำให้การแพร่ของสารเกิดได้ไม่ดี

สำหรับค่าความไววิเคราะห์ ที่อัตราไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที และ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที จะมีความไววิเคราะห์ใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราไหล 0.50 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที จะมีค่าความไววิเคราะห์ต่ำกว่าที่อัตราไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที 67 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำมากนี้จึงพิจารณาเปรียบเทียบเฉพาะที่อัตราไหล 0.10 และ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที จะเห็นว่าทั้งสองอัตราไหลนี้ความไววิเคราะห์ต่างกันเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่อัตราไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้เวลาวิเคราะห์มากกว่าที่อัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ถึง 4 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง 7 ผลของอัตราไหลต่อการตอบสนองของเซนโซมิรีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ส
เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปในระบบไหลผ่าน

ความเข้มข้นของอะเซทิล โคลีน (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์) ที่อัตราไหลต่างๆ			
	0.10 มิลลิลิตรต่อนาที	0.25 มิลลิลิตรต่อนาที	0.50 มิลลิลิตรต่อนาที	1.00 มิลลิลิตรต่อนาที
10	2.2	1.9	1.0	0.5
20	3.0	2.9	1.4	0.7
40	4.2	4.0	1.8	1.0
60	5.0	4.9	2.0	1.1
80	5.8	5.6	2.2	1.3
100	6.2	5.8	2.4	1.4
เวลาวิเคราะห์ (นาที)	13-18	9-14	8-12	6-10
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อลิอการิทึมของมิลลิโมลาร์)	4.0793	4.0351	1.3597	0.8984
สัมประสิทธิ์การลดอยเชิงเส้นยกกำลังสอง	0.9832	0.9918	0.9961	0.9858



ภาพประกอบ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและสื่อการรឹมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลินที่อัตราไหล 0.10, 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลิน 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปในระบบไหลผ่าน

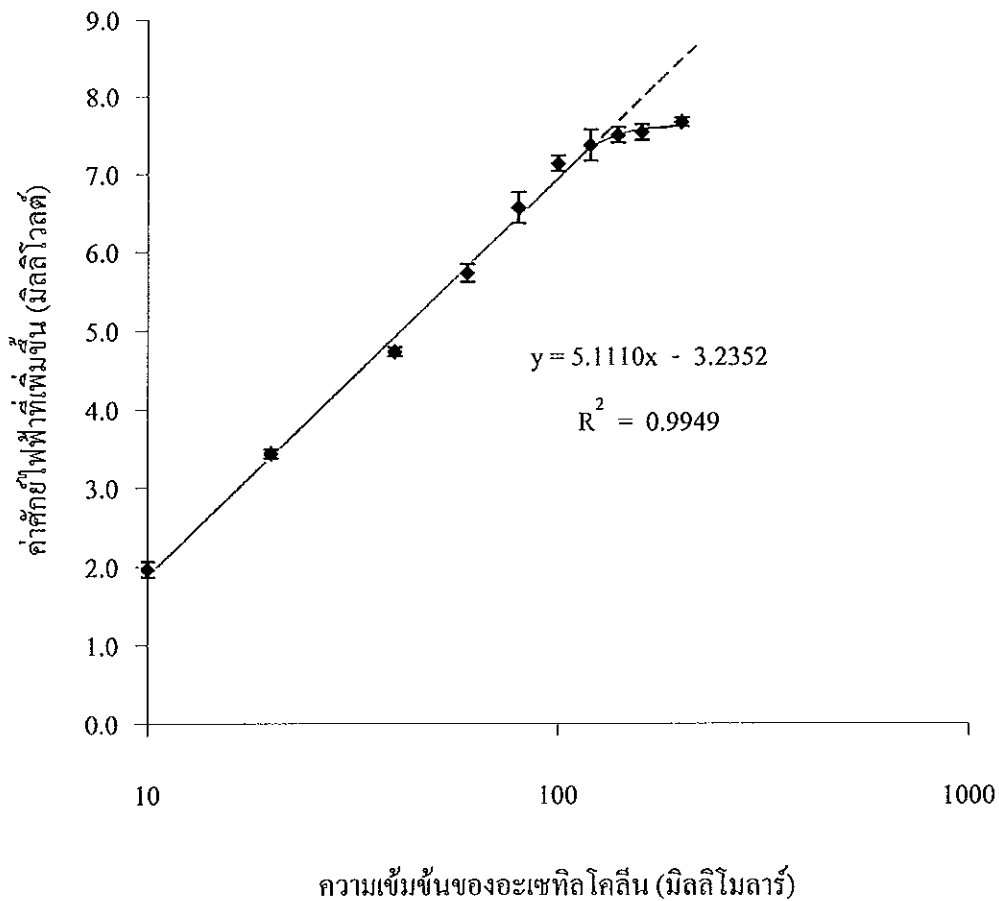
3.2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีน

เอสเทอเรสและความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่อัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรของสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ให้สัญญาณการตอบสนองเชิงเส้นคือ 10 - 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 10 มิลลิโมลาร์ ความไววิเคราะห์ 5.1 มิลลิโวลต์ต่อสิบเท่าของความเข้มข้น และมีสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง 0.9959 (ตาราง 8 และภาพประกอบ 19) เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 100 มิลลิโมลาร์ ค่าการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและเริ่มเข้าสู่ค่าคงที่ ดังนั้นจึงเลือกช่วงความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีน 10 - 100 มิลลิโมลาร์ สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 8 การตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
10	2.0	1.9	2.0	2.0	0.1
20	3.5	3.4	3.4	3.4	0.1
40	4.8	4.6	4.8	4.7	0.1
60	5.8	5.6	5.8	5.7	0.1
80	6.8	6.5	6.4	6.6	0.2
100	7.2	7.2	7.0	7.1	0.1
120	7.4	7.5	7.2	7.4	0.2
140	7.5	7.4	7.6	7.5	0.1
160	7.5	7.5	7.6	7.5	0.1
200	7.6	7.6	7.8	7.7	0.1



ภาพประกอบ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลอคการิทึมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลิน เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลินแบบพัลส์ 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปในระบบไหลผ่านด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของอิเล็กทรอนิกส์ในระบบไหลผ่านแบบพัลส์โดยไม่มีเอนไซม์รีแอกเตอร์ พบว่าความไววิเคราะห์ของระบบมีค่า 57 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (59 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น) แต่ในระบบวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณอะเซทิลโคลีนโดยใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์พบว่าความไววิเคราะห์มีค่าเพียง 5.1 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ต่ำกว่าความไววิเคราะห์ของระบบถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ 57 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น) ถ้าพิจารณาตามปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีน (สมการ 1.2) จะเห็นว่าหนึ่งโมเลกุลของอะเซทิลโคลีนจะให้ไฮโดรเจนไอออนหนึ่งไอออน ดังนั้นหากของเอนไซม์รีแอกเตอร์มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าความไววิเคราะห์ของระบบเอนไซม์รีแอกเตอร์ควรจะเป็น 57 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ประสิทธิภาพที่ต่ำมากของเอนไซม์รีแอกเตอร์นี้น่าจะเป็นผลมาจากปริมาณเอนไซม์ในคอลัมน์ที่น้อยเกินไปทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณสารให้มีความถูกต้องขึ้นจำเป็นจะต้องปรับปรุงระบบการทดลองเพื่อให้มีความไววิเคราะห์มากขึ้น เช่น การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในรีแอกเตอร์ให้มากขึ้นหรือเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารละลายอะเซทิลโคลีนและเอนไซม์เจลเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองก็จะมีค่ามากขึ้นด้วย แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงการทดลองเบื้องต้นเพื่อดูการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ต่ออะเซทิลโคลีนโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งของเอนไซม์โดยยาฆ่าแมลง ซึ่งหากใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เห็นการยับยั้งได้น้อยเพราะเอนไซม์บางส่วนที่ไม่ถูกยับยั้งจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ต่อไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่ได้ทดลองเพิ่มปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์เพื่อให้การตอบสนองและความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้น นั่นคือจะใช้เอนไซม์ปริมาณเดิม (60 ยูนิต) เพราะสัญญาณการตอบสนองที่ได้เพียงพอที่จะเห็นการยับยั้งจากยาฆ่าแมลง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ของระบบที่วัดปริมาณยูเรียโดยใช้ยูเรียเอนไซม์เมมเบรนซึ่งมีปริมาณเอนไซม์น้อยกว่าระบบวัดปริมาณอะเซทิลโคลีนที่ใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ (30 ยูนิต เทียบกับ 60 ยูนิต) แต่จะให้ความไววิเคราะห์มากกว่า เนื่องจากไฮโดรเจนไอออนที่ถูกใช้ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียจะเกิดในยูเรียเอนไซม์เมมเบรนที่ติดกับหัววัด ซึ่งบริเวณช่องว่างระหว่างยูเรียเมมเบรนและหัววัดจะมีปริมาตรน้อยมากทำให้มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนสูง จึงสามารถตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนไอออนที่ลดลงได้ง่าย แต่ในระบบที่วัดปริมาณอะเซทิลโคลีนไฮโดรเจนไอออนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีนในเอนไซม์รีแอกเตอร์จะไหลผ่านไปยังหัววัดที่เสียบบอยู่ในเซลล์ไหลผ่านซึ่งปริมาตรของสาร

