

การพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์อย่างง่ายและราคาถูก  
สำหรับการวิเคราะห์หาไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์

DEVELOPMENT OF A SIMPLE AND LOW COST  
BIOSENSOR TECHNIQUE FOR DETECTION OF  
HYPOXANTHINE IN MEAT

มณฑิตา มูลทองชุน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์อย่างง่ายและราคาถูก  
สำหรับการวิเคราะห์หาไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์

มณฑิตา มูลทองชุน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2562

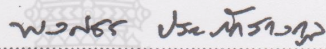
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์อย่างง่ายและราคาถูกสำหรับการวิเคราะห์หา  
ไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์  
Development of a Simple and Low Cost Biosensor Technique for  
Detection of Hypoxanthine in Meat

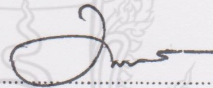
ชื่อ - นามสกุล            นางสาวมณฑิตา มุลทองขุน  
สาขาวิชา                  เคมีสิ่งแวดล้อม  
อาจารย์ที่ปรึกษา          ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ประ.ด.  
ปีการศึกษา                2562

---

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ  
(อาจารย์พงศธร ประภัก์รางกุล, Ph.D.)




.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เนตรนภิส แก้วช่วย, Ph.D.)



.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ประ.ด.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์  
ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ประ.ด.)

วันที่ 1๒ เดือน กันยายน พ.ศ. 2562

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์อย่างง่ายและราคาถูกลสำหรับการวิเคราะห์หาไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์
ชื่อ – นามสกุล	นางสาวมณฑิตา มุลทองขุน
สาขาวิชา	เคมีนวัตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ ตีฎ, ประ.ด.
ปีการศึกษา	2562

### บทคัดย่อ

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์เพื่อประเมินคุณภาพความสด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้เทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของไฮโปแซนทีนด้วยแซนทีนออกซิเดส ฮอสตราดิชเปอร์ออกซิเดส และโอโตอะนิซินติน เกิดเป็นสารละลายสีน้ำตาลบนกระดาษและวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ค่าความเข้มสีที่ได้จะแปรผันตรงกับปริมาณไฮโปแซนทีน

ขั้นแรกทำการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีพิมพ์สกรีนโดยใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิด ศึกษาวิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและศึกษาวิธีการตรวจวัดไฮโปแซนทีน จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม และศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน ผลการทดลองพบว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีความเที่ยง ความถูกต้อง และจำเพาะเจาะจงสูงสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน มีช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 5-40 มิลลิกรัม/ลิตร ชัดจำกัดในการตรวจพบและชัดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณเท่ากับ 1.8 และ 6.1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์สดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ พบว่าอุปกรณ์ตรวจวัดสามารถตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีน เพื่อประเมินความสดของเนื้อสัตว์ได้

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนที่พัฒนาขึ้นมีข้อดี คือ มีความถูกต้องสูง ง่ายต่อการใช้งาน เป็นวิธีที่เร็ว และราคาถูก

**คำสำคัญ:** ไฮโปแซนทีน อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ไบโอเซนเซอร์ ความสดของเนื้อสัตว์



<b>Thesis Title</b>	Development of a Simple and Low Cost Biosensor Technique for Detection of Hypoxanthine in Meat
<b>Name – Surname</b>	Miss Montita Mooltongchun
<b>Program</b>	Innovative Chemistry
<b>Thesis Advisor</b>	Assistant Professor Siriwan Teepoo, Ph.D.
<b>Academic Year</b>	2019

## ABSTRACT

In the food industry, the amount of hypoxanthine in meat is assessed for the quality of freshness. Therefore, the objective of this research was to fabricate a microfluidic paper-based analytical device ( $\mu$ PAD) for hypoxanthine detection using the biosensor technique. The device fabrication was based on the reactions of hypoxanthine with xanthine oxidase, horseradish peroxidase, and *o*-dianisidine, the brown solution was obtained on the paper. The color intensity of this solution was measured with the Image J program. The color intensities corresponded to the amount of hypoxanthine.

Firstly, the  $\mu$ PAD was fabricated by the screen printing technique using polylactic acid solution. Fabrication of  $\mu$ PAD and analytical method for detection of hypoxanthine were studied. Next, the conditions were optimized and performances of  $\mu$ PAD were evaluated. The results were found that,  $\mu$ PAD provide precision, accuracy, and specificity for detection of hypoxanthine. The concentrations were linear in the range of 5-40 mg/L. Limit of detection and limit of quantitative were 1.8 and 6.1 mg/L, respectively. Then, the developed method was applied for detection of hypoxanthine in meat and processed meat. The results showed that, the  $\mu$ PAD could detect hypoxanthine for evaluation of meat freshness.

The developed analytical method for detection of hypoxanthine has advantages such as high accuracy, ease of use, rapid method and low cost.

**Keywords:** hypoxanthine, microfluidic paper-based analytical device, biosensor, meat freshness

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ ตีฎ ที่เสียสละเวลาและให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี พร้อมทั้งติดตามความก้าวหน้าของวิทยานิพนธ์อย่างสม่ำเสมอตลอดมา นับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสำเร็จอย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่งที่ให้ความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.พงศธร ประภักกรางกุล ประธานในการสอบวิทยานิพนธ์และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนตรนภิส แก้วช่วย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ รวมทั้งยังกรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย อาคารสถาบันวิจัยเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ พร้อมการสนับสนุนเป็นอย่างดีจนทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้จนประสบผลสำเร็จ อีกทั้งความช่วยเหลือจากครอบครัว เพื่อน พี่ และน้อง ตลอดจนบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ให้แก่ผู้สนใจ หากมีความผิดพลาดหรือบกพร่องใดๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

มณฑิตา มุลทองขุน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญภาพ.....	(9)
สารบัญตาราง.....	(11)
คำสัญลักษณ์และคำย่อ.....	(12)
บทที่ 1 บทนำ.....	13
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	13
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	15
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	15
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย.....	17
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	19
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
2.1 ดัชนีบ่งชี้ความสดของเนื้อสัตว์.....	20
2.1.1 การสลายตัวของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์.....	20
2.1.2 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด.....	20
2.1.3 ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine) .....	20
2.1.4 การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์.....	21
2.2 ไฮโปแซนทีน.....	24
2.2.1 สมบัติทั่วไปของไฮโปแซนทีน.....	24
2.2.2 วิธีทั่วไปสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน.....	26
2.3 เทคนิคไบโอเซนเซอร์.....	28
2.3.1 ค่ะตะไลติกไบโอเซนเซอร์.....	29
2.3.2 เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส.....	30

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์.....	31
2.5 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	33
2.5.1 หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	33
2.5.2 วิธีสร้างขอบเขตบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
3.1 สารเคมี.....	36
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	36
3.3 วิธีการทดลอง.....	37
3.3.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	37
3.3.2 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	40
3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน.....	47
3.3.4 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง.....	50
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	52
4.1 ผลการศึกษาวิธีสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	52
4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิด สำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า.....	52
4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิด สำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง.....	53
4.2 ผลการศึกษาวิธีตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	55
4.2.1 ผลการศึกษาปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง.....	55
4.2.2 ผลการศึกษาปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด.....	56
4.2.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดส.....	57
4.2.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส.....	58
4.2.5 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายแซนทีนออกซิเดส.....	59
4.2.6 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลาย ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส.....	60

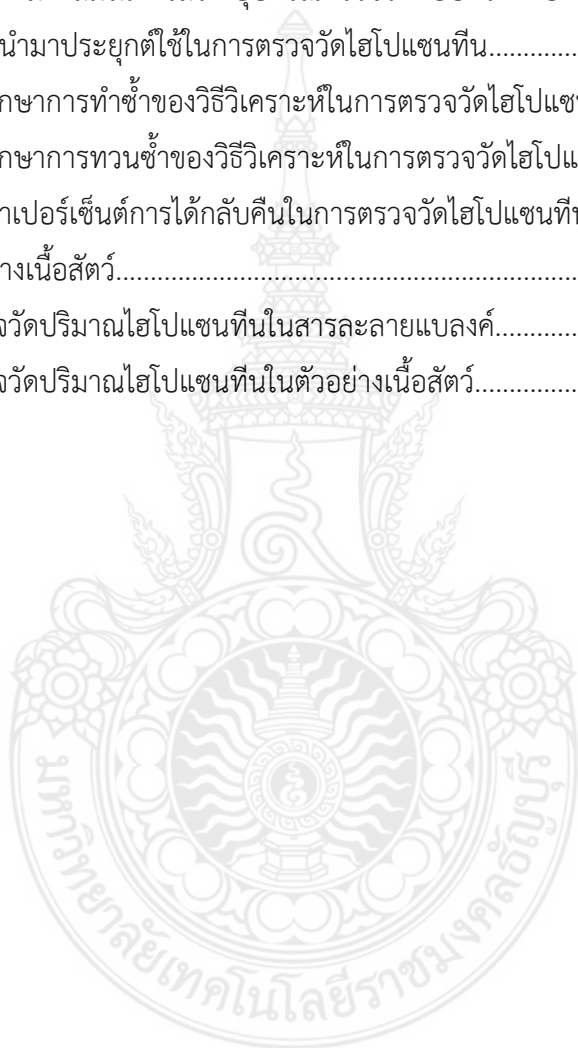


## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.7 ผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน.....	61
4.2.8 ผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับโอโตอะนิซิติน.....	62
4.2.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอโตอะนิซิติน.....	63
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัด.....	65
4.3.1 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์.....	65
4.3.2 การศึกษาความถูกต้องของวิธี.....	67
4.3.3 การศึกษาความเป็นเส้นตรง.....	68
4.3.4 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ.....	69
4.3.5 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ.....	70
4.3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์.....	71
4.3.7 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน.....	72
4.4 ผลการตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง.....	73
4.4.1 การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อปลาที่มีระยะเวลา หลังการตายต่างกัน.....	73
4.4.2 ตรวจวัดหาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ และเปรียบเทียบกับวิธีทางสเปกโทรสโกปี.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	76
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	76
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	77
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	112

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1	
สถานะที่ศึกษาในการพัฒนาเทคนิคไปโอเซนเซอร์	
สำหรับการตรวจวัดไฮโปแซนทีน.....	46
ตารางที่ 4.1	
สถานะที่เหมาะสมในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	
และการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน.....	64
ตารางที่ 4.2	
ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน.....	65
ตารางที่ 4.3	
ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน.....	66
ตารางที่ 4.4	
ผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน	
ในตัวอย่างเนื้อสัตว์.....	67
ตารางที่ 4.5	
การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในสารละลายแบบลงค์.....	69
ตารางที่ 4.6	
การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์.....	74



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิด.....	18
ภาพที่ 1.2 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	18
ภาพที่ 2.1 การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์.....	22
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไฮโปแซนทีน.....	24
ภาพที่ 2.3 ปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ตามระยะเวลาหลังการเก็บรักษา.....	25
ภาพที่ 2.4 องค์ประกอบของเทคนิคไบโอเซนเซอร์.....	29
ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์.....	30
ภาพที่ 2.6 กระบวนการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์.....	33
ภาพที่ 3.1 วิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	38
ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	41
ภาพที่ 4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหน้า.....	53
ภาพที่ 4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหลัง.....	54
ภาพที่ 4.3 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง.....	55
ภาพที่ 4.4 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตรวจวัด.....	56
ภาพที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่แตกต่างกัน.....	57
ภาพที่ 4.6 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่แตกต่างกัน.....	58
ภาพที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรโดยใช้สารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน.....	59
ภาพที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรโดยใช้สารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน.....	60

## สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีนที่แตกต่างกัน.....	61
ภาพที่ 4.10 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับ ไอโอดีนซิดินที่แตกต่างกัน.....	62
ภาพที่ 4.11 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนซิดินที่แตกต่างกัน.....	63
ภาพที่ 4.12 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนที่ความเข้มข้น 0.1 - 100 มิลลิกรัม/ลิตร.....	68
ภาพที่ 4.13 ผลการตอบสนองของสารทดสอบต่อการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วย อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	71
ภาพที่ 4.14 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	72
ภาพที่ 4.15 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อปลานิล ที่มีระยะเวลาหลังการตายต่างกัน.....	73
ภาพที่ 4.16 ความสัมพันธ์ของปริมาณไฮโปแซนทีนที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี และตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.....	75



