การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารตกค้างเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์

THE DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR DETECTION OF PENICILLIN G AND HYDROGEN PEROXIDE RESIDUES IN MILK USING BIOSENSOR TECHNIQUE

กิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีนวัตกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารตกค้างเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์

กิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารตกค้างเพนนิซิลีนจีและ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ The Development of Analytical Methods for Detection of Penicillin G and Hydrogen Peroxide Residues in Milk using Biosensor Technique
ชื่อ – นามสกุล	นางสาวกิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก
สาขาวิชา	เคมีนวัตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋กู่, ปร.ด.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สมพร มูลมั่งมี, Ph.D.
ปีการศึกษา	2559

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฉัตรชัย พลเชี่ยว, D.Eng.)

..... กรรมการ
(อาจารย์สมพร มูลมั่งมี, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์พงศธร ประภักรางกูล, Ph.D.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋กู่, ปร.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิริแข พงษ์สวัสดิ์, วท.ด.)
วันที่ 24 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารตกค้างเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์
ชื่อ – นามสกุล นางสาวกิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก
สาขาวิชา เคมีนวัตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี้ภู่, ปร.ด.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์สมพร มูลมั่งมี, Ph.D.
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการนำเพนนิซิลินจีมาใช้สำหรับรักษาโรคในโคนมและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาใช้ในการผลิตนม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนม ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีเหลือง สำหรับวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาศัยเทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ โดยใช้เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ หาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ ต่อไปนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ตรวจหาเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนม

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี วิธีนี้มีช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.0005-0.05 พีพีบี ให้ขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 0.008 พีพีบี และ 0.025 พีพีบี ตามลำดับ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลการทดลองพบว่ากราฟมาตรฐานของวิธีนี้มีช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงที่ 0.4-3.0 พีพีเอ็ม ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 5 นาที สุดท้ายนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปตรวจหาเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนม พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน สรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีหลายข้อ เช่น ง่ายต่อการใช้งาน ไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย และมีขีดจำกัดในการตรวจพบต่ำ

คำสำคัญ: เพนนิซิลินจี ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน ไบโอเซนเซอร์ ตัวอย่างนม

Thesis Title The Development of Analytical Methods for Detection of Penicillin G and Hydrogen Peroxide Residues in Milk using Biosensor Technique

Name – Surname Miss Kittiyaphon Junlamatdilok

Program Innovative Chemistry

Thesis Advisor Assistant Professor Siriwan Teepoo, Ph.D.

Thesis Co-advisor Mr. Somporn Moonmangmee, Ph.D.

Academic Year 2016

ABSTRACT

Nowadays, penicillin G was used to treat *dairy cattle's d*iseases while hydrogen peroxide was used for producing milk. Therefore, this research aimed to develop analytical methods to detect penicillin G and hydrogen peroxide residues in milk. The analytical method for detecting penicillin G concentration was developed using competitive immunosensor technique. This resulted in yellow solution. Catalytic biosensor technique using peroxidase as catalyst was employed for analytical method of hydrogen peroxide. The absorbance was detected with UV-visible spectrophotometer.

All parameters influencing the analytical methods were optimized. The performances of analytical methods were evaluated. Then the developed methods were applied to detect penicillin G and hydrogen peroxide in milk samples.

Under the optimum conditions for the detection of penicillin G, this method provided the linear range concentration of 0.0005-0.05 ppb. The limit of detection and limit of quantitation were 0.008 ppb and 0.025 ppb respectively. In the developed analytical method for hydrogen peroxide detection, the results showed that the calibration curve was linear in concentration range of 0.4-3.0 ppm. The analysis time was 5 min. Finally, these methods were applied for detections of penicillin G and hydrogen peroxide in milk samples. The results showed that both developed methods were corresponded with such standard methods. This could be summed up that the developed methods were of great advantages in terms of its easy use, no sample preparation step, short-time analysis and low detection limit.

Keywords: penicillin G, hydrogen peroxide, competitive immunosensor, biosensor, milk sample

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ไปได้เนื่องด้วยได้รับด้วยความอนุเคราะห์ความกรุณา การดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คือ ผศ.ดร.ศิริวรรณ ตี้ภู่ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คือ ดร.สมพร มูลมั่งมี ที่เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ตรวจแก้ไขข้อพกพร่องต่างๆ และติดตามความก้าวหน้าของการดำเนินงานวิจัย ซึ่งผู้วิจัยซาบซึ้งในความกรุณาของท่านอาจารย์ทั้งสองเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ฉัตรชัย พลเชี่ยว ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ดร.พงศธร ประภักรางกูล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อผิดพลาดและให้แนวคิดที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย รวมทั้งเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย อาคารสถาบันวิจัยเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนการศึกษาภายใต้โครงการภาคีบัณฑิตศึกษา และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้การสนับสนุนจนผู้วิจัยสามารถนำเอาความรู้และหลักการต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี นอกเหนือจากนี้ ผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือจากครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ตลอดจนบุคลากรทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลืออีกมากมาย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยนช์แก่ผู้ที่สนใจ หากงานวิจัยนี้มีความผิดพลาดหรือบกพร่องประการใด ผู้วิจัยกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้

กิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... (3)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... (4)

กิตติกรรมประกาศ..... (5)

สารบัญ..... (6)

สารบัญตาราง..... (10)

สารบัญภาพ..... (12)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... (14)

บทที่ 1 บทนำ..... 15

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 15

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 16

1.3 ขอบเขตของการศึกษา..... 17

1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย..... 19

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 22

บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 23

2.1 อุตสาหกรรมการผลิตที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นม..... 23

2.2 ยาปฏิชีวนะ..... 24

2.2.1 ความหมายและประเภทของยาปฏิชีวนะ..... 24

2.2.2 เพนนิซิลินจี..... 25

2.2.3 วิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี..... 26

2.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์..... 28

2.3.1 ความหมายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์..... 28

2.4 ไบโอเซนเซอร์..... 30

2.4.1 แอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์..... 31

2.4.2 คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 39
3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน... 39
3.1.1 สารเคมี..... 39
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 40
3.1.3 การทดลอง..... 41
3.1.3.1 การเตรียมเพนนิซิลินจีติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน..... 41
3.1.3.2 การเตรียมแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน..... 42
3.1.3.3 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี..... 42
3.1.3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์..... 44
3.1.3.5 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์..... 48
3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติก ไบโอเซนเซอร์..... 52
3.2.1 สารเคมี..... 52
3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 52
3.2.3 การทดลอง..... 53
3.2.3.1 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์..... 53
3.2.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์..... 54
3.2.3.3 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์..... 55
3.2.3.4 การวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง..... 57
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 58
4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน... 58
4.1.1 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์..... 58
4.1.1.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่ม อัลบูมินในไมโครเพลท..... 58

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1.2 ผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน 60

4.1.1.3 ผลของเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลีนจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน 61

4.1.1.4 ผลของความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส 62

4.1.1.5 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 63

4.1.2 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ 65

4.1.2.1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 65

4.1.2.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 67

4.1.2.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง 68

4.1.2.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ 70

4.1.2.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ 70

4.1.2.6 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ 70

4.1.3 การวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง 72

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ 74

4.2.1 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ของการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 74

4.2.2 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ 76

4.2.2.1 ผลของเวลาที่ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา 76

4.2.2.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 77

4.2.2.3 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 78

4.2.2.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน 79

4.2.3 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ 81

4.2.3.1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 81

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.3.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 83

4.2.3.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง 85

4.2.3.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ 87

4.2.3.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ 87

4.2.3.6 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ 87

4.2.3 การวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง 89

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 90

บรรณานุกรม 92

ภาคผนวก 97

ภาคผนวก ก ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ 98

ประวัติผู้เขียน 112

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ต้องการศึกษาในการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจี..... 44

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะการทดลองสำหรับหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์..... 49

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะที่ต้องการศึกษาในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจน
เปอร์ออกไซด์..... 54

ตารางที่ 4.1 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิค
อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน..... 64

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิค
อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน..... 65

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิค
อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน..... 66

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้
เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน..... 67

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจี
ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 68

ตารางที่ 4.6 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิค
อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน..... 71

ตารางที่ 4.7 ผลของการหาเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง..... 72

ตารางที่ 4.8 ผลของการหาสารละลายแบลงค์..... 73

ตารางที่ 4.9 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิค
คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 80

ตารางที่ 4.10 แสดงผลของการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 81

ตารางที่ 4.11 แสดงผลของการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 82

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 84
ตารางที่ 4.13 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 85
ตารางที่ 4.14 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 88
ตารางที่ 4.15 ผลของการตรวจหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงโดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์..... 89

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจีที่ตกค้างในนมโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน 20

รูปที่ 1.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ 21

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเพนนิซิลีนจี 25

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 28

รูปที่ 2.3 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ 31

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแอนติบอดี 32

รูปที่ 2.5 หลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ 33

รูปที่ 2.6 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง 33

รูปที่ 2.7 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช 34

รูปที่ 2.8 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน 35

รูปที่ 2.9 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจี 36

รูปที่ 2.10 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจี 36

รูปที่ 2.11 หลักการของคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ 37

รูปที่ 3.1 การติดฉลากแอนติเจนเพนนิซิลีนจีด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน 41

รูปที่ 3.2 การติดฉลากแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีด้วยไบโอติน 42

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจีโดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน 43

รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ 53

รูปที่ 4.1 ผลของเวลาในการตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน 59

รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน 60

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.3 ผลของเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน 61
รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส 62
รูปที่ 4.5 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 63
รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานของเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นต่างๆ 67
รูปที่ 4.7 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน 69
รูปที่ 4.8 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ 71
รูปที่ 4.9 แสดงผลของการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีด้วยชุดทดสอบ 73
รูปที่ 4.10 สารละลายสีชมพูที่ได้จากปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 74
รูปที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงของ ก) สารละลายสีชมพูที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ข) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (แบลงค์) ค) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ง) โอ-ไดอะนิซิดีน 75
รูปที่ 4.12 ผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา 76
รูปที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นที่ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 77
รูปที่ 4.14 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 78
รูปที่ 4.15 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน 79
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ 83
รูปที่ 4.17 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ 86
รูปที่ 4.18 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ 88

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ppb	ไมโครกรัมต่อลิตร
ppm	มิลลิกรัมต่อลิตร
M	โมลต่อลิตร (โมลาร์)
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
µg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µg/g	ไมโครกรัมต่อกรัม
µg/kg	ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
µg/µl	ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
ng/ml	นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
nM	นาโนโมลต่อลิตร (นาโนโมลาร์)
% w/v	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
ml	มิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
min	นาที
nm	นาโนเมตร
SD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
RSD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
mV/s	มิลลิโวลต์ต่อวินาที
V	โวลต์
^{o}C	องศาเซลเซียส

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิประเทศที่เหมาะกับการทำเกษตรกรรมและการเลี้ยงสัตว์ โดยอาชีพเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญในประเทศไทยคือ การเลี้ยงโคนมเพื่อนำน้ำนมมาบริโภค ซึ่งการเลี้ยงโคนมนั้นมีมาตั้งแต่อดีต โดยในปี พ.ศ. 2505 พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชได้ทรงสถาปนาศูนย์ฝึกอบรมการเลี้ยงโคนมไทย-เดนมาร์ก ร่วมกับสมเด็จพระเจ้าเฟรเดอริกที่ 9 แห่งประเทศเดนมาร์ก (King Frederick IX) พันธุ์โคนมที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยคือพันธุ์โฮลสไตน์ (Holstein) หรือเรียกง่ายๆ ว่า โคนมพันธุ์ขาวดำ (Black & White Holstein) เป็นโคนมที่มีลักษณะเด่น คือ มีลายสีดำตัดกับสีขาว และมีการให้น้ำนมอยู่ในปริมาณที่สูงประมาณ 5000 กิโลกรัมต่อปี มีไขมันนมประมาณ 3.5 % (เป็นไขมันสีขาวเหมาะสมที่จะนำไปบริโภค)

สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตที่เป็นผลิตภัณฑ์นมเพื่อการบริโภคและการส่งออกของประเทศไทย ได้ประสบกับปัญหาหนึ่งซึ่งเป็นปัญหาสำคัญและส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมคือ ปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ที่มาจากน้ำนม เนื่องจากมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในโคนม โดยเฉพาะเพนนิซิลินจีที่ใช้สำหรับรักษาโรคเต้านมอักเสบหรือโรคท้องเดินของโคนม

เพนนิซิลินจีเป็นยาปฏิชีวนะที่มีความคงทนสูง สลายตัวได้ยากและไม่ถูกทำลายด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคนม มาตรฐานของมกอช. 6003-2548 ได้กำหนดปริมาณการตกค้างของเพนนิซิลินจีในนมได้ไม่เกิน 4 ppb ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในน้ำนมดิบก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเพื่อที่จะได้ผลิตภัณฑ์นมที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วิธีทั่วไปที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีคือ เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น เครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) แต่พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์มีราคาสูง ผู้วิเคราะห์จะต้องมีความชำนาญในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี ต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

นอกจากนี้ยังพบปัญหาเกี่ยวกับการตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนม เนื่องจากมีการใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาเป็นสารฆ่าเชื้อในเครื่องจักร เช่น อุปกรณ์ที่ใช้แปรรูปอาหาร อุปกรณ์ที่ใช้บรรจุอาหาร และเครื่องจักรที่ใช้ในกระบวนการผลิตต่างๆ และยังมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาช่วยในการควบคุมคุณภาพของน้ำนมดิบก่อนนำไปแปรรูปอีกด้วย ทำให้เกิดการตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์นม มาตรฐานของ มกอช. 6003-2548 จึงกำหนดห้ามมีสารตกค้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งในผลิตภัณฑ์นมและน้ำนมดิบ

วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น เครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) แต่วิธีวิเคราะห์เหล่านี้ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง มีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในน้ำนม โดยอาศัยหลักการของอิมมูโนเซนเซอร์ ประเภทอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (Competitive Immunosensor) และสนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในน้ำนม โดยใช้หลักการของไบโอเซนเซอร์ ประเภทคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (Catalytic Biosensor) เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงและไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

1.2.1.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี โดยใช้หลักการของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

1.2.1.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี

1.2.1.3 เพื่อหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี

1.2.1.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีในตัวอย่างนม

1.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

1.2.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้หลักการของเทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

1.2.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1.2.2.3 เพื่อหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1.2.2.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

1.3.1.1 เตรียมเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน

(1) ศึกษาวิธีการเตรียมเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากโบวีนซีรั่มอัลบูมินโดยใช้สารเชื่อมไขว้

(2) ทดสอบการเกาะติดของเพนนิซิลินจีกับโบวีนซีรั่มอัลบูมิน

1.3.1.2 ตรวจสอบการตอบสนองของแอนติเจนกับแอนติบอดี

1.3.1.3 เตรียมแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

(1) ศึกษาวิธีการติดฉลากแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีด้วยไบโอติน

(2) ทดสอบการเกาะติดของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีกับไบโอตินด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)

1.3.1.4 หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี ได้แก่

(1) ศึกษาหาเวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท

(2) ศึกษาหาความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

(3) ศึกษาเวลาในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

(4) ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

(5) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1.3.1.5 หาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่

(1) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

(2) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ (Repeatability)

(3) การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ (Reproducibility)

(4) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

(5) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)

(6) หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ (Limit of Quantitation; LOD)

(7) หาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Selectivity)

1.3.1.6 วิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีในตัวอย่างนม โดยนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป

1.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

1.3.2.1 หาวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้หลักการของคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

1.3.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้แก่

(1) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

(2) ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

(3) ศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมของสารลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

(4) ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโอ-ไดอะนิซิดีน

1.3.2.3 หาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่

(1) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

(2) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

(3) การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

(4) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

(5) ช่วงความเป็นเส้นตรง

(6) หาขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

(7) หาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

1.3.2.4 วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนม และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีไทเทรต

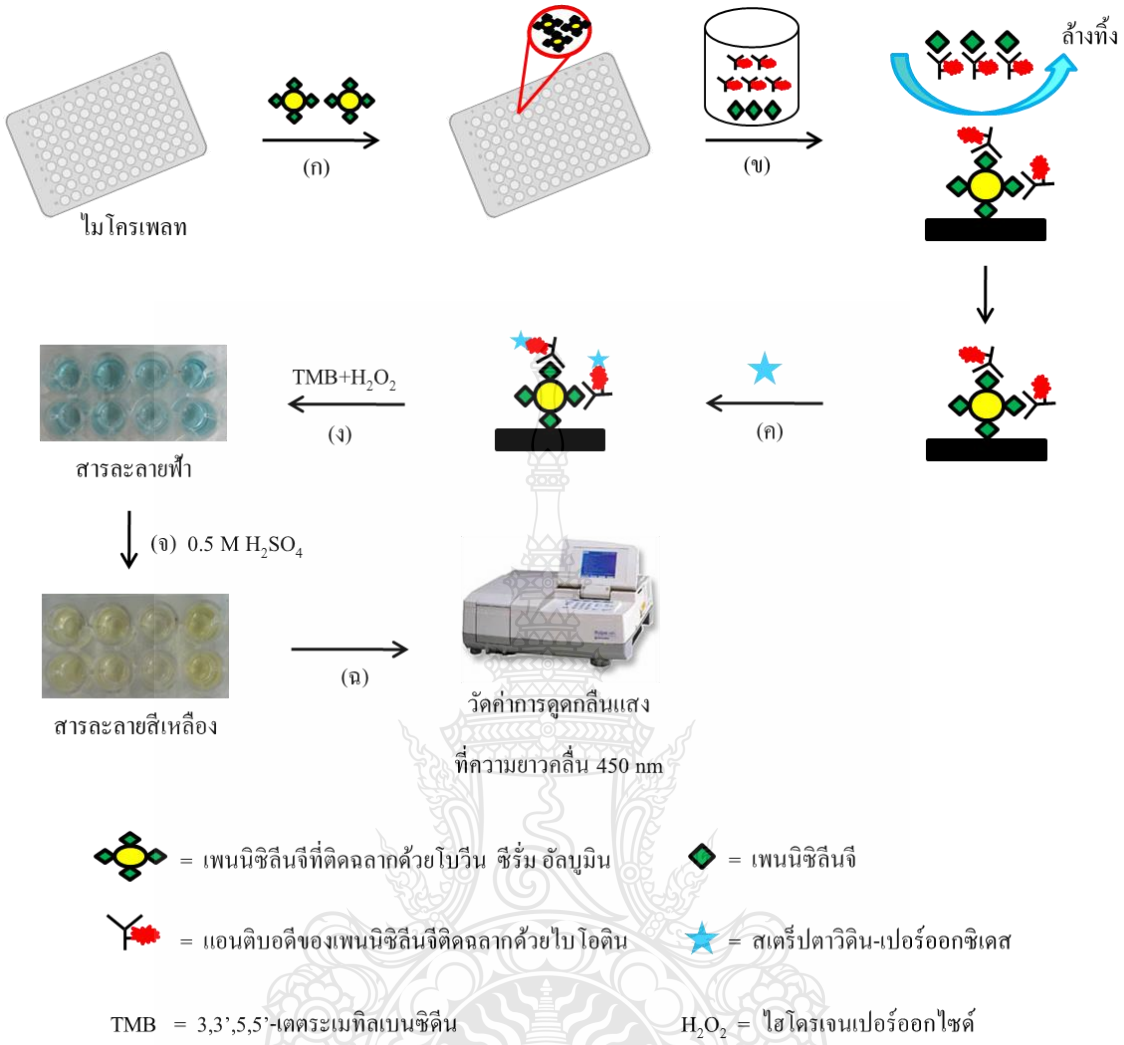
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย

1.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

เนื่องจากปริมาณของเพนนิซิลีนจีในน้ำนมจะพบได้ในปริมาณที่น้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดเพื่อที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีความไววิเคราะห์ที่สูง (High Sensitivity) โดยอาศัยหลักการของอิมมูโนเซนเซอร์ ประเภทแข่งขัน (Competitive Immunosensor) โดยมีแนวความคิดดังรูปที่ 1.1 อาศัยการจับกันของแอฟฟินิตี้ไบโอเซนเซอร์แบบแข่งขันระหว่างแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีกับแอนติเจนของเพนนิซิลีนจี เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจี โดยในขั้นแรก (รูป 1.1 (ก)) ตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินในไมโครเพลทด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) จากนั้นจะเติมตัวอย่างนม (ที่มีเพนนิซิลีนจี) และแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (ที่มีปริมาณที่มากเกินพอ) (รูป 1.1 (ข)) เพนนิซิลีนจีที่มีอยู่ในตัวอย่างนมจะไปจับกับแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินส่วนแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่เหลือจะไปจับกับเพนนิซิลีนจีที่ถูกตรึงอยู่ในไมโครเพลท ต่อมาเติมสเต็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (รูป 1.1 (ค)) ในขั้นตอนนี้สเต็ปตาวิดินจะไปจับกับไบโอตินของแอนติบอดีที่จับกับเพนนิซิลีนจีที่ตรึงอยู่ในไมโครเพลท แล้วเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (รูป 1.1 (ง)) เปอร์ออกซิเดสจะไปเร่งปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ (TMB_{red}) เปลี่ยนไปอยู่ในรูปออกซิไดส์ (TMB_{ox}) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีฟ้า ดังสมการที่ 1.1 ขั้นตอนสุดท้ายจะเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (รูป 1.1 (จ)) เพื่อหยุดการทำงานของเปอร์ออกซิเดส เมื่อ 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะได้เป็นสารละลายสีเหลือง ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 nm ถ้าในตัวอย่างนมมีปริมาณของเพนนิซิลีนจีมาก จะทำให้มีแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเหลือไปจับกับเพนนิซิลีนจีที่ถูกตรึงอยู่ในไมโครเพลทน้อย ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงน้อย ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเพนนิซิลีนจีที่มีอยู่ในตัวอย่างนม

$$TMB_{red} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} TMB_{ox} + 2H_2O_2 \qquad \text{..... 1.1}$$

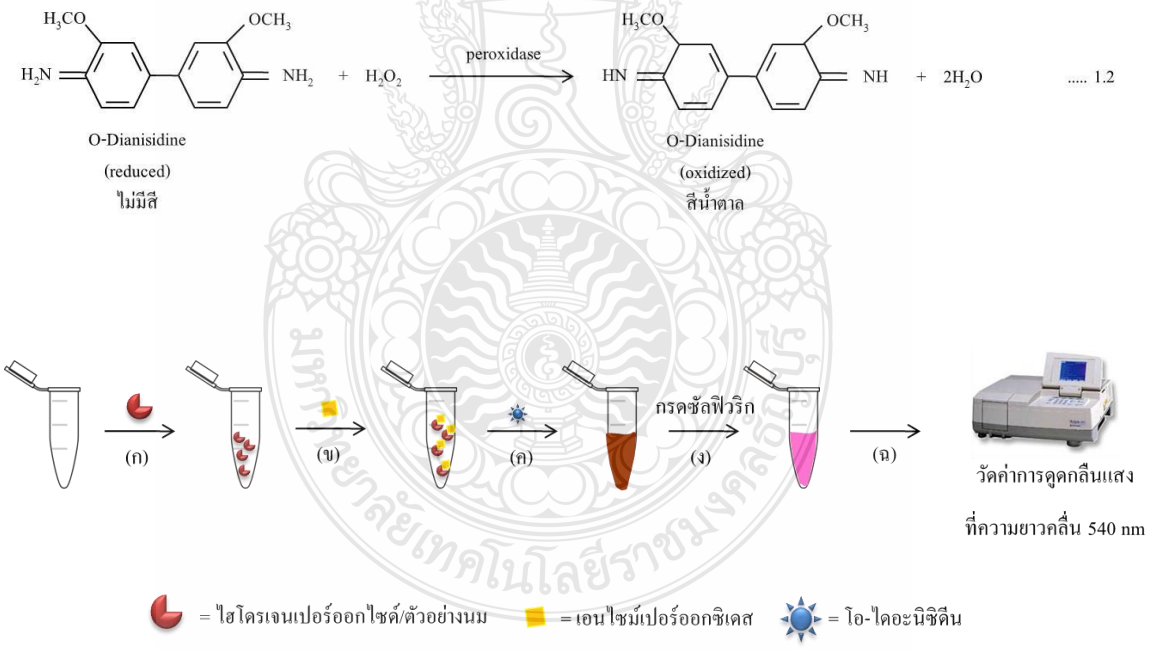
(ไม่มีสี) (สีฟ้า)