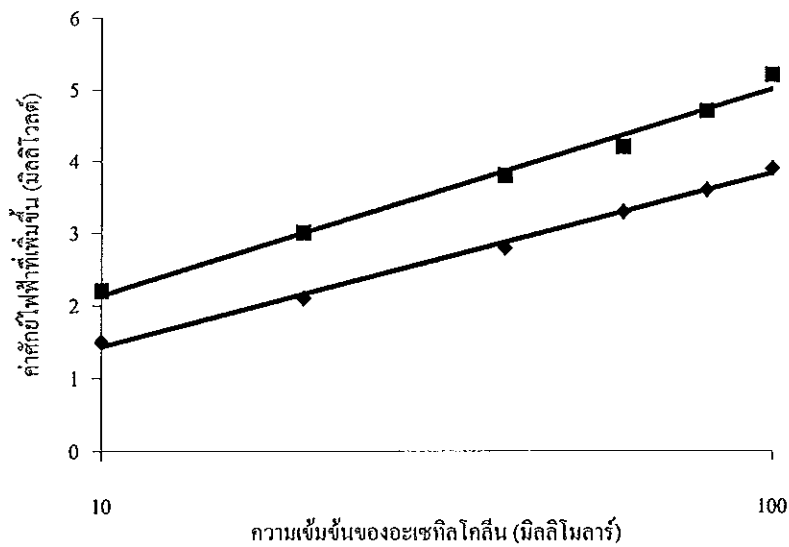
ละลายที่หัววัดมีมากถึง 3 มิลลิลิตร ทำให้มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนน้อยกว่า การตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนไอออนที่เพิ่มขึ้นจะทำได้ยากกว่า จึงทำให้ระบบมีความไววิเคราะห์น้อยกว่า

3.2.5 ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์

จากการศึกษาผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ (ตาราง 9 ภาพประกอบ 20) พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรเท่ากัน เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดเล็กและยาว (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.38 เซนติเมตร ยาว 5.20 เซนติเมตร) จะให้สัญญาณการตอบสนองมากกว่าเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่แต่สั้น (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.50 เซนติเมตร ยาว 3.01 เซนติเมตร) และค่าความไววิเคราะห์จะมากกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาวิเคราะห์เพิ่มขึ้น 3 - 4 นาที ทั้งนี้จะเนื่องจากในเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่ยาวและเล็กจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารละลายอะเซทิลโคลีนกับเอนไซม์เจลมากกว่า ทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดได้มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองจึงมีค่าสูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดเล็กและยาวตลอดการทดลอง

ตาราง 9 ผลของขนาดของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์)	
	เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 เซนติเมตร ยาว 3.01 เซนติเมตร	เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.38 เซนติเมตร ยาว 5.20 เซนติเมตร
10	1.5	2.2
20	2.1	3.0
40	2.8	3.8
60	3.3	4.2
80	3.6	4.7
100	3.9	5.2
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่ออ็อกคาร์ทีนของมิลลิโมลาร์)	2.4043	2.8712
สัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้นยกกำลังสอง	0.9957	0.9877
เวลาการตอบสนอง (นาที)	2 - 4	3 - 6
เวลาวิเคราะห์ (นาที)	9 - 14	12 - 18



- เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.50 เซนติเมตร ยาว 3.01 เซนติเมตร
- ◆— เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.38 เซนติเมตร ยาว 5.20 เซนติเมตร

ภาพประกอบ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและล้อยคาริเทียมของความเข้มข้นของอะเซทิลโคสทิน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีปริมาตรเท่ากันแต่มีขนาดต่างกัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคสทิน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

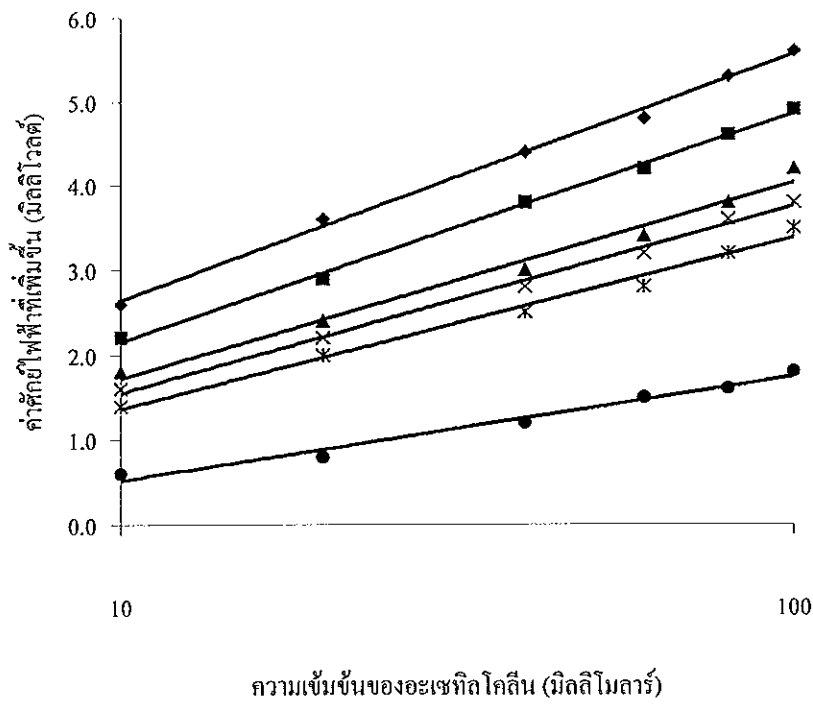
เมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์ของระบบหลังจากเปลี่ยนมาใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเล็กและยาว พบว่าระบบมีความไววิเคราะห์ลดลงเหลือเพียง 2.9 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ซึ่งลดลงจากช่วงเริ่มต้นการทดลองที่ศึกษาดูการตอบสนองของเอนไซม์ถึง 43 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ 5.1 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ภาพประกอบ 19) ในขณะที่ความไววิเคราะห์จากการใช้คอลัมน์ที่มีขนาดใหญ่และสั้นมีค่าเพียง 2.4 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ซึ่งความไววิเคราะห์ที่ลดลงนี้ไม่น่าจะเป็นผลมาจากการเตรียมเอนไซม์รีแอกเตอร์จากเอนไซม์เจลต่างครั้งกัน เพราะการเตรียมรีแอกเตอร์ในลักษณะนี้จะให้ความไววิเคราะห์ต่างกันเพียง 3 - 7 เปอร์เซ็นต์ (ดู 3.2.7) ดังนั้นจึงคาดว่าความไววิเคราะห์ของระบบที่ลดลงน่าจะเกิดจากแอคติวิตีของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ลดลงเนื่องจากอายุของเอนไซม์นับตั้งแต่ตั้งขึ้นนานถึง 1.5 ปี ทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ลดลง ซึ่งส่งผลให้สัญญาณการตอบสนองและความไววิเคราะห์ของระบบลดลง

3.2.6 ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์

เอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพที่เกิดการเสื่อมสภาพได้โดยตัวเอง (denaturation) หรือจากการใช้งานเป็นเวลานานซึ่งจะทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง (สุนันทา, 2335) ตาราง 10 และภาพประกอบ 21 แสดงผลการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่ใช้ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ต่อสารละลายอะเซทิลโคลีน ซึ่งพบว่าสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์จะลดลงเมื่ออายุการใช้งานเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์พบว่าในวันที่ 2 ค่าความไววิเคราะห์จะน้อยกว่าวันที่ 1 อยู่ 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวันที่ 3, 4 และ 5 จะมีค่าความไววิเคราะห์ใกล้เคียงกันแต่จะน้อยกว่าวันที่ 1 มากคือ 21, 25 และ 31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ก็ยังใช้งานได้ ส่วนในวันที่ 6 ค่าความไววิเคราะห์จะต่างจากวันที่ 1 ถึง 58 เปอร์เซ็นต์ คือมีค่าเพียง 1 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น ซึ่งจัดว่าต่ำและไม่เหมาะสมสำหรับการใช้งาน ความเหมาะสมในการใช้งานนี้พิจารณาจากการหาปริมาณยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยอาศัยปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งหากใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีความไววิเคราะห์น้อยกว่า 2 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น อาจจะไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณการตอบสนองภายหลังการยับยั้งได้ ดังนั้นเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีความไววิเคราะห์มากกว่า 2 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น จึงจะเหมาะสมสำหรับการใช้งาน อย่างไรก็ตามหากจุดประสงค์ของระบบนี้คือการวัดปริมาณอะเซทิลโคลีนก็ควรที่จะเพิ่มปริมาณของเอนไซม์เพื่อให้ระบบมีความไววิเคราะห์มากกว่านี้ เนื่องจากความไววิเคราะห์เพียง 2 มิลลิโวลต์ต่อสลิปเท่าของความเข้มข้น เป็นค่าที่น้อยมาก หากผลการวัดคลาดเคลื่อนเพียง 0.1 มิลลิโวลต์ ก็จะทำให้การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นคลาดเคลื่อนไปถึง 12 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 10 ผลของอายุของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของอะเซทิลโคลีน (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์)					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
10	2.6	2.2	1.8	1.6	1.4	0.6
20	3.6	2.9	2.4	2.2	2.0	0.8
40	4.4	3.8	3.0	2.8	2.5	1.2
60	4.8	4.2	3.4	3.2	2.8	1.5
80	5.3	4.6	3.8	3.6	3.2	1.6
100	5.6	4.9	4.2	3.8	3.5	1.8
ความไววิเคราะห์ (มิลลิวอลต์ต่อลิกคาร์ทิมของมิลลิโมลาร์)	2.9243	2.7051	2.3127	2.2026	2.0144	1.2213
สัมประสิทธิ์การลดคดของเชิงเส้นยกกำลังสอง	0.9964	0.9977	0.9845	0.9948	0.9866	0.9803