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Hx	ไฮโปแซนทีน
X	แซนทีน
XOD	แซนทีนออกซิเดส
HRP	ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส
$\mu$ PAD	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
PLA	พอลิแลคติกแอซิด
ATP	อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต
ADP	อะดีโนซีนไดฟอสเฟต
AMP	อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต
IMP	อินโนซีนโมโนฟอสเฟต
Ino	อินโนซีน
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
% RSD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
LOD	ขีดจำกัดการตรวจพบ
LOQ	ขีดจำกัดการตรวจพบเชิงปริมาณ
Vol.	ฉบับที่
pp.	เลขหน้า

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศเหมาะสำหรับการทำเกษตรกรรม การประมง และการเลี้ยงสัตว์ ทำให้เป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ด้วยทรัพยากรธรรมชาติ และมีความพร้อมทางด้านวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารทั้งบริโภคภายในประเทศและส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศ โดยประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่สำคัญของโลกในการส่งออกวัตถุดิบต่างๆ ได้แก่ ข้าว เนื้อสัตว์ ปลา และอาหารทะเล [1] สำหรับการส่งออกเนื้อสัตว์มีทั้งที่อยู่ในรูปของเนื้อสัตว์แช่เยือกแข็ง และเนื้อสัตว์แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ปลาหมึกกระป๋อง นกเก็ดไก่ หมูยอ ลูกชิ้นเนื้อ และน้ำปลา เป็นต้น [2-4] ซึ่งประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกน้ำปลามากที่สุดในโลก นอกจากนี้ รายงานจากกรมปศุสัตว์ [5] พบว่ามีอัตราการส่งออกเนื้อสัตว์แช่เยือกแข็งและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ของประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากปี 2548 จนถึงปี 2561 ซึ่งคิดเป็นรายได้ให้แก่ประเทศไทยมากกว่า 87,000 ล้านบาท

ความสดของเนื้อสัตว์เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมอาหาร แต่เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและมีการขนส่งวัตถุดิบที่ใช้เวลานาน จึงมักพบปัญหาในเรื่องของการเน่าเสียได้ง่าย ทำให้เนื้อสัตว์เสียสภาพและมีกลิ่นเปลี่ยนไป เช่น เกิดจากการรวมตัวของไขมันกับออกซิเจนในอากาศจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนขึ้น และเนื่องจากกระบวนการทางชีวเคมีภายในเนื้อสัตว์ที่เกิดขึ้นภายหลังจากสัตว์ตาย โดยจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนต่างๆด้วยเอนไซม์ โดยเริ่มจากการย่อยอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate : ATP) และย่อยต่อไปจนเกิดเป็นไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) โดยมีเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase : XOD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [6-9] ดังนั้นปริมาณของไฮโปแซนทีนที่เกิดขึ้นจึงมีความสัมพันธ์กับการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ สามารถใช้เป็นดัชนีวัดความเน่าเสียของเนื้อสัตว์ได้ กล่าวคือ เมื่อมีปริมาณไฮโปแซนทีนเพิ่มมากขึ้นแสดงว่าเนื้อสัตว์มีการเน่าเสียเพิ่มขึ้น ถ้าหากมีการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีไฮโปแซนทีนปนเปื้อนอยู่ พบว่ามีอันตรายต่อร่างกาย เนื่องจากไฮโปแซนทีนสามารถย่อยสลายต่อไปกรดยูริกได้ ซึ่งปริมาณกรดยูริกที่สะสมในร่างกายจะทำให้มีโอกาสเสี่ยงในการเกิดภาวะกรดยูริกในเลือดสูงและเกิดโรคเก๊าต์ได้ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ ซึ่งนับว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมอาหาร อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ในทางอุตสาหกรรมอาหารจึงมีการตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ก่อนแปรรูปเพื่อประเมินคุณภาพความสด และตรวจวัดในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์เพื่อตรวจสอบคุณภาพย้อนกลับของวัตถุดิบ

วิธีทั่วไปสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography : HPLC) [10] วิธีทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) [11] และวิธีสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) [12] ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีวิเคราะห์สารที่มีความถูกต้องแม่นยำ และมีความไววิเคราะห์สูง อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากเพื่อกำจัดตัวรบกวน นักวิทยาศาสตร์จึงนำเทคนิคไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนร่วมกับวิธีทั่วไป [11-13] ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังนั้นข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องโดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดตัวรบกวน ถือเป็นกระบวนการระยะเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โดยเทคนิคไบโอเซนเซอร์อาศัยหลักการทำงานร่วมกันสองส่วนประกอบหลัก คือ วัสดุชีวภาพ (Biological sensing element) และตัวตรวจวัด (Detector) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์จะใช้เซนเซอร์ออกซิเดสเป็นวัสดุชีวภาพ เพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโปแซนทีน แต่ทั้งนี้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอื่นๆ ได้แก่ เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาแพง ต้องทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น อีกทั้งผู้ใช้เครื่องมือต้องมีทักษะและความเชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือ

ปัจจุบันมีการนำกระดาษมาพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อให้สะดวกและง่ายขึ้น เปรียบเสมือนการย่อส่วนห้องปฏิบัติการลงบนกระดาษเพียงแผ่นเดียว (Lab-on-paper) เรียกว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices :  $\mu$ PAD) [14-16] เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน สามารถวัดได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกัน ใช้ตัวอย่างและสารเคมีปริมาณน้อย และด้วยวัสดุที่ทำจากกระดาษจึงมีราคาถูก อุปกรณ์มีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา สามารถพกพาไปวิเคราะห์ยังภาคสนามได้ หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ อาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างกับสารเคมีบนกระดาษซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) และกำหนดขอบเขตหรือทิศทางไหลของสารด้วยการสร้างส่วนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ขึ้นเป็นลวดลาย ด้วยการตัดหรือปรับแต่งกระดาษให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคการพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) [17] การปรับสภาพด้วยเลเซอร์ (Laser treatment) [18] การปรับสภาพด้วยพลาสมา (Plasma treatment) [19] การพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยไข (Wax screen printing) [20] และการพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อตเตอร์ (Plotter) [21] เป็นต้น โดยเทคนิคการปรับแต่งกระดาษดังกล่าว บางเทคนิคจะต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน เช่น เครื่องฉายแสง เครื่องฉายเลเซอร์ สำหรับเทคนิคการพิมพ์สกรีนด้วยไข เป็นขั้นตอนการพิมพ์ที่ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน แต่จะต้องใช้ความร้อนในการหลอมละลายไขลงบนกระดาษ งานวิจัยนี้จึงสนใจการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิเมอร์ คือ กรดพอลิแลคติก (Polylactic acid : PLA) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือและความร้อนในการพิมพ์ และด้วยคุณสมบัติของกรดพอลิแลคติกที่ไม่ชอบน้ำ เป็นพอลิเมอร์ที่เข้ากันได้กับ

สารชีวภาพ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงเหมาะแก่การนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ โดยพัฒนาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ผ่านสกรีนโดยใช้สารละลายกรดพอลิแลคติก วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนำไปตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อปลา และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ ซึ่งคาดว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีกว่าวิธีวิเคราะห์ไฮโปแซนทีนในปัจจุบัน คือ ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง ไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดตัวรบกวน เป็นเทคนิคที่ง่าย ให้ผลการวิเคราะห์เร็ว ใช้สารปริมาณน้อย ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และสามารถพกพาไปปฏิบัติงานที่ภาคสนามได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายกรดพอลิแลคติก

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยหลักการไบโอเซนเซอร์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

1.2.3 เพื่อหาประสิทธิภาพของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยหลักการไบโอเซนเซอร์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

1.2.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริงด้วยหลักการไบโอเซนเซอร์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้เทคนิคการพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยสารละลายกรดพอลิแลคติก

1.3.1.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า

1.3.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยหลักการไบโอเซนเซอร์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ



- 1.3.2.1 ศึกษาปริมาณของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง
- 1.3.2.2 ศึกษาปริมาณของสารเคมีบริเวณตรวจวัด
- 1.3.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดส
- 1.3.2.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฮอสตราดิซเปอร์ออกซิเดส
- 1.3.2.5 ศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายแซนทีนออกซิเดส
- 1.3.2.6 ศึกษาความเป็นกรด-เบส ของสารละลายฮอสตราดิซเปอร์ออกซิเดส
- 1.3.2.7 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน
- 1.3.2.8 ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ  
ไอโอดีนซิดีน
- 1.3.2.9 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอโอดีนซิดีน

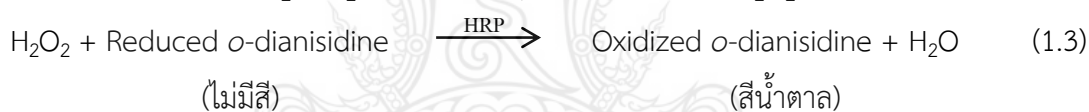
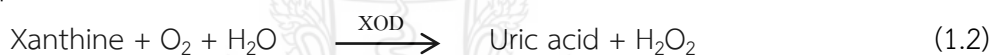
1.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยหลักการไบโอเซนเซอร์บน  
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

- 1.3.3.1 ความเที่ยงของวิธี (Precision)
- 1.3.3.2 ความถูกต้องของวิธี (Accuracy)
- 1.3.3.3 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range)
- 1.3.3.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection)
- 1.3.3.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ (Limit of quantitative)
- 1.3.3.6 ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity)

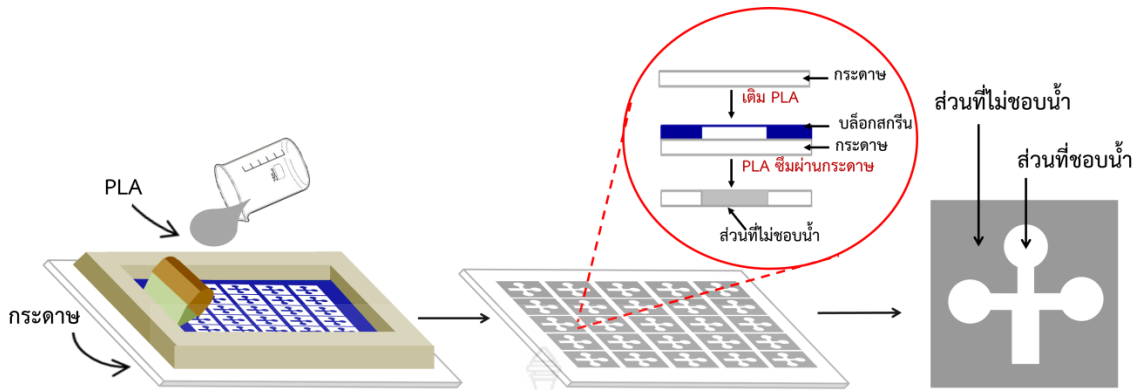
1.3.4 ตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริงด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น  
โดยตัวอย่างที่ใช้ ได้แก่ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ใช้  
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับผลที่ได้จากวิธีทางสเปกโทรสโกปี

#### 1.4 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

เทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิคในการตรวจวัดสารที่อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงแบบแม่กุญแจกับลูกกุญแจระหว่างสารที่สนใจกับวัสดุชีวภาพ ทำให้สามารถตรวจวัดสารที่สนใจได้อย่างจำเพาะเจาะจง ไม่มีผลของตัวรบกวน จึงลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดตัวรบกวน ในงานวิจัยนี้จึงสนใจการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์โดยใช้แซนทีนออกซิเดส และฮอสมราดิซเปอร์ออกซิเดสเป็นวัสดุชีวภาพ โดยแซนทีนออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นแซนทีน (Xanthine) ดังสมการที่ 1.1 จากนั้นแซนทีนจะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อด้วยแซนทีนออกซิเดสได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ดังสมการที่ 1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโอไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ (Reduced) ซึ่งไม่มีสี โดยมีฮอสมราดิซเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอไดอะนิซิดีนที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (Oxidized) ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นสารละลายสีน้ำตาล ดังสมการที่ 1.3 ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของไฮโปแซนทีนในตัวอย่าง