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในนมโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (ก) ตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท (ข) เติมตัวอย่างนม (ที่มีเพนนิซิลินจี) และแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (ค) เติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (ง) เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (จ) เติมกรดซัวฟิวริก และ (ฉ) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

1.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

แนวความคิดที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ที่ตกค้างในน้ำนม โดยอาศัยหลักการของไบโอเซนเซอร์ ประเภทคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ ดังรูปที่ 1.2 ซึ่งถ้าในตัวอย่างนมมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ก)ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับโอ-ไดอะนิซิดีน โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้โอ-ไดอะนิซิดีนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปออกซิไดส์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีน้ำตาล ดังสมการที่ 1.2 จากนั้นจะเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (ง) เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อโอ-ไดอะนิซิดีนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดสารละลายจะที่ได้มีสีชมพู จากนั้นทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm (ฉ) ถ้าในตัวอย่างมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ก็จะมาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



รูปที่ 1.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (ก) เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวป์ (ข) เติมโอ-ไดอะนิซิดีน (ค) เติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ง) เติมกรดซัลฟิวริก และ (ฉ) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจีที่ตกค้างในตัวอย่างนม โดยใช้เทคนิคอิมมูโน-เซนเซอร์แบบแข่งขัน

1.5.2 ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในตัวอย่างนม โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

บทที่ 2
วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมการผลิตที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นม

ประเทศไทยเริ่มมีการเลี้ยงโคนมกันอย่างจริงจัง เมื่อพระบาทสมเด็จพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช รัชกาลที่ 9 ได้ทรงสถาปนาศูนย์ฝึกอบรมการเลี้ยงโคนมไทย-เดนมาร์ก ขึ้นที่ตำบลมวกเหล็ก อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ร่วมกับพระเจ้าเฟรดเดอริกที่ 9 แห่งประเทศเดนมาร์ก วันที่ 16 มกราคม พ.ศ.2505 [1] ซึ่งพันธุ์โคนมที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยคือ พันธุ์โฮลสไตน์ มีลักษณะเด่นคือ มีลายสีดำตัดกับสีขาวชัดเจน และสามารถให้น้ำนมประมาณ 5000 กิโลกรัมต่อปี มีไขมันนมประมาณ 3.5 % เป็นไขมันสีขาวเหมาะสมที่จะนำไปบริโภค

ประเทศไทยเป็นประเทศที่เหมาะแก่การทำเกษตรกรรมและการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น การเลี้ยงโคนมเพื่อนำน้ำนมที่ได้ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ นมพร้อมดื่ม นมพาสเจอไรส์ (Pasteurized milk) นมสเตอริไลส์ (Sterilized milk) นมยู.เอช.ที (Ultra High Temperature, UHT) นมข้นหวาน (Sweeten condensed milk) นมข้นจืด (Evaporated milk) เนย (Butter) เนยแข็ง (Cheese) นมเปรี้ยว (Fermented milk) โยเกิร์ต (Yogurt) เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพของน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ ปัจจุบันในประเทศไทยได้มีหน่วยงานทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพของน้ำนมอยู่สองหน่วยงานคือ องค์การอาหารและยา (อย.) และมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) มาตรฐานคุณภาพขององค์การอาหารและยาจะทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์นม ส่วนมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติมีหน้าที่ควบคุมคุณภาพของน้ำนมดิบ

อุตสาหกรรมการผลิตที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นมเพื่อการบริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออกต่างประเทศ ในยุคปัจจุบันประสบความสำเร็จอย่างมาก แต่ก็พบปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำนมและส่งผลกระทบต่อการบริโภคและการส่งออกคือ ปัญหาการตกค้างของสารต้องห้ามในน้ำนม ทั้งยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน ทำให้มีสภาพอากาศร้อนชื้นเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อโรคและเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ จึงได้มีการนำยาเพนนิซิลินจีมาใช้ในการรักษาโคนม เช่น โรคเต้านมอักเสบหรือโรคท้องเดินในโคนม นอกจากนี้ยังมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อช่วยในการควบคุมคุณภาพของน้ำนมดิบก่อนนำไปแปรรูป รวมถึงใช้เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียในเครื่องจักรที่ใช้ในกระบวนการผลิตต่างๆ

2.2 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)

2.2.1 ความหมายและประเภทของยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เรียกว่า จุลินทรีย์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียทั้งในมนุษย์และสัตว์ [2]

ยาปฏิชีวนะเริ่มมีขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1928 โดยเซอร์อเล็กซานเดอร์ เฟลมมิง (Alexander Fleming) ได้ค้นพบราชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า ราเพนนิซิเลียม (Pennicillium) และได้นำราชนิดนี้มาสกัดเป็นยาเพนนิซิลิน (Penicillin) ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะผลิตจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา จึงอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ที่ได้รับยาชนิดนี้ทั้งทางตรงและทางอ้อม อาการที่สามารถเกิดขึ้นได้คือ เกิดอาการแพ้ยา (Allergy) เช่น มีผื่นแดง แต่ในผู้ที่เกิดอาการแพ้ยาขั้นรุนแรงอาจทำให้เสียชีวิตได้ นอกจากนี้อาจส่งผลเสียในระยะยาวเนื่องจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และก่อให้เกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ [3] ยาปฏิชีวนะสามารถแบ่งได้เป็นหลายประเภท ในแต่ละประเภทจะใช้ป้องกันหรือรักษาโรคที่แตกต่างกัน ดังนี้

(1) เพนนิซิลิน (Penicillin) เป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า เบต้า-แลคแทม (Beta-lactam) ที่ผลิตจากเชื้อรา ใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น คออักเสบ ยาในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็นหลายประเภท ได้แก่ เพนนิซิลินจี (Penicillin G) เพนนิซิลินวี (Penicillin V) แอมพิซิลิน (Ampicillin) อะมอกซีซิลิน (Amoxicillin) คาร์เบนิซิลิน (Carbenicillin) คลอกซาซิลิน (Cloxacillin) และฟลูคลอซาซิลิน (Flucloxacillin)

(2) อะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) เป็นยาที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง ข้อ และกระดูก เป็นต้น โดยยาจะออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างสารพันธุกรรมขึ้นมาใหม่ได้ ตัวอย่างยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์คือ เจนตามัยซิน (Gentamycin) โทบรามัยซิน (Tobramycin) อะมิคาซิน (Amikacin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) สเปคทิโนมัยซิน (Spectinomycin) กานามัยซิน (Kanamycin) และนีโอมัยซิน (Neomycin)

(3) เซฟาโลสปอริน (Cephalosporin) เป็นยาปฏิชีวนะที่มาจากเชื้อราที่มีชื่อว่า *Cephalosporium* ยาชนิดนี้ใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบของระบบทางเดินอาหารหรือระบบทางเดินหายใจ

(4) แมคโครไลด์ (Macrolide) เป็นยาที่ใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกที่มักจะเกิดจากการติดเชื้อของเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายและระบบทางเดินหายใจ โดยยาชนิดนี้จะไปรบกวน

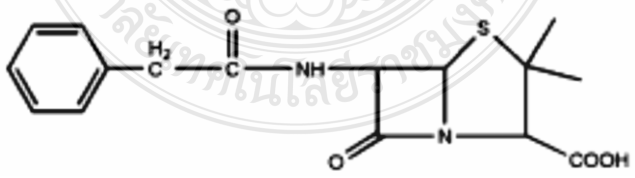
การทำงานของสารพันธุกรรม ส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในการดำรงชีวิตได้ ตัวยาในกลุ่มของแมคโครไลด์ ได้แก่ อีรีโทรมัยซิน (Erythromycin) อะซิโทรมัยซิน (Azithromycin) คลาริโธรมัยซิน (Clarithromycin) และรอซิโทรมัยซิน (Roxithromycin)

(5) เตตราไซคลีน (Tetracyclines) เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้โรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคติดเชื้อในลำไส้และโรคที่ติดเชื้อในทางเดินกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น

(6) ควิโนโลน (Quinolones) เป็นยาที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะและต่อมลูกหมาก โดยที่ยากลุ่มนี้จะไปรบกวนการสร้างโปรตีนในสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

2.2.2 เพนนิซิลินจี

เพนนิซิลินจีหรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เบนซิลเพนนิซิลิน (Benzylpenicillin) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 [4] เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบต้า-แลคแทม (Beta-Lactam) ที่สัตวแพทย์นิยมใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ [5] โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเต้านมอักเสบในวัว (Bovine mastitis) โรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial diarrhea) โรคปอดอักเสบ (Pneumonia) และโรคข้ออักเสบ (Bacterial arthritis) เป็นต้น [6] เพนนิซิลินจีเป็นยาที่สลายตัวยากจึงอาจเกิดการตกค้างของเพนนิซิลินจีในน้ำนม ถ้าผู้บริโภคได้รับสารนี้เข้าไปในร่างกายถึงแม้จะมีปริมาณที่น้อยมากก็สามารถส่งผลก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ เช่น ความดันโลหิตต่ำ หลอดเลือดหยุดการทำงาน ภูมิแพ้ ผื่นคัน หายใจลำบาก ปวดข้อและผิวหนังลอก [7] เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการตกค้างของเพนนิซิลินจีในอาหารและน้ำนม มาตรฐานของ มกอช. 6003-2548 จึงได้กำหนดปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์นมให้มีค่าไม่เกิน 4 ppb [8]



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเพนนิซิลินจี [4]

2.2.3 วิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี

การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีมีหลายเทคนิค เช่น เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี (Chromatography) [9] เช่น การวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ในปี ค.ศ. 1998 Luo และคณะ [10] ได้วิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีในพลาสมาและปัสสาวะของม้า โดยใช้เครื่องโครมาโต-กราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการเตรียมตัวอย่างของเพนนิซิลินจีด้วยวิธีการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-phase extraction) จากผลการทดลองพบว่า วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีได้อย่างรวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจงสูง และสามารถวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.05 μg/ml (50 ppb)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Kukusamude และคณะ [7] ได้วิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในน้ำนมวัวและเนื้อวัว มีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดโดยใช้เทคนิคคู่ไอออน (Ion-paired extraction) เพื่อแยกเพนนิซิลินจีออกจากตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง และใช้ตัวตรวจวัดทางแสงที่ความยาวคลื่น 215 nm พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดเพนนิซิลินจีได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1-2 ng/ml (1-2 ppb)

จากนั้นในปี ค.ศ. 2013 Evaggelopoulou และคณะ [11] ได้พัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีและอนุพันธ์ในเนื้อปลา ใช้เทคนิคการสกัดของเหลว-ของเหลว และเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง เพื่อสกัดเพนนิซิลินจีและอนุพันธ์ออกจากตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 225 nm พบว่าสามารถตรวจวัดเพนนิซิลินจีที่มีความเข้มข้นต่ำสุดคือ 16.8 μg/kg (16.8 ppb)

นอกจากนี้การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ยังสามารถใช้ตัวตรวจวัดชนิดอื่นได้ เช่น Tandem mass spectrometry detection เช่น ในปี ค.ศ. 2012 Macarov และคณะ [12] ได้พัฒนาวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ และใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction; SPE) ในการเตรียมตัวอย่าง พบว่าวิธีนี้ตรวจวัดเพนนิซิลินจีได้ที่ความเข้มข้น 0.2 μg/kg (0.2 ppb)

จากวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะพบว่าการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูงวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิชีนจียังมีข้อจำกัดคือ เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์มีราคาสูง ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ ต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น และต้องเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ [13]

นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยตรวจวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของเพนนิซิลินจีโดยมีเอนไซม์เพนนิซิลินเนส (Penicillinase) ที่ตรึงอยู่บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทอง ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่า สามารถตรวจวัดหาปริมาณเพนนิซิลินจีได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 4.5 nM (1.50 ppb) [14]

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีคือ อาศัยหลักการทางจุลชีววิทยา เช่น ในปี ค.ศ. 2012 Nagel และคณะ [15] ได้วิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีโดยอาศัยการเปลี่ยนสีของบรอมกรีซอล (Bromcresol purple) ในอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์ *Geobacillus stearothermophilus* แต่พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ผู้วิเคราะห์ต้องมีทักษะในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากวิธีวิเคราะห์มีหลายขั้นตอน และอาจมีผลของตัวรบกวนอื่นๆ ทำให้วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีได้เบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งถ้าต้องการผลการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณจะต้องส่งตัวอย่างวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

นอกจากวิธีดังกล่าวยังได้มีการพัฒนาชุดทดสอบเพื่อตรวจหาเพนนิซิลินจี [16] โดยอาศัยหลักการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sterothermophilus var. calidolactis.* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจะผลิตกรด ทำให้อินดิเคเตอร์ Bromcresol purple เปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง แต่ถ้าในตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะ ยาปฏิชีวนะนี้จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทำให้ไม่สามารถผลิตกรดได้ อินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีม่วง แสดงว่าตัวอย่างมียาปฏิชีวนะ แต่ถ้าต้องการทราบว่าเป็นยาปฏิชีวนะประเภทเพนนิซิลินจีหรือไม่ สามารถนำไปตรวจสอบโดยเติมเอนไซม์ Penicilinase ถ้าในตัวอย่างมีเพนนิซิลินจีจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจาก Penicilinase จะเร่งปฏิกิริยาของเพนนิซิลินจีได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรด จึงทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ชุดทดสอบมีข้อจำกัดคือไม่สามารถระบุความเข้มข้นของเพนนิซิลินจีได้แน่นอนและมีขั้นตอนหลายขั้นตอน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาหาวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถหาปริมาณเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นต่ำได้ ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ราคาถูก และให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว

2.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

2.3.1 ความหมายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.2 และมีสูตรทางเคมีว่า H_2O_2 เป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ (สารที่ประกอบด้วยออกซิเจนสองตัวและเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยว) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย [17-18] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีลักษณะเป็นของเหลวใส หนืด มีรสขม และไม่อยู่ตัว สามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนกับน้ำ เมื่อเจือจางจะเป็นสารละลายไม่มีสี โดยปกติไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถสลายตัวได้เองแต่ต้องใช้ระยะเวลานาน แต่ถ้ามีแสงสว่างและความร้อนจะช่วยให้การสลายตัวเกิดได้เร็วขึ้น นอกจากนี้หากมีส่วนผสมของโลหะ โดยเฉพาะเหล็ก แมงกานีส ทองแดง จะทำให้เกิดการสลายตัวเร็วยิ่งขึ้น

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารไวไฟ ซึ่งภาชนะบรรจุสารอาจระเบิดได้เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิสูง ในกรณีเกิดเพลิงไหม้ให้ใช้น้ำฉีดเป็นฝอย ผงเคมีแห้ง โฟม หรือคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะอยู่ในรูปสารละลายความเข้มข้นตั้งแต่ 3-90 % มักใช้เป็นสารฟอกสีในอาหาร สารทำความสะอาด น้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้ฆ่าเชื้อโรคบนผิวหนัง ใช้ล้างภาพสีน้ำมันเก่าๆ ให้สดใสขึ้น ทำน้ำยาบ้วนปาก ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงขับเคลื่อนจรวดจะมีความเข้มข้นเข้มข้นสูงถึง 90 % นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถใช้ล้างแผลได้ เนื่องจากเป็นยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออ่อนๆ เฉพาะที่ เช่น บาดแผลเล็กๆ แต่อาจเกิดผลข้างเคียงคือ ทำให้แผลแสบและเกิดการระคายเคือง [19-20]

ในด้านอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารฆ่าเชื้อ (Sanitizer) เช่น เครื่องจักร อุปกรณ์แปรรูปอาหารและบรรจุภัณฑ์อาหาร (Packaging) เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (Peroxidation) ของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ เสียไป ส่วนใหญ่จะส่งผล

ต่อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และนอกจากนี้ยังส่งผลกับเชื้อรา (Mold) ได้อีกด้วย โดยจะไปทำลายโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนภายในเซลล์ [21-22]

ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นมจึงนิยมนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 35 % มาใช้ในการฆ่าเชื้อภาชะที่ใช้ในการบรรจุ เช่น ขวดพลาสติกที่ทำมาจากโพลี-โพรพิลีน (Polypropylene: PP) หรือโพลีเอทิลลีน (Polyethylene: PE) เป็นต้น [23-24] นอกจากนี้เกษตรกรยังมีการลักลอกเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในน้ำนมดิบ เพื่อป้องกันไม่ให้นมเกิดการเน่าเสียในระหว่างการขนส่ง จึงอาจทำให้เกิดการตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมได้ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติในประเทศไทยจึงกำหนดห้ามมีการปนเปื้อนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตกในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม [25]

วิธีทั่วไปที่นิยมใช้หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ฟลูออโรเมทรี (Fluorometry) เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) เคมิลูมิเนสเซนต์ (Chemiluminescence) และเทคนิคทางโครมาโตรกราฟี ในปี ค.ศ. 2009 Yue และคณะ [26] ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในตัวยาคอสโพวิโดน (Crospovidone) และผลิตภัณฑ์ยา ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะการทดลอง คือ คอลัมน์เป็น C18 เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือแอมโมเนียมอะซิเตต อัตราการไหล 1 ml/min ผลการทดลองพบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0.6-90 μg/g และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ 0.2 μg/ml

ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Chen และคณะ [27] ได้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างน้ำฝน ด้วยวิธี Fluorescent quenching ซึ่งจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับ 3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodide (DI) ผลที่เกิดขึ้นคือความเข้มแสงของ 3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodide จะลดลงตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น ตรวจวัดค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นคายพลังงาน (Emission wavelength) ที่ 604 nm และค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) ที่ 570 nm ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะเก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกันและต้องนำมากรองก่อนนำไปวิเคราะห์ จากผลการทดลองพบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในช่วงความเข้มข้น 5.0×10^{-7} ถึง 9.0×10^{-4} M นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2007 Hu และคณะ [28] ได้วิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในบุหรี่ ด้วยวิธีเคมิลูมิเนสเซนต์ (Chemiluminescence) พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 4.1×10^{-11} M

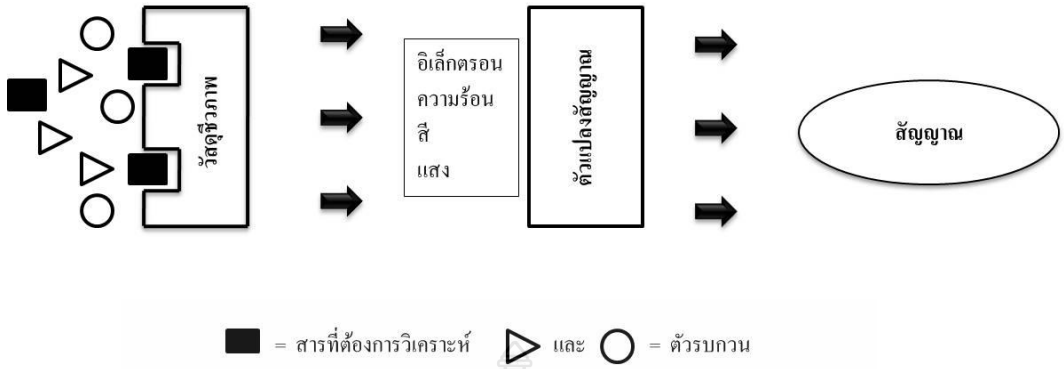
จากวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะพบว่ามีข้อจำกัด คือ ผู้วิเคราะห์ต้องมีความเชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือเนื่องจากเป็นเครื่องมือขั้นสูง เครื่องมือมีราคาแพง ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการทดลอง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

นอกจากนี้การใช้ชุดทดสอบแบบกระดาษเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถวิเคราะห์หาไฮโดรเจอเปอร์ออกไซด์ได้โดยอาศัยหลักการการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีทำให้เกิดสี จากนั้นนำสีที่เกิดขึ้นไปเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐาน แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ จะให้ผลที่แสดงช่วงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างได้ และไม่สามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนมโดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไม่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง และสามารถระบุความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเชิงปริมาณได้

2.4 ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)

ไบโอเซนเซอร์หรือเรียกอีกอย่างว่า ตัวตรวจวัดชีวภาพ เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ อย่างจำเพาะเจาะจง โดยอาศัยหลักการทำงานของการเกิดปฏิกิริยาของสิ่งมีชีวิต (Biologocal) ไบโอเซนเซอร์มีองค์ประกอบหลักอยู่ 2 ส่วนคือ วัสดุชีวภาพ (Biological element) และตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) ดังรูปที่ 2.3 โดยที่วัสดุชีวภาพจะสามารถจับกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analyte) อย่างเฉพาะเจาะจง ตัวอย่างสารชีวภาพ ได้แก่ เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก แอนติบอดี เป็นต้น วัสดุชีวภาพจะทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น เช่น ความร้อน แสง สี อิเล็กตรอน มวล เป็นต้น จากนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสัญญาณต่างๆ แล้วตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม สัญญาณที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ การแบ่งประเภทของไบโอเซนเซอร์ตามวัสดุชีวภาพที่ใช้ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ แอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์ (Affinity biosensor) กับคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (Catalytic biosensor) [29]



รูปที่ 2.3 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ที่มาของรูปดัดแปลงมาจาก [29]

2.4.1 แอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์

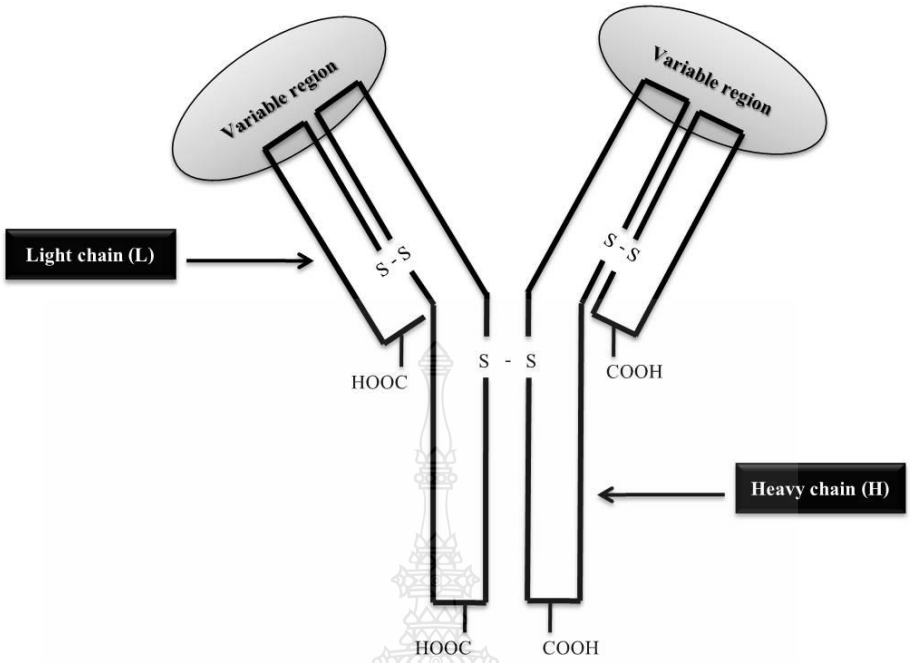
เป็นวิธีที่อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของคู่แอฟฟินิตี เช่น การจับกันของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ หรือการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งเป็นการจับกันแบบแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (Lock and Key) ผลของการจับกันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพแล้วตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม

2.4.1.1 อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor)

เป็นแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์ประเภทหนึ่งที่อาศัยการจับกันของคู่แอฟฟินิตีระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนอย่างจำเพาะเจาะจง เช่น แอนติเจนเพนนิซิลินจีจะจับกับแอนติบอดีของเพนนิซิลินจี เป็นต้น

แอนติบอดี (Antibody; Ab) เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig) เป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นหลังจากมีสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า แอนติเจน (Antigen) เข้าสู่ร่างกาย แอนติบอดีเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ สร้างจาก plasma cell ชนิดของแอนติบอดีจะแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ IgA IgD IgE IgG และ IgM ซึ่งแต่ละชนิดจะมีลักษณะการเคลื่อนที่ การเรียงตัวของกรดอะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์นิยมใช้แอนติบอดีประเภท IgG [30]

แอนติบอดีจะมีรูปร่างคล้ายตัววาย (Y shape) (ดังรูปที่ 2.4) จะประกอบด้วยสายพอลีเปปไทด์ทั้งหมด 4 สาย ประกอบด้วย สายพอลีเปปไทด์สายหนัก (Heavy chain) 2 สาย และสายพอลีเปปไทด์สายเบา (Light chain หรือ L chain) 2 สาย แต่ละสายเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟล์ (disulfide bond) บริเวณที่ใช้จับกับแอนติเจนจะเรียกว่า Variable region ส่วนบริเวณที่บ่งบอกถึงชนิดของแอนติบอดีจะเรียกว่า Constant region



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแอนติบอดี ที่มาของรูปดัดแปลงมาจาก [31]

แอนติเจน (Antigen; Ag) เป็นสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ต้องการเมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายแล้วจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีขึ้นมาเพื่อทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติเจนนั้นๆ หรืออาจกล่าวได้ว่าแอนติเจนเป็นสารที่กระตุ้นให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะเจาะจง แหล่งของแอนติเจนได้แก่ องค์ประกอบของจุลินทรีย์ เช่น สารพิษ แฟกเจลลา ผนังเซลล์ รวมถึงอนุภาคของไวรัสอีกด้วย

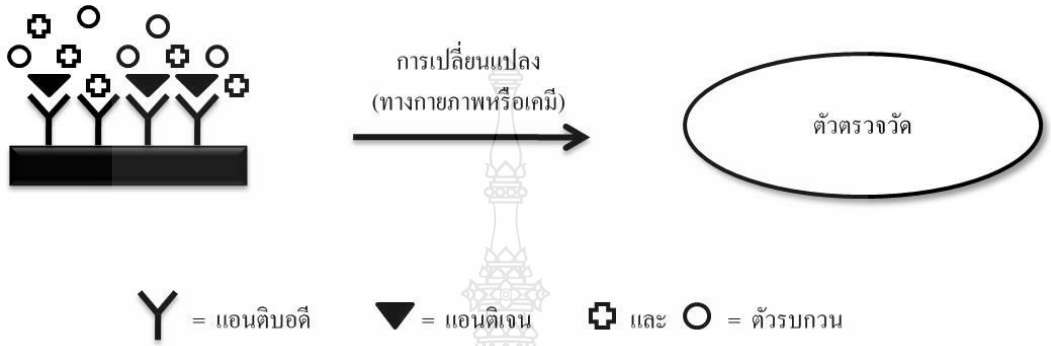
การจับกับของแอนติเจนและแอนติบอดี แอนติเจนและแอนติบอดีจะจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงด้วยแรงอ่อนๆ ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (Non-covalent) ได้แก่

(1) แรงวันเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงกันซึ่งถือว่าเป็นแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแบบอ่อน แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ แรงลอนดอน (London force) แรงเหนี่ยวนำ (Dipole-Induced dipole force) และแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole-dipole force)

(2) แรงจากประจุไฟฟ้า (Electrostatic force) เป็นแรงที่เกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลที่มีประจุที่แตกต่างกัน

(3) แรงจากพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) เป็นแรงที่เกิดจากการจับกันระหว่างไฮโดรเจนกับธาตุที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงๆ

หลักการของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์คือ ถ้าต้องการวิเคราะห์หาแอนติเจน จะทำการตรึงแอนติบอดีไว้บนตัวตรวจวัด จะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของแอนติเจนและแอนติบอดี เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมี แล้วตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม [31] (ดังรูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 หลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ ที่มาของรูปภาพดัดแปลงมาจาก [29]

2.4.1.2 ประเภทของอิมมูโนเซนเซอร์ [31]

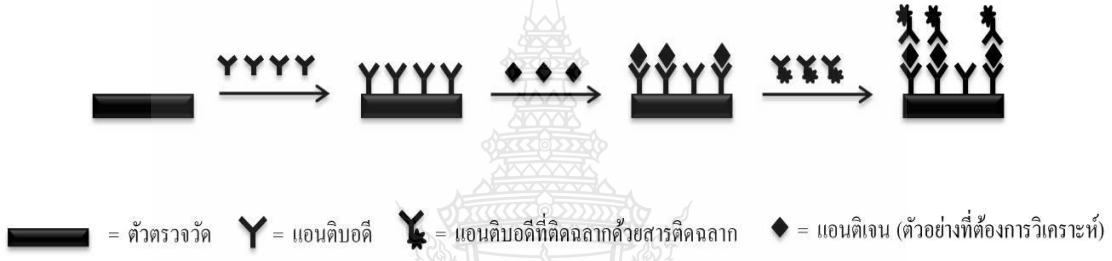
(1) อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง (Direct immunosensor)

เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยการจับกันโดยตรงระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีโดยตรง (ดังรูปที่ 2.6) ผลที่ได้จากการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจน จะทำให้สมบัติทางกายภาพ เช่น มวลเปลี่ยนไป แล้วตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม ข้อดีของอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรงคือ เป็นวิธีที่ง่ายและมีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน [32] แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ตัวตรวจวัดที่มีความไววิเคราะห์สูงมาก และสารที่นำมาวิเคราะห์ต้องมีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นชัดเจน

รูปที่ 2.6 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง

(2) อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช (Sandwich immunosensor)

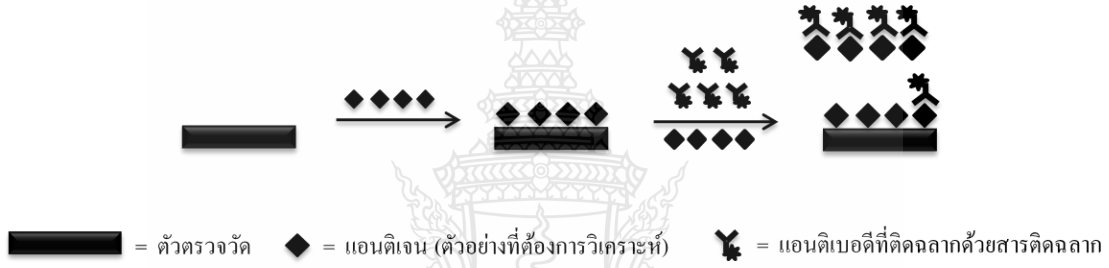
เป็นวิธีทางอ้อมที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างโดยตรึงแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (Primary antibody) ไว้บนตัวตรวจวัดเพื่อจับกับแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (Secondary antibody) ที่ติดฉลากด้วยสารติดฉลาก เช่น เอนไซม์ อนุภาคนาโนทอง เป็นต้น แอนติบอดีตัวที่สองนี้จะเข้าจับกับปลายข้างหนึ่งของแอนติเจน (ดังรูปที่ 2.7) จากนั้นติดตามผลของการจับกันจากสารติดฉลากที่ติดอยู่กับแอนติบอดีตัวที่สอง สัญญาณที่ได้จะแปรผันตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความจำเพาะเจาะจงและให้ความไววิเคราะห์สูง [31] แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดคือ มีขั้นตอนในการวิเคราะห์หลายขั้นตอนและใช้สารเคมีมาก



รูปที่ 2.7 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช

(3) อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (Competitive immunosensor)

เป็นวิธีที่อาศัยการแข่งขันกันเข้าจับกันระหว่างแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารติดฉลากกับแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์และแอนติเจนที่ถูกตรึงอยู่บนตัวตรวจวัด ผลที่ได้จะติดตามจากสารติดฉลากที่ติดอยู่กับแอนติบอดี (ดังรูปที่ 2.8) ถ้าในตัวอย่างมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ (แอนติเจน) มาก จะทำให้สามารถจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารติดฉลากได้มาก ส่งผลให้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารติดฉลากเหลือน้อย แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารติดฉลากที่เหลือจะไปจับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงอยู่บนตัวตรวจวัด ทำให้ได้สัญญาณน้อย ดังนั้นถ้าในตัวอย่างมีแอนติเจนมาก สัญญาณที่ได้จะน้อย ข้อดีของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันคือ สามารถตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีมวลโมเลกุลต่ำๆ ได้ [31]

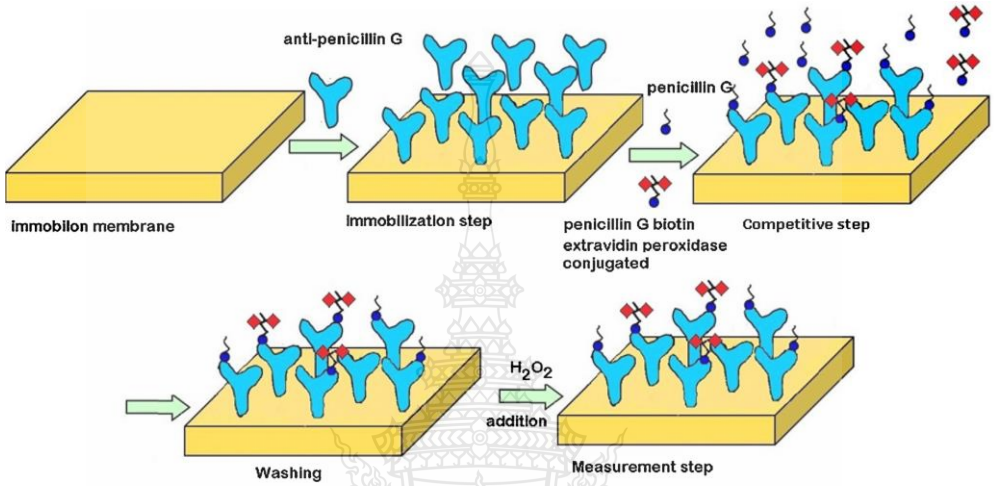


รูปที่ 2.8 หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

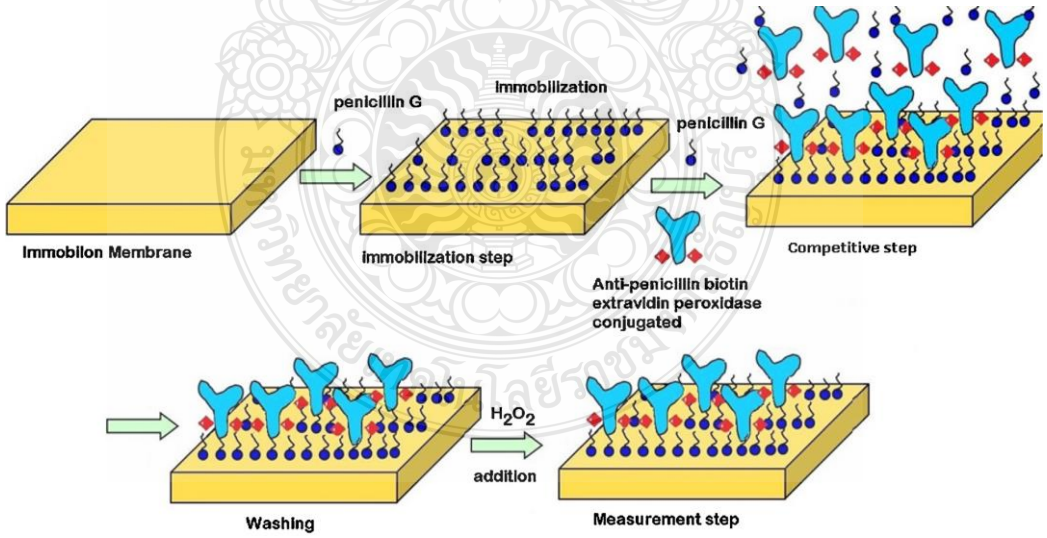
2.4.1.3 การวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

ได้มีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันในการหาปริมาณเพนนิซิลีนจี เช่น ในปี ค.ศ. 2014 Merola และคณะ [33] ได้พัฒนาวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลีนจีและยาปฏิชีวะนะในกลุ่มเบต้าแลกแทมชนิดอื่นๆ ในตัวอย่างน้ำเสียจากแม่น้ำ โดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกอิมมูโนเซนเซอร์ งานวิจัยนี้อาศัยหลักการของเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน ซึ่งได้ทำการทดลอง 2 แบบ โดยแบบที่ 1 (ดังรูปที่ 2.9) จะตรึงแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีบนเมมเบรน แล้วเติมเพนนิซิลีนจีและเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยอะวิดิน-ไบโอติน เปอร์ออกซิเดสจะเกิดการจับกันอย่างแข่งขันระหว่างเพนนิซิลีนจีและเพนนิซิลีนจีที่ติกฉลากกับแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ตรึงบนเมมเบรน จากนั้นจะเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป ทำการตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นโดยใช้ขั้วไฟฟ้าแอมเพอร์โรเมทริกที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สัญญาณที่ได้จะติดตามจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ไป และแบบที่ 2 (ดังรูปที่ 2.10) ตรึงเพนนิซิลีนจีบนเมมเบรน แล้วเพนนิซิลีนจีกับแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยอะวิดิน-ไบโอติน เปอร์ออกซิเดส ขั้น

ต่อไปเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป ทำการตรวจวัดการสัญญาณที่เกิดขึ้นโดยใช้ขั้วไฟฟ้าแอมเพอร์โรเมทริกที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สัญญาณที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณเพนนิซิลินจีในตัวอย่าง จากผลที่ได้พบว่ามีขีดจำกัดในการตรวจวัดเพนนิซิลินจีเท่ากับ 10^{-10} M และเป็นวิธีที่ง่าย มีความจำเพาะเจาะจงสูง



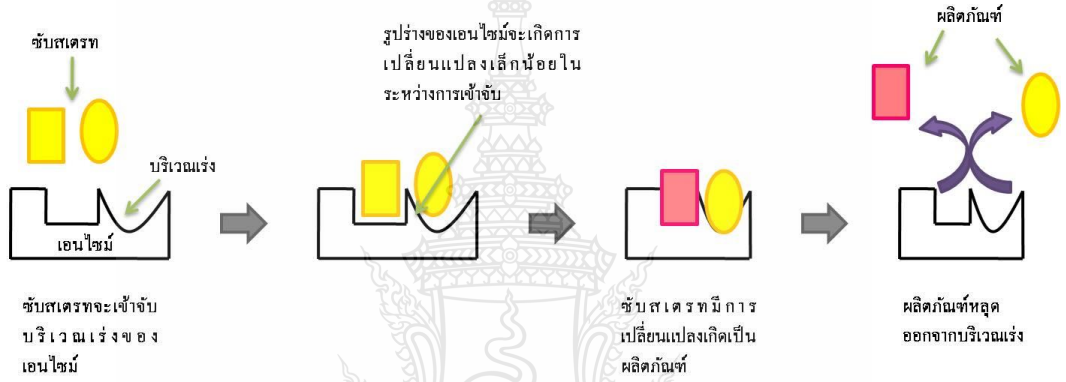
รูปที่ 2.9 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี [33]



รูปที่ 2.10 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี [33]

2.4.2 คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

คะตะไลติก มีที่มาจากคำว่า คะตะลิส (Catalyst) มีความหมายว่าตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้น คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์จึงเป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์เป็นวัสดุชีภาพ เอนไซม์เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก เอนไซม์จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต มีบริเวณที่เรียกว่า บริเวณเร่ง (Active site) ที่มีลักษณะจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรท (Substrate) เหมือนกับลักษณะของแม่กุญแจ (เอนไซม์) กับลูกกุญแจ (สับสเตรท) เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเอนไซม์จะกลับมาอยู่ในสภาพเดิม และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดที่เหมาะสม [34] ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 หลักการของคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

2.4.2.1 การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

มีงานวิจัยที่อาศัยเทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เช่น ในปี ค.ศ. 2003 Xu และคณะ [35] ทำการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าเป็นตัวตรวจวัด โดยจะตรึงฮอสราดิชเปอร์ออกซิเดสไว้บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนสกรีนปริ้น (Screen-printed carbon) ซึ่งใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าคาโลเมลเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าแพลตตินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ทำการตรวจวัดหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้ไซคลิกโวลแทมเมตรี ให้ศักย์ไฟฟ้าที่อัตราการสแกน 50 mV/s สัญญาณที่ได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.8 μM ถึง 1.0 mM และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ 0.4 μM และในปี ค.ศ. 2005 Sun และคณะ [36] ได้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย

เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ในงานวิจัยนี้จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะซินิดีนโดยมีฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะให้ศักย์ฟ้าเริ่มต้นที่ -0.40 V อัตราการสแกนที่ 1000 mV/s จากผลการทดลองพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้เท่ากับ 2.0×10^{-7} ถึง 1.0×10^{-4} mol/l และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 5.0×10^{-8} mol/l

ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 Fernandes และคณะ [37] ทำการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างของเหลวโดยอาศัยระบบโฟลว์ (Flow system) ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโต-เมตริกไบโอเซนเซอร์ ทำการตรึงฮอสราดิชเปอร์ออกซิเดสบนพอลีอะนิลีน ในการวิเคราะห์นั้นจะใช้อัตราการไหลที่ 3.0 ml/min และใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 100 µl เมื่อฉีดสารเข้าไปในระบบแล้วจะตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm จากผลที่ได้พบว่าวิธีนี้สามารถหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 55 ถึง 2730 nmol/l จากผลการทดลองที่ได้พบว่าได้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% RSD) อยู่ในช่วง 0.3 ถึง 2.3 %

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี โดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

3.1.1 สารเคมี

3.1.1.1 แอนติ-เพนนิซิลินจี ชนิดโพลีโคนอล แอนติบอดี (anti-Penicillin G, Polyclonal Antibody Type, Bioss Antibodies, USA)

3.1.1.2 เพนนิซิลินจี (Penicillin G, US Biological, United State)

3.1.1.3 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.5 ไบโอติน 3-ซัลโฟ-เอ็น-ไฮดรอกซิซักซินิไมด์ เอสเทอร์ โซเดียม ซอลต์ (Biotin 3-sulfo-N-hydroxxysuccinimide ester sodium salt, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.6 1-[3-(ไดเมทิลอะมิโน)โพรพิล]-3-เอทิลคาร์โบไดไมด์ เมไทโอไดด์ (1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.7 สเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (Streptavidin-peroxidase, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.8 โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum albumin; BSA, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Ajex Finechem, Germany)

3.1.1.10 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate, Ajex Finechem, New Zealand)

3.1.1.11 ไดโซเดียมคาร์บอเนต (Di-sodium carbonate, Ajex Finechem, New Zealand)

3.1.1.12 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphase, Ajex Finechem, New Zealand)

3.1.1.13 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphase, Ajex Finechem, New Zealand)

3.1.1.14 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, RCI Labscan Ltd., Thailand)

3.1.1.15 โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทน โมโนเลท (Polyoxyethylenesorbitan monoleate, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.1.16 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 7.40

สารละลาย A : ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 15.601 g ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

สารละลาย B : ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 28.392 g ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 95 ml ลงในสารละลาย B ปริมาตร 405 ml ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น และปรับพีเอชให้ได้ 7.40

3.1.1.17 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 9.60

ผสมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.283 g กับไดโซเดียมคาร์บอเนต 0.159 g ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 9.60 ด้วย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์

3.1.1.18 เมมเบรนไดอะไลซิส (Seamless cellulose tubing, size 20/32, lot: 009001,Viskase Sales Corp, USA)

3.1.1.19 ชุดทดสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในนม ผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ (ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรจนารักษ์เภสัช)

3.1.1.20 ตัวอย่างน้ำนมดิบ

3.1.1.21 ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์

3.1.1.22 ตัวอย่างนมผง

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.2.1 ไมโครเพลท (Micro plate, TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland)

3.1.2.2 เขย่ารุ่น VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, USA)

3.1.2.3 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 และ 1000 µl (BRAND, Germany)

3.1.2.4 เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อม Magnetic Bar ขนาด 10 เซนติเมตร (IKA RH basic 1, Canada)

3.1.2.5 เครื่องมือวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10 (DENVER INSTRUMENT, UK)

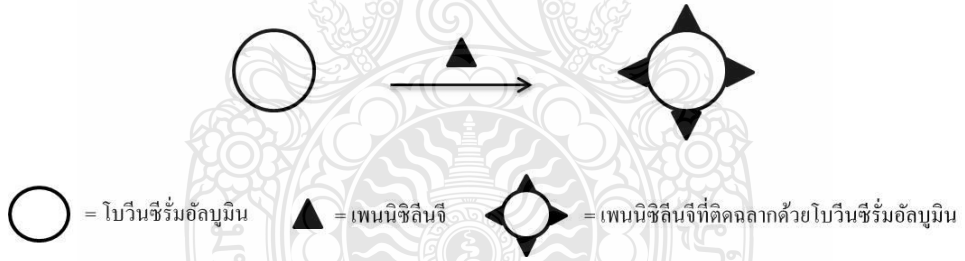
3.1.2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยมสี่ตำแหน่ง รุ่น AZ Series (SARTORIUS, USA)

3.1.2.7 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 (SHIMATSU, Japan)

3.1.3 การทดลอง

3.1.3.1 การเตรียมเพนนิซิลินจีติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน (ดังรูป 3.1)