◆ วันที่ 1 ■ วันที่ 2 ▲ วันที่ 3 ✕ วันที่ 4 * วันที่ 5 ● วันที่ 6

ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการรุ่มของความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลิน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีอายุ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลิน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

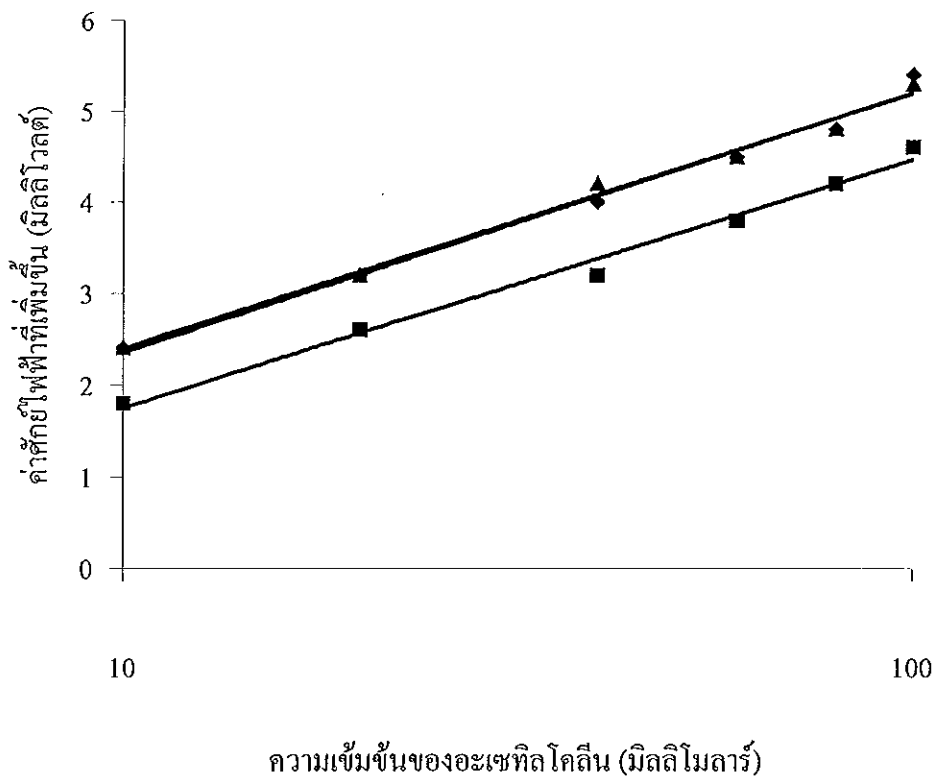
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลของอายุของเอนไซม์เมมเบรน (กรณีวิเคราะห์ยูเรีย) และเอนไซม์รีแอกเตอร์ (กรณีวิเคราะห์เซทิลโคลีน) พบว่าเอนไซม์รีแอกเตอร์จะมีอายุการใช้งานมากกว่าเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด 3 วัน ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะและอุณหภูมิของการเก็บหลังการใช้งานในแต่ละวันต่างกัน โดยเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดจะเสียบอยู่ในเซลล์ไหลผ่านซึ่งภายในมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และโซเดียมเอไซด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ อยู่เต็มโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30 องศาเซลเซียส) แต่เอนไซม์รีแอกเตอร์จะถอดออกจากกระบอกไหลผ่านและเก็บในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ภายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่ต่างกันนี้จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสื่อมสภาพเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งอุณหภูมิห้องอาจจะมีค่าสูงเกินไปที่จะเก็บเอนไซม์จึงทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีลดลงได้รวดเร็วกว่าการเก็บในตู้เย็น ดังนั้นการเก็บเอนไซม์รีแอกเตอร์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงเป็นการรักษาสภาพธรรมชาติของเอนไซม์และมีผลทำให้เอนไซม์รีแอกเตอร์มีอายุการใช้งานมากกว่าเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด

3.2.7 ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์รีแอกเตอร์

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์คือปริมาณของเอนไซม์ในรีแอกเตอร์ หากต้องการให้รีแอกเตอร์แต่ละอันมีการตอบสนองเท่ากันเอนไซม์เจลในรีแอกเตอร์แต่ละอันควรมีปริมาณเอนไซม์เท่าๆ กัน ซึ่งการใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์หลายๆ อันที่เตรียมจากเอนไซม์เจลที่ทำในครั้งเดียวกันหรือเตรียมเจลต่างครั้งกันอาจจะมีผลต่อสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ในแต่ละรีแอกเตอร์อาจจะไม่เท่ากัน จากการศึกษาผลการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ 3 อัน (อันที่ 1 ถึง 3) ซึ่งมีเอนไซม์เจลที่เตรียมในครั้งเดียวกัน พบว่าสัญญาณการตอบสนองมีค่าใกล้เคียงกัน (ตาราง 11 ภาพประกอบ 22) และความไววิเคราะห์ของสัญญาณมีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างนี้อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์สในโพลีอะคริลาไมด์เจล แต่สำหรับเอนไซม์รีแอกเตอร์อันที่ 4, 5 และ 6 ที่เตรียมจากเอนไซม์เจลต่างครั้งกัน จะเห็นว่าสัญญาณการตอบสนองจะมีความแตกต่างกันมากกว่าข้างต้น (ตาราง 11 ภาพประกอบ 23) โดยความไววิเคราะห์ของสัญญาณแตกต่างกัน 3-7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากสภาวะการเตรียมเจลที่ต่างกันในแต่ละครั้ง เช่น อุณหภูมิขณะเตรียมเจล ระยะเวลาการแข็งตัวของเจล ซึ่งอาจจะมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ ดังนั้นหากต้องใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์หลายๆ อันก็น่าจะเตรียมเอนไซม์รีแอกเตอร์จากเอนไซม์เจลที่เตรียมในครั้งเดียวกัน

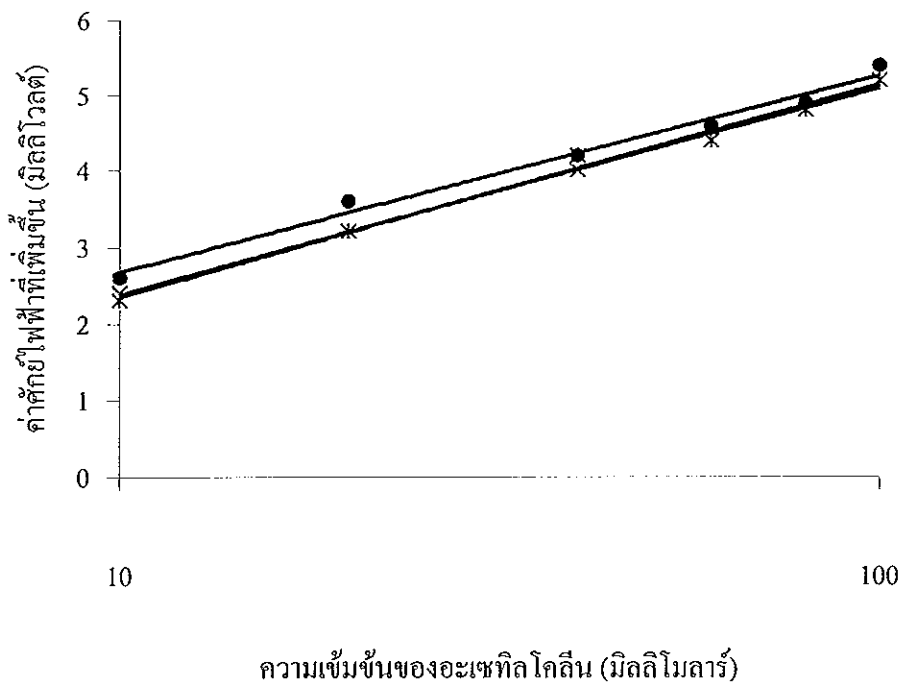
ตาราง 11 สัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่เตรียมในครั้งเดียวกันและต่างครั้งกัน เมื่อผ่านอะเซทิลโคลีน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นของอะเซทิล โคลีน (มิลลิโมลาร์)	ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น (มิลลิโวลต์)					
	เอนไซม์รีแอกเตอร์ จากเอนไซม์เจตครั้งเดียวกัน			เอนไซม์รีแอกเตอร์ จากเอนไซม์เจตต่างครั้งกัน		
	อันที่ 1	อันที่ 2	อันที่ 3	อันที่ 4	อันที่ 5	อันที่ 6
10	2.4	1.8	2.4	2.4	2.3	2.6
20	3.2	2.6	3.2	3.2	3.2	3.6
40	4.0	3.2	4.2	4.0	4.2	4.2
60	4.5	3.8	4.5	4.4	4.4	4.6
80	4.8	4.2	4.8	4.8	4.8	4.9
100	5.4	4.6	5.3	5.2	5.2	5.4
ความไววิเคราะห์ (มิลลิโวลต์ต่อลิออคการิทึมของมิลลิโมลาร์)	2.8541	2.7182	2.8004	2.7196	2.8023	2.5969
สัมประสิทธิ์การลดข้อเบี่ยงเส้นยกกำลังสอง	0.9889	0.9891	0.9918	0.9961	0.9906	0.9866