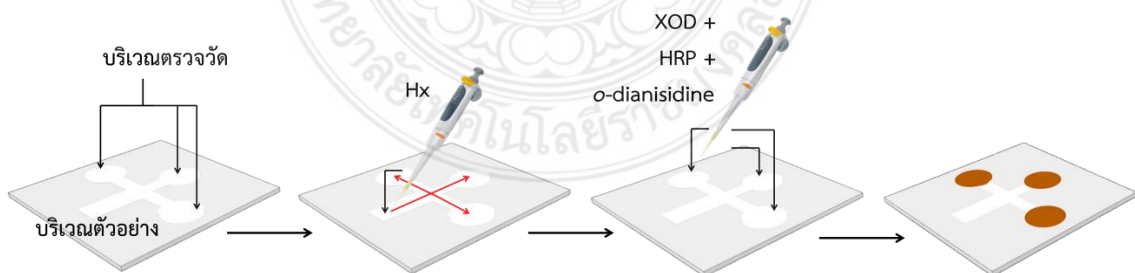


งานวิจัยนี้มีแนวความคิดที่จะพัฒนาการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์เพื่อให้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว ราคาถูก และไม่ต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ โดยการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการวิเคราะห์ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในงานวิจัยนี้ทำการสร้างขอบเขตในการเกิดปฏิกิริยาของสาร โดยการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิดด้วยวิธีพิมพ์สกรีน ดังภาพที่ 1.2 ทำได้โดยสร้างบล็อกสกรีนขึ้นให้มีรูปแบบตามต้องการและทำการพิมพ์สารละลายพอลิแลคติกแอซิดผ่านรูพรุนของบล็อกสกรีนไปยังกระดาษ สารละลายที่ถูกพิมพ์จะเคลื่อนที่แทรกตัวลงในเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษ และเมื่อแห้งจะเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ มีหน้าที่กั้นบริเวณในการเกิดปฏิกิริยาของสาร



ภาพที่ 1.1 หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีการพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิด

ต่อไปเป็นขั้นตอนการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างขึ้น โดยอาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ ดังสมการ 1.1 1.2 และ 1.3 ปฏิริยาตั้งกล่าวจะเกิดขึ้นบนส่วนที่ชอบน้ำของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ดังภาพที่ 1.2 ปฏิริยาจะเริ่มขึ้นเมื่อเปิดละลายไฮโปแซนทีน (หรือสารละลายตัวอย่าง) ลงบนบริเวณตัวอย่าง สารละลายจะเคลื่อนที่ไปตามเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษสู่บริเวณตรวจวัด จากนั้นเปิดสารละลายแขนทีนออกซิเดส ฮอสมราดิซเปอร์ออกซิเดสและไอโดอะนิซิดีนลงบริเวณตรวจวัด เมื่อทำปฏิริยาในสภาวะที่เหมาะสมจะเกิดเป็นสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด การจากนั้นสแกนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเครื่องสแกน เพื่อวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรมประมวลผลด้วยภาพ Image J ค่าความเข้มสีที่ได้จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของไฮโปแซนทีน นำค่าความเข้มสีที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนต่อไป



ภาพที่ 1.2 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 สามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.5.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.5.3 ได้ทราบประสิทธิภาพของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ
- 1.5.4 สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างไม่ออสต์ว์และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่สร้างขึ้น





## บทที่ 2

### วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ดัชนีบ่งชี้ความสดของเนื้อสัตว์

ความสดของเนื้อสัตว์ที่นำมาเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป นับว่ามีความสำคัญอย่างมากซึ่งแสดงถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ในอุตสาหกรรมอาหารจึงมีการประเมินความสดของวัตถุดิบดัชนีทางเคมีที่ใช้ในการบ่งชี้ความสดหรือการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อสัตว์ มีดังนี้

##### 2.1.1 การสลายตัวของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์

ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide) สามารถพบได้ในปลาทะเลและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เป็นสารอนินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุล [22-23] มีหน้าที่เป็นสารป้องกันการเสื่อมสภาพของโปรตีนในตัวปลา รวมถึงป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากเนื้อปลา (Water logout) มักพบมากบริเวณผิวหนัง โดยหลังจากสัตว์ตายลงไตรเมทิลเอมีนออกไซด์สามารถเปลี่ยนเป็นไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine) ด้วยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนรีดักเตส (Trimethylamine reductase) จากปฏิกิริยารีดักชันของแบคทีเรีย เช่น *Shewanella putrifaciens* ไตรเมทิลเอมีนที่เกิดขึ้นจะมีกลิ่นเหม็น ดังนั้นปริมาณไตรเมทิลเอมีนออกไซด์จะลดลงเมื่อระยะเวลาหลังการตายของสัตว์มากขึ้น จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสดของเนื้อสัตว์ได้

##### 2.1.2 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด

สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen) จะเกิดขึ้นภายในเนื้อสัตว์ โดยเมื่อสัตว์ตายเอนไซม์ที่อยู่ในตัวสัตว์หรือที่อยู่ในจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยองค์ประกอบต่างๆของเนื้อสัตว์และเกิดเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ เช่น แอมโมเนีย (Ammonia) เอมีน (Amine) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen Sulphide) เมทิลเมอแคปแทน (Methylmercaptan) อินโดล (Indole) และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ เมื่อระยะเวลาหลังการตายมากขึ้นหรือเก็บรักษาวัตถุดิบที่อุณหภูมิสูง จุลินทรีย์จะมีปริมาณสูง จึงเกิดกระบวนการย่อยสลายและเกิดเป็นสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสดของเนื้อสัตว์ [22] ซึ่งปริมาณที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับคุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น สีและกลิ่นเปลี่ยนไป ตัวอย่างเช่น สหภาพยุโรป (EU) ได้กำหนดคุณภาพพลาสติก จะต้องมียปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดไม่เกิน 35 มิลลิกรัม/100 กรัม [24]

##### 2.1.3 ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine)

ไบโอจีนิกเอมีน คือ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ของกรดอะมิโน โดยใช้เอนไซม์อะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (Amino

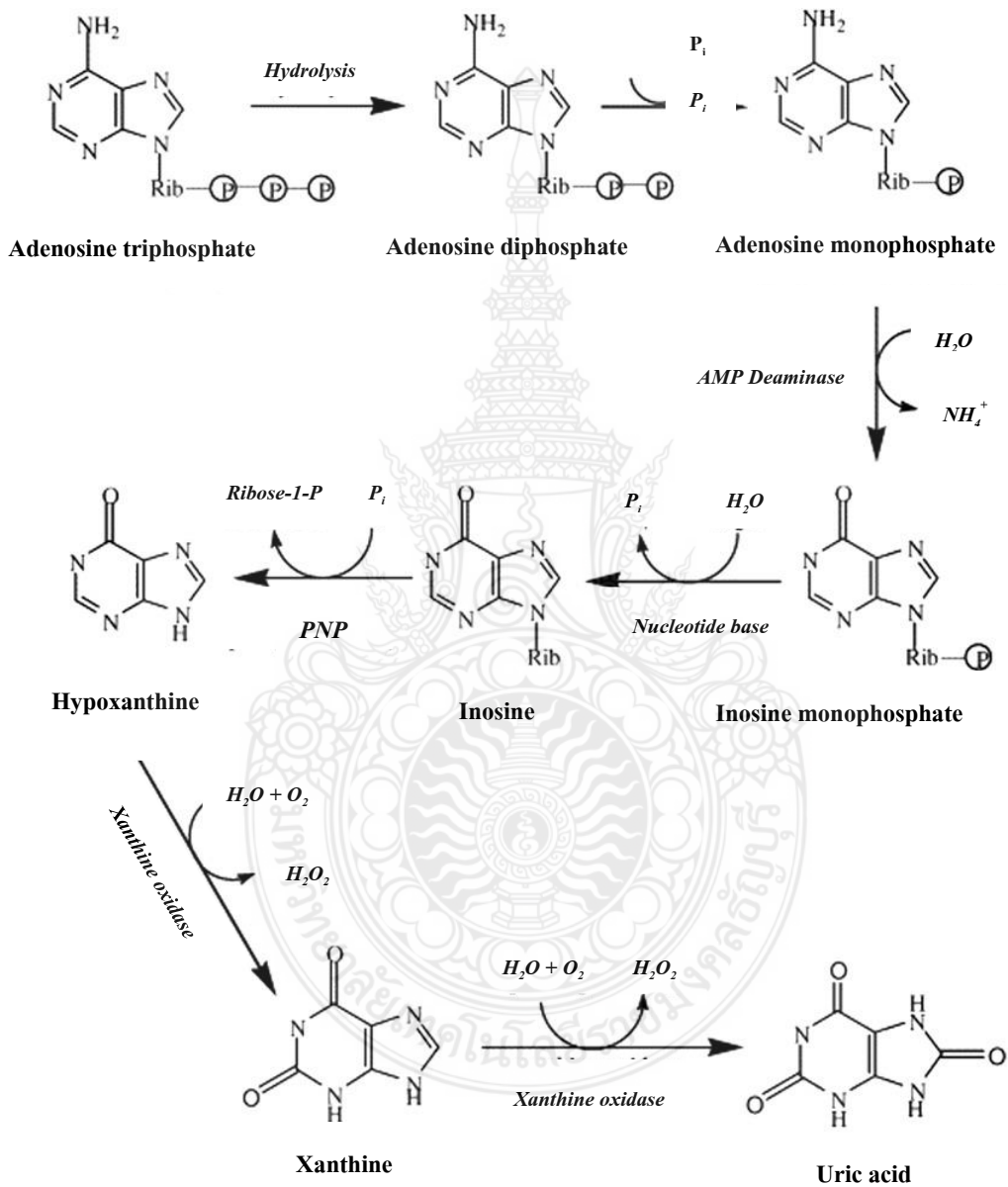
decarboxylase) หรือเกิดจากปฏิกิริยาเอมิเนชัน (Amination) และปฏิกิริยาทรานส์เอมิเนชัน (Transamination) ของอัลดีไฮด์หรือคีโตน สังเคราะห์ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ปริมาณของไบโอจีนิกเอมีนในอาหารมักเกิดจากแบคทีเรีย โดยจะมีการผลิตสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี เช่น *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella* และ *Streptococcus* ไบโอจีนิกเอมีนสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารหมัก เช่น ไวน์ เนื้อหมัก และอาหารทะเล โดยสารไบโอจีนิกเอมีนสำคัญที่มักพบในอาหารได้แก่ ฮิสตามีน (Histamine) ทริปตามีน (Tryptamine) สเปอ์มีน (Spermine) 2-ฟีนิลเอธิลเอมีน (2-phenylethylamine) คาดาเวอรีน (Cadaverine) ไทราไมน์ (Tyramine) และสเปอ์มิดีน (Spermidine) [25]

เมื่อรับสารไบโอจีนิกเอมีนเข้าร่างกายจะก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพ โดยเมื่อบริโภคอาหารที่มีระดับของฮิสตามีนสูง จะมีผลทำให้เกิดอาการแพ้ที่เรียกว่า สคอมโบทอกซิโคซิส (Scombrototoxicosis) มักจะมีอาการคลื่นไส้ ปวดหัว มีผื่นแดง หายใจขัด และความดันเลือดต่ำ [26] นอกจากนี้สามารถใช้สารไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อสัตว์หรือวัตถุดิบได้ โดยเฉพาะปลาในวงศ์ Scombridae และ Carpeidae เนื่องจากปลาเหล่านี้มีปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีนสูง เมื่อเกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลส กรดอะมิโนฮิสติดีนจะถูกเปลี่ยนเป็นฮิสตามีน และเนื่องจากฮิสตามีนเป็นสารที่มีความเสถียร ทนความร้อนสูง ไม่สามารถทำให้สลายตัวได้ จึงสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์ที่แม้จะผ่านกระบวนการให้ความร้อนฆ่าเชื้อแล้ว เช่น ผลิตภัณฑ์ปลากระป๋อง ดังนั้นหากผลิตภัณฑ์ปลากระป๋องหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์มีปริมาณฮิสตามีนในระดับสูง อาจสันนิษฐานได้ว่าวัตถุดิบเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการผลิตมีคุณภาพความสดต่ำ [27]