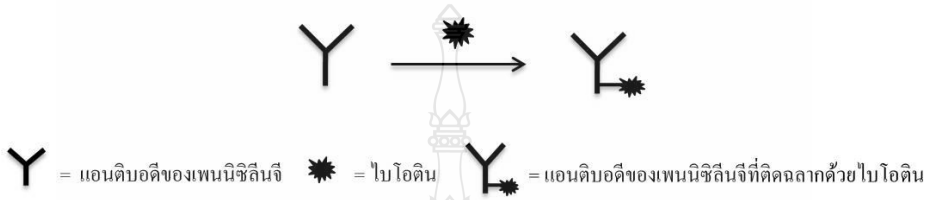
ขั้นแรกทำการผสมสารละลายเพนนิซิลินจีกับสารละลายโบวีนซีรั่มอัลบูมิน โดยชั่งเพนนิซิลินจี 25 mg ละลายใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ปริมาตร 5 ml ผสมกับสารละลายโบวีนซีรั่มอัลบูมิน โดยชั่งโบวีนซีรั่มอัลบูมิน 10 mg ละลายใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ปริมาตร 5 ml จากนั้นเติมสารละลาย 1-[3-(ไดเมทิลอะมิโน)โพรพิล]-3-เอทิล คาร์โบไดไมล์ เมไทโอไดล์ ปริมาตร 2 ml คนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ไปไดอะไลซิส (Dialysis) ด้วยสารละลาย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 คนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เพื่อใช้ในการทำการทดลองในขั้นต่อไป ซึ่งเพนนิซิลินจีสามารถเชื่อมกับโบวีนซีรั่มอัลบูมินได้ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยใช้ 1-[3-(ไดเมทิลอะมิโน)โพรพิล]-3-เอทิล คาร์โบไดไมล์ เมไทโอไดล์ เป็นสารเชื่อมไขว้



รูปที่ 3.1 การติดฉลากแอนติเจนเพนนิซิลินจีด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน

3.1.3.2 การเตรียมแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (ดังรูปที่ 3.2)

ผสมแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีความเข้มข้น 1 µg/µl ปริมาตร 100 µl และสารละลายไบโอติน ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 100 µl คนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในขั้นนี้จะได้แอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนทำการทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.2 การติดฉลากแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีด้วยไบโอติน

3.1.3.3 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี (ดังรูปที่ 3.3)

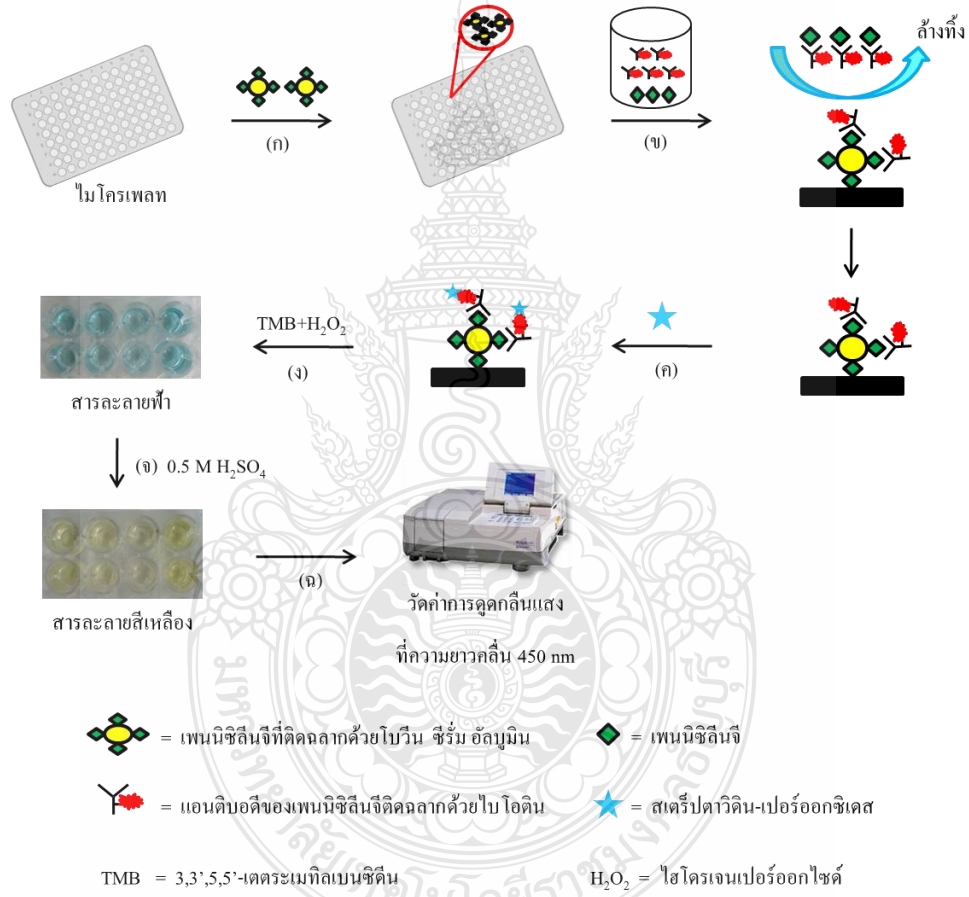
ขั้นที่ 1 เติมเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท (ดังรูปที่ 3.3 (ก)) โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่มีสารละลาย 0.1 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 5 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Blocking buffer) ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง

ขั้นที่ 2 ผสมสารละลายเพนนิซิลินจีที่ต้องการวิเคราะห์และแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (ดังรูปที่ 3.3 (ข)) โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลินจี ปริมาตร 30 µl และสารละลายแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.006 µg/µl ปริมาตร 30 µl ลงในทิวป์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปเติมลงในไมโครเพลท ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง

ขั้นที่ 3 เติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (ดังรูปที่ 3.3 (ค)) ความเข้มข้น 0.004 mg/ml ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่ได้จากขั้นที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 % (w/v) โพลี-ออกซีเอทิลลีนซอบิแทนโมโนเลต จำนวน 5 ครั้ง

ขั้นที่ 4 (ดังรูปที่ 3.3 (ง)) ปิเปตสารละลาย 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 µl และสารละลาย 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้สารละลายสีฟ้า จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 µl จะได้สารละลายสีเหลือง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 nm



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี โดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (ก) ตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท (ข) เติมเพนนิซิลินจีที่ต้องการวิเคราะห์และแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (ค) เติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (ง) เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (จ) เติมกรดซัวฟิวริก และ (ฉ) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.1.3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการตรวจหาเพนนิซิลินจี โดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน ให้สามารถตรวจหาเพนนิซิลินจีที่ตกค้างในนมที่มีความเข้มข้นต่ำตามที่มาตรฐานกำหนด (4 ppb) สภาวะที่ทำการศึกษา ได้แก่ ศึกษาหาเวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท ศึกษาหาความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ศึกษาหาเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ศึกษาหาความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส และศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สรุปสภาวะที่ศึกษาได้ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ต้องการศึกษาในการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี

สภาวะที่ศึกษา	การทดลอง
1. ศึกษาเวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท	9 12 16 18 และ 24 ชั่วโมง
2. ศึกษาเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน	0.003 0.006 และ 0.012 µg/µl
3. ศึกษาเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน	20 40 60 และ 80 นาที
4. ศึกษาความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส	0.001 0.002 0.004 และ 0.006 mg/ml
5. ศึกษาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	6.50 7.00 7.50 และ 8.00

(1) ศึกษาเวลาในการตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท

ศึกษาเวลาในการตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท ทำการทดลองที่เวลา 9 12 16 18 และ 24 ชั่วโมง ทำการตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่มีสารละลาย 0.1 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ที่เวลาต่างๆ จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 5 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Blocking buffer) ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง ขั้นต่อไปเติมสารละลายเพนนิซิลีนจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ปริมาตร 30 µl และสารละลายแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.006 µg/µl ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.004 mg/ml ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 % (w/v) โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทน โมโนเลต จำนวน 5 ครั้ง ต่อมาเติมสารละลาย 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 µl และสารละลาย 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้สารละลายฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 µl จะได้สารละลายสีเหลือง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

(2) ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

ศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.003 0.006 และ 0.012 µg/µl แต่ละความเข้มข้น ทำการตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่มีสารละลาย 0.1 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 5 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Blocking

buffer) ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง ขั้นต่อไปเติมสารละลายเพนนิซิลินจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ปริมาตร 30 µl และสารละลายแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.004 mg/ml ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 % (w/v) โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทนโมโนเลต จำนวน 5 ครั้ง ต่อมาเติมสารละลาย 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 µl และสารละลาย 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้สารละลายสีฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 µl จะได้สารละลายสีเหลืองนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

(3) ศึกษาเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

ศึกษาเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่เวลาต่างๆ คือ 20 40 60 และ 80 นาที ทำการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่มีสารละลาย 0.1 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 5 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Blocking buffer) ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง ขั้นต่อไปเติมสารละลายเพนนิซิลินจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ปริมาตร 30 µl และสารละลายแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.006 µg/µl ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v)โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.004 mg/ml ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 % (w/v) โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทนโมโนเลต จำนวน 5 ครั้ง

ต่อมาเติมสารละลาย 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 µl และสารละลาย 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้สารละลายสีฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 µl จะได้สารละลายสีเหลือง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

(4) ศึกษาความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

ศึกษาความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.001 0.002 0.004 และ 0.006 mg/ml ทำการเคลือบเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่มีสารละลาย 0.1 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 µl ลงในไมโครเพลทตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมินจำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 5 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Blocking buffer) ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง ขั้นต่อไปเติมสารละลายเพนนิซิลินจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ปริมาตร 30 µl และสารละลายแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.006 µg/µl ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมเอนไซม์ สเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 % (w/v) โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทนโมโนเลท จำนวน 5 ครั้ง ต่อมาเติมสารละลาย 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 µl และสารละลาย 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้สารละลายสีฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 µl จะได้สารละลายสีเหลือง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

(5) ศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยศึกษาที่พีเอชต่างๆ คือ 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ทำการเคลือบเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท โดยปิเปตสารละลายเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน

ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลทที่มีสารละลาย 0.1 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.60 ปริมาตร 100 µl ลงในไมโครเพลทตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 5 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Blocking buffer) ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง ขั้นต่อไปเติมสารละลายเพนนิซิลินจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ปริมาตร 30 µl และสารละลายแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.006 µg/µl ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 1 % (w/v) โบวีนซีรั่มอัลบูมิน จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ที่ละลายในฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ความเข้มข้น 0.004 mg/ml ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.40 ที่มี 0.05 % (w/v) โพลีออกซีเอทิลลีนซอบิแทนโมโนเลท จำนวน 5 ครั้ง ต่อมาเติมสารละลาย 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 µl และสารละลาย 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในขั้นนี้จะได้สารละลายสีฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 µl จะได้สารละลายสีเหลือง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.1.3.5 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดในการตรวจพบ ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ และความจำเพาะเจาะจงของวิธี ซึ่งทำการทดลองตามข้อ 3.1.3.3 โดยทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะการทดลองสำหรับหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

การทดลอง	ผลการทดลอง
1. เวลาในการเคลือบเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท	12 ชั่วโมง
2. ความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน	0.006 µg/µl
3. เวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน	60 นาที
4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส	0.004 mg/ml
5. พีเอชที่เหมาะสมสารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์	7.00

(1) การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

1) ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้เพนนิซิลินจีความเข้มข้น 0.5 ppb ปริมาตร 30 µl ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้งภายในสภาวะการทดลองเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2) ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้เพนนิซิลินจีความเข้มข้น 0. 5 ppb ปริมาตร 30 µl ทำการทดลองภายใต้สภาวะที่ต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วแล้วคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

(2) ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยเติมสารละลายมาตรฐานเพนนิซิลินจีจำนวน 3 ความเข้มข้น ลงในตัวอย่างจริงจำนวน 4 ตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วนำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยอาศัยกราฟมาตรฐานของเพนนิซิลินจี

(3) ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยใช้แอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.006 μg/μl และเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0005 0.005 0.05 0.025 0.5 0.25 และ 5.0 ppb นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเพนนิซิลินจีกับค่าการดูดกลืนแสง

(4) ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ขีดจำกัดการตรวจพบหาได้จากการคำนวณ ขีดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 3.3 (SD)/S [38] โดยที่ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Standard Deviation) หาได้จากการตรวจวัดสารละลายแบลงค์ จำนวน 7 ซ้ำ และ S คือ ความชันของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นของเพนนิซิลินจี 0.0005-0.05 ppb

(5) ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพได้จาก 10 (SD)/S [38] โดยที่ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หาได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานแบลงค์ จำนวน 7 ซ้ำ และ S คือ ความชันของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นของเพนนิซิลินจี 0.0005-0.05 ppb ซึ่งขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพจะต้องมีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

(6) ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีโดยใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่น เช่น อะมอกซิซิลลิน แอมพิซิลลิน เพนิซิลลินวี เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แต่ใช้ยาปฏิชีวนะตัวอื่นแทนเพนนิซิลินจี นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm

(7) การวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีในตัวอย่างจริง

เมื่อได้วิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีในตัวอย่างจริง ตัวอย่างที่ใช้คือ ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ A และ B ตัวอย่างนมผง A และ B และตัวอย่างน้ำนมดิบ รวมทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ทำการทดลองตามข้อ 3.1.3.3 โดยใช้ตัวอย่างจริงแทนเพนนิซิลินจี จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเพนนิซิลินจีจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับชุดทดสอบ (Test kit)

ทั่วไป โดยวิธีทดลองของชุดทดสอบคือ หยดตัวอย่างนม 3 หยด ลงในหลอดทดสอบ จากนั้นบ่มเพาะเชื้อหลอดทดสอบในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 64±2 °C จับเวลาจนหลอดทดสอบเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองทั้งหมด (ประมาณ 3 ชั่วโมง) แล้วอ่านผลการเปลี่ยนสีของตัวอย่าง

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

3.2.1 สารเคมี

3.2.1.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, Sigma-Aldrich, USA)

3.2.1.2 เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase, Sigma-Aldrich, USA)

3.2.1.3 โอ-ไดอะนิซิดีน (o-Dianisidine, Sigma-Aldrich, USA)

3.2.1.4 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphase, Ajex Finechem, New Zealand)

3.2.1.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphase, Ajex Finechem, New Zealand)

3.2.1.6 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, RCI Labscan Ltd., Thailand)

3.2.1.7 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, พีเอช 7.00

สารละลาย A : สารละลาย 0.2 M โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 15.601 g ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

สารละลาย B : สารละลาย 0.2 M ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 28.392 g ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น

ผสมสารละลาย A ลงในสารละลาย B ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชเป็น 7.00

3.2.1.8 โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganage, Ajex Finechem, New Zealand)

3.2.1.9 ตัวอย่างน้ำนมดิบ

3.2.1.10 ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์

3.2.1.11 ตัวอย่างนมผง

3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.2.1 ไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ขนาด 600 และ 2000 µl (Molecular Bio Product, USA)

3.2.2.2 เครื่องเขย่ารุ่น VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, USA)

3.2.2.3 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 และ 1000 µl (BRAND, Germany)

3.2.2.4 เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อม Magnetic Bar ขนาด 10 เซนติเมตร (IKA RH basic 1, Canada)

3.2.2.5 เครื่องมือวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10 (DENVER INSTRUMENT, UK)

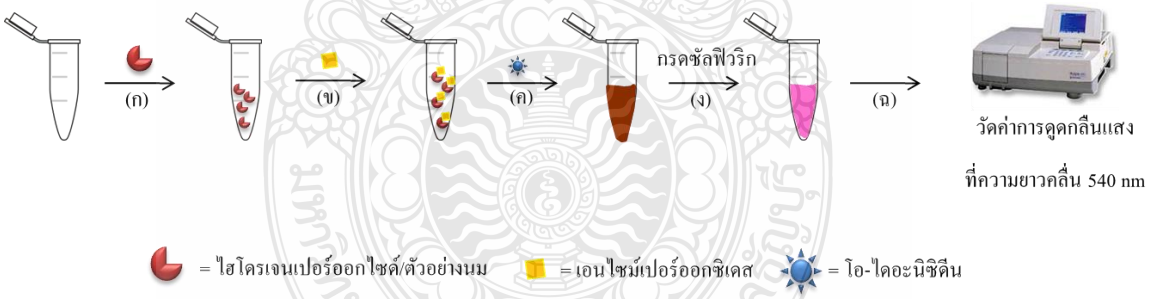
3.2.2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยมสี่ตำแหน่ง รุ่น AZ Series (SARTORIUS, USA)

3.2.2.7 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-1601 (SHIMATSU, Japan)

3.2.3 การทดลอง

3.2.3.1 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (รูปที่ 3.4)

ขั้นที่แรกเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 10 ppm ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ขนาด 600 µl ปริมาตร 30 µl (ก) ต่อมาเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml ปริมาตร 30 µl (ข) และสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 30 µl ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที (ค) ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายสีน้ำตาล จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก (ง) ได้สารละลายสีชมพู แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 nm



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (ก) เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวป์ (ข) เติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ค) เติมโอ-ไดอะนิซิดีน (ง) เติมกรดซัลฟิวริก และ (จ) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

3.2.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในน้ำนม สภาวะที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน สรุปสภาวะที่จะศึกษาได้ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะที่ต้องการศึกษาในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สภาวะที่ศึกษา	การทดลอง
1. เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	3 5 10 และ 15 นาที
2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	0.001 0.002 0.004 0.006 และ 0.008 mg/ml
3. พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	6.50 7.00 7.50 และ 8.00
4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน	0.1 0.3 0.5 และ 0.7 mM

(1) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ทำการทดลองโดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ปริมาตร 30 µl จากนั้นเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml ปริมาตร 30 µl และสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ที่เวลาต่างๆ คือ 3 5 10 และ 15 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายสีน้ำตาล หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ได้สารละลายสีชมพู แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวิ-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 nm

(2) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ทำการทดลองโดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ปริมาตร 30 µl จากนั้นเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.001 0.002 0.004 0.006 และ 0.008 mg/ml ปริมาตร 30 µl และสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายสีน้ำตาล หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ได้สารละลายสีชมพู แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวิ-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm

(3) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

โดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ปริมาตร 30 µl จากนั้นเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆ คือ 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ปริมาตร 30 µl และสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายสีน้ำตาล หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ได้สารละลายสีชมพู แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวิ-วิสิเบิล สเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 nm

(4) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน

ทดลองโดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ปริมาตร 30 µl จากนั้นเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.002 mg/ml ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 7.00 ปริมาตร 30 µl และสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 mM ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายสีน้ำตาล หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ได้สารละลายสีชมพู แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวิ-วิสิเบิล สเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 nm

3.2.3.3 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

(1) การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

1) ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 30 µl ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ภายในสภาวะการทดลองเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2) ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 30 µl ทำการทดลองภายใต้สภาวะที่ต่างกัน เป็นเวลา 5 วัน

นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

(2) ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยเติมสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จำนวน 4 ความเข้มข้น ลงในตัวอย่างจริง จำนวน 4 ตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วนำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยอาศัยกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

(3) ศึกษาความเป็นเส้นตรง

ศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 3.0 5.0 10.0 15.0 20.0 30.0 และ 40.0 ppm แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับค่าการดูดกลืนแสง

(4) ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ขีดจำกัดการตรวจพบหาได้จากการคำนวณ ขีดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 3.3 (SD)/S [38]โดยที่ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หาได้จากการตรวจวัดสารละลายแบลงค์ จำนวน 7 ซ้ำ และ S คือ ความชันของกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.4-3.0 ppm

(5) ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพได้จาก 10 (SD)/S [38] โดยที่ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หาได้จากการตรวจวัดสารละลายแบลงค์ จำนวน 7 ซ้ำ และ S คือ ความชันของกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.4-3.0 ppm ซึ่งขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพจะต้องมีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

(6) ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีโดยใช้สารที่เป็นตัวออกซิไดส์ชนิดอื่นเปรียบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในข้อ 3.2.3.1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แต่ใช้สารที่ต้องการศึกษาแทนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

3.2.3.4 การวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง

เมื่อได้วิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง ตัวอย่างที่ใช้คือ ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ A และ B ตัวอย่างนมผง A และ B และตัวอย่างน้ำนมดิบ รวมทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ทำการทดลองตามข้อ 3.2.3.1 โดยใช้ตัวอย่างจริงแทนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวิ-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และนำตัวอย่างจริงทั้ง 5 ตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีไทเทรต ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างนมผสมกับสารละลายกรดซัลฟิวริก แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต อ่านผลการทดลองที่ได้จากนั้นนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น

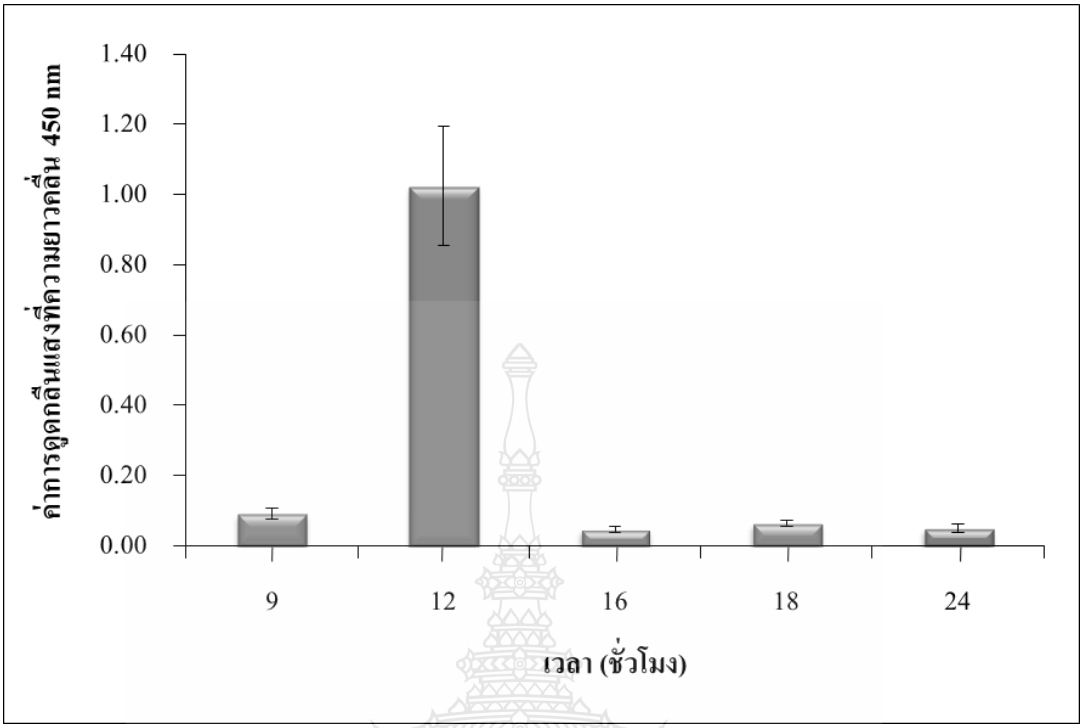
บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