◆ เอนไซม์รีแอกเตอร์อื่นที่ 1 ■ เอนไซม์รีแอกเตอร์อื่นที่ 2 ▲ เอนไซม์รีแอกเตอร์อื่นที่ 3

ภาพประกอบ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและล้อยอกการที่มของความเข้มข้นของอะเซทิลโคลิน เมื่อใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่เตรียมจากเอนไซม์เจลในครั้งเดียวกัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลิน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที



—x— เอนไซม์อีแอกเตอร์อันที่ 4 —*— เอนไซม์อีแอกเตอร์อันที่ 5 —●— เอนไซม์อีแอกเตอร์อันที่ 6

ภาพประกอบ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นและลือคการวิทมของความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลิน เมื่อใช้เอนไซม์อีแอกเตอร์ที่เตรียมจากเอนไซม์เจดต่างครั้งกัน โดยผ่านสารละลายอะเซทิลโคลิน 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

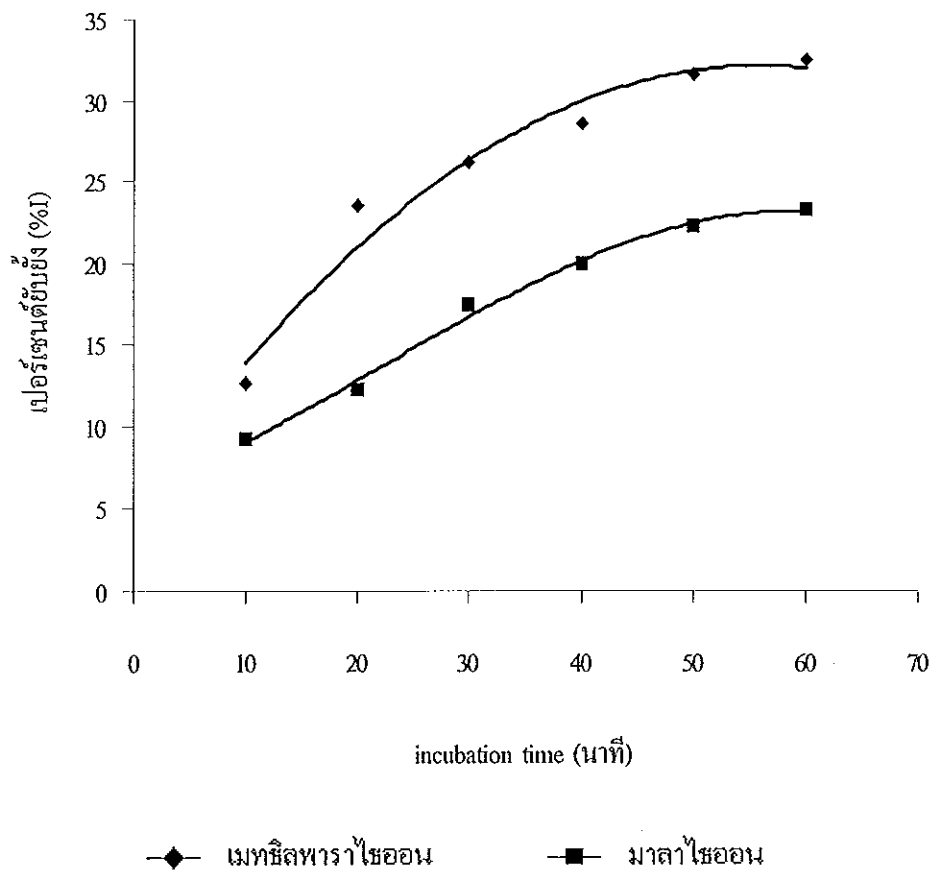
3.3 การศึกษาการยับยั้งเนื่องจากยาฆ่าแมลง

3.3.1 ผลของ incubation time

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการที่สารยับยั้งจะจับตัวกับเอนไซม์ได้มากหรือน้อยคือเวลา ได้ทดสอบปัจจัยนี้โดยการเปลี่ยนช่วงเวลา incubation time ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เอนไซม์จับตัวกับยาฆ่าแมลงซึ่งเป็นสารยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ พบว่าเมื่อ incubation time เพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 20 และ 30 นาที ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะสูงขึ้น (ตาราง 12 ภาพประกอบ 24) ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากยาฆ่าแมลงมีโอกาสที่จะจับตัวกับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อ incubation time มากกว่า 30 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเริ่มคงที่เนื่องจากที่ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงที่ใช้ (10 ส่วนในล้านส่วน) จะมีความสามารถจับกับเอนไซม์ที่มีอยู่ในเอนไซม์เจลได้มากที่สุดเพียงเท่านี้ จากภาพประกอบ 24 จะเห็นว่าที่ incubation time 30 - 60 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยที่ incubation time 50 และ 60 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเริ่มคงที่นั่นคือจะมีค่าต่างกันเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการศึกษาการยับยั้งโดยยาฆ่าแมลงต่อไปจึงใช้ incubation time 30 นาที เนื่องจากในช่วงเวลานี้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งค่อนข้างสูงและใช้เวลาการวิเคราะห์ไม่มากนัก

ตาราง 12 ผลของ incubation time และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) ที่ถูกยับยั้งโดยสารละลายเมทิลพาราไรออนและมาลาไรออนที่มีความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน

Incubation time (นาที)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง (%I)	
	เมทิลพาราไรออน	มาลาไรออน
10	12.6	9.2
20	23.5	12.2
30	26.1	17.4
40	28.6	20.0
50	31.6	22.2
60	32.5	23.2



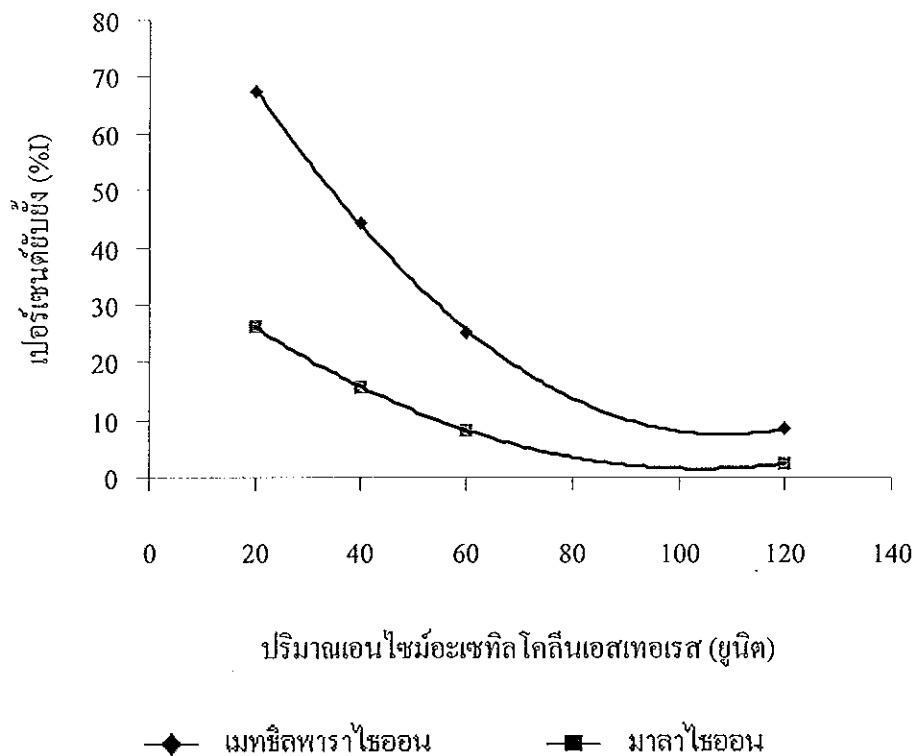
ภาพประกอบ 24 ความสัมพันธ์ระหว่าง incubation time และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรส (%I) เมื่อยับยั้งด้วยสารละลายเมทธิลพาราไซออนและมาลาไซออนที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน

3.3.2 ผลของปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสต่อการยับยั้ง

ปริมาณเอนไซม์ภายในเอนไซม์รีแอกเตอร์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง หากมีเอนไซม์ในปริมาณมากเกินไปจะเห็นผลการยับยั้งไม่ชัดเจน ในทางตรงข้ามหากมีเอนไซม์ปริมาณน้อยเกินไปสารยับยั้งเพียงเล็กน้อยก็อาจจะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งได้หมด จากตาราง 13 และภาพประกอบ 25 จะเห็นว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในเอนไซม์รีแอกเตอร์ลดลงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อมีปริมาณเอนไซม์อยู่น้อยเอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งจึงทำให้ความสามารถของการเร่งปฏิกิริยาลดลง และในทางตรงกันข้ามเมื่อปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในเอนไซม์รีแอกเตอร์เพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่ยังไม่ถูกยับยั้งและสามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ จากการพิจารณาจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส 60 ยูนิต เนื่องจากการยับยั้งเอนไซม์เห็นได้ชัดเจนและในขณะเดียวกันเอนไซม์บางส่วนที่ไม่ถูกยับยั้งก็ยังมีมากพอที่จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะเซทิลโคลีนทำให้สามารถตรวจวัดการตอบสนองเพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ต่อไป

ตาราง 13 ผลของปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสต่อเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (%I) โดยผ่านสารละลายเมทิลไรออนและมาลาไรออนที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที

ปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (ยูนิต)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง (%I)	
	เมทิลพาราไรออน	มาลาไรออน
20	67.5	26.1
40	44.4	15.6
60	25.1	8.3
120	8.5	2.4



ภาพประกอบ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การตอบสนองเอโนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ (%I) และปริมาณของเอโนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอร์ภายในเอโนไซม์รีแอกเตอร์ในปริมาณต่างๆ กัน เมื่อยับยั้งเอโนไซม์ด้วยสารละลายเมทิลพาราไรออนและมาลาไรออนที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน และใช้ incubation time 30 นาที

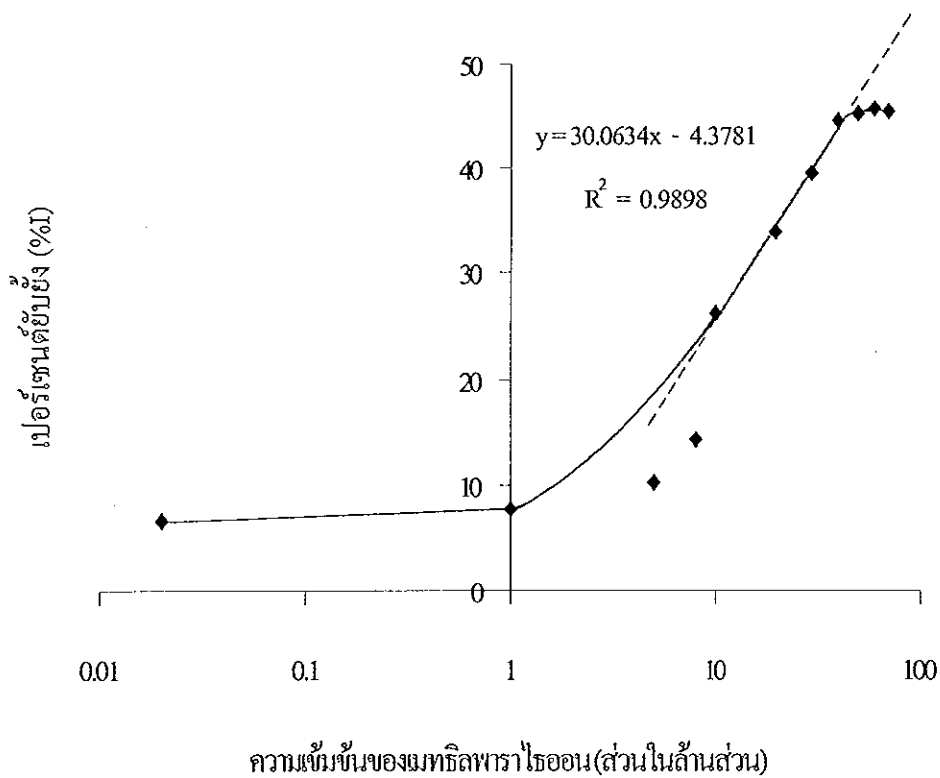
เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (%I) โดยใช้ยาฆ่าแมลงสองชนิดคือเมทิลพาราไรดอนและมาลาไรดอน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันของยาฆ่าแมลงทั้งสอง เมทิลพาราไรดอนจะให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่ามาลาไรดอน เนื่องจากเมทิลพาราไรดอนเป็นยาฆ่าแมลงที่มีระดับความเป็นพิษอยู่ในระดับมีพิษร้ายแรง ในขณะที่มาลาไรดอนอยู่ในระดับมีพิษน้อย ซึ่งพิจารณาได้จากค่า LD_{50} (leathal dose) ซึ่งเป็นปริมาณมิลลิกรัมของสารต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวที่ทำให้สัตว์ทดลองปริมาณครึ่งหนึ่งตายลง (ศุภมาศ, 2540) โดยค่า LD_{50} (จากการใช้หนูเป็นสัตว์ทดลองและให้ยาฆ่าแมลงทางปาก) ของเมทิลพาราไรดอนและมาลาไรดอนคือ 15 และ 1500 ตามลำดับ ดังนั้นเมทิลพาราไรดอนจึงเป็นยาฆ่าแมลงที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีกว่ามาลาไรดอน

3.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรดอนและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรดอน พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรดอนที่ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นเชิงเส้น คือ 10 - 40 ส่วนในล้านส่วน (ตาราง 14 ภาพประกอบ 26) เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรดอนสูงกว่า 40 ส่วนในล้านส่วน เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองจะเริ่มเข้าสู่ค่าคงที่ และได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในช่วงความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรดอน 10 - 40 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งให้ผลตามตาราง 15 ภาพประกอบ 27

ตาราง 14 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบไหลผ่านปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที

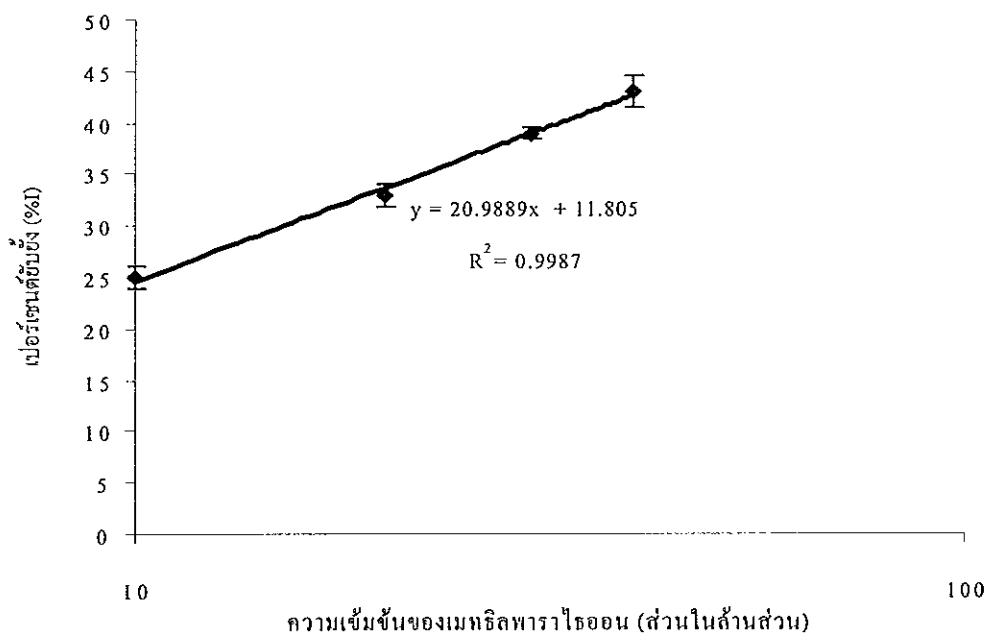
ความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออน (ส่วนในล้านส่วน)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง (%)
0.02	6.5
1	7.8
5	10.2
8	14.3
10	26.2
20	33.9
30	39.5
40	44.6
50	45.2
60	45.6
70	45.5



ภาพประกอบ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ย้อมยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายเมทิลีนพาราไรออน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที

ตาราง 15 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออน

ความเข้มข้นของเมทิลพาราไรออน (ส่วนในล้านส่วน)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง (%I)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
10	26.2	24.6	24.1	25.0	1.1
20	33.9	32.9	31.8	32.9	1.1
30	39.5	38.8	38.4	38.9	0.6
40	44.6	42.4	41.8	42.9	1.5
ความไววิเคราะห์	20.9889				
สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง	0.9987				



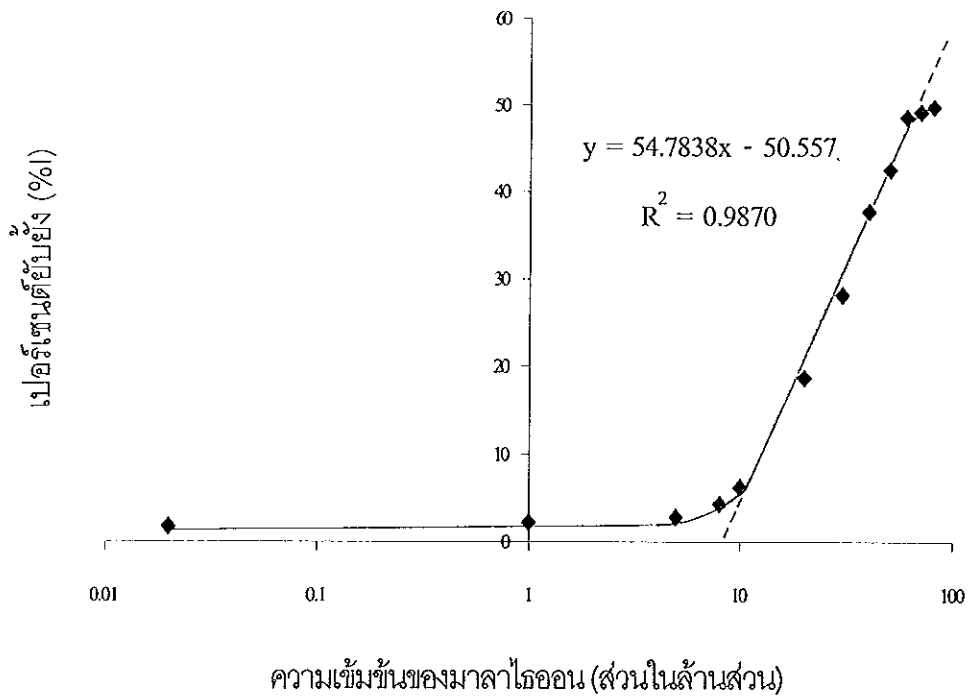
ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราไรออน 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในล้านส่วน

3.3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออนและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออนซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสอีกชนิดหนึ่งที่ใช้กันมาก (2.9.5) พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออนที่ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเป็นเชิงเส้น คือ 10 - 60 ส่วนในล้านส่วน (ตาราง 16 ภาพประกอบ 28) โดยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองจะเริ่มเข้าสู่ค่าคงที่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออนสูงกว่า 60 ส่วนในล้านส่วน และได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออน 10 - 60 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งให้ผลตามตาราง 17 และภาพประกอบ 29

ตาราง 16 เปอร์เซนต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออน

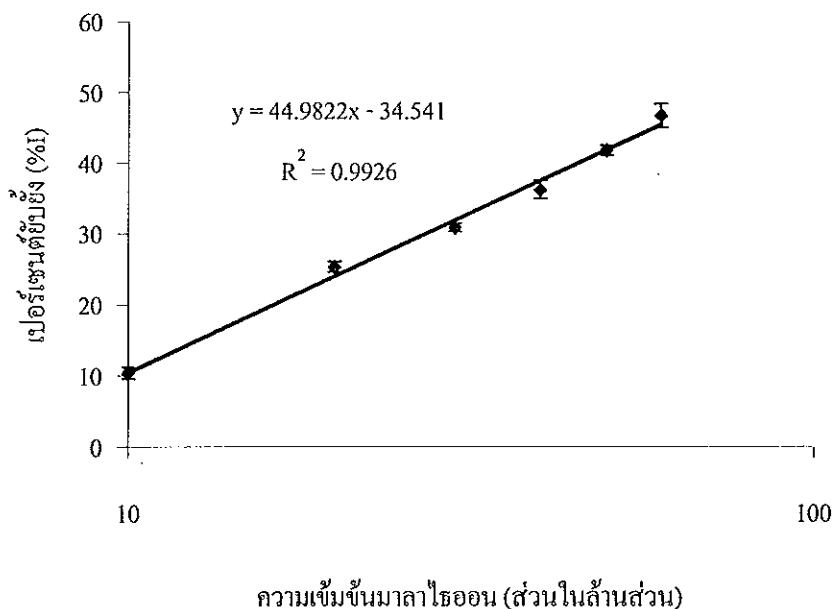
ความเข้มข้นของมาลาไรออน (ส่วนในล้านส่วน)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง (%I)
0.02	1.8
1	2.2
5	2.8
8	4.3
10	6.2
20	18.7
30	28.1
40	37.7
50	42.5
60	48.6
70	49.2
80	49.8



ภาพประกอบ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ที่ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาโครอน เมื่อผ่านเข้าไปในระบบไหลผ่าน 1.25 มิลลิลิตร และใช้ incubation time 30 นาที

ตาราง 17 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (%I) และ ความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออน

ความเข้มข้นของมาลาไรออน (ส่วนในล้านส่วน)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง (%I)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
10	9.5	10.8	10.8	10.4	0.8
20	25.7	24.5	25.6	25.3	0.8
30	30.2	31.4	30.8	30.8	0.6
40	37.7	35.5	35.4	36.2	1.3
50	42.5	41.6	41.2	41.8	0.7
60	48.6	46.3	45.2	46.7	1.7
ค่าความไววิเคราะห์	44.9822				
สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นยกกำลังสอง	0.9822				



ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการตอบสนอง (%I) และความเข้มข้นของสารละลายมาลาไรออน 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ส่วนในล้านส่วน

จะเห็นได้ว่าเทคนิคโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลลพาราไรออนและมาลาไรออนในช่วงความเข้มข้น 10 - 40 และ 10 - 60 ส่วนในล้านส่วน โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากันคือ 10 ส่วนในล้านส่วน และมีความไววิเคราะห์ 21 และ 45 เปอร์เซ็นต์ต่อสปีท่างของความเข้มข้น ตามลำดับ แต่ก่องวัตตุมิพิษการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้ค่าสูงสุดของเมทิลลพาราไรออนและมาลาไรออน (Maximum Residue Limited ; MRL) ไว้ที่ 0.2 และ 8 ส่วนในล้านส่วน (ก่องวัตตุมิพิษการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2538) ซึ่งเทคนิคโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ยังไม่สามารถตรวจวัดปริมาณเมทิลลพาราไรออนและมาลาไรออนได้ถึงระดับความเข้มข้นดังกล่าวได้ ดังนั้นอาจจะต้องมีการปรับปรุงโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์เพื่อเพิ่มขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เช่น การเพิ่ม incubation time ให้นานขึ้นและ/หรือลดปริมาณเอนไซม์เพื่อช่วยให้ยาฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นในระดับที่น้อยมากๆ ได้มีเวลาจับกับเอนไซม์มากขึ้น ซึ่งน่าจะช่วยให้เห็นผลการยับยั้งได้

บทที่ 4

บทสรุป

งานวิจัยนี้ทดสอบการใช้เทคนิคโพเทนชิโอเมตริกในระบบไบโอเซนเซอร์โดยใช้การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียและอะเซทิลโคลีนเป็นกรณีศึกษา ในระบบที่ทดสอบใช้กลาสพีเอซีเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ร่วมกับเอนไซม์ยูรีเอสหรืออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ถูกตรึงโดยวิธีกักในโพลีอะคริลาไมด์เจล เอนไซม์ยูรีเอสและอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียและอะเซทิลโคลีน ทำให้ปริมาณไฮโดรเจนไอออนในสารละลายเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงนี้ด้วยกลาสพีเอซีเล็กโทรด นอกจากนี้ยังใช้โพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์วิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสสองชนิด ได้แก่ เมทิลพาราไรดอนและมาลาไรดอนซึ่งเป็นชนิดที่ใช้กันมาก โดยยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียโดยใช้เอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรด พบว่าการผ่านสารละลายที่เหมาะสมคือแบบพัลส์เนื่องจากใช้สารละลายและเวลาในการวิเคราะห์ไม่มากนัก โดยผ่านสารละลายยูเรีย 1.5 มิลลิลิตร เข้าไปเป็นช่วงๆ ในระบบไหลผ่านที่มีบัฟเฟอร์ไหลผ่านอย่างต่อเนื่อง ด้วยอัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งช่วงความเข้มข้นของสารละลายยูเรียที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นคือ 20 - 60 มิลลิโมลาร์ โดยเอนไซม์เมมเบรนจะมีอายุการใช้งานประมาณ 2 วัน