#### 2.1.4 การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์

ปริมาณของสารประกอบที่เกิดจากการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของเนื้อสัตว์ได้ โดยหลังจากสัตว์ตายสารประกอบนิวคลีโอไทด์จะเกิดการสลายตัว ดังภาพที่ 2.1 เริ่มต้นจากอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate; ATP) ถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟต ไปเป็นอะดีโนซีนไดฟอสเฟต (Adenosine diphosphate; ADP) และอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (Adenosine monophosphate; AMP) ตามลำดับ จากนั้นเกิดการกำจัดหมู่แอมโมเนีย (Deamination) เกิดเป็นสารอิโนซีนโมโนฟอสเฟต (Inosine monophosphate; IMP) ในขั้นนี้จะทำให้เนื้อสัตว์มีรสชาติหวาน เนื่องจากอิโนซีนโมโนฟอสเฟตเป็นสารที่ให้ความหวาน ในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตไปเป็นอิโนซีนโมโนฟอสเฟต มักเกิดจะเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ที่อยู่ในสัตว์ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วและเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 3-5 วัน จากนั้นอิโนซีนโมโนฟอสเฟตจะเปลี่ยนไปเป็นอิโนซีน (Inosine; Ino) โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการเกิดปฏิกิริยา และย่อยสลายต่อไปเกิดเป็นไฮโปแซนทีน ในขั้นตอนนี้จะในเวลานานในการเกิดปฏิกิริยา

ดังนั้น เมื่อเก็บเนื้อสัตว์ไว้นานจะมีปริมาณไฮโปแซนทีนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสารที่ให้รสขม เมื่อเวลาผ่านไปหลายวันไฮโปแซนทีนจะถูกย่อยสลายต่อด้วยแซนทีนออกซิเดสและเกิดเป็นแซนทีน (Xanthine; X) และกรดยูริก (Uric acid) ตาม ลำดับ [6-8, 28-30]



ภาพที่ 2.1 การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ [30]

การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์จนสุดท้ายเกิดเป็นไฮโปแซนทีน จึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อสัตว์ได้ มีรายงานว่าปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ อย่างไรก็ตาม สัตว์แต่ละชนิดมีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณไฮโปแซนทีนต่างกัน ดังนั้น ในการประเมินความสดโดยใช้ปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์เป็นเกณฑ์จะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เช่น ความสดของปลา ได้กำหนดให้มีปริมาณ ไฮโปแซนทีนไม่เกิน 1.5 - 2 ไมโครโมล/กรัม [8]

ค่าเค (K - value) เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อสัตว์ โดยเป็นการวัดสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ [6-9] ดังสมการที่ (2.1)

$$\% \text{ K - value} = \frac{(Hx + Ino)}{(ATP + ADP + AMP + IMP + Hx + Ino)} \times 100 \quad (2.1)$$

แต่เนื่องจากอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตสามารถสลายตัวอย่างรวดเร็วไปเป็นอินโนซีนโมโนฟอสเฟต ดังนั้น จึงมีการใช้ค่าเคไอ (Ki value) ซึ่งไม่จำเป็นต้องตรวจสอบปริมาณอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต อะดีโนซีนไดฟอสเฟต และอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต ดังสมการที่ (2.2)

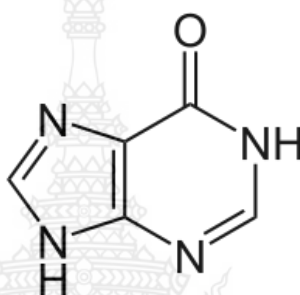
$$\% \text{ Ki - value} = \frac{(Hx + Ino)}{IMP + Hx + Ino} \times 100 \quad (2.2)$$

การใช้ค่าเคไอจะลดความแปรปรวนต่างๆ อันเกิดจากความแตกต่างของชนิดของสัตว์และปัจจัยอื่นๆ ในทางอุตสาหกรรมมีการตั้งค่าของการปฏิเสธผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Rejection limit) เช่น การปฏิเสธปลาที่ใช้ในการทำเป็นวัตถุดิบที่มีค่าเคเกิน 60% สำหรับค่าเคของปลาที่ใช้สำหรับทำผลิตภัณฑ์ปลาดิบ (ซาซิมิ) ต้องไม่เกิน 20% [9] ทั้งนี้การกำหนดค่าเคของเนื้อสัตว์ในแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เนื่องจากมีการย่อยสลายในขั้นตอนต่างๆ ที่แตกต่างกัน และปัจจัยอื่นๆ เช่น ขั้นตอนในการจับสัตว์แต่ละชนิด และการเก็บรักษาก่อนการแปรรูปย่อมแตกต่างกัน เป็นต้น

## 2.2 ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine; Hx)

### 2.2.1 สมบัติทั่วไปของไฮโปแซนทีน

ไฮโปแซนทีนมีชื่อเรียกตามสหภาพเคมีบริสุทธิ์และเคมีประยุกต์ระหว่างประเทศ (International Union of Pure and Applied Chemistry : IUPAC) คือ 1*H*-purin-6(9*H*)-one เป็นสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของพิวรีน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นวงแหวน (Heterocyclic aromatic) จึงมีชื่อเรียกทั่วไป คือ 6-ไฮดรอกซีพิวรีน (6-hydroxypurine) มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_5H_4N_4O$  และมีโครงสร้างโมเลกุล ดังภาพที่ 2.2



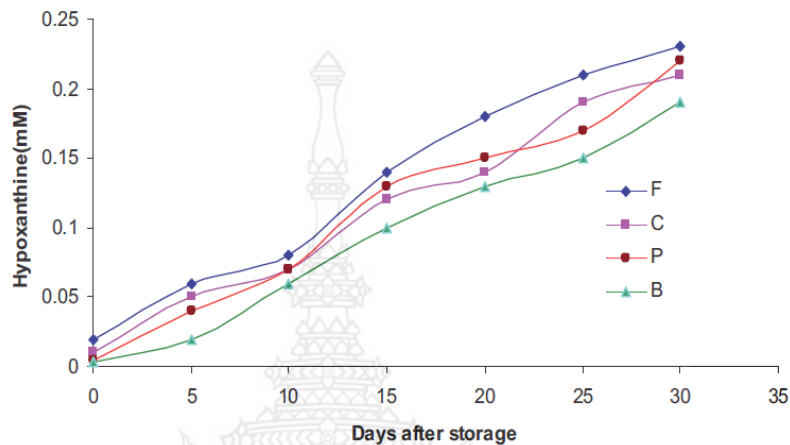
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไฮโปแซนทีน

สมบัติโดยทั่วไปของไฮโปแซนทีน ได้แก่ มีจุดเดือด 533 องศาเซลเซียส ที่ 760 มิลลิเมตรปรอท จุดหลอมเหลว 250 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ 276 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 1.892 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร น้ำหนักโมเลกุล คือ 136.11 กรัม/โมล และสามารถละลายในน้ำได้น้อย [30]

ไฮโปแซนทีนที่สะสมอยู่ในเนื้อสัตว์เกิดจากการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.1.4 โดยกระบวนการย่อยสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์จะเริ่มขึ้นภายหลังจากสัตว์ตายลง เอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อสัตว์จะเป็นตัวย่อยสลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตจนเกิดเป็นอิโนซีนมอนอฟอสเฟต จากนั้นเอนไซม์ที่เกิดจากจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายอิโนซีนโมโนฟอสเฟตเป็นอิโนซีนและย่อยสลายต่อจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโปแซนทีนในที่สุด ดังนั้น ไฮโปแซนทีนจึงเป็นสารที่บ่งชี้ถึงความสดของเนื้อปลาได้



มีรายงานวิจัยว่าปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บงานวิจัยของ Rooma davi และคณะ [31] ได้ตรวจวัดหาปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อปลา และเนื้อวัว พบว่า เมื่อเก็บเนื้อสัตว์ดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณไฮโปแซนทีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลา 30 วัน ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ตามระยะเวลาหลังการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ  $30 \pm 5$  องศาเซลเซียส (F = เนื้อปลา C = เนื้อไก่ P = เนื้อหมู B = เนื้อวัว) [31]

จากสมบัติของไฮโปแซนทีนที่สามารถละลายในน้ำได้น้อยมาก ดังนั้นเมื่อมีไฮโปแซนทีนอยู่ในเนื้อสัตว์จะล้างออกได้ยาก และเนื่องจากไฮโปแซนทีนมีจุดเดือดสูง การแปรรูปเนื้อสัตว์ด้วยความร้อนจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฮโปแซนทีน จึงทำให้ไฮโปแซนทีนยังคงตกค้างในเนื้อสัตว์นั้น ดังนั้น ถ้ารับประทานเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนไฮโปแซนทีนจะทำให้มีการสะสมไฮโปแซนทีนอยู่ในร่างกาย พบว่าไฮโปแซนทีนที่อยู่ในร่างกายสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยแซนทีนออกซิเดสทำให้สามารถสลายตัวได้ผลิตภัณฑ์ คือ แซนทีน ซึ่งจะสลายตัวต่อไปด้วยแซนทีนออกซิเดสและได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดยูริก ซึ่งปริมาณกรดยูริกที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อร่างกาย สามารถทำให้เกิดภาวะกรดยูริกในเลือดสูงและเกิดโรคเก๊าต์ได้ เนื่องจากกรดยูริกไปสะสมอยู่ตามข้อต่างๆของร่างกาย ซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายได้ [32]

## 2.2.2 วิธีทั่วไปสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน

วิธีทั่วไปสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) [33-36]

จากงานวิจัยของ Don Farthing และคณะ [34] ได้วิเคราะห์ปริมาณอินซูลินและไฮโปแซนทีนในตัวอย่างน้ำเลือดหรือพลาสมา (Plasma) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง โดยเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครผู้มีสุขภาพแข็งแรง และจากผู้ป่วยกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดอย่างเฉียบพลัน ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทำได้โดยนำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้แยกชั้น จากนั้นกรองเพื่อเก็บสารละลายที่เป็นส่วนของพลาสมาแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะในการทดลอง คือ คอลัมน์ C<sub>18</sub> อัตราการไหลของสาร 1.0 มิลลิลิตร/นาที และใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) และเมทานอล เทคนิคในการวิเคราะห์นี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.25-5 กรัม/มิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9990 ขีดจำกัดในการตรวจพบ คือ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร งานวิจัยนี้กล่าวไว้ว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงนี้ สามารถวิเคราะห์ไฮโปแซนทีนได้สะดวกและรวดเร็ว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการประเมินผู้ป่วยฉุกเฉินในขั้นตอนการประเมินศักยภาพของสารชีวโมเลกุลที่ชี้วัดโรค (Biomarker) เทคนิควิเคราะห์ไฮโปแซนทีนอาจช่วยในส่วนของการทำงานของบุคลากรในห้องฉุกเฉินของโรงพยาบาลให้สามารถตรวจสอบเบื้องต้นได้อย่างรวดเร็ว ต่อผู้ป่วยฉุกเฉินที่มีอาการเจ็บหน้าอกแต่ไม่มีบาดแผลซึ่งอาจมีภาวะหัวใจขาดเลือด [34]

การวิเคราะห์ข้างต้นเป็นการวิเคราะห์ไฮโปแซนทีนซึ่งมีประโยชน์ทางการแพทย์ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์เพื่อตรวจสอบคุณภาพความสดของเนื้อสัตว์ สามารถใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิล [35] โดยวิเคราะห์ปริมาณอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต และสารที่ได้จากการสลายตัวของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต ซึ่งประกอบด้วยไฮโปแซนทีน ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาเริ่มจากทำเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) โดยผสมเนื้อปลา 5 กรัม กับกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 900 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส 10 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยให้พีเอชอยู่ในช่วง 6.5-6.8 เพื่อตกตะกอน และเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงกรองเพื่อกำจัดตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตรเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง โดยใช้