4.1.1 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

4.1.1.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินในไมโครเพลท

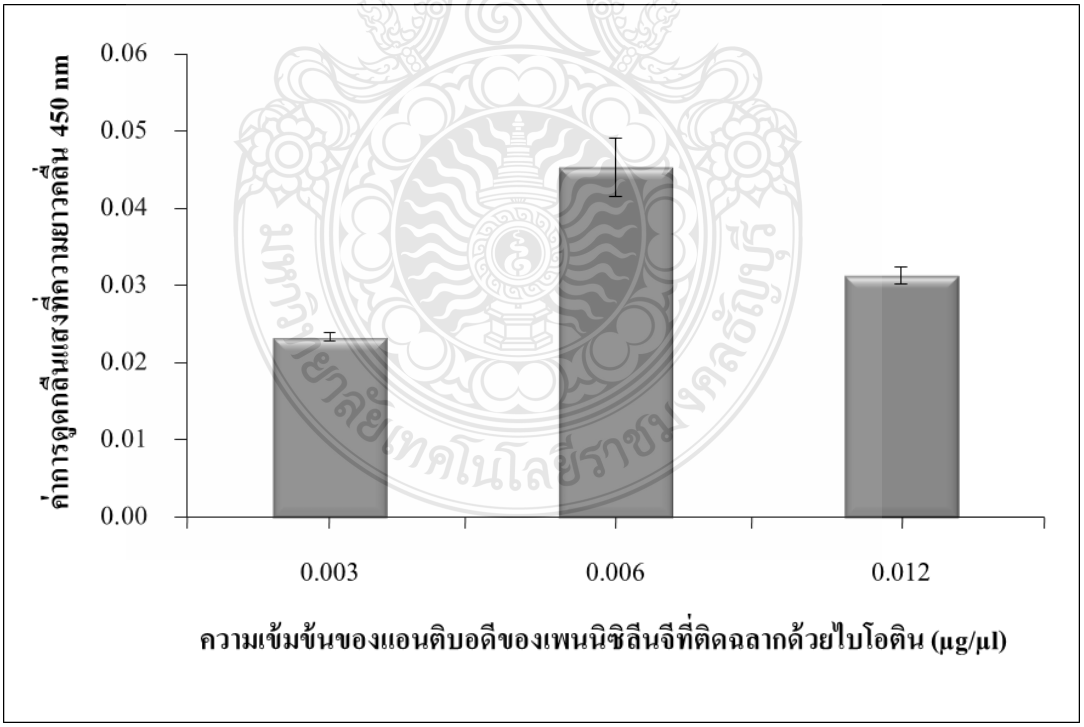
ประสิทธิภาพการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลทจะขึ้นอยู่กับเวลา ดังนั้นจึงศึกษาเวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินในไมโครเพลทที่เวลา 9 12 16 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าที่เวลา 9 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าน้อย เนื่องจากเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินถูกตรึงอยู่ในไมโครเพลทได้น้อย ทำให้สัญญาณที่ได้มีค่าน้อย และเมื่อใช้เวลาในการตรึงเป็น 12 ชั่วโมง พบว่าสัญญาณที่ได้มีค่าสูงสุด เนื่องจากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทำให้เพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินถูกตรึงในไมโครเพลทได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาหลังจาก 12 ชั่วโมง จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลง เนื่องจากพื้นที่ในไมโครเพลทมีจำกัด เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการซ้อนทับกันของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน สัญญาณที่ได้จึงมีค่าน้อย (ดังรูปที่ 4.1) ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลทคือ 12 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 4.1 ผลของเวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน

4.1.1.2 ผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

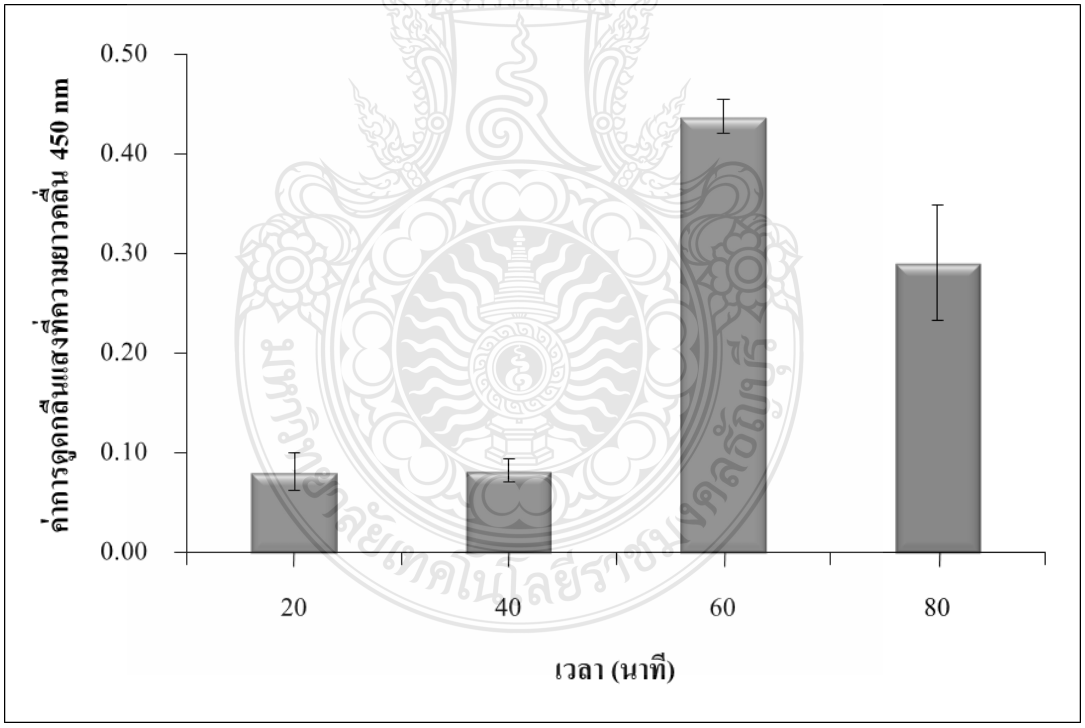
ปริมาณของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินมีผลต่อการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี เพราะแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินจะต้องมีปริมาณที่มากเกินพอเพื่อที่จะให้เพนนิซิลินจีจับกับแอนติบอดีได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.003 0.006 และ 0.012 µg/µl เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าที่ความเข้มข้น 0.003 µg/µl ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าน้อย เนื่องจากปริมาณของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินมีไม่เพียงพอที่จะเข้าจับกับแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ (เพนนิซิลินจี) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 0.006 µg/µl พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงสุด เพราะมีปริมาณของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเพียงพอที่จะเข้าจับกับแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ (เพนนิซิลินจี) และเมื่อความเข้มข้น 0.012 µg/µl พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าน้อยลง อาจเกิดเนื่องจากแอนติบอดี ทำให้มีแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่มากเกินไปกีดกันการเข้าจับกับแอนติเจน ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.006 µg/µl ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

4.1.1.3 ผลของเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

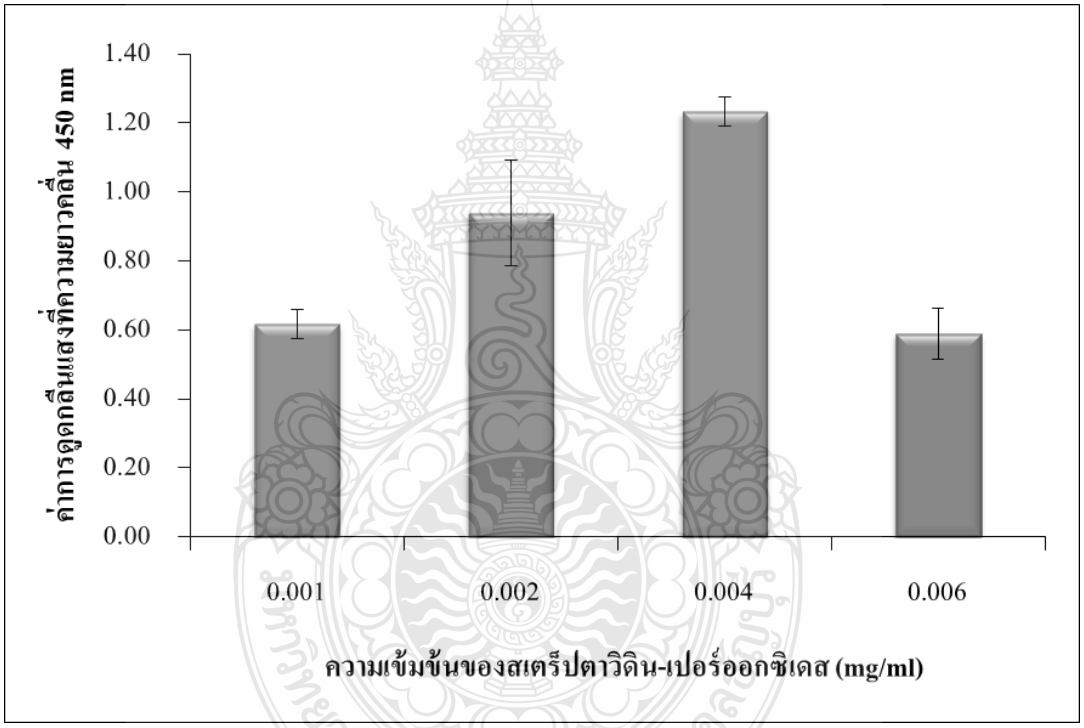
การจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนต้องใช้เวลาที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการจับกันได้อย่างสมบูรณ์ จึงศึกษาเวลาที่ใช้ในเข้าจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน ดังนั้นจึงศึกษาที่เวลาที่ใช้ในการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เวลา 20 40 60 และ 80 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวิ-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าที่เวลา 20 และ 40 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าน้อย เนื่องจากการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดียังไม่สมบูรณ์ แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าสูง แต่เมื่อเวลา 80 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าลดลง เนื่องจากการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีจะขึ้นอยู่กับเวลา ถ้าใช้เวลาในการจับกันนานเกินไปจะทำให้เกิดการหลุดของแอนติเจนและแอนติบอดี ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่ 60 นาที ในการทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.3 ผลของเวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีและแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

4.1.1.4 ผลของความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

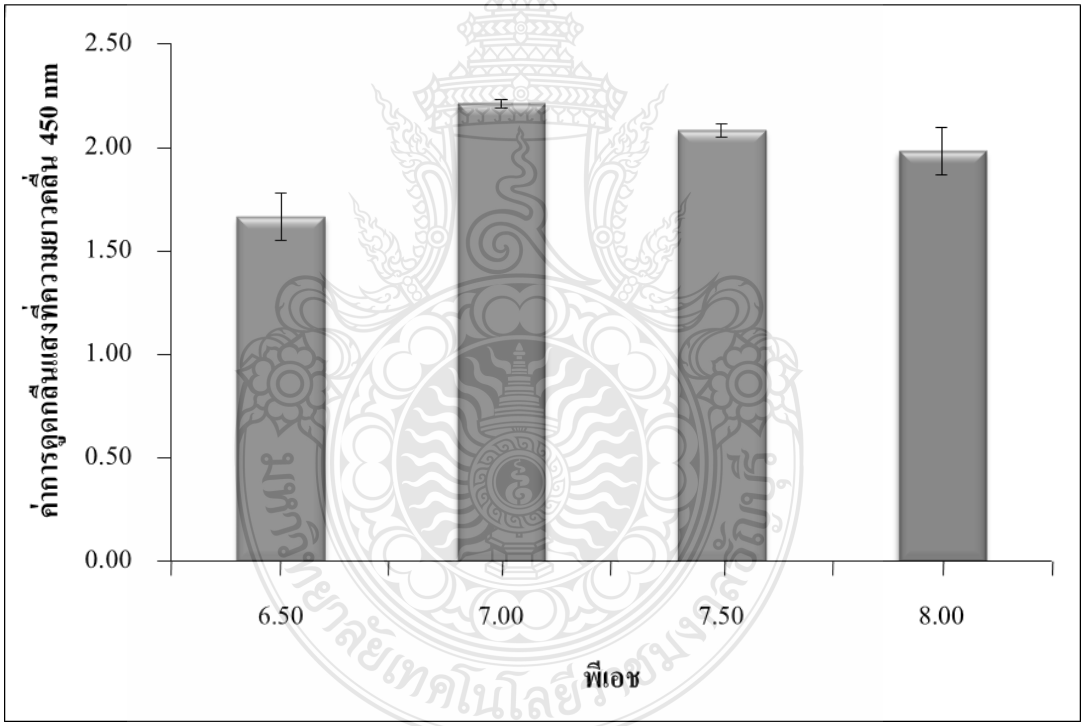
เนื่องจากปริมาณของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสมีผลต่อการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี ดังนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.001 0.002 0.004 และ 0.006 mg/ml จากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส จนถึงที่ความเข้มข้น 0.004 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าสูงสุด เพราะปริมาณของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสมีเพียงพอที่จะเข้าจับกับไบโอติน (รูปที่ 4.4) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0.004 mg/ml ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

4.1.1.5 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การทำงานเปอร์ออกซิเดสจะต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการทำงานสูงที่สุด ดังนั้นจึงศึกษาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์คือ 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm ผลการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามพีเอชจนถึงที่พีเอช 7.00 แต่หลังจากพีเอช 7.00 ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงน้อยลง (ดังรูปที่ 4.5) เนื่องจากเปอร์ออกซิเดสมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 5.00-9.00 [39] แสดงว่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือ 7.00 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.00 ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 4.5 ผลของพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ตารางที่ 4.1 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

การทดลอง	สภาวะที่เหมาะสม
1. เวลาในการตรึงเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมิน	12 ชั่วโมง
2. ความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน	0.006 µg/µl
3. เวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลีนจีกับแอนติบอดีของเพนนิซิลีนจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน	60 นาที
4. ความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส	0.004 mg/ml
5. พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	7.00

4.1.2 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

4.1.2.1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

1) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานเพนนิซิลินจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ทำการทดลอง 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) พบว่ามีค่าเท่ากับ 9 เป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้น ppb (µg/l) ต้องมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 30 [40] ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโน-เซนเซอร์แบบแข่งขัน

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm
1	2.114
2	2.358
3	2.051
4	2.088
5	2.301
6	2.591
7	2.436
ค่าเฉลี่ย	2.277
SD	0.202
% RSD	9

2) การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานเพนนิซิลินจี ความเข้มข้น 0.5 ppb ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 11 เป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้น ppb (µg/l) ต้องมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 30 [40] ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

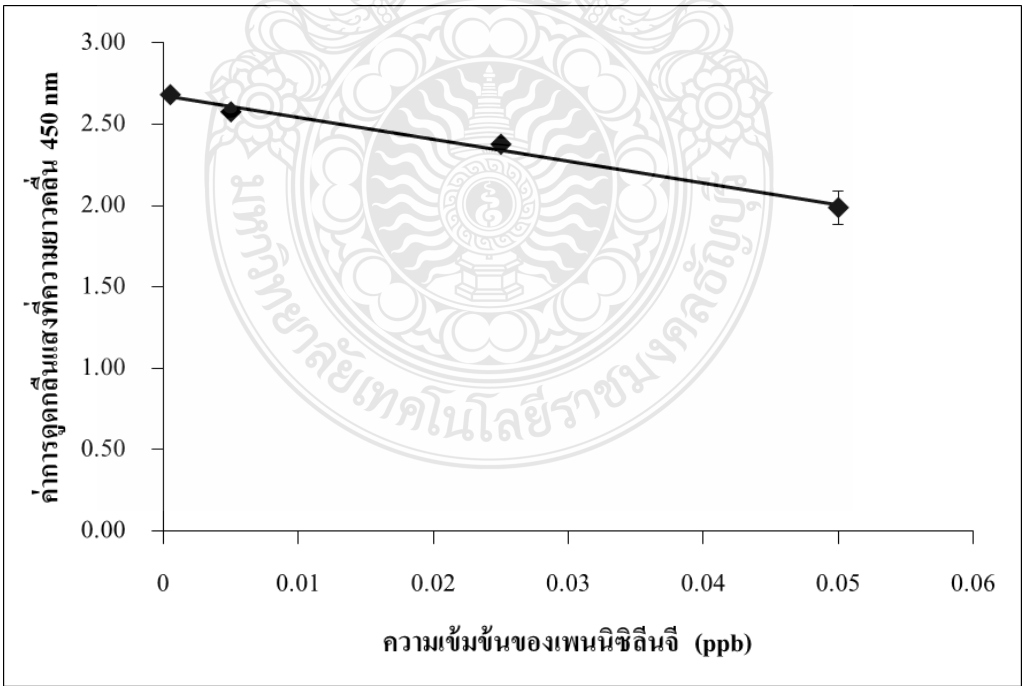
ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm
1	1.984
2	2.094
3	1.817
4	2.214
5	2.088
6	2.114
7	2.591
ค่าเฉลี่ย	2.129
SD	0.239
% RSD	11

4.1.2.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเพนนิซิลีนจี (รูปที่ 4.6) ผลการทดลองที่ได้พบว่า เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 116-118 % ดังตารางที่ 4.4 ถือว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีนี้มีความถูกต้อง โดยเกณฑ์ปกติของเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ระดับความเข้มข้น ppb (µg/l) มีค่าอยู่ในช่วง 40-120 % [40]

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของเพนนิซิลีนจี (ppb)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
1	0	0.025	0.029	116
2	0	0.04	0.047	118



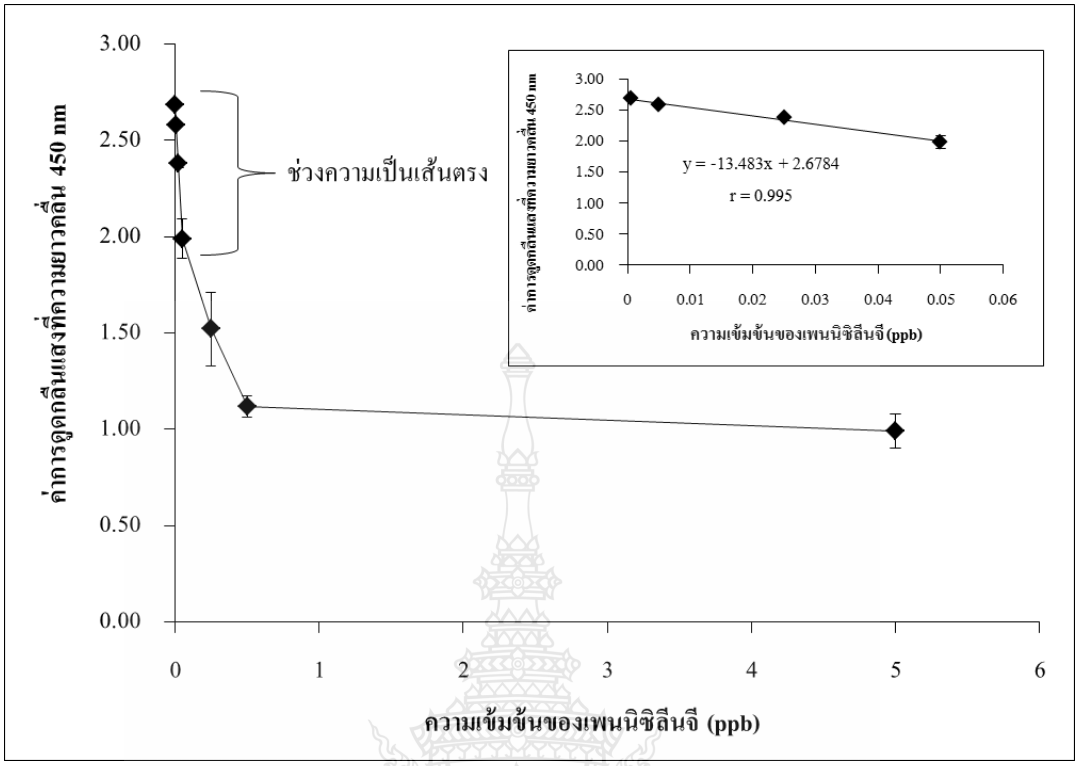
รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานของเพนนิซิลีนจีที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.1.2.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ทดลองโดยใช้สารละลายมาตรฐานเพนนิซิลีนที่ความเข้มข้น 0.0005 0.005 0.025 0.05 0.25 0.5 และ 5.0 ppb วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของเพนนิซิลีนจีเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงจะลดลง (ตารางที่ 4.5) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของเพนนิซิลีนจี แสดงดังรูปที่ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงระหว่างสารละลายแบลงค์และสารละลายเพนนิซิลีนจีที่ความเข้มข้น 0.0005 ppb โดยทดสอบด้วยสถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ผลการคำนวณที่ได้พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์และสารละลายเพนนิซิลีนจีที่ความเข้มข้น 0.0005 ppb มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่าวิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.0005-0.05 ppb และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; r) เท่ากับ 0.995

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเพนนิซิลีนจี (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm				ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
แบลงค์ (reagent blank)	2.834	2.834	2.767	2.812	0.039
0.0005	2.683	2.683	2.683	2.683	0.000
0.005	2.571	2.591	2.571	2.578	0.012
0.025	2.382	2.395	2.358	2.378	0.019
0.05	1.984	1.888	2.094	1.989	0.103
0.25	1.704	1.531	1.324	1.520	0.190
0.5	1.055	1.146	1.157	1.119	0.056
5	1.08	0.901	0.994	0.992	0.090



รูปที่ 4.7 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน

4.1.2.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ

ขีดจำกัดในการตรวจพบหาได้จากการคำนวณ ขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 3.3 (SD)/S ซึ่ง SD = 0.034 และ S = 13.485 ซึ่งผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 0.008 ppb

$$LOD = \frac{3.3\times(SD)}{S}$$

$$= \frac{3.3\times(0.034)}{13.485}$$

$$= 0.008 \text{ ppb}$$

4.1.2.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

ผลการทดลองพบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ เท่ากับ 0.025 ppb ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้มีความถูกต้องโดยหาจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมีค่าเท่ากับ 116 % และมีความเที่ยงซึ่งพิจารณาจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ มีค่าเท่ากับ 5

$$LOQ = \frac{10\times(SD)}{S}$$

$$= \frac{10\times(0.034)}{13.485}$$

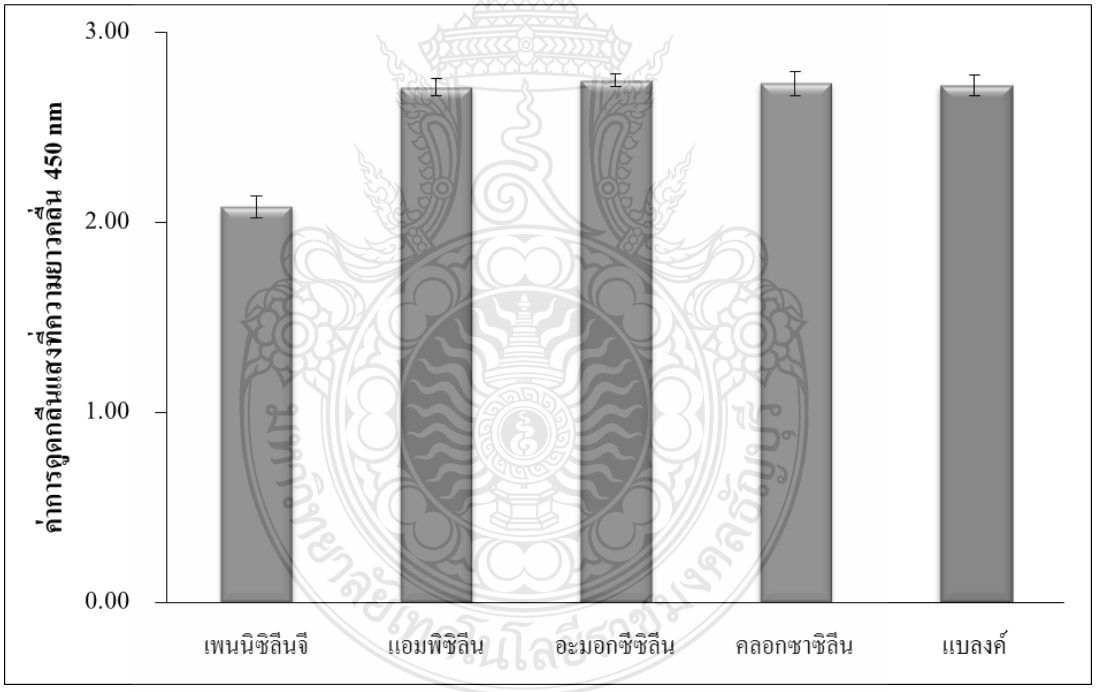
$$= 0.025 \text{ ppb}$$

4.1.2.6 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ด้วยยาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีโครงสร้างอยู่ในกลุ่มเดียวกับเพนนิซิลินจี ได้แก่ แอมพิซิลิน (Ampicillin) อะมอกซีซิลิน (Amoxicillin) และคลอกซาซิลิน (Cloxacillin) เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.5 ppb ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.8 พบว่าแอมพิซิลิน อะมอกซีซิลิน และคลอกซาซิลิน ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับแบลงค์ แสดงว่ายาปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจี เนื่องจากไม่สามารถจับกับแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง

ตารางที่ 4.6 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีโดยใช้เทคนิคอิมมูโน-เซนเซอร์แบบแข่งขัน

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm
เพนนิซิลีนจี	0.5	2.082
แอมพิซิลีน	0.5	2.711
อะมอกซีซิลีน	0.5	2.748
คลอกซาซิลีน	0.5	2.731
แบลงค์	-	2.721



รูปที่ 4.8 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

4.1.3 การวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง

เมื่อได้วิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีที่เหมาะสมแล้ว จึงใช้วิธีวิเคราะห์นี้ เพื่อวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง โดยใช้ตัวอย่างนมจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ A และ B ตัวอย่างนมผง A และ B และตัวอย่างน้ำนมดิบ จากผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 4.7 พบว่าในตัวอย่างนมทั้ง 5 ตัวอย่าง ไม่มีการปนเปื้อนของเพนนิซิลีนจี โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกับสารละลายแบลงค์ และเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.9 จะเห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของเพนนิซิลีนจีในนมทั้ง 5 ตัวอย่าง แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลที่สอดคล้องกับชุดทดสอบ

นอกจากนี้เพื่อยืนยันผลการทดลองของการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง จึงศึกษาผลของการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้ตัวอย่างจริง ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.8 จะเห็นว่าไม่พบการปนเปื้อนของเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง

ตารางที่ 4.7 ผลของการหาวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีในตัวอย่างจริง

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm				เพนนิซิลีนจี
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
นมพาสเจอร์ไรซ์ A	2.739	2.709	2.659	2.702	ไม่พบ
นมพาสเจอร์ไรซ์ B	2.799	2.709	2.709	2.739	ไม่พบ
นมผง A	2.683	2.659	2.767	2.703	ไม่พบ
นมผง B	2.834	2.737	2.709	2.760	ไม่พบ
น้ำนมดิบ	2.834	2.659	2.737	2.743	ไม่พบ
แบลงค์ของสารเคมี (Reagent blank)	2.767	2.737	2.752	2.752	ไม่พบ

ตารางที่ 4.8 ผลของการหาสารละลายแบลงค์

สารละลาย	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
แบลงค์ของสารเคมี (reagent blank)	2.767	2.737	2.752	2.752
แบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank)	2.834	2.659	2.737	2.743

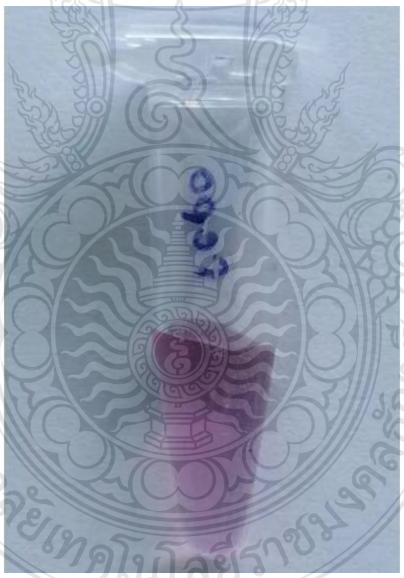
การทดลองควบคุม (ไม่มีเพนนิซิลีนจี) | นม พาสเจอร์ไรซ์ A | นม พาสเจอร์ไรซ์ B | นมผง A | นมผง B | น้ำนมดิบ

รูปที่ 4.9 แสดงผลของการวิเคราะห์หาเพนนิซิลีนจีด้วยชุดทดสอบ

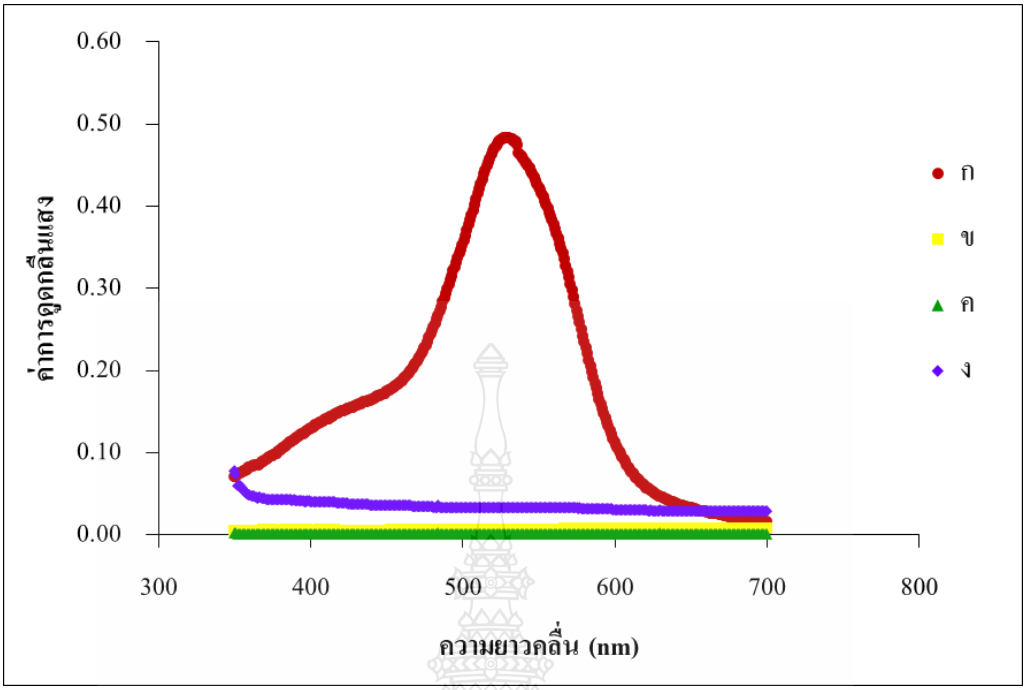
4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

4.2.1 ผลของค่าการดูดกลืนแสงของการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมของการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยนำสารละลายสีชมพู (รูปที่ 4.10) ที่ได้จากปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (แบลงค์) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 350-700 nm ผลการทดลองพบว่าสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 nm (รูปที่ 4.11) ในขณะที่สารละลายอื่นๆ ไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นนี้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อตรวจวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อไป



รูปที่ 4.10 สารละลายสีชมพูที่ได้จากปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอ-ไดอะนิซิดีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

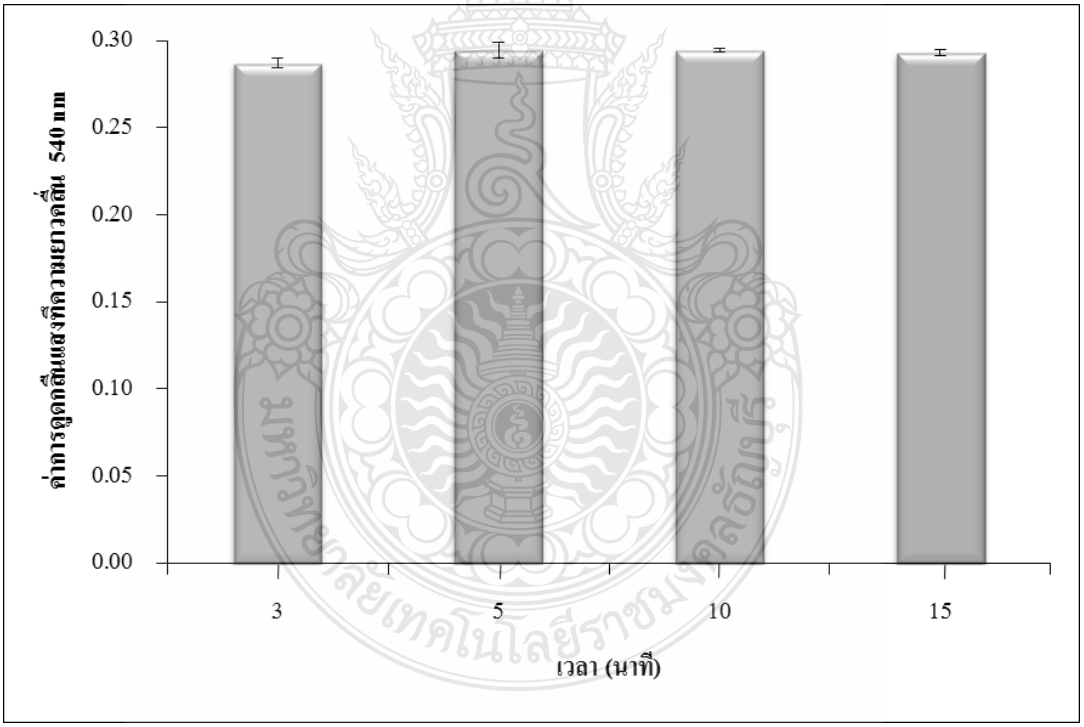


รูปที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงของ ก) สารละลายสีชมพูที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอ-ไดอะนิซิดีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ข) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (แบลงค์) ค) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ง) โอ-ไดอะนิซิดีน

4.2.2 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

4.2.2.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

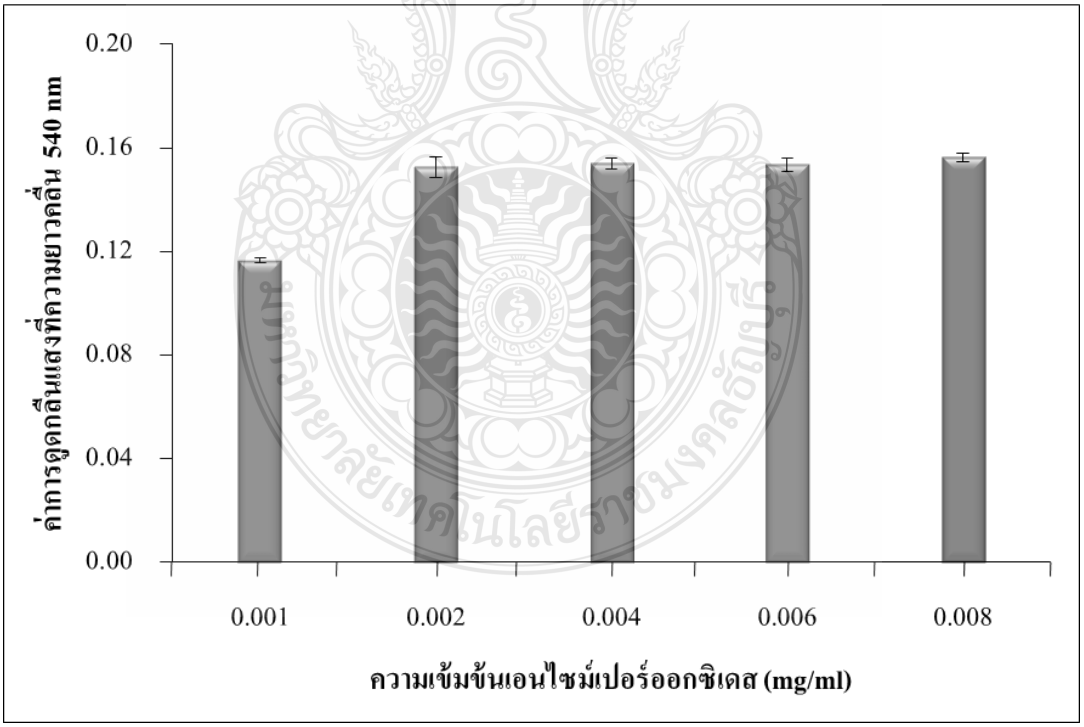
การวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะต้องใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงได้ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม เพื่อให้ได้การเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ โดยศึกษาที่เวลา 3 5 10 และ 15 นาที เมื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm เปรียบเทียบที่เวลาต่างๆ ผลการทดลองเป็น ดังรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 3 ถึง 5 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น แต่หลังจากที่เวลา 5 นาทีเป็นต้นไป ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เริ่มคงที่ แสดงว่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ที่เวลา 5 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 5 นาที เป็นเวลาที่ใช้ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 4.12 ผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

4.2.2.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

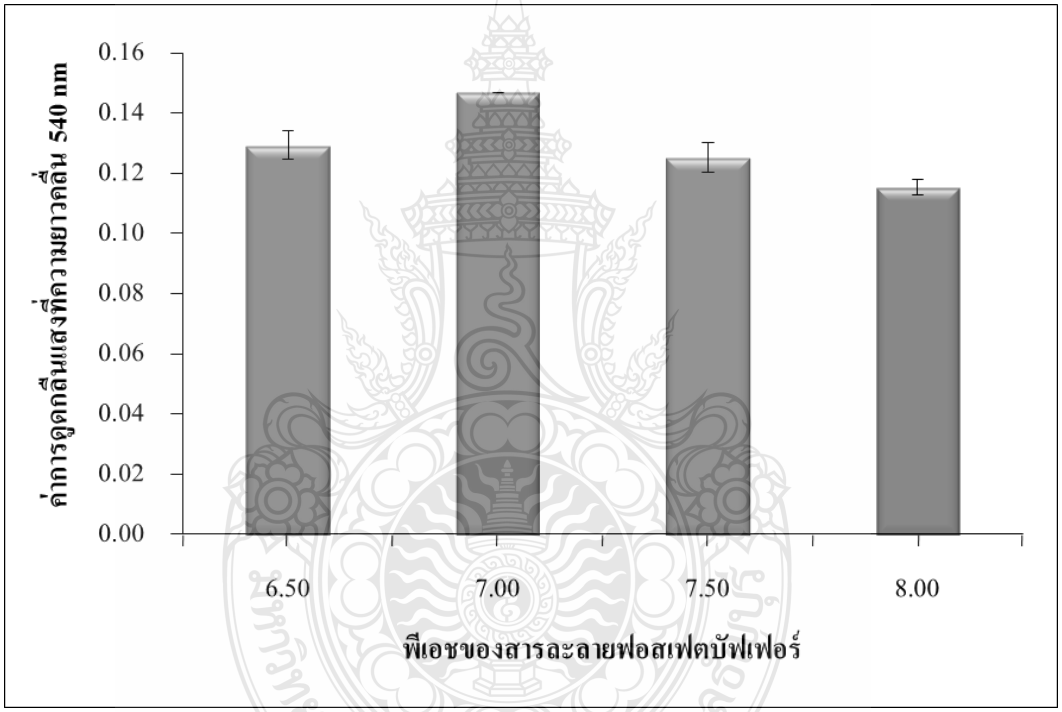
ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอ-ไดอะนิซิดีน ดังนั้นปริมาณของเปอร์ออกซิเดสต้องมีมากเพียงพอเพื่อให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ จึงศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.001 0.002 0.004 0.006 และ 0.008 mg/ml จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.001 ถึง 0.002 mg/ml ให้ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพราะความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมาก สามารถเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้น (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน)ได้มาก ค่าการดูดกลืนแสงจึงมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เริ่มมีค่าคงที่ (รูปที่ 4.13) เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นจนหมด ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้มากขึ้นก็ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคือ 0.002 mg/ml



รูปที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

4.2.2.3 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

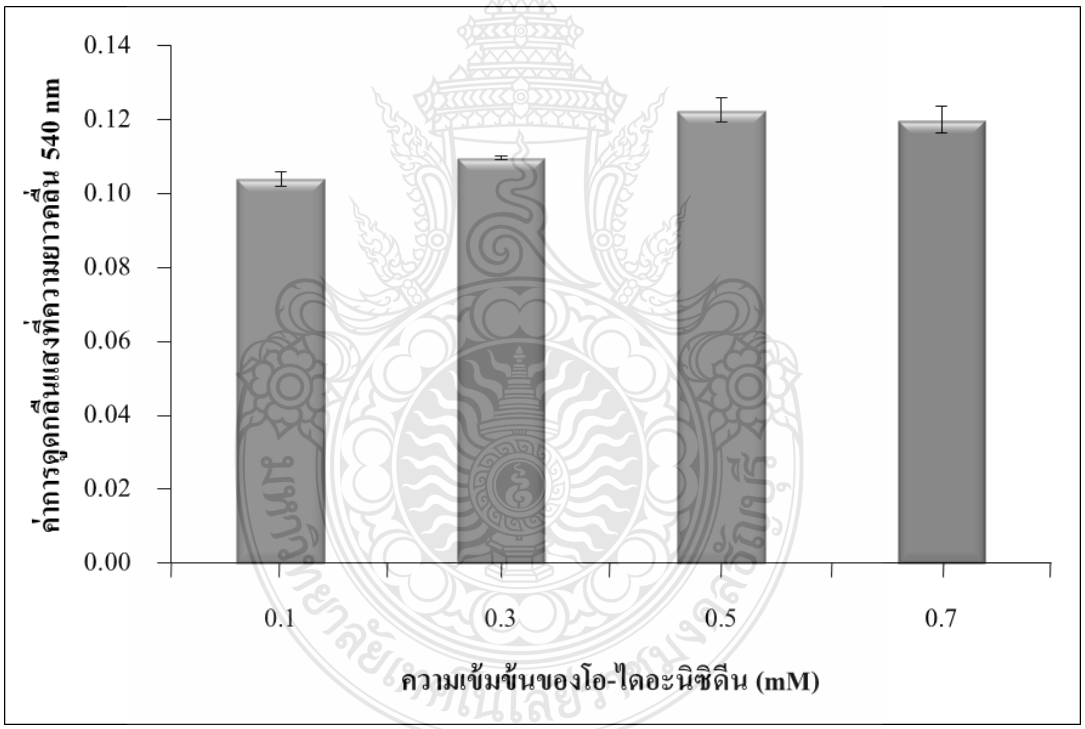
การทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลาย เพื่อให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกิดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด จึงศึกษาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ คือ 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ผลการทดลองจะเห็นว่าที่พีเอชเท่ากับ 7.00 เป็นค่าพีเอชที่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำงานได้ดีที่สุดค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าสูงสุด และที่พีเอชมากกว่า 7.00 ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลง (รูปที่ 4.14) เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 5.00-9.00 [39] ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.00 ใช้ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 4.14 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4.2.2.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน

ปริมาณของโอ-ไดอะนิซิดีนจะมีผลต่อความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากโอ-ไดอะนิซิดีนเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 mM จากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีนเพิ่มขึ้น เพราะสารตั้งต้นมีความเข้มข้นสูงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้มาก ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้น 0.5 mM ดังรูปที่ 4.15 และเมื่อความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีนมากกว่า 0.5 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง เพราะปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นมีจำนวนจำกัด ทำให้โอ-ไดอะนิซิดีนที่เหลือไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีนคือ 0.5 mM



รูปที่ 4.15 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน

ตารางที่ 4.9 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

การทดลอง	สภาวะที่เหมาะสม
1. ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม	540 nm
2. เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	5 นาที
3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	0.002 mg/ml
4. พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	7.00
5. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน	0.5 mM

4.2.3 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ เป็นการตรวจสอบและการยืนยันการใช้ได้ของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ดังนั้นจึงทำการหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ เป็นดังนี้

4.2.3.1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

1) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 10 ppm ทำการทดลองซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 1 ดังตารางที่ 4.10 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เพราะเกณฑ์การยอมรับได้ของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ในช่วงความเข้มข้นระดับ ppm (mg/l) ต้องมีค่าไม่เกิน 11 [40] แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 4.10 แสดงผลของการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
1	0.451
2	0.463
3	0.461
4	0.467
5	0.461
ค่าเฉลี่ย	0.461
SD	0.006
% RSD	1

2) การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

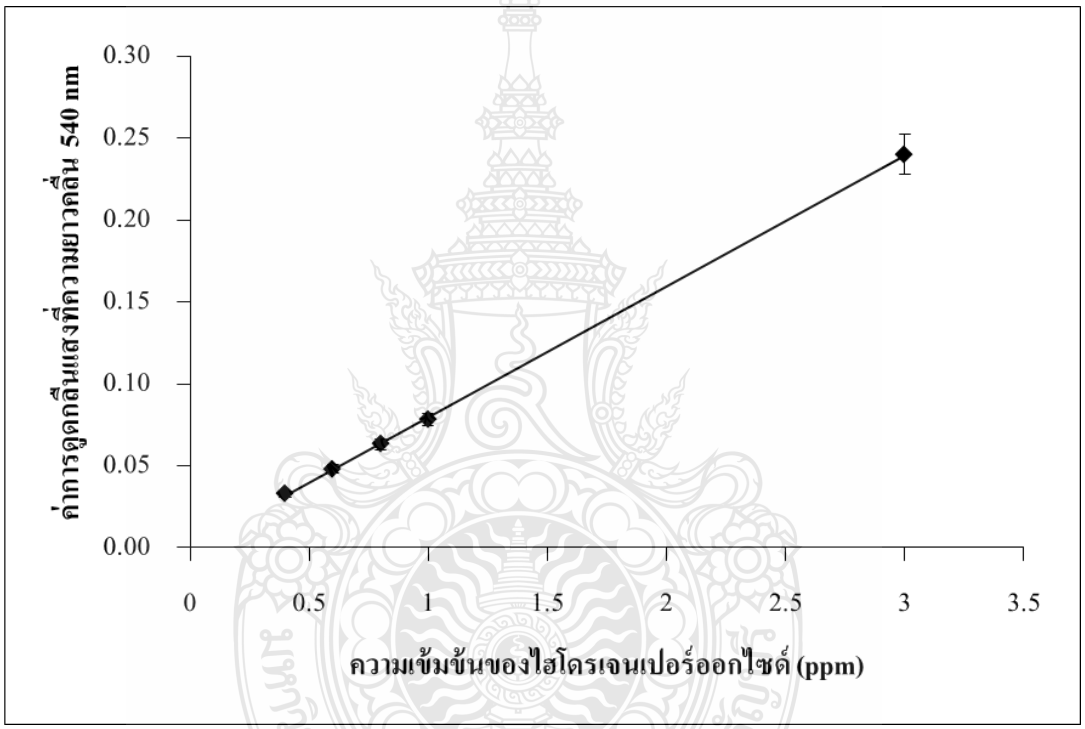
ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายโดยใช้สารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 10 ppm ทำการทดลองซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 2 ดังตารางที่ 4.11 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เกณฑ์การยอมรับได้ของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วงความเข้มข้นระดับ ppm (mg/l) ต้องมีค่าไม่เกิน 11 [40] จากผลที่ได้จะเห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์มีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 4.11 แสดงผลของการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
1	0.435
2	0.452
3	0.453
4	0.444
5	0.428
ค่าเฉลี่ย	0.442
SD	0.0097
% RSD	2

4.2.3.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (รูปที่ 4.16) จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 91-108 % ดังตารางที่ 4.12 ถือว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ซึ่งเกณฑ์การยอมรับได้ของเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ระดับความเข้มข้น ppm มีค่าอยู่ในช่วง 80-110 % [40] แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีนี้ความถูกต้องสูง



รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ppm)			เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
1	0.00	0.50	0.54	108
2	0.00	0.60	0.59	98
3	0.00	1.00	0.91	91
4	0.00	3.00	2.98	99