ในกรณีวิเคราะห์ปริมาณอะเซทิลโคลีนได้เปลี่ยนลักษณะของเซนเซอร์จากเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดมาเป็นเอนไซม์รีแอกเตอร์ เนื่องจากเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดมีข้อจำกัดในการเก็บเอนไซม์เจลทำให้มีอายุการใช้งานสั้น จากการศึกษาสัญญาณการตอบสนองของเอนไซม์รีแอกเตอร์ต่อสารละลายอะเซทิลโคลีน พบว่าการผ่านสารละลายอะเซทิลโคลีนแบบพัลส์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่อัตราไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้สัญญาณการตอบสนองที่ดีและใช้เวลาวิเคราะห์ไม่มากนัก ในการทดลองจะเลือกใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ที่มีขนาดยาวและเล็กนั่นคือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.38 เซนติเมตร ยาว 5.20 เซนติเมตร เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารละลายอะเซทิลโคลีนกับเอนไซม์เจล ซึ่งจะช่วยให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดได้มากขึ้น สัญญาณการตอบสนองก็จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยช่วงความเข้มข้นของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ให้การตอบสนองเชิงเส้นคือ 10 - 100 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์รีแอกเตอร์มีอายุการใช้งานประมาณ 5 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์รีแอกเตอร์หลายอันจากเอนไซม์

เจลที่เตรียมในครั้งเดียวกันได้โดยจะให้ความไววิเคราะห์ต่างกันไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสชนิดเมทิลพาราโรดอนและมาลาโรดอนโดยเปรียบเทียบการตอบสนองก่อนและหลังการผ่านยาฆ่าแมลง พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมที่เอนไซม์จับกับยาฆ่าแมลง (incubation time) คือ 30 นาที โดยปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่เหมาะสมในการศึกษาการยับยั้งมีค่าคือ 60 ยูนิต สำหรับช่วงความเข้มข้นของสารละลายเมทิลพาราโรดอนและมาลาโรดอนที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชิงเส้นคือ 10-40 และ 10-60 ส่วนในล้านส่วน

สำหรับขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดปริมาณยูเรียของระบบเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดคือ 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับทรานสดิวเซอร์ชนิดอื่น เช่น แอมโมเนียเซนเซอร์ที่ให้ขีดจำกัดต่ำสุด 0.01 มิลลิโมลาร์ (Liu *et al.*, 1997) หรือแอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ที่ใช้แอมโมเนียมซีเลคทีฟอิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์จะให้ขีดจำกัดต่ำสุด 0.01 มิลลิโมลาร์ (Bertocchi and Comphgnoe, 1996) และแอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ที่ใช้พีเอชอิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ก็ให้ขีดจำกัดต่ำสุด 0.01 มิลลิโมลาร์ (Stred'anský *et al.*, 2000) แต่เทคนิคดังกล่าวจะไม่มีควมจำเพาะโดยจะตอบสนองต่อไอออนของโซเดียมและโพแทสเซียมที่อยู่ในเลือดและปัสสาวะ ในกรณีของการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซทิลโคลีนจะมีขีดจำกัดต่ำสุด 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้เทคนิคแอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ที่ใช้แพลตทินัมเป็นทรานสดิวเซอร์ซึ่งให้ขีดจำกัดต่ำสุด 1 ไมโครโมลาร์ (Mascini and Moscone, 1986) แต่เทคนิคนี้จะไม่มีความจำเพาะมากนักโดยจะได้รับผลการรบกวนจากโปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ และสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงสองชนิดคือเมทิลพาราโรดอนและมาลาโรดอนจะมีขีดจำกัดต่ำสุดเท่ากันคือ 10 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งมีค่าสูงกว่าเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีคือ 0.17 และ 0.20 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ (Kjølholt, 1985) แต่การใช้เทคนิคนี้จะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะได้ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพงและผู้ใช้ต้องมีความชำนาญและทักษะพอสมควร (Jeanty and Merty, 1998) ซึ่งเทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์จะมีข้อดีกว่าเทคนิคอื่นคือไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะ รวมทั้งเครื่องมือราคาไม่แพงนัก และใช้งานได้ง่าย

จากการทดสอบการใช้เทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ โดยใช้กลาสพีเอชอิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์ โดยนำระบบเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและเอนไซม์รีแอกเตอร์มาใช้ร่วมกับระบบไหลผ่านเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย อะเซทิลโคลีน และยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์

กาโนฟอสฟอรัส พบว่าเทคนิคนี้มีระบบการวิเคราะห์ที่ง่ายต่อการใช้และดูแลรักษาและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆได้

เทคนิคโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ในงานวิจัยนี้มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ค่อนข้างสูง ขนาดของสัญญาณและความไววิเคราะห์ที่ค่อนข้างต่ำ รวมทั้งอายุการใช้งานของเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดและเอนไซม์รีแอกเตอร์ที่น้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ แนวทางหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของเทคนิคนี้ให้ดีขึ้นคือการเตรียมเอนไซม์เจลที่มีความหนาลดลงเพื่อให้โมเลกุลของสับสเตรทแพร่ผ่านเจลเข้าไปจับกับเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น ซึ่งน่าจะช่วยให้ขีดจำกัดต่ำสุดและขนาดของสัญญาณเพิ่มขึ้น รวมทั้งการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ยูรีเอสหรืออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในเอนไซม์เมมเบรนอิเล็กโทรดหรือเอนไซม์รีแอกเตอร์ให้มากขึ้นก็จะทำให้ขนาดของสัญญาณการตอบสนองและความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้อาจจะปรับปรุงระบบไหลผ่านโดยลดระยะห่างระหว่างรีแอกเตอร์และเซลล์ไหลผ่านเพื่อลดการเจือจางตามความยาวของความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายซึ่งวิธีนี้ก็จะทำให้สัญญาณการตอบสนองเพิ่มขึ้นได้ แต่ในกรณีวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงหากต้องการให้ขีดจำกัดต่ำสุดเพิ่มขึ้นจะต้องลดปริมาณเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในรีแอกเตอร์ให้น้อยลง เพื่อให้ยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นน้อยๆจับกับเอนไซม์ได้มากขึ้นแต่ปริมาณเอนไซม์ในรีแอกเตอร์จะต้องไม่น้อยจนยาฆ่าแมลงจับได้หมดนั่นคือต้องมีสัญญาณการตอบสนองภายหลังการยับยั้งให้สามารถตรวจวัดได้ นอกจากนี้อีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ให้ดีขึ้นคือการเปลี่ยนแปลงวิธีตรึงเอนไซม์จากแบบกักเก็บแบบโควาเลนต์ (covalent) บนตัวพวยชนิดต่างๆ เช่น เม็ดแก้วอะคริลาไมด์หรือซิลิกาเจล โดยเตรียมในลักษณะเอนไซม์รีแอกเตอร์เนื่องจากการตรึงเอนไซม์แบบกักจะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่ค่อนข้างรุนแรงซึ่งอาจจะมีผลไปลดแอกติวิตีของเอนไซม์ทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลงได้ รวมทั้งการตรึงเอนไซม์แบบนี้เอนไซม์ไม่ได้เกิดพันธะเคมีใดๆกับช่องตาข่ายพอลิเมอร์จึงมีโอกาสที่เอนไซม์จะหลุดออกไปในระหว่างการใช้งานได้ ในขณะที่การตรึงเอนไซม์แบบโควาเลนต์บนตัวพวยจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดได้มากขึ้น ทำให้ขนาดของสัญญาณ ความไววิเคราะห์และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเพิ่มขึ้น อีกทั้งความแข็งแรงของพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพวยก็จะช่วยให้เอนไซม์ไม่หลุดออกไปในระหว่างการใช้งานได้ ซึ่งน่าจะช่วยให้อายุการใช้งานของรีแอกเตอร์เพิ่มขึ้นด้วย

ผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วแสดงให้เห็นว่าหากมีการปรับปรุงระบบโพเทนซิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพดีขึ้นระบบนี้น่าจะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารชนิด

ต่างๆ ทั้งที่อาศัยการเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์และการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ ดังนั้นเทคนิคโพเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ที่ใช้กลาสพีเอชอิเล็กโทรดเป็นทรานสดิวเซอร์นี้ น่าจะใช้ในการวิเคราะห์สารอื่นๆ ที่มีปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชได้ ไม่ว่าจะปฏิกิริยานั้นจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือใช้เอนไซม์ไบโอเซนเซอร์ในการหาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น การหาปริมาณโลหะหนัก (ทองแดงและปรอท) เนื่องจากโลหะหนักจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Tran-Minh, 1993a)

บรรณานุกรม

กองประชุมวิชาการ กองวัดภูมิพิษการเกษตร ครั้งที่ 1 ณ.โรงแรมแกรนด์จอมเทียนพาเลข
23 - 25 สิงหาคม 2538 หน้า 79 - 103.

ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2535. วิธีโพเทนชิโอเมตริก. ใน *เคมีวิเคราะห์* 2, พิมพ์ครั้งที่ 5, หน้า 29-132.
กรุงเทพฯ : สำนักงานพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ปราณี อานแป๊ะ. 2535. บทนำ. ใน *เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1*, พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้า 1-5.
กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2535. แก๊สโครมาโตกราฟี. ใน *หลักการและเทคนิค
วิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. หน้า 811-882. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. สารฆ่าศัตรูพืชกับภาวะมลพิษของดิน. ใน *ภาวะมลพิษของดินจากการ
ใช้สารเคมี*, พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้า 140-141. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.

สุนันทา ภิญาวัฒน์. 2535. เอนไซม์. ใน *ชีวเคมี 1*, พิมพ์ครั้งที่ 5, หน้า 133-169. กรุงเทพฯ :
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สุภาณี พิมพ์สมาน. 2540. พัฒนาการของสารฆ่าแมลงและสภาพการใช้สารฆ่าแมลงในประเทศ
ไทย. ใน *สารฆ่าแมลง*, พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้า 1-34. ขอนแก่น : โรงพิมพ์คลังนานาชาติ.

สุรศักดิ์ วัฒนเสถียร. 2538. การคำนวณทางสถิติ. ใน *เทคนิคการคำนวณทางเคมีวิเคราะห์*. หน้า
20-55. เชียงใหม่ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Anderson, C. S. and Cockayne, S. 1993. Nonprotein Nitrogenous Compounds and
Renal Function. In *Clinical Chemistry : concepts and applications*. pp
367-369. London : W.B.Saunders.

Bergmeyer, U. H. 1974: Acetylcholine and Choline. In *Methods of Enzymatic
Analysis* (vol.IV), pp 1819-1824. New York : Academic Press.

Bertocchi, P. and Compagnone, D. 1996. Amperometric ammonium ion and urea
determination with enzyme-based probe. *Biosensors & Bioelectronics* 11 :
1-10.

Danzer, T. and Schwedt, G. 1996. Chemometric methods for the development of a
biosensor system and the evaluation of inhibition studies with solutions
and mixtures of pesticides and heavy metal. Part1. Development of an

- enzyme electrodes system for pesticide and heavy metal screening using selected chemometric method. *Analytical Chimica Acta* 318 : 275-286.
- Eggenstein, C., Borchardt, M., Dumschat, C., Grundig, B. and Cammann, K. 1995. Potentiometric biosensor in double matrix membrane technology. *Biosensors & Bioelectronics* 10 : 595-600.
- Eggins, B. R. 1996. Introduction. In *Biosensors : an introduction*. pp 1-12. New York : John Wiley & Sons.
- Eldefrawi, M. E. 1993. Why I am a Biosensor Optimist. *Biosensors & Bioelectronics* 8 : i.
- Gorton, L. and Ögren, L. 1981. Flow injection analysis for glucose and urea with enzyme reactors and on-line dialysis. *Analytica Chimica Acta* 130 : 45-53.
- Guilbault, G. G. and Montalvo, G. J. 1969. A Urea-Specific Enzyme Electrode. *Journal of the American Chemical Society* 91 : 2164-2165.
- Guilbault, G. G. and Montalvo, G. J. 1970. An Enzyme Electrode for the Substrate Urea. *Journal American Chemistry Society* 92 : 2533-2538.
- Guilbault, G. G. and Trap, M. 1974. A Specific enzyme electrode for urea. *Analytica Chimica Acta* 73 : 355-365.
- Hendji, N. A. M., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Clechet, P., Shul'ga, A. A., Strikha, I. V., Netchiporuk, I. L., Soldatkin, P. A. and Wlodarski, B. W. 1993. Sensitive Detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilized cholinesterase. *Analytica Chimica Acta* 281 : 3-11.
- Ivnitskii, D. M. and Rishpon, J. 1994. A potentiometric biosensor for pesticide based on thiocholine hexacyanoferrate (III) reaction. *Biosensors & Bioelectronics* 9 : 569-576.
- Jeanty, G. and Merty, J. L. 1998. Detection of paraoxon by continuous flow system based enzyme sensor. *Biosensors & Bioelectronics* 13 : 213-218.
- Johansson, G. and Ögren, L. 1976. An enzyme reactor electrode for urea determinations. *Analytica Chimica Acta* 84 : 23-29.

- Kano, K., Morikage, K., Uno, B., Esaka, Y. and Goto, M. 1994. Enzyme Microelectrodes for choline and acetylcholine and their application. *Analytica Chimica Acta* 299 : 69-74.
- Kjølholt, J. 1985. Determination of trace amounts of organophosphorus pesticides and related compounds in soils and sediments using capillary gas chromatography and a nitrogen-phosphorus detector. *Journal of Chromatography* 325 : 231-238.
- Koncki, R., Chudzik, A. and Walcerz, I. 1999a. Urea determination using pH-enzyme electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 : 51-57.
- Koncki, R., Hulanicki, A., Glab, S. 1997. Biochemical modifications of membrane ion-selective sensors. *trends in analytical chemistry* 16 : 528-536.
- Koncki, R., Walcerz, I. and Leszczyn'ska, E. 1999b. Enzymatically modified ion-selective electrode for flow injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19 : 633-638.
- Liu, B, Hu, R. and Deng, J. 1997. Studies on a potentiometric urea biosensor based on an ammonia electrode and urease, immobilized on a γ -aluminum oxide matrix. *Analytica Chimica Acta* 341 : 161-169.
- Llenado, R. A. and Rechnita, G. A. 1974. Automated serum urea determination using membrane electrodes. *Analytical Chemistry* 46 : 1109-1112.
- Mascini, M. and Moscone, D. 1986. Amperometric acetylcholine and choline sensors with immobilized enzymes. *Analytica Chimica Acta* 179 : 439-444.
- Mascini, M. and Palleschi, G. 1982. Determination of creatinine in clinical sample with a creatininase reactor and an ammonia probe. *Analytical Chimica Acta* 136 : 69-76.
- Meyerhoff, M. and Rechnitz, A. G. 1976. An activated enzyme electrode for creatinine. *Analytica Chimica Acta* 85 : 277-285.
- Miller, J. C. and Miller, J. N. 1993. *Statistics for Analytical Chemistry*, (3rd ed.). 104 -109 pp. West Sussex : Simon & Schuster International Group.

- Pryde, L. T. 1973. Pesticides : Chemical Controls and Their Alternatives. In *Environmental Chemistry : An Introduction*. pp 253-255. California : San Diego Mesa College.
- Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Alegret, S. and Fàbregas, E. 1999. Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all solid state potentiometric ammonium electrode. *Biosensors & Bioelectronics* 14 : 67-75.
- Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Fàbregas, E. Alegret, S. 1998. Potentiometric biosensors for lysine analysis based on a chemically immobilized lysine oxidase membrane. *Analytica Chimica Acta* 371 : 49-56.
- Skoog, D. A. and West, D. M. 1963. Potentiometric Methods. In *Principle of instrumental Analysis*, (2nd ed.). pp 539-579. New York : Holt, Rinehart and Winston.
- Stein, K. and Schwedt, G. 1993. Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. *Analytica Chimica Acta* 272 : 73-81.
- Stred'anský, M., Pizzariello, A., Stred'anská, S. and Miertuš, S. 2000. Amperometric pH-sensing biosensors for urea, penicillin, and oxalacetate. *Analytica Chimica Acta* 415 : 151-157.
- Taylor, A. J. and Vadgama, P. 1992. Analytical reviews in clinical biochemistry : the estimation of urea. *Analytical Clinical Biochemistry* 29 : 245-264.
- Tran-Minh, C. 1993a. Introduction. In *Biosensors*. pp 1-6. France : Chapman & Hall and Masson.
- Tran-Minh, C. 1993b. Biosensors for the Analysis of Pesticide Residues. *Analytical Processings* 30 : 73-74.
- Tran-Minh, C., Pandey, C. P. and Kumaran, S. 1990. Studies on Acetylcholine Sensor and its Analytical Application Based on the Inhibition of Cholinesterase. *Biosensors & Bioelectronics* 5 : 461-471.

- Trojanowicz, M. and Hitchman, M. L. 1996. Determination of pesticide using electrochemical biosensors. *Trends in analytical chemistry* 15 : 38-41.
- Turner, A. P. F. 1989. Current Trends in Biosensor Research and development. *Sensor and Actuator* 17 : 433-450.
- Turner, A. P. F. Karube, I. and Wilson, G. S. 1987. Fundamentals an Applications. In *Biosensor*. pp 135-141. Oxford : Oxford University Press.
- Wang, Joseph. 1984. Potentiometry. In *Analytical Chemistry*. 107-109. New York : WILEY-VCH.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวอรรรณ ทิพย์มณี

วัน เดือน ปี 24 มกราคม 2517

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เคมี) (วท.บ.) เกียรตินิยมอันดับ 2	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา	2539

ทุนการศึกษา

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
(มี.ย. 2539 - พ.ค. 2541)