คอลัมน์ RPC18 stainless-steel ขนาด 25 เซนติเมตร x 3.9 มิลลิเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ (Flow rate) เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร/นาที ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเนื้อปลานิลที่นำมาทดลองยังมีความสดอยู่มาก เนื่องจากเนื้อปลายังคงมีปริมาณอินซูลินโมโนฟอสเฟตสูง คือ 5 ไมโครโมล/กรัม และตรวจวัดความเข้มข้นของไฮโปแซนทีนและอินซูลินได้เพียง 0.11 และ 0.17 ไมโครโมล/กรัม ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อปลาที่ยอมรับให้มีได้สูงสุดคือ 1.5-2 ไมโครโมล/กรัม [6] และเมื่อคำนวณหา % K-value พบว่าเนื้อปลาสดยังคงมีค่า % K-value ที่ต่ำอยู่คือ 2.54 % แสดงว่าตัวอย่างปลานิลยังคงความสดอยู่เนื่องจาก มาตรฐานคุณภาพของเนื้อปลาสดกำหนดให้มีค่า % K-value ไม่เกิน 60%

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนเพื่อตรวจวัดคุณภาพความสดของเนื้อสัตว์ นอกจากตรวจวัดในเนื้อสัตว์สดแล้วยังสามารถตรวจวัดไฮโปแซนทีนได้ในผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากเนื้อสัตว์ เพื่อตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่นำมาแปรรูป เนื่องจากความร้อนในกระบวนการผลิตไม่สามารถสลายปริมาณไฮโปแซนทีนออกจากเนื้อสัตว์ได้ ดังนั้น ปริมาณไฮโปแซนทีนที่อยู่ในเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปแล้วจะใกล้เคียงกับปริมาณไฮโปแซนทีนที่อยู่ในเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบก่อนการแปรรูป จึงสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในผลิตภัณฑ์ซูริมิจากเนื้อปลา [36] การหาปริมาณไฮโปแซนทีนในผลิตภัณฑ์ ซูริมิเนื้อปลาเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับคุณภาพความสดของปลาที่เป็นวัตถุดิบ สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง กระบวนการทำซูริมิเริ่มจากนำเนื้อปลาสดที่ผ่านการล้างน้ำ เพื่อกำจัดไขมัน และองค์ประกอบที่ละลายน้ำได้ เช่น โปรตีนที่ละลายน้ำได้ เม็ดสี เอนไซม์ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ซูริมิจะแตกต่างจากเนื้อปลาธรรมดา คือ มีสีขาว ไม่มีกลิ่นคาว และมีความสามารถเกิดเจลที่ดี สามารถนำซูริมิไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆได้อีก เช่น บู๊ต ลูกชิ้น เนื้อกึ่งเทียม เป็นต้น [36] ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนทำได้โดยนำซูริมิที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด โดยชั่งตัวอย่างมา 5 กรัม ผสมกับสารละลายกรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid) ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กรองเพื่อเก็บสารละลายส่วนใส แล้วนำไปเจือจางโดยปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 7.5% จากนั้นเติมสารละลาย Neutralizing buffer ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จึงนำมากรองด้วยกระดาษกรอง และเก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร แยกสารด้วยคอลัมน์ Hypersil BDS C18 เฟส

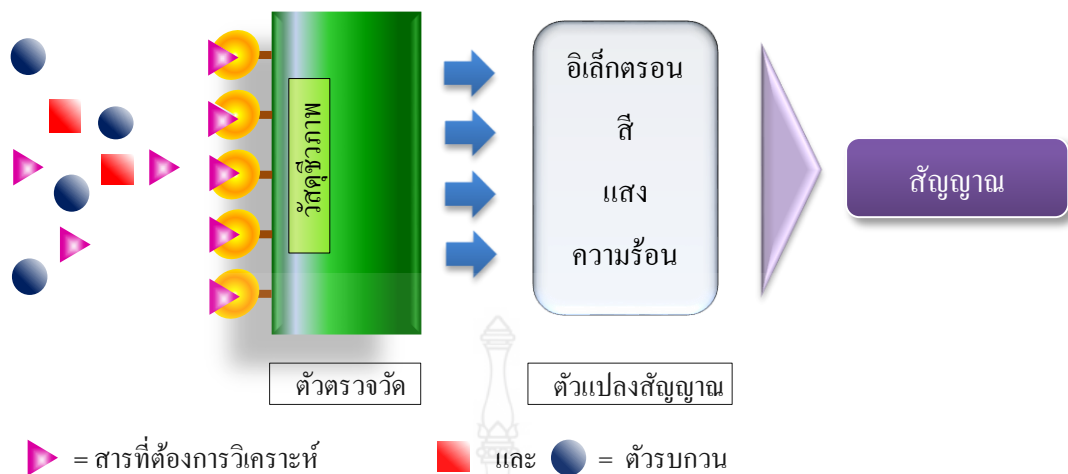
เคลื่อนที่ได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 10 นาที ตรวจวัดไฮโปแซนทีนที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แสดงค่าปริมาณไฮโปแซนทีนในหน่วย ไมโครโมล/100 กรัมตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าตัวอย่างซูริมิจากเนื้อปลาที่มีปริมาณไฮโปแซนทีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ 17 และลดลงในวันที่ 27 ซึ่งการแช่แข็งซูริมิที่ 7 วันอยู่คงความสดอยู่จากนั้นเริ่มเน่าเสียในวันที่ 12 และเน่าเสียรุนแรงเมื่อเก็บซูริมิไว้เกิน 17 วัน

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีข้อดี คือ มีความถูกต้องแม่นยำและมีความไววิเคราะห์สูง อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากเพื่อกำจัดตัวรบกวนต่างๆ มีความซับซ้อนหลายขั้นตอน จึงทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์เวลานาน เครื่องมือวิเคราะห์มีราคาแพง อีกทั้งผู้ใช้งานเครื่องมือนี้ยังต้องมีความรู้ และมีทักษะการใช้งานเป็นอย่างดี ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงได้พัฒนาเครื่องมือหรืออุปกรณ์วิเคราะห์ขึ้นมาเพื่อให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนได้ง่ายขึ้น นั่นคือ เทคนิคไบโอเซนเซอร์

### 2.3 เทคนิคไบโอเซนเซอร์

เทคนิคไบโอเซนเซอร์ เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยอาศัยหลักการทำงานของร่วมกันขององค์ประกอบที่สำคัญสองส่วน ดังภาพที่ 2.4 องค์ประกอบส่วนแรกคือ วัสดุชีวภาพ (Biological element) ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analyte) เช่น เอนไซม์ (Enzyme) แอนติบอดี (Antibody) กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) และกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นต้น สารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงกับวัสดุชีวภาพ หลังจากการเกิดปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เช่น เกิดอิเล็กตรอน เกิดสารชนิดใหม่ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน และการเปลี่ยนแปลงทางสี เป็นต้น จากนั้นองค์ประกอบส่วนที่สองคือ ตัววัดสัญญาณ (Detector) จะทำหน้าที่ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าเพื่อประมวลผล





ภาพที่ 2.4 องค์ประกอบของเทคนิคไบโอเซนเซอร์

เนื่องด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างวัสดุชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นตัวรับกวนต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่าง จึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคไบโอเซนเซอร์มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆอย่างหลากหลาย เช่น การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส [37] การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรีย [38] รวมถึงการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน [31, 39-42]

เทคนิคไบโอเซนเซอร์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดของวัสดุชีวภาพที่ใช้ ได้แก่ แอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์ (Affinity biosensor) โดยอาศัยแอนติบอดีเป็นวัสดุชีวภาพในการจับกับแอนติเจน และคะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ (Catalytic biosensor) อาศัยวัสดุชีวภาพที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ เอนไซม์ [42-43]

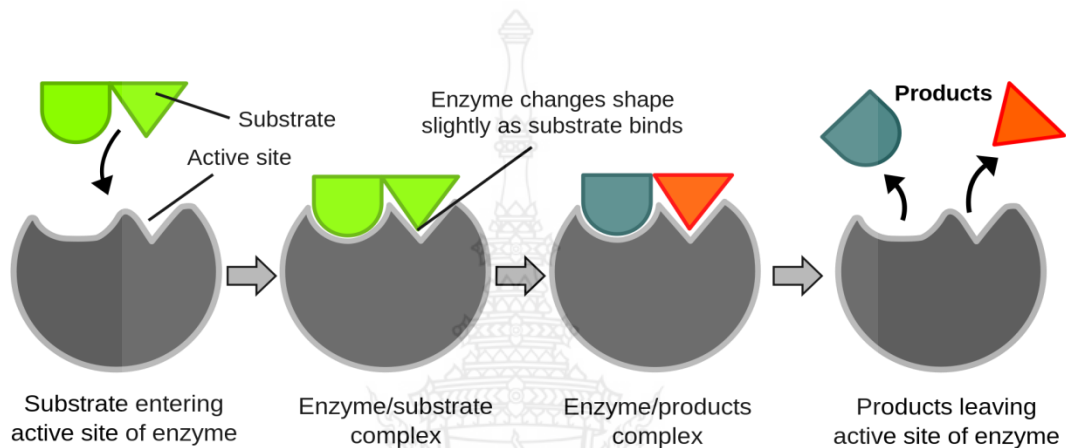
### 2.3.1 คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์

คะตะไลติกไบโอเซนเซอร์ เป็นเทคนิคไบโอเซนเซอร์ประเภทหนึ่ง โดยใช้เอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพ ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อปฏิกิริยาขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป หรือติดตามจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น [43]

เอนไซม์ (Enzyme) เป็นสารชีวโมเลกุลที่สร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิต มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อนและมีโมเลกุลขนาดใหญ่ โครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายโซ่ยาวหรือพอลิเพปไทด์ (Polypeptide) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น โดยการลดพลังงานกระตุ้นหรือพลังงานก่อกัมมันต์ ขั้นตอนในการเร่ง



ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังภาพที่ 2.5 โดยอาศัยสารตั้งต้น (Substrate) เข้าไปจับกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง (Active site) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะเจาะจง สารตั้งต้นจะเข้าจับกันได้พอดีกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ เหมือนแม่กุญแจกับลูกกุญแจ ทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นอย่างรวดเร็วและเกิดสารผลิตภัณฑ์ใหม่ขึ้น เมื่อการเกิดปฏิกิริยาสิ้นสุดลง สารตั้งต้นจะหลุดออกจากบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์กลับมาอยู่ในสภาพเดิมโดยที่โครงสร้างไม่มีการเปลี่ยนแปลง และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาได้ใหม่ [44-48]



ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ [49]

### 2.3.2 เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโปแซนทีนให้เกิดเป็นแซนทีน และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของแซนทีนให้เกิดเป็นกรดยูริก [40] ดังสมการที่ (2.3) และ (2.4)



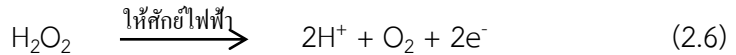
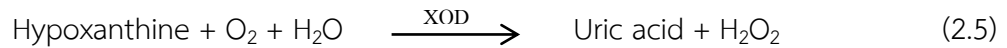
โมเลกุลของแซนทีนออกซิเดสมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ โมลิบดีนัม 2 อะตอม และเหล็ก 8 อะตอม โดยอะตอมของโมลิบดีนัมเป็นโคแฟกเตอร์อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของแซนทีนออกซิเดสแซนทีนออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุล 270 กิโลดาลตัน พบแซนทีนออกซิเดสได้ในพืชและสัตว์ สำหรับมนุษย์จะ

กระจายอยู่ในส่วนต่างๆของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลำไส้และในตับ นอกจากนี้ยังพบอยู่ในปอด สมอง และพลาสมา

## 2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์

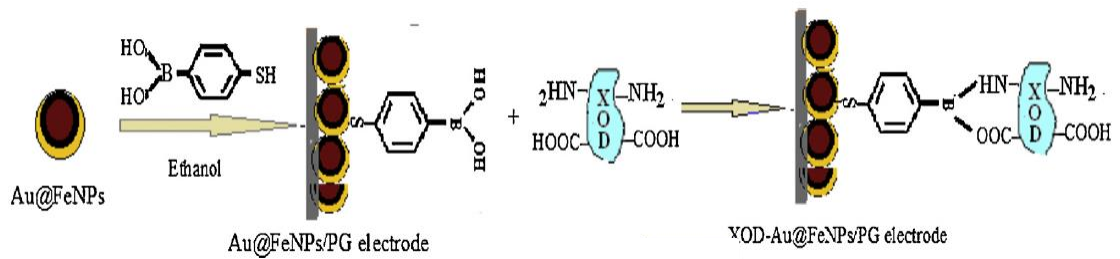
การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์และวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Biosensors) โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของแซนทีนออกซิเดส เป็นการวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อหมูเพื่อตรวจวัดความสด [49] โดยนำตัวอย่างเนื้อหมู 5 กรัม มาบดละเอียดและทำให้เข้ากันกับสารละลายกรดเปอร์คลอริกแช่เย็น ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยปั่นละเอียดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นกรองและปรับสารละลายให้เป็นกลางโดยมีพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-7 โดยเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (Potassium carbonate) และทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างให้ความเย็น จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายแซนทีนออกซิเดสปริมาตร 10 ไมโครลิตร (0.017 unit) ลงในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphas buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ทำการคนเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างเนื้อหมูหรือสารละลายมาตรฐานไฮโปแซนทีนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไป โดยให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 190 วินาที ปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ จึงทำการวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยสัญญาณที่วัดได้จะลดลงสัมพันธ์กับออกซิเจนที่ลดลงเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน วิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง มีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ = 0.992 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = 2.29

งานวิจัยดังกล่าวให้ความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนสูง เนื่องจากเป็นการทำงานของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกัน แต่เป็นการตรวจวัดโดยใช้เอนไซม์อิสระที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการตรวจวัด โดยตรึงเอนไซม์ไว้บนวัสดุรองรับโดยมีข้อดีคือ สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ ทำการตรึงแซนทีนออกซิเดสไว้ที่ขั้วไฟฟ้า เช่น ขั้วไฟฟ้าทอง ขั้วไฟฟ้าเงิน ขั้วไฟฟ้าแพตตินัม เป็นต้น [50] ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของไฮโปแซนทีนกับแซนทีนออกซิเดสซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดยูริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าเพื่อให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดอิเล็กตรอนขึ้นในสารละลาย ดังสมการที่ (2.5) (2.6) และ (2.7) วัดอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า [51-52]



เทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน แบ่งออกตามวิธีตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าได้ 2 ประเภท ได้แก่ แอมเพอร์โรเมตริกไบโอเซนเซอร์ (Amperometric biosensor) และ โปเทนชิโอเมตริกไบโอเซนเซอร์ (Potentiometric biosensor)

งานวิจัยของ Rooma Devi และคณะ ในปี 2013 [53] ได้วิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน เพื่อตรวจสอบคุณภาพความสดของเนื้อสัตว์ต่างๆ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อไก่ และเนื้อปลา ด้วยเทคนิค แอมเพอร์โรเมตริกไบโอเซนเซอร์ โดยการตรึงแซนทีนออกซิเดสลงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (Graphite electrode; PG) ซึ่งทำการปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ก่อนการตรึงแซนทีนออกซิเดสโดยผ่านกระบวนการสะสมด้วยไฟฟ้า (Electrodeposition) เพื่อให้อนุภาคนาโนเหล็กที่เคลือบทอง (Ag@FeNPs) เกาะติดลงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic voltammetry) ทำการจุ่มขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีอนุภาคนาโนเหล็กที่เคลือบทองและให้ศักย์ไฟฟ้าในกระบวนการโพลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) ที่ 20 รอบ ในช่วง -0.6 ถึง +0.6 โวลต์ ให้อัตราการสแกน (Scan rate) ที่ 50 มิลลิโวลต์/วินาที จะได้ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ที่มีอนุภาคนาโนเหล็กที่เคลือบทอง (Au@FeNPs/PG) จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้ามาตรึงแซนทีนออกซิเดส อาศัยหมู่ฟังก์ชันของสาร 4-เมอร์แคปโทฟีนิลบอโรนิก (4-mercapto-phenylboronic acid) เป็นตัวเชื่อม โดยใช้หมู่ไฮดรอกซิล (-COOH) เชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ กระบวนการตรึงเอนไซม์ทำได้โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าลงในสารละลายแซนทีนออกซิเดสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ขั้วไฟฟ้าเอนไซม์ (XOD-Au@FeNPs/PG) ดังภาพที่ 2.6 ซึ่งใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีน ใช้ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าหาอ้างอิง และใช้แพตตินัมเป็น ขั้วไฟฟ้าช่วย ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานลงในสารละลาย อิเล็กโทรไลต์ ให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 ถึง +0.6 โวลต์ ให้อัตราการสแกนที่ 50 มิลลิโวลต์/วินาที เมื่อ เกิดปฏิกิริยาขึ้นจะทำให้ได้กระแสไฟฟ้า



ภาพที่ 2.6 กระบวนการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ [53]

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยวิธีนี้พบว่า สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว โดยเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ที่ 3 วินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.05-150 ไมโครโมล/กรัม มีขีดจำกัดในการตรวจพบที่ 0.05 ไมโครโมล/กรัม จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่ได้ไปตรวจวัดหาปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อไก่ และเนื้อปลา เอนไซม์มีค่ากิจกรรมลดลง 50% เมื่อใช้ทำปฏิกิริยา 200 ครั้ง และสามารถเก็บขั้วไฟฟ้าเอนไซม์ได้มากกว่า 100 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ร่วมกับวิธีทางเคมีไฟฟ้ามีข้อดีคือ ความจำเพาะเจาะจงสูง แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความซับซ้อนในการวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือที่ใช้มีขนาดใหญ่ และผู้วิเคราะห์จะต้องมีทักษะในการใช้เครื่องมือ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาวิธีที่ง่ายขึ้นสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสาร และเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน นั่นคือ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

## 2.5 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

### 2.5.1 หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารส่วนใหญ่จะทำในห้องปฏิบัติการ ผู้ที่ทำการวิเคราะห์ต้องเป็นผู้ที่มีความสามารถ มีความรู้ในการใช้เครื่องมือเฉพาะทาง ใช้เวลานาน ราคาในการวิเคราะห์สูงและใช้สารปริมาณมากในการวิเคราะห์ นักวิทยาศาสตร์จึงพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว โดยอาศัยเทคโนโลยีของไหลจุลภาค (Microfluidic technology) [54] เป็นเทคโนโลยีที่อาศัยการไหลของสารละลายหรือของเหลวปริมาณน้อยไปตามท่อขนาดจุลภาค (Microchannel) เป็นท่อที่มีขนาดเล็กมากและเชื่อมต่อทั่วถึงกัน ดังนั้นจึงใช้สารละลายในการไหลเพียงระดับไมโครลิตร เทคโนโลยีของไหลจุลภาคถูกพัฒนาและนำมาใช้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสาร เพื่อให้การวิเคราะห์เกิดขึ้นทุกขั้นตอนบนตัวตรวจวัดเพียงอันเดียว เรียกว่า อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาค



(Microfluidic device) อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะใช้สารเคมีและสารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย มีราคาถูก สามารถที่จะพกพาไปใช้ในการตรวจวัดสารในภาคสนามได้ สำหรับวัสดุที่นิยมใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ได้แก่ แก้ว ( $\text{SiO}_2$ ) ซิลิคอน พลาสติก และกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษหรืออุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ (Microfluidic paper-based analytical devices;  $\mu$ PAD) มีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์มากขึ้น ซึ่งเปรียบเสมือนการย่อส่วนห้องปฏิบัติการทดลองลงบนกระดาษเพียงแผ่น หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดนี้อาศัยการเคลื่อนที่ของสารละลายไปตามเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษด้วยแรงแคปิลลารี (Capillary action) และเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) โดยสร้างบริเวณกั้นเพื่อกำหนดทิศทางหรือขอบเขตในการเคลื่อนที่ของสารละลาย สามารถทำได้โดยการตัดกระดาษตามลวดลายที่ต้องการ หรือการปรับแต่งกระดาษให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic)

## 2.5.2 วิธีสร้างขอบเขตบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

วิธีการสร้างขอบเขตบนอุปกรณ์ตรวจวัดกระดาษนอกจากวิธีการตัดแล้ว สามารถทำได้โดยปรับแต่งกระดาษให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิคการพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) ทำได้โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV light) ผ่านแม่แบบลงบนกระดาษที่เคลือบสารเคมีที่เกิดปฏิกิริยาไวต่อแสง สารเคมีนี้จะเปลี่ยนเป็นพอลิเมอร์และเป็นลวดลายบนกระดาษ ซึ่งมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ การปรับแต่งคุณสมบัติของกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไข (Wax printing) ทำได้โดยการพิมพ์ไข (Solid wax) ด้วยเครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ทเพื่อสร้างลวดลาย นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ เช่น การปรับสภาพด้วยเลเซอร์ (Laser treatment) การปรับสภาพด้วยพลาสมา (Plasma treatment) การพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อตเตอร์ (Plotter) และการพิมพ์ด้วยหมึก การสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยเทคนิคดังกล่าวบางเทคนิคต้องใช้ขั้นตอนและเครื่องมือที่ยุ่งยาก เช่น เครื่องฉายแสง เครื่องฉายเลเซอร์ เครื่องพล็อตเตอร์ เครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ท เป็นต้น จึงมีการพัฒนาการเทคนิคการพิมพ์ผ่านสกรีนขึ้น โดยสร้างแม่แบบหรือบล็อกสกรีน (Screen block) ขึ้นมา ดังในงานวิจัยของ Dungchai และคณะที่สามารถสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้วิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยไข (Wax screen printing) ซึ่งทำได้โดยนำบล็อกสกรีนวางบนกระดาษ จากนั้นนำไข (Solid wax) มาถูบนบล็อกสกรีน ไขจะถูกระบายลงบนผิวหน้าของกระดาษโดยผ่านรูพรุนของบล็อกสกรีนเป็นลวดลายตามที่ออกแบบไว้ จากนั้นนำกระดาษไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ไขจะละลายและซึมเข้าภายในของกระดาษเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สำหรับการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนโดยใช้ไขจะต้องมีขั้นตอนการให้ความร้อนทำให้ไขละลายบนกระดาษ



ปัจจุบันยังไม่ม้งานวิจัยใดที่สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้วิธีพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิด ซึ่งมีความน่าสนใจ เนื่องจากการสร้างด้วยวิธีพิมพ์สกรีนโดยไม่ต้องใช้ความร้อน และเนื่องด้วยคุณสมบัติของพอลิแลคติกแอซิด ซึ่งสังเคราะห์ได้จากวัตถุดิบทางชีวภาพ โดยผ่านกระบวนการหมักและพอลิเมอไรเซชัน ได้เป็นพอลิเมออร์ มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ เป็นพอลิเมออร์ที่เข้ากันได้กับสารชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว จึงเหมาะกับการนำมาใช้สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่ม้งานวิจัยใดที่ตรวจวัดสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ และตรวจวัดสัญญาณทางสีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคแบบพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิด เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนได้อย่างง่ายขึ้น สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก ไม่ต้องพักชะและใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ในการวิเคราะห์ และสามารถนำไปวิเคราะห์ยังภาคสนามได้



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมี

- 3.1.1 ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.1.2 แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase from bovin milk, EC 1.17.3.2, grade III, 1.0-2.0 units/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.1.3 ฮอสตราดิชเปอร์ออกซิเดส (Peroxidase from horseradish, EC 1.11.1.7, type VI, 250-330 units/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.1.4 โอไดอะนิซิดีน (o-Dianisidine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.1.5 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrogen orthophosphate, Ajex Finechem, Seven Hills, New South Wales, Australia)
- 3.1.6 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen orthophosphate, Ajex Finechem, Seven Hills, New South Wales, Australia)
- 3.1.7 พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, Nature Work, Blair, NE, USA)
- 3.1.8 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, RCI Labscan, Pathumwan, Bangkok, Thailand)

#### 3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 3.2.1 เครื่องสแกน รุ่น Canoscan lide 120 (Canon, Ha Noi, Vietnam)
- 3.2.2 กระดาษโครมาโทกราฟี (chromatography paper) Whatman No. 4 (25 x25 cm pure cellulose paper) (GE Healthcare Little, Buckinghamshire, UK)
- 3.2.3 บล็อกสกรีน (Patterned screening block) ขอบไม้ขนาด 25 x25 ซม. ซึงตริงด้วยผ้าโพลีเอสเตอร์รูพรุน 100 mesh (Chaiyaboon Brothers Co., Ltd., Lam Luk Ka, Pathum Thani, Thailand)
- 3.2.4 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-1601 (SHIMATSU, Japan)

- 3.3.5 เครื่องบดละเอียดด้วยความถี่สูง (Ultrasonic homogenizer)  
รุ่น VCX 130 PB Vibra-cell (Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA)
- 3.2.6 เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10  
(Denver Instrument, USA)
- 3.2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)  
รุ่น AZ series (SARTORIUS Instrument, USA)
- 3.2.8 เครื่องสั่นความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Transonic Digital S ผลิตโดยบริษัท (Elma)
- 3.2.9 ไมโครเซนตริฟิวส์ทิวบ์ (Microcentrifuges tubes) ขนาด 1 และ 2 มิลลิลิตร  
(Molecular Bio Product)
- 3.2.10 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร  
(Brand, Germany)
- 3.2.11 เครื่องเขย่ารุ่น VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, USA)
- 3.2.12 เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น 30106889 (Jouan, UK)
- 3.2.13 เครื่องกวนแม่เหล็ก Magnetic Bar ขนาด 10 เซนติเมตร (IKA RH basic 1, Germany)

### 3.3 การทดลอง

#### 3.3.1 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

##### 3.3.1.1 วิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

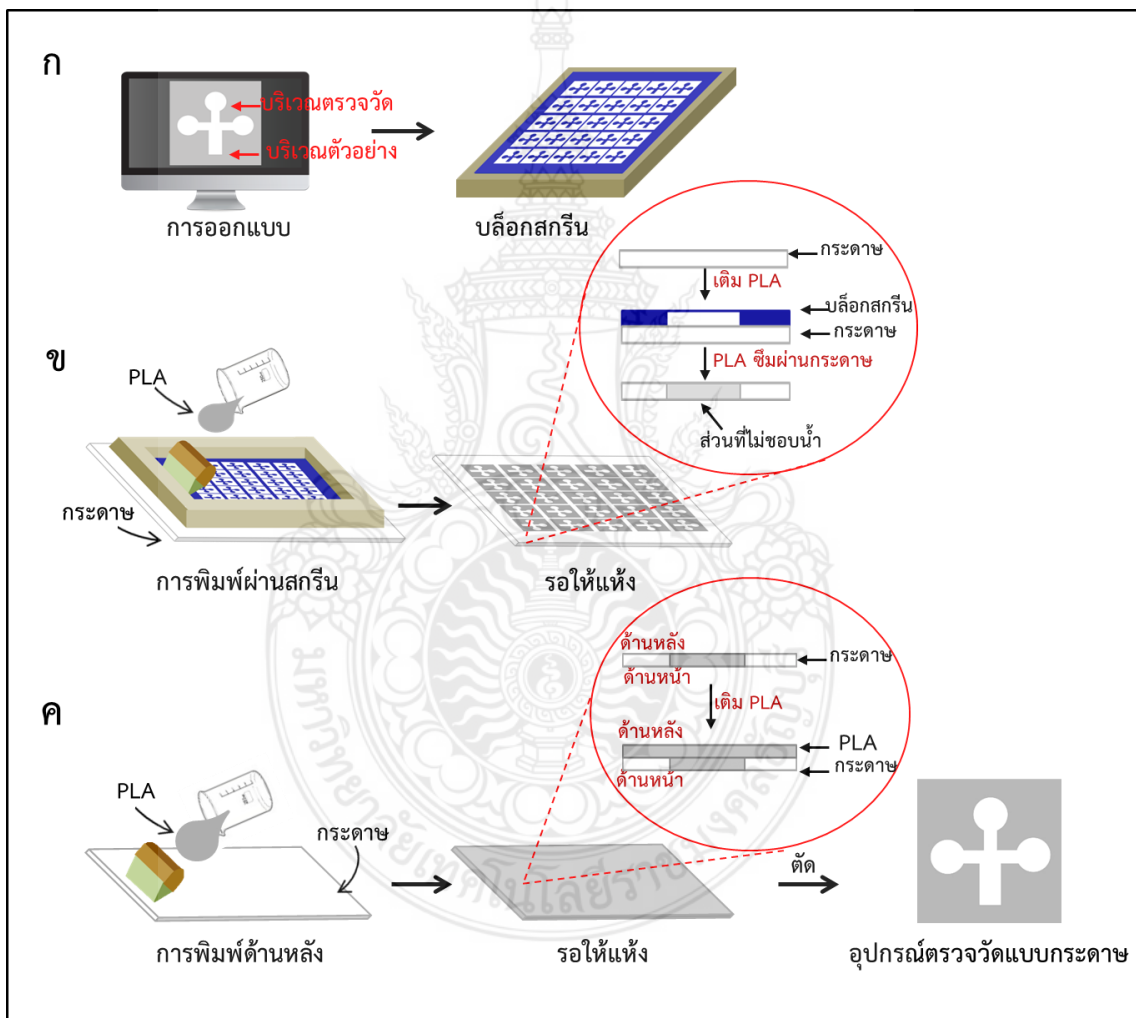
การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์สกรีนโดยใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิด มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ออกแบบรูปแบบ (Pattern) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยโปรแกรม Adobe illustrator ดังรูปที่ 3.1 (ก) สร้างขอบเขตในการเกิดปฏิกิริยาของสารโดยให้มีส่วนขอบน้ำ และส่วนกั้นที่ไม่ขอบน้ำ ส่วนที่ขอบน้ำจะแบ่งออกเป็นบริเวณตัวอย่างที่มีพื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร และบริเวณตรวจวัดมีพื้นที่ 0.5 ตารางเซนติเมตร นำรูปแบบที่ได้นี้ไปสร้างบล็อกสกรีนโดยใช้ผ้าพอลิเอสเตอร์ที่มีรูพรุนขนาด 100 mesh ซึ่งบนฉากไม้ด้วยความตึง 10 นิวตัน

ขั้นที่ 2 สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยทำการพิมพ์พอลิแลคติกแอซิดลงบนด้านหน้าและด้านหลังของกระดาษโครมาโทกราฟี การพิมพ์ด้านหน้าจะใช้วิธีการพิมพ์ผ่านสกรีน ทำได้โดยวางบล็อกสกรีนที่สร้างขึ้นไว้บนกระดาษโครมาโทกราฟีขนาด 25 × 25 เซนติเมตร ดังภาพที่ 3.1 (ข) จากนั้นเติมสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร

ลงด้านบนของบล็อกสกรีน ปาดสารละลายพอลิแลคติกแอซิดไปทางเดียวกันให้ซึมผ่านบล็อกสกรีน ไปยังกระดาษโครมาโทกราฟี วางไว้ให้แห้งจึงนำมาพิมพ์ด้านหลัง

ขั้นที่ 3 ทำการพิมพ์ด้านหลังเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารเคมีในส่วนที่ซอบน้ำ ทำได้โดยการเทสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษโครมาโทกราฟีด้านหลังได้โดยตรง ดังภาพที่ 3.1 (ค) จากนั้นปาดสารละลายพอลิแลคติกแอซิดไปทางเดียวกันให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งจึงนำมาตัด จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษขนาด  $3.5 \times 3.5$  เซนติเมตร สำหรับใช้ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนต่อไป



ภาพที่ 3.1 วิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (ก) การออกแบบบล็อกสกรีน (ข) การพิมพ์สารละลายพอลิแลคติกแอซิดลงบนกระดาษด้านหน้า (ค) การพิมพ์สารละลายพอลิแลคติกแอซิดลงบนกระดาษด้านหลัง

### 3.3.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

วิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับงานวิจัยนี้ ซึ่งจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาและประสิทธิภาพในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน ปัจจัยดังกล่าว ได้แก่ ความหนืดของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้ในการพิมพ์กระดาษ เนื่องจากพอลิแลคติกแอซิดมีหน้าที่เป็นบริเวณกั้นในการเกิดปฏิกิริยาของสารเคมี โดยการพิมพ์กระดาษด้านหน้าสารละลายพอลิแลคติกแอซิดควรมีความหนืดที่เหมาะสม สามารถเคลื่อนที่ผ่านเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษได้ดี และไม่ไหลเคลื่อนที่เข้าไปยังขอบเขตที่ขอบน้ำ สำหรับการพิมพ์ด้านหลังเพื่อป้องกันการทะลุของสารเคมี สารละลายพอลิแลคติกแอซิดควรเคลือบอยู่ที่พื้นผิวของกระดาษเท่านั้น ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดจึงต้องเหมาะสม จึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

โดยการศึกษาจะเปลี่ยนแปลงเฉพาะปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ส่วนปัจจัยอื่นกำหนดให้คงที่ และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะทำการเลือกสภาวะที่อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พอลิแลคติกแอซิดสามารถกั้นบริเวณที่ขอบน้ำและไม่ขอบน้ำได้ดีที่สุด โดยจะศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

#### 1) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า ได้แก่ ร้อยละ 1 5 10 15 และ 20 โดยมวลต่อปริมาตร โดยเตรียมสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้พิมพ์ผ่านสกรีนลงบนกระดาษด้านหน้า โดยใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิดความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตรในการพิมพ์กระดาษด้านหลัง จากนั้นใช้สารละลายเมทิลีนบลูเป็นสารละลายที่มีสีฟ้าเป็นสารทดสอบ โดยหยดสารละลายเมทิลีนบลูปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่างของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที สังเกตการแพร่ของเมทิลีนบลูในบริเวณตรวจวัด

#### 2) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง ได้แก่ ร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 โดยมวลต่อปริมาตร เตรียมสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิดความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตรสำหรับพิมพ์ลงบนกระดาษด้านหน้า จากนั้นทำการพิมพ์กระดาษด้านหลังด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษใช้สารละลายเมทิลีนบลูเป็นสารละลายที่มีสีฟ้าเป็นสารทดสอบ โดยหยดสารละลายเมทิลีนบลูปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่างของอุปกรณ์



ตรวจวัดแบบกระดาษ ที่งไว้ให้แห้ง 5 นาที สังเกตการแพร่ของเมทิลีนบลูจากบริเวณตัวอย่างไปยัง บริเวณตรวจวัด

### 3.3.2 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

#### 3.3.2.1 วิธีการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น ดัง ภาพที่ 3.2 ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 ปีเปตสารละลายมาตรฐานไฮโปแซนทีน (หรือสารละลายตัวอย่าง) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง

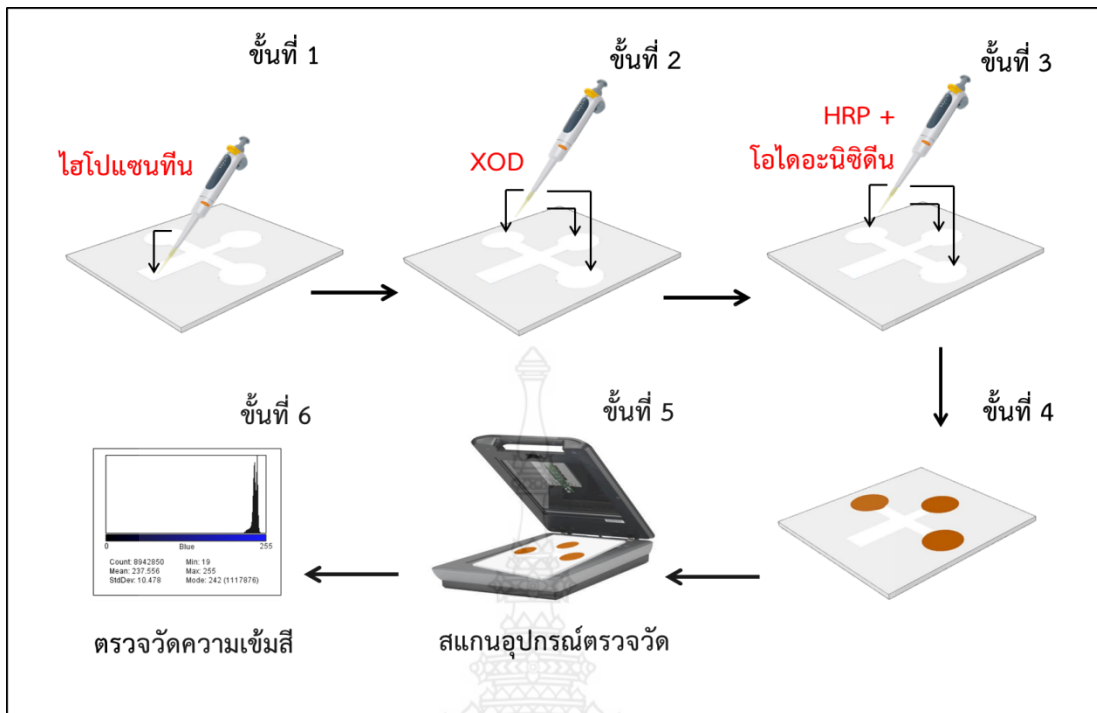
ขั้นที่ 2 ปีเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที

ขั้นที่ 3 ปีเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโดอะนิซิดีนความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ (1:1) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที

ขั้นที่ 4 ตรงบริเวณตรวจวัดสารละลายจะเกิดสีน้ำตาลขึ้น

ขั้นที่ 5 นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนด้วยเครื่องสแกนกระดาษ

ขั้นที่ 6 วัดค่าความเข้มสีบนบริเวณตรวจวัดด้วยโปรแกรม Image J โดยใช้ เณดสีน้ำเงินในการวิเคราะห์ และนำค่าความเข้มสีที่ได้จากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆไป สามารถสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่าง



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

### 3.3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

งานวิจัยนี้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดไฮโปแซนทีน ได้แก่ ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด ความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดส ความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส ค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายแซนทีนออกซิเดส ค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโปแซนทีนกับแซนทีนออกซิเดส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส และความเข้มข้นของสารละลายโอไดอะนิซิดีน โดยการศึกษาจะเปลี่ยนแปลงเฉพาะปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ส่วนปัจจัยอื่นกำหนดให้คงที่ แต่ละปัจจัยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีขั้นตอนดังนี้

#### 1) ศึกษาปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง

ปริมาตรของสารเคมีที่หยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยปริมาตรของสารเคมีที่หยดลงบริเวณตัวอย่างจะต้องมีมากพอสำหรับแพร่ไปยังบริเวณตรวจวัดเพื่อเกิดปฏิกิริยา จึงทำการศึกษาปริมาตรของสารเคมีที่เหมาะสมสำหรับหยดลงบน

บริเวณตัวอย่าง โดยการศึกษาจะใช้สารละลายเมทิลีนบลูเป็นสารทดสอบ ปริมาตรที่ทำการศึกษา ได้แก่ 10 15 20 25 และ 30 ไมโครลิตร การทดลองทำได้โดยปิเปตสารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ปริมาตรต่างๆที่ทำการศึกษาลงบนบริเวณตัวอย่างของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ วางทิ้งไว้ 1 นาที เหนือการพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่สารละลายเมทิลีนบลูสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณตรวจวัดได้เต็มบริเวณ

### 2) ศึกษาปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด

ปริมาตรของสารเคมีที่หยดลงบริเวณตรวจวัดมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีของไฮโปแซนทีน โดยปริมาตรจะต้องมากพอสำหรับการแพร่ได้เต็มบริเวณตรวจวัด จึงทำการศึกษาปริมาตรของสารเคมีที่เหมาะสมในบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยการศึกษาจะใช้สารละลายเมทิลีนบลูเป็นสารทดสอบ ปริมาตรที่ทำการศึกษา ได้แก่ 1 2 3 4 และ 5 ไมโครลิตร การทดลองทำได้โดยปิเปตสารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตรต่างๆที่ต้องการศึกษาลงบนบริเวณตรวจวัดของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ วางทิ้งไว้ 1 นาที เหนือการพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่สารละลายเมทิลีนบลูสามารถแพร่ได้เต็มบริเวณและไม่ไหลออกนอกขอบเขตของบริเวณตรวจวัด

### 3) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดส

แซนทีนออกซิเดส คือ เอนไซม์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยากับไฮโปแซนทีน ดังสมการที่ 1 ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดสจึงมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีน จึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแซนทีนออกซิเดส ความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ได้แก่ 0.001 0.01 0.1 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การทดลองทำได้โดยปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง และปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้ความเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไอโอดอนิซิดีนความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ (1:1) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้ความเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

#### 4) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส

ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สำหรับติดตามปริมาณไฮโปแซนทีน ดังสมการที่ 3 ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสจึงมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีน จึงศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.001 0.01 0.1 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การทดลองทำได้โดยปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัดให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำการศึกษา และโอไดอะนิซินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์พิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

#### 5) ศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายแซนทีนออกซิเดส

ความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการทำงานของแซนทีนออกซิเดส โดยทำการศึกษาจากแซนทีนออกซิเดสที่ละลายในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ได้แก่ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 การทดลองทำได้ปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่างและปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอชต่างๆที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และโอไดอะนิซินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์พิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

6) ศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส

ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการทำงานของฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส จึงทำการศึกษาฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่ละลายในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ได้แก่ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 การทดลองทำได้ปีเปิดสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่างและปีเปิดสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 7.00 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปีเปิดสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอชต่างๆที่ต้องการศึกษา และโอไดอะนิซิดีนความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

7) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน

เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานปฏิกิริยาของไฮโปแซนทีน จึงทำการศึกษาค้นหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของไฮโปแซนทีนที่มีแซนทีนออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาในเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.5 1 2 3 5 7 และ 9 นาที การทดลองทำได้ปีเปิดสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง และปีเปิดสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 7 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกันที่ต้องการศึกษา จากนั้นปีเปิดสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 6.50 และโอไดอะนิซิดีนความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด



8) ศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์  
กับโอโดอะนิซิน

ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอโดอะนิซินที่มีฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยให้เวลาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1 3 5 7 9 11 และ 13 นาที การทดลองทำได้ปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง และปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 7.00 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 6.50 และโอโดอะนิซิน ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกันที่ต้องการศึกษา จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

9) ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซิน

ความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซินเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ จึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ได้แก่ 0.1 0.3 0.5 1 2 3 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ การทดลองทำได้ปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง และปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 7.00 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 6.50 และโอโดอะนิซินความเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และเกณฑ์การพิจารณาการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะการทดลองที่ให้ค่าความเข้มสีที่สูงที่สุด

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ศึกษาในการพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดไฮโปแซนทีน

การทดลอง	สภาวะที่ทดลอง
1. กระบวนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	
1.1) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า (ร้อยละโดยมวล/ปริมาตร)	1 5 10 15 และ 20
1.2) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง (ร้อยละโดยมวล/ปริมาตร)	5 10 15 20 และ 25
2. กระบวนการตรวจวัดไฮโปแซนทีน	
2.1) ปริมาตรของสารเคมีปริมาตรตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	10 15 20 25 และ 30
2.2) ปริมาตรของสารเคมีปริมาตรตรวจวัด (ไมโครลิตร)	1 2 3 4 และ 5
2.3) ความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.001 0.01 0.1 0.5 1 2 และ 4
2.4) ความเข้มข้นของสารละลายฮอสตราดิชเปอร์ออกซิเดส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.0001 0.001 0.01 0.1 0.5 1 และ 2
2.5) ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายแซนทีนออกซิเดส (พีเอช)	5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50
2.6) ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายฮอสตราดิชเปอร์ออกซิเดส (พีเอช)	5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50
2.7) เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโปแซนทีนกับแซนทีนออกซิเดส (นาที)	0.5 1 2 3 5 7 และ 9
2.8) เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับฮอสตราดิชเปอร์ออกซิเดส (นาที)	1 3 5 7 9 11 และ 13
2.9) ความเข้มข้นของสารละลายไอโดอะนิซิน (มิลลิโมลาร์)	0.1 0.3 0.5 1 2 3 4 และ 5

3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน  
การศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบ  
กระดาษที่สร้างขึ้นมา เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพและข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์นี้ โดยงานวิจัยนี้ศึกษา  
หาประสิทธิภาพต่างๆ ดังต่อไปนี้

#### 3.3.3.1 การศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

##### 1) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้  
สร้างขึ้นตรวจวัดไฮโปแซนทีน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลอง  
เดียวกัน การทดลองจะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ โดยปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีน ปริมาตร 25  
ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง และปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/  
มิลลิลิตร ที่พีเอช 7.00 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที  
จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่  
พีเอช 6.50 และโอโดอะนิซินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด  
และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัด  
แบบกระดาษไปสแกนและวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และนำค่าความเข้มสีที่วัดได้มา  
คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation; % RSD)

##### 2) การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่  
ได้สร้างขึ้นตรวจวัดไฮโปแซนทีน โดยใช้สารละลายมาตรฐานไฮโปแซนทีน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/  
ลิตร จำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน คือ เปลี่ยนผู้ทดลอง การทดลองจะใช้  
สภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ โดยปิเปตสารละลายไฮโปแซนทีน ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณ  
ตัวอย่าง และปิเปตสารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 7.00  
ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปต  
สารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 6.50  
และโอโดอะนิซินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลา  
ในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบ  
กระดาษไปสแกนและวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และนำค่าความเข้มสีที่วัดได้มาคำนวณหา  
ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

### 3.3.3.2 การศึกษาความถูกต้องของวิธี

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานไฮโปแซนทีนที่ความเข้มข้น 15 และ 20 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อปลา เนื้อไก่ และน้ำปลา จากนั้นตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยเปิดสารละลายไฮโปแซนทีนและสารละลายแซนทีนออกซิเดสลงบนบริเวณตัวอย่าง จากนั้นเปิดสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสและโอไดอะนิซิดีน ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารละลายมาตรฐานไฮโปแซนทีน โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Recovery} \left[ \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \right] = \quad \times 100$$

โดย  $C_{sp}$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

$C_s$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

$C_a$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

### 3.3.3.3 การศึกษาความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐานไฮโปแซนทีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0.1 ถึง 120 มิลลิกรัม/ลิตร การทดลองจะใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยเปิดสารละลายไฮโปแซนทีนและสารละลายแซนทีนออกซิเดสลงบนบริเวณตัวอย่าง จากนั้นเปิดสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสและโอไดอะนิซิดีน ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของสารละลายไฮโปแซนทีนกับค่าความเข้มสีที่ตรวจวัดได้

#### 3.3.3.4 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยตรวจวัดไฮโปแซนทีนในสารละลายแบลงค์ การทดลองใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยปิเปตสารละลายแบลงค์และสารละลายแซนทีนออกซิเดสลงบนบริเวณตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิและโอโดอะนิซิดีน ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J ทำการทดลองซ้ำจำนวน 7 ครั้ง จากนั้นนำค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ไปคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (ขีดจำกัดในการตรวจพบ = 3SD)

#### 3.3.3.5 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยตรวจวัดไฮโปแซนทีนในสารละลายแบลงค์ การทดลองใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยปิเปตสารละลายแบลงค์และสารละลายแซนทีนออกซิเดสลงบนบริเวณตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิและโอโดอะนิซิดีน ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J ทำการทดลองซ้ำจำนวน 7 ครั้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เพื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ (ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ = 10SD) โดยความเข้มข้นที่ได้จะต้องมีความเที่ยงและความถูกต้อง

#### 3.3.3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง

ศึกษาความจำเพาะของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้สารทดสอบ ได้แก่ กรดยูริก ฮีสตามีน และไทรามีน แทนสารละลายไฮโปแซนทีน ซึ่งเป็นสารที่