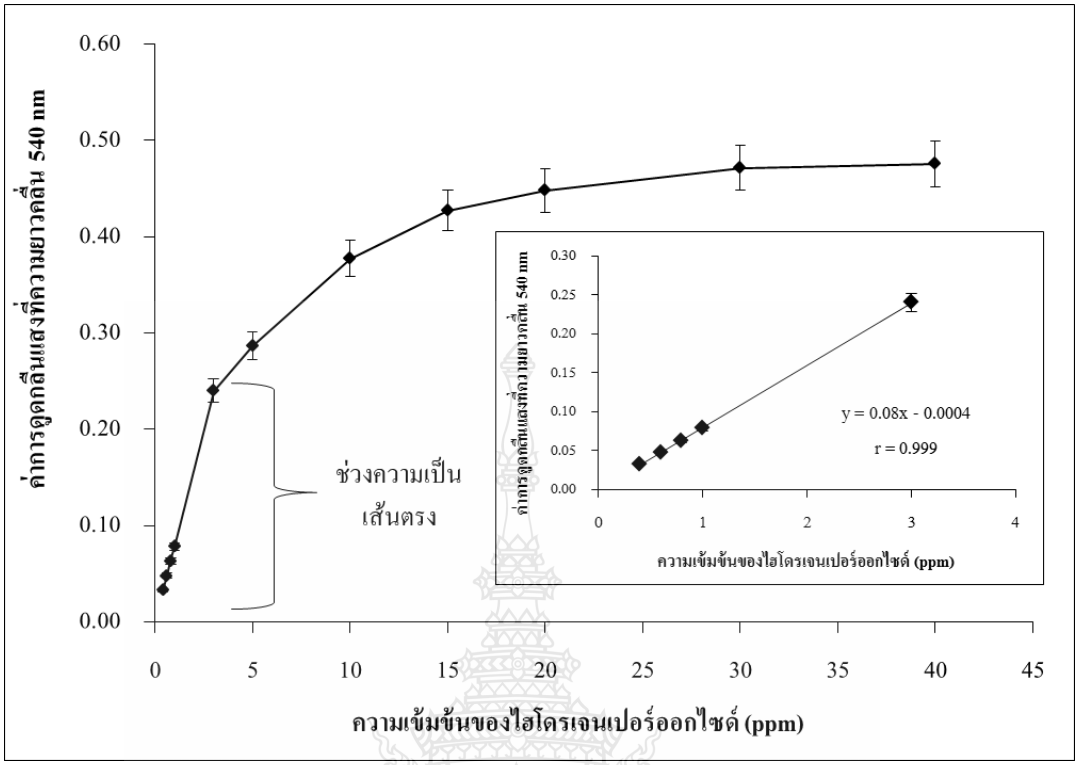
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

4.2.3.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 3.0 5.0 10.0 15.0 20.0 30.0 และ 40.0 ppm แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm ผลการทดลองที่ได้เป็นดังตารางที่ 4.13 เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเพิ่มขึ้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 4.17 วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.4-3.0 ppm และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm				ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.1	0.050	0.053	0.050	0.051	0.002
0.2	0.058	0.054	0.057	0.056	0.002
0.4	0.032	0.033	0.033	0.033	0.001
0.6	0.049	0.047	0.048	0.048	0.001
0.8	0.063	0.063	0.063	0.063	0.000
1.0	0.078	0.078	0.079	0.078	0.001
3.0	0.238	0.242	0.240	0.240	0.002
5.0	0.285	0.285	0.289	0.286	0.002
10.0	0.380	0.373	0.379	0.3787	0.004
15.0	0.428	0.421	0.433	0.427	0.006
20.0	0.450	0.444	0.450	0.448	0.003
30.0	0.476	0.471	0.468	0.472	0.004
40.0	0.476	0.477	0.474	0.476	0.002



รูปที่ 4.17 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

4.2.3.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ

ขีดจำกัดในการตรวจพบ คำนวณได้จาก 3.3×(SD)/S โดยที่ SD = 0.0042 และ S = 0.08 ผลการทดลองพบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 0.2 ppm

$$LOD = \frac{3.3\times(SD)}{S}$$

$$= \frac{3.3\times(0.0042)}{0.08}$$

$$= 0.2 \text{ ppm}$$

4.2.3.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพคำนวณได้จาก 10×(SD)/S ผลการทดลองพบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ เท่ากับ 0.5 ppm และนำความเข้มข้นนี้มาหาความถูกต้องพบว่าให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเท่ากับเท่ากับ 108 % และหาความเที่ยงพบว่าให้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 2

$$LOQ = \frac{10\times(SD)}{S}$$

$$= \frac{10\times(0.0042)}{0.08}$$

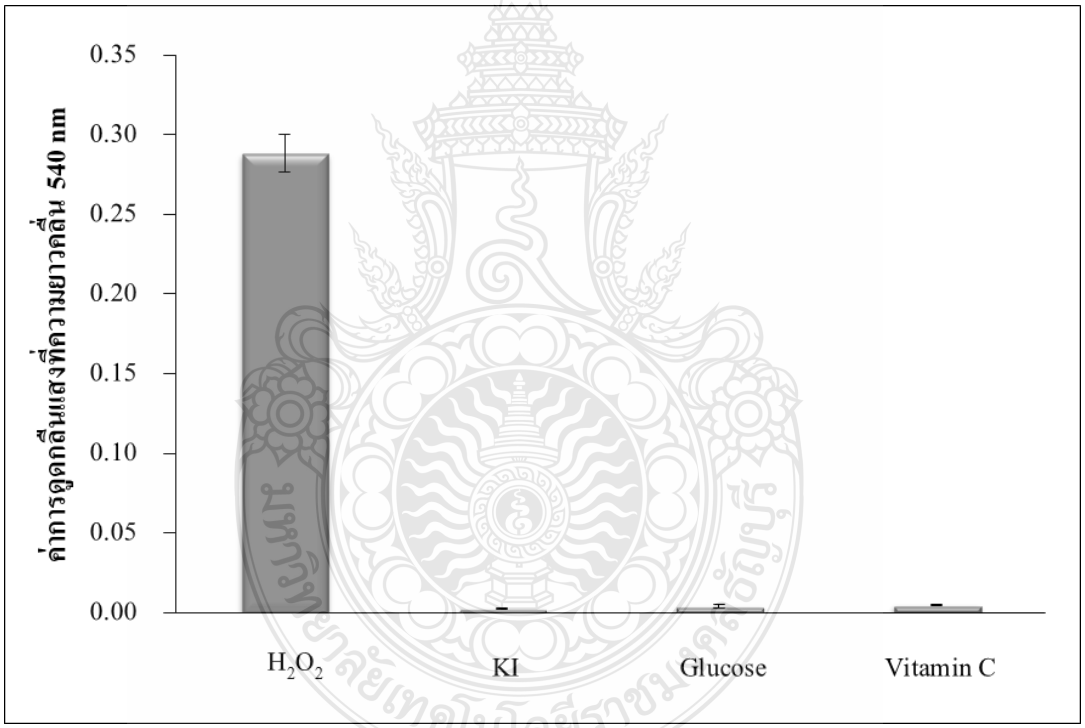
$$= 0.5 \text{ ppm}$$

4.2.3.6 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์โดยศึกษาจากผลของตัวรบกวนที่คาดว่าจะมีผลต่อการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [41] ได้แก่ โพแทสเซียมไอโอไดด์ กลูโคส และวิตามินซี เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 10 ppm ผลการทดลองดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.18 พบว่าโพแทสเซียมไอโอไดด์ กลูโคส และวิตามินซีไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เกิดปฏิกิริยาเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูง

ตารางที่ 4.14 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	10	0.288
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	10	0.002
กลูโคส (Glucose)	10	0.004
วิตามินซี (Vitamin C)	10	0.005



รูปที่ 4.18 แสดงผลของความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

4.2.3 การวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง

เมื่อได้วิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมและพบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพ จึงใช้วิธีนี้เพื่อวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง โดยใช้ตัวอย่างนมจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ คือ ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ A และ B ตัวอย่างนมผง A และ B และตัวอย่างน้ำนมดิบ ผลการทดลองที่ได้พบว่าในตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่างไม่พบการปนเปื้อนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ดังตารางที่ 4.15) และนำตัวอย่างจริงไปวิเคราะห์ด้วยวิธีไทเทรต จะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกันคือ ไม่พบการปนเปื้อนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนมทั้ง 5 ตัวอย่าง แสดงว่าตัวอย่างนมที่นำมาวิเคราะห์มีคุณภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ตารางที่ 4.15 ผลของการตรวจหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงโดยใช้วิธีคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm				ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
นมพาสเจอร์ไรซ์ A	0.019	0.019	0.019	0.019	ไม่พบ
นมพาสเจอร์ไรซ์ B	0.004	0.005	0.004	0.004	ไม่พบ
นมผง A	0.008	0.009	0.009	0.009	ไม่พบ
นมผง B	0.005	0.006	0.006	0.006	ไม่พบ
น้ำนมดิบ	0.009	0.008	0.009	0.009	ไม่พบ
แบลงค์	0.006	0.007	0.005	0.006	ไม่พบ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนม โดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ การวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีจะอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน ซึ่งเป็นการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจน (เพนนิซิลินจี) กับแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน โดยจะตรึงเพนนิซิลินจีที่ติกฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลท แล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินลงไป เพนนิซิลินจีที่ตรึงอยู่บนไมโครเพลทกับเพนนิซิลินจีที่อยู่ในตัวอย่างจะแข่งขันกันจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ตรวจวัดหาปริมาณเพนนิซิลินจี ได้จากการติดตามการเกิดปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสที่ติดอยู่กับแอนติบอดี โดยมี 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรท เกิดเป็นสารละลายสีฟ้า เมื่อเติมกรดซัลฟิวริกจะได้สารละลายสีเหลือง ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเพนนิซิลินจี

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจี พบว่า ใช้เวลาในการตรึงเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยโบวีนซีรั่มอัลบูมินลงในไมโครเพลทคือ 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นของแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน 0.006 μg/μl เวลาในการจับกันระหว่างเพนนิซิลินจีกับแอนติบอดีของเพนนิซิลินจีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินคือ 60 นาที ความเข้มข้นของสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสและพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.004 mg/ml และ 7.00 ตามลำดับ

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ พบว่า การวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีโดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันมีความเที่ยงสูง (% RSD น้อยกว่า 30) และมีความถูกต้องสูง (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 116-118 %) มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0.0005-0.05 ppb มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.995 มีขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 0.008 และ 0.025 ppb ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเพนนิซิลินจีสูง จากนั้นนำวิธีที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีในตัวอย่างจริงทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรซ์ A และ B นมผง A และ B และตัวอย่าง

น้ำนมดิบ ผลการทดลองที่ได้พบว่าไม่มีการตกค้างของเพนนิซิลินจีในตัวอย่างจริงซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับชุดทดสอบ

สำหรับการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนมจะอาศัยหลักการของเทคนิคคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพ ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีชมพู ภายใต้สภาวะกรดสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จากผลการทดลองพบว่าที่ความยาวคลื่น 540 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้พบว่าแปรผันตรงตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที ความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0.002 mg/ml พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์คือ 7.00 และความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีนที่เหมาะสมคือ 0.5 mM จากนั้นหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์พบว่าวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยวิธีคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ ให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 91-108 % มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.4-3.0 ppm มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999 ให้ขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 0.2 ppm และขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 0.5 ppm นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำวิธีที่ได้ไปวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรซ์ A และ B นมผง A และ B และตัวอย่างน้ำนมดิบ และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับวิธีการไทเทรต พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันคือไม่มีการตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริง

จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนมโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำไปวิเคราะห์หาเพนนิซิลินจีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนมได้ โดยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีคือ ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์และให้ขีดจำกัดการตรวจพบที่ความเข้มข้นต่ำ

5.2 ข้อเสนอแนะ

วิธีการตรวจหาเพนนิซิลินจีโดยใช้หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำอื่นๆ ได้ โดยเปลี่ยนคู่แอนติเจนและแอนติบอดี

บรรณานุกรม

[1] วิโรจน์ ภัทรจินดา. (2554). ทิศทางโคนมไทยมาไกลเกินฝัน. แก่นเกษตร, 39. 99-104.

[2] H. A. Martins-Junior, T. A. Kussumi, A. Y. Wang, and D. T. Lebre, "A Rapid Method to Determine AntibioticResidues in Milk using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 18, pp. 397-405, Apr 2007.

[3] ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง, ศรีสมัย วิริยารัมภะ, สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ และ ประกรณ์ จาละ. ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมรูปแบบใหม่. ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์และการบริการวินิจฉัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[4] L. Chuangji, W. Hai, J. Yanbin, and D. Zhenxia, "Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 879, pp. 533-540, Jan 2011.

[5] P. Thavarngkul, S. Dawan, P. Kanatharana, and P. Asawatreratanakul, "Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 688-694, Aug 2000.

[6] L. Janine, and P. Michael, "Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 586, pp. 296-303, Sep 2007.

[7] C. Kukusamude, R. Burakham, O. Chailapakul, and S. Srijaranai, "High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water–acetonitrile mixture," *Talanta*, vol. 92, pp. 38-44, Jan 2012.

[8] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2548). มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง น้ำนมดิบ. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 122.

[9] R. B. D. Brito, and R. G. Junqueira, "Determination of Beta-Lactam Residues in Milk by High Performance Liquid Chromatography," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 49, pp. 41-46, Jan 2006.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[10] Y. Luo, B. McNamara, M.A. Fennell, D.C. Teleis, L. May, J. Rudy, A.O. Watson, C.E. Uboh, and L.R. Soma. "Quantification of penicillin-G and procaine in equine urine and plasma using high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography B*, vol. 714, pp. 269-276, Apr 1998.

[11] N.E. Evaggelia, and F.S. Victoria, "Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (Sparus Aurata) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC*," Food Chemistry*, vol. 136, pp. 1322–1329, Sep 2013.

[12] C.A. Macarov, L. Tong, M. Martnez-Hulamo, M.P. Hermo, E. Chirila, Y.X. Wang, D. Barron, and J. Barbosa, "Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC–MS/MS," *Food Chemistry*, vol. 135, pp. 2612–2621, Jul 2012.

[13] W.M. Hassen, A. Abdelghani, L. Vonna, K. Cherif, M. Boussaid, and M.A. Maaref "Electrochemical properties and topology of gold electrodes with adsorbed penicillin G for biosensor applications," *Sensors and Actuators B*, vol. 120, pp. 621-627, May 2007.

[14] M.G. Luís, F.A. C. Welder, D.P.T. S. Maria, and R. B. Paulo, "Penicillinase-based amperometric biosensor for penicillin G," *Electrochemistry Communications*, vol. 38, pp. 131-133, Dec 2014.

[15] O.G. Nagel, M.C. Beltran, M.P. Molina, and R.L. Althaus, "Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk," *Small Ruminant Research*, vol. 102, pp. 26-31, Dec 2012.

[16] E. N. Escobar, "Use of Antibiotic Residue Test Kits for Goat Milk," *Proc.*, pp. 115-118, 1999.

[17] Y. Li, "Biological Properties of Peroxide-containing Tooth Whiteners," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 34, pp. 887-904, May 1996.

[18] V. Katarina, "Review of the genotoxicity of ozone," *Mutation Research*, vol. 277, pp. 221-238, Sep 1992.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[19] C. Klomsiri, C. R. LeAnn, S. Laura, K. M. Anita, K. S. Bruce, J. N. Kimberly, B. P. Leslie, and W. D. Larry, "Endosomal H_2O_2 production leads to localized cysteine sulfenic acid formation on proteins during lysophosphatidic acid-mediated cell signaling," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 71, pp. 49-60, Mar 2014.

[20] H. Patel, J. Chen, and M. Kavdia, "Induced peroxidase and cytoprotective enzyme expressions support adaptation of HUVECs to sustain subsequent H_2O_2 exposure," *Microvascular Research*, vol. 103, pp. 1-10, Sep 2016.

[21] H. Luck, "The use of hydrogen peroxide in milk and dairy products," *World Health Organization*, vol. 48, pp. 423-447, 1962.

[22] B. K. Saha, M. Y. Ali, M. Chakraborty, Z. Islam, and A. K. Hira, "Study on the Preservation of Raw Milk with Hydrogen Peroxide for Rural Dairy Farmers," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 2, pp. 36-42, 2003.

[23] MD. I. A. Ansari, and A. K. Datta, "An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems," *Trans IChemE Journal*, vol. 81, pp. 57-65, Mar 2003.

[24] W. H. Hanway, A. P. Hansen, K. L. Anderson, R. L. Lyman, and J. E. Rushing, "Inactivation of penicillin G in milk using hydrogen peroxide," *Journal of Dairy Science*, vol. 88, pp. 466-469, Feb 2005.

[25] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2553). มาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง น้ำนมดิบ. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 127.

[26] Y. Hongfei, B. Xin, H. Ming-Hsing, Y. Joel, and R. Thomas, "Quantitative determination of trace levels of hydrogen peroxide in crospovidone and a pharmaceutical product using high performance liquid chromatography with coulometric detection," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 375, pp. 33-40, Apr 2009.

[27] C. Hongqi, Y. Hupeng, Z. Yunyou , and W. Lun, "Fluorescent quenching method for determination of trace hydrogen peroxide in rain water," *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 67, pp. 683–686, Jul 2007.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[28] H. Yufei, Z. Zhujun, and Y. Chunyan, "The determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selective chemiluminescence method," *Analitica Chimica Acta*, vol. 601, pp. 95-100, Aug 2007.

[29] S. Teepoo, "Nanotechnology and Biosensor," *KKU Science Journal*, vol. 39, pp. 575-586, 2011.

[30] J. K. Anthony, D. Brian Deasy, K. Richard O, and R. S. Malcolm, "Antibodies: production, functions and applications in biosensors," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 14, pp. 257-266, Jun 1995.

[31] ศิริวรรณ ตี้ภู่. (2555). การประยุกต์ใช้อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับการวิเคราะห์ทางอาหาร. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 17. 197-204.

[32] M.P. Byfield, and R.A. Abuknesha, "Biochemical aspects of biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 9, pp. 373-399, 1994.

[33] G. Merola, E. Martini, M. Tomassetti, and L. Campanella, "New immunosensor for beta-lactam antibiotics determination in river waste waters," *Sensors and Actuators B*, vol. 199, pp. 301-313, Apr 2014.

[34] B. R. Eggins, "*Biosensor: an Introduction*," Teubner Publishers, 1996.

[35] X. Xiaoxing, L. Songqin, and J. Huangxian, "A Novel Hydrogen Peroxide Sensor via the Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on Colloidal Gold Modified Screen-printed Electrode," *Sensors*, vol. 3, pp. 350-360, Sep 2003.

[36] W. Sun, H. Jiang, and K. Jiao, "Electrochemical determination of hydrogen peroxide using *o*-dianisidine as substrate and hemoglobin as catalyst," *Journal of Chemical Sciences*, vol. 117, pp. 317-322, Mar 2005.

[37] F. F. Ka´tia, S. L. Claudinei, F. M. Lopes, and H. C. Carol, "Hydrogen peroxide detection system consisting of chemically immobilised peroxidase and spectrometer," *Process Biochemistry*, vol. 40, pp. 3441-3445, Aug 2005.

[38] M.A. Eid, N.A. Yusof, M. Faruq, A. Jaafar, and S. Yusran, "Quantitative measurement of amoxicillin in Ibuprofen tablets using UPLC," *Measurement*, vol. 93, pp. 465-472, Jul 2016.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[39] D. Schomburg, M. Salzmann, and D. Stephan, "Enzyme Handbook 7," *EC 1.11.1.7*, pp. 1-6, 1993.

[40] I. Taverniers, M. D. Loose, and E. V. Bockstaele, "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 535-552, Sep 2004.

[41] Z. Jing, Y. Yalin, Z. Li, L. Xiaoxi, and L. Genxi, "An amperometric biosensor for the detection of hydrogen peroxide released from human breast cancer cells," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 41, pp. 815- 819, Oct 2013.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

SCIENCE
RESEARCH
CONFERENCE
7th
การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 7
The 7th National Science Research Conference
30-31 March 2015 Faculty of Science, Naresuan University.
Science and Technology to Innovation
ม.นเรศวร
ม.พะเยา
ม.บูรพา

การพัฒนาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Development of hydrogen peroxide biosensor for detection of hydrogen peroxide concentration

กิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก, เจ๊ะฮาซัน เจ๊ะอุบง, และ ศิริวรรณ ตี้ภู่*

Kittiyaphon Junlamatdilok[1], Chehasan Cheubong and Siriwan Teepoo*

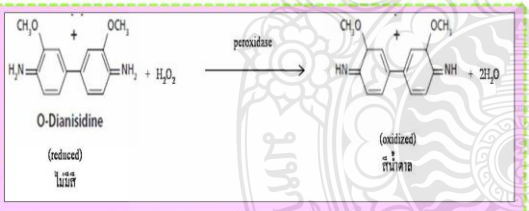
[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นวัสดุชีวภาพ และใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด หลักการของวิธีนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอไดอะนิซิดีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีน้ำตาล และเมื่ออยู่ในสภาวะกรดสารละลายสีน้ำตาลจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีชมพู ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ พบว่าให้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.4-3.0 พีพีเอ็ม ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 5 นาที วิธีไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดีคือเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย มีความจำเพาะเจาะจงและความถูกต้องสูง

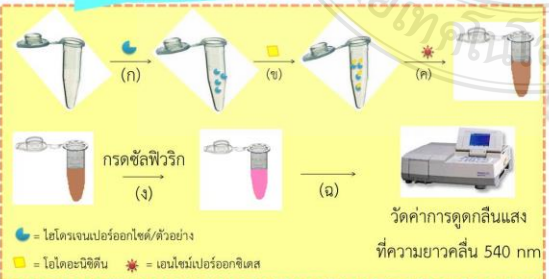
หลักการและเหตุผล

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) มีสูตรทางเคมีคือ H_2O_2 มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง สามารถนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรคหรือสารฟอกสีได้ มีการนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง ถ้าหากร่างกายได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดการแพ้หรือการระคายเคืองได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้มี วัตถุประสงค์คือ เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร_ออกไซด์โดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาของโอไดอะนิซิดีนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

วิธีวิจัย



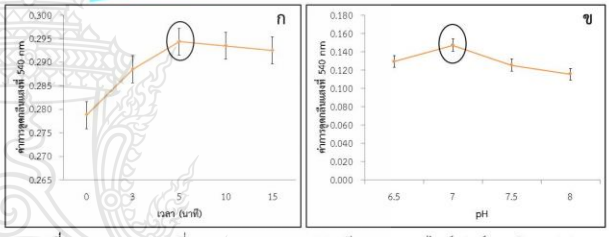
รูปที่ 1 หลักการวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์

กิตติกรรมประกาศ

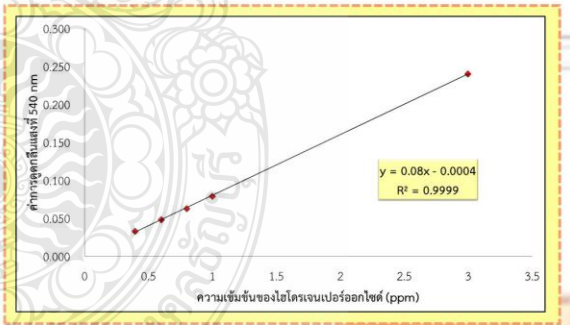
1.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

2.สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล



รูปที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเวลา (ก), พีเอชของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ข)



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นวัสดุชีวภาพ สัญญาณที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากผลการทดลองพบว่าวิธีไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.4 – 3.0 พีพีเอ็ม และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 5 นาที

เอกสารอ้างอิง

1.Hu H.C., Jin H.J. & Chai X.S. (2012). Rapid determination of hydrogen peroxide in pulp bleaching effluents by headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography A, 1235* 182– 184.

2. Ghaderi, S. &Mehrgardi, M.A. (2014). Prussian blue-modified nanoporous gold film electrode foramperometric determination of hydrogen peroxide. *Bioelectrochemistry, 98*, 64–69.

PTTEP

ขอมอบรางวัลนี้ไว้เพื่อแสดงว่า

ได้นำเสนอผลงาน ประเภท Poster Presentation

ได้รับรางวัลชมเชย ในการประชุมวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 7 "ทรัพยากรน้ำ ความมั่นคงของมนุษย์" ในหัวข้อเรื่อง

"การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อการเกิดน้ำท่วมฉับพลันในพื้นที่ลุ่มน้ำย่อยคลองหลวง จังหวัดสงขลา"

ระหว่างวันที่ 30 – 31 มีนาคม 2558

ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

(ศาสตราจารย์ ดร.อุทัย ตันตระกูล)
อธิการบดีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุดสงวน สงวนวงศ์วาน)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุดสงวน สงวนวงศ์วาน)
ประธานจัดการประชุมวิชาการ

Science and Technology
RMUTT Journal
Vol.5 No.1 (2015) : 22–31
www.sci.rmutt.ac.th/stj
Online ISSN 2229-1547

การพัฒนาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม

Development of hydrogen peroxide biosensor for detection of hydrogen peroxide concentration in milk

กิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก[1], สมพร มูลมั่งมี[2], เนตรนภิส แก้วช่วย[1] และ ศิริวรรณ ตี้ภู่[1,*]

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
[2]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเทคโนธานี
อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12110
*E-mail: siriwan@mail.rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เป็นวัสดุชีวภาพและตัวตรวจวัดตามลำดับ หลักการของวิธีนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีน้ำตาล และเมื่ออยู่ในสภาวะกรดสารละลายสีน้ำตาลจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีชมพู ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์พบว่าให้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.4-3.0 ppm และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 5 นาที วิธีไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย มีความจำเพาะเจาะจงและความถูกต้องสูง

คำสำคัญ: ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, ไบโอเซนเซอร์, เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

Received: Jun 03, 2015
Revised: Jun 21, 2015
Accepted: Jun 21, 2015

Abstract

An analytical method was developed for detection of hydrogen peroxide concentration in milk using biosensor technique. Peroxidase enzyme and a spectrophotometer were used as biological sensing element and detector, respectively. The principle of this method is based on the oxidation reaction of hydrogen peroxide by peroxidase enzyme. The oxidation reaction of hydrogen peroxide and *o*-dianisidine were catalyzed by peroxidase enzyme, which results in brown solution. Under acidic condition, the color of solution turns from brown to pink. The absorptions were detected with spectrophotometer at the wavelength of 540 nm. The results were found that the absorbance were proportional to the concentrations of hydrogen peroxide. Under optimum conditions, the calibration curves were linear in the range of concentrations 0.4-3.0 ppm with the analysis time of 5 min. The advantages of a developed biosensor were simple, short analysis time, high sensitivity and accuracy method.

Keywords: Hydrogen peroxide, Peroxidase enzyme, Biosensor

1. บทนำ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) มีสูตรทางเคมีคือ H_2O_2 เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีรสขม เป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย [1-2] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไปทำให้เกิดปฏิกิริยา Peroxidation ของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ เสียไปทำให้แบคทีเรียตายลงในที่สุด เนื่องจากในประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น มีอุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เกษตรกรจึงมีการลักลอบเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในน้ำนมดิบเพื่อป้องกันเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ช่วยในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ นอกจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีโอกาสตกค้างในน้ำนมดิบแล้วยังสามารถเกิดการปนเปื้อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระหว่างกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์นมอีกด้วย เช่น ในกระบวนการผลิตนมยูเอชที มีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 35% เพื่อฆ่าเชื้อโรคภาชนะที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์นม เช่น กล่องกระดาษและขวดพลาสติกชนิด PE หรือ PP เป็นต้น [3-4] จึงทำให้ผลิตภัณฑ์นมที่ได้มีโอกาสเกิดการตกค้างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 1 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 สารออกซิไดซ์ชนิดรุนแรงเป็นอันตราย เมื่อกลืนกิน สัมผัสผิวหนัง และเป็นพิษเมื่อหายใจเข้าไปโดยมีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังไหม้อย่างรุนแรงทำลายดวงตา เกิดอันตรายต่อการเจริญพันธุ์หรือทารกในครรภ์ ทำอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาทส่วนกลางปอด และระบบเลือดเป็นต้น [5] เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 ในประเทศจีน ได้มีรายงานข่าวว่ามีเกษตรกรลักลอบเติมสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อฟอกสีและฆ่าเชื้อโรคลงในน้ำนมดิบ [6] ทำให้องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา เตือนผู้บริโภคไม่ให้ซื้อผลิตภัณฑ์นมจากประเทศจีน ส่งผลเสียหายครั้งยิ่งใหญ่ต่ออุตสาหกรรมผลิตนมใน

ประเทศ นอกจากนี้ยังตรวจพบการปนเปื้อนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในผลิตภัณฑ์นม ในประเทศบราซิล ในเดือนกันยายน คศ. 2007 เกษตรกรได้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในน้ำนมดิบก่อนส่งขายให้กับโรงงานผลิตนม เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีราคาถูก เติมลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย ช่วยในการรักษาอายุของน้ำนมดิบ และช่วยเพิ่มปริมาณน้ำนมดิบได้อีกด้วย [7] ทำให้บริษัทผู้ผลิต เรียกคืนผลิตภัณฑ์จากนมจำนวนมากจากหลายประเทศคู่ค้า ส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายแก่บริษัทผู้ผลิต รวมถึงความน่าเชื่อถือของผลิตภัณฑ์นมของประเทศด้วย

จึงทำให้องค์กรต่างๆที่เกี่ยวข้องได้กำหนดมาตรฐานค่าสูงสุดที่ยอมให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีได้ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์จากนม ในประเทศไทยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ได้กำหนดมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ ห้ามมีการปนเปื้อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนมดิบ ในส่วนการกำหนดมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์นม องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาได้กำหนดให้มีไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ตกค้างในผลิตภัณฑ์นมได้ไม่เกิน 0.5 ppm [8] ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบปริมาณไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ที่ตกค้างในทั้งน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม เพื่อควบคุมคุณภาพให้ผ่านเกณฑ์กำหนดได้ สามารถผลิตเพื่อการส่งออกขายไปยังประเทศต่างๆได้

วิธีตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์โดยทั่วไป ได้แก่ ฟลูออโรเมตรี (Fluorometry) [9] เคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) [10] และเคมิลูมิเนสเซนต์ (Chemiluminescence) [11] แต่พบว่าเทคนิคเหล่านี้มีข้อจำกัดคือ ใช้เครื่องมือขั้นสูง มีราคาแพง ผู้วิเคราะห์ต้องมีความเชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือ และต้องส่งตัวอย่างน้ำนมไปวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจหาปริมาณของของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม จากข้อจำกัดต่างๆของวิธีข้างต้น จึงทำให้ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นมโดยอาศัยหลักการของไบโอเซนเซอร์ และตรวจวัดสีที่เกิดขึ้น ที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยในการหาตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูโคส โดยจะใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีซับสเตรทเป็น 3,3,5,5-เตตระเมทิล-เบนซิดีน (3, 3, 5, 5-tetramethylbenzidine; TMB) เมื่อเกิดปฏิกิริยาขึ้นจะได้สารละลายสีฟ้า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 655 nm พบว่าวิธีนี้มีข้อดีคือมีความจำเพาะเจาะจงสูง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แปรผันตรงกับปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ [12] การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์โดยทั่วไปจะใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นวัสดุชีวภาพ เป็นการอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ถ้าในตัวอย่างนมมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน(O-dianisidine) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารโอ-ไดอะนิซิดีนที่อยู่ในรูปออกซิไดส์จะได้สารละลายสีน้ำตาล เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะได้สารละลายเป็นสีชมพู [13] ความเข้มของสารละลายสีชมพูที่เกิดขึ้น แปรผันตรงตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยจะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีได้แก่ เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน สุดท้ายนำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างนม

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; Sigma-Aldrich) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase; Sigma-Aldrich) โอ-ไดอะนิซิดีน (o-Dianisidine; Sigma-Aldrich) โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphase; AjexFinechem) ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphase; AjexFinechem) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; J.T.Baker) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-1601 จากบริษัท SHIMADZU ใช้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์

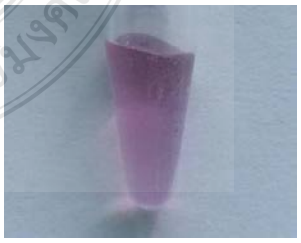
ขั้นแรกเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 30 µl ลงในไมโครเซนติฟิวจ์ทิวบ์ ต่อมาเติมเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml ปริมาตร 30 µl และโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 30 µl ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายสีน้ำตาล จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ได้สารละลายสีชมพู แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm [14]

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและความเข้มข้นที่เหมาะสมของโอไดอะนิซิดีน สรุปสภาวะที่จะศึกษาได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่ศึกษาในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สภาวะที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา
1. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	0 3 5 10 และ 15 นาที
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	0.001 0.002 0.004 0.006 และ 0.008 mg/ml
3. พีเอชของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	6.50 7.00 7.50 และ 8.00
4. ความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีน	0.1 0.3 0.5 และ 0.7 mM



รูปที่ 1 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออก-ซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน ทำให้โอ-ไดอะนิซิดีนเปลี่ยนไปอยู่ในรูปออกซิไดส์ ดังสมการที่ 1 ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเมื่ออยู่ในสภาวะกรดสารละลายสีน้ำตาลจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีชมพู (รูปที่ 1) และเมื่อนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 nm ดังรูปที่ 2 ดังนั้นในการตรวจวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงเลือกตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

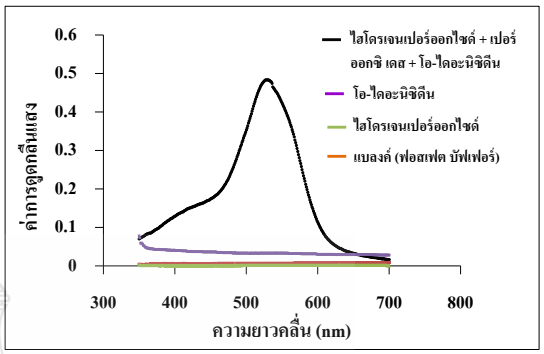
$$\text{o-Dianisidine}_{red} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{o-Dianisidine}_{oxi} + 2H_2O \quad ..(1)$$

(ไม่มีสี) (สีน้ำตาล)

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

3.2.1 เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

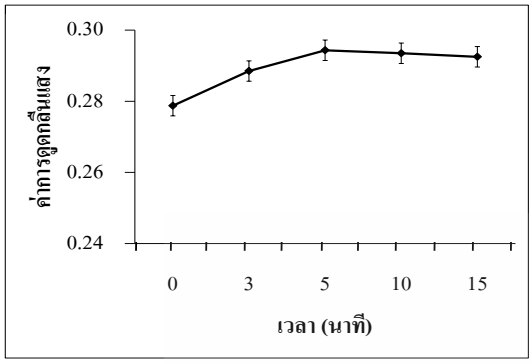
การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะต้องอาศัยเวลาในการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ จึงได้ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ทำการศึกษาที่เวลา 0 3 5 10 และ 15 นาที โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm โอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3) จนถึงเวลาที่ 5 นาทีเป็นต้นไปค่าการดูดกลืนแสงเริ่มคงที่ แสดงว่าปฏิกิริยาได้เกิดขึ้นสมบูรณ์แล้วที่เวลา 5 นาที ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาคือ 5 นาที



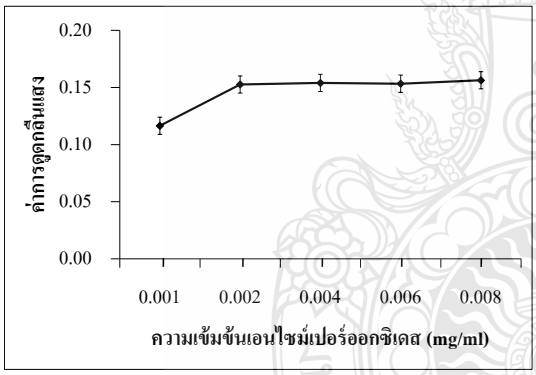
รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายต่างๆในปฏิกิริยา โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 ppm ผสมกับโอ-ไดอะนิซิดีน 0.5 mM และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 0.002 mg/ml ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00 และเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 5 นาที

3.2.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับสารละลาย โอ-ไดอะนิซิดีน ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ 0.001 0.002 0.004 0.006 และ 0.008 mg/ml โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ ความเข้มข้น 10 ppm โอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM จากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จนถึงความเข้มข้น 0.002 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มคงที่ เนื่องจากปริมาณของสารตั้งต้น (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน) ถูกใช้ไปในการเกิดปฏิกิริยาหมด ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบรูณ์ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากขึ้น ก็ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อีกแล้ว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ เปอร์ออกซิเดสคือ 0.002 mg/ml (รูปที่ 4)



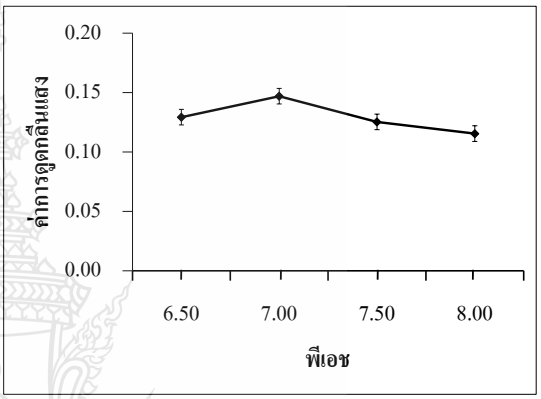
รูปที่ 3 ผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 10 ppm ผสมกับโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00



รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 ppm ผสมกับโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM และเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 5 นาที

3.2.3 พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ดังนั้นจึงทำการศึกษาพีเอช โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M ที่พีเอชต่างๆ คือ 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกซด์ ความเข้มข้น 10 ppm โอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที จากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่พีเอช 7.00 (รูปที่ 5)เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงพีเอช 6.0-8.0 [15]

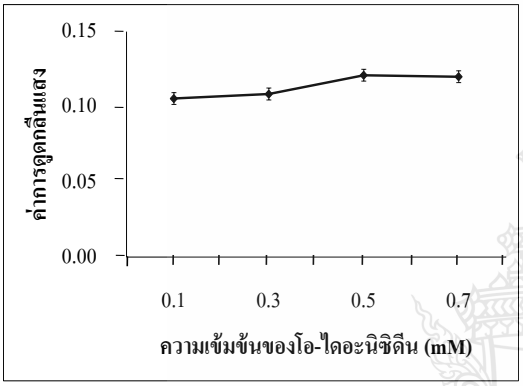


รูปที่ 5 ผลของพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ ความเข้มข้น 10 ppm ผสมกับโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml และเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 5 นาที

3.2.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโอ-ไดอะนิซิดีน

ความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีนมีผลต่อการตรวจวัดหาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีนตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 mM โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 ppm เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที จากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีนจนถึงที่

ความเข้มข้น 0.5 mM พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คงที่ เพราะปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีปริมาณจำกัด ทำให้โอ-ไดอะนิซิดีนที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.5 mM เหลือไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโอ-ไดอะนิซิดีน คือ 0.5 mM (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีนโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ ความเข้มข้น 10 ppm ผสมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml และเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 5 นาที

สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
1. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	5 นาที
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	0.002 mg/ml
3. พีเอชของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	7.00
4. ความเข้มข้นของโอ-ไดอะนิซิดีน	0.5 mM

3.3 การทวนสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

3.3.1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สามารถหาได้จากการทำซ้ำของวิธี (Repeatability) และการทวนซ้ำของวิธี (Reproducibility) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์จะทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 ppm จำนวน 5 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละครั้งและนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation ; RSD) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1 และสำหรับการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ ทำการทดลองภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม จำนวน 5 ซ้ำ พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 2 จากผลการทดลองสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงสูง [16]

ตารางที่ 3 แสดงผลเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ppm)			การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	(%)
1	0.00	0.50	0.54	108
2	0.00	0.60	0.59	98
3	0.00	1.00	0.91	91
4	0.00	3.00	2.98	99

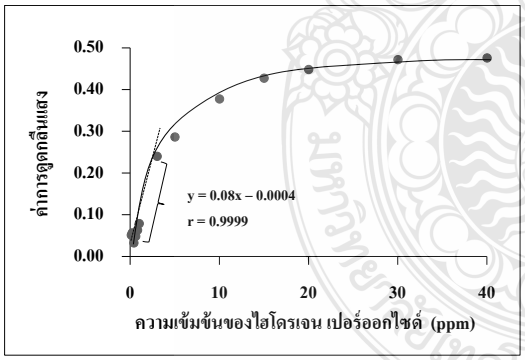
3.3.2 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จะศึกษาโดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ทดลองโดยการเติมสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ลงในตัวอย่างจริง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น540 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 91-108 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีนี้มีความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สูง [15] สามารถนำไปตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงได้

3.3.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง

วิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยอาศัยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1-40.0 ppm (รูปที่ 7) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากผลการทดลองพบว่า ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ช่วงความเข้มข้น 0.4-3.0 ppm ให้ค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999



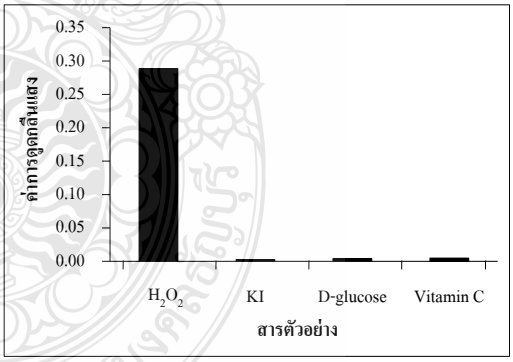
รูปที่ 7 ช่วงความเป็นเส้นตรงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.3.4 ขีดจำกัดในการตรวจวัด

การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดของวิธี จะทำการทดลองโดยการตรวจวัดสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของช่วงความเป็นเส้นตรง ทำการวัดซ้ำจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัดโดยใช้ทฤษฎีสามเท่าของสัญญาณรบกวน [16] ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.06 ppm

3.3.5 ความจำเพาะเจาะจงของวิธี

ศึกษาผลของตัวรบกวนที่คาดว่าจะมีผลรบกวนต่อการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ได้แก่ โพแทสเซียมไอโอไดด์ กลูโคส และวิตามินซี [17] เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำการทดลองโดยใช้ตัวรบกวนแทนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 ppm ผลของตัวรบกวนเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าโพแทสเซียมไอโอไดด์ กลูโคส และวิตามินซี ไม่มีผลต่อการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลการศึกษาผลของตัวรบกวน โพแทสเซียมไอโอไดด์ กลูโคส และวิตามินซี เปรียบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 10 ppm

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนม

ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง นม ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง

ได้แก่ น้ำนมดิบ 1 ตัวอย่าง นมยูเอชที 2 ตัวอย่าง และนมผง 2 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 30 µl ผสมกับสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน ความเข้มข้น 0.5 mM และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.002 mg/ml จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จากผลการทดลองจะพบว่า ในตัวอย่างนมทั้ง 5 ตัวอย่างนั้นไม่พบการปนเปื้อนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างนมที่นำมาวิเคราะห์มีคุณภาพและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

4. สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอ-ไดอะนิซิดีน โดยมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง แม่นยำสูง ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและสามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างจริงได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และโครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] M. Toyoda, Y. Ito, M. Iwaida, M. Fujii. Rapid procedure for the determination of minute quantities of residual hydrogen peroxide in food by using a sensitive oxygen electrode. *J. Agric. Food Chem.* **30** (1982); 346–349.

[2] O. Demirkol, A. C. Mehmetoglu, Z. Qiang, N. Ercal, C. Adams. Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in strawberry. *J. Agric. Food Chem*. **56** (2008); 10414-10421.

[3] M. I. A. Ansari, A. K. Datta. An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. *Trans IChemE*. **81** (2003); 57–65.

[4] W. H. Hanway, A. P. Hansen, K. L. Anderson, R. L. Lyman, J. E. Rushing. Inactivation of penicillin G in milk using hydrogen peroxide. *J Dairy Sci.* **88** (2005); 466–469.

[5] Y. Wei, M. Guo. Hydrogen peroxide triggered prochelator activation, subsequent metal chelation, and attenuation of the Fenton reaction. *Angew Chem Int Ed Engl*. **46** (2007); 4722–4725.

[6] http://www.manager.co.th/china/ViewNews.aspx?NewsID=9510000131274

[7] T. R. L. C. Paixao, M. Bertotti. Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using Prussian blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration. *Sensor Actuat B-Chem*. **137** (2009); 266-273.

[8] M. Özkan, A. Kırca, ˘lu, B. Cemerog. Effects of hydrogen peroxide on the stability of

ascorbic acid during storage in various fruit juices. *Food Chem*. **88** (2004); 591–597.

[9] H. Chen, H. Yu, Y. Zhou, L. Wang. Fluorescent quenching method for determination of trace hydrogen peroxide in rain water. *Spectrochimica Acta A*. **67** (2007); 683–686.

[10] X. Zheng, Z. Guo. Potentiometric determination of hydrogen peroxide at MnO_2-doped carbon paste electrode. *Talanta*. **50** (2000); 1157–1162.

[11] Y. Hu, Z. Zhang, C. Yang. The determination of hydrogen peroxidegenerated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selectivechemiluminescence method. *Anal Chim Acta*. **601** (2007); 95–100.

[12] W. Yonghong, Z. Bo, W. Shun, W. Kemin, H. Xiaoxiao. Colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose using the magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Talanta*. **134** (2015); 712-717.

[13] F.L. Benedito, S. Nakagaki, A.A. Saczk, P.G. Peralta-Zamor, C.M.M. Costa. Study of metalloporphyrin covalently bound to silica as catalyst in the *ortho*-dianisidine oxidation. *Appl Catal A-Gen*. **250** (2003); 1–11.

[14] W.E. Mary, R.W. Eugene. Determination of Glucose by an Improved Enzymatic Procedure. *Clin. Chem*. **7** (1961); 542-545.

[15] D. Schomburg, M. Salzmann, D. Stephan. Enzyme Handbook 7. *Springer Publisher*. (1993); 1-6.

[16] http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/analytical-method-validation

[17] M.E. Abbas, L. Wei, Z. Lihua, Z. Jing, T. Heqing. Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system. *Food Chem*. **120** (2010); 327-331.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวกิตติยาภรณ์ จุลมาสดิลก
วัน เดือน ปีเกิด	26 มีนาคม 2534
ที่อยู่	789/112 หมู่ 18 หมู่บ้านสิริภิรมย์ ถนนชยางกูร ตำบลขามใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000
การศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เบอร์โทรศัพท์	085-639-9551
อีเมล์	doraemon_ice9@hotmail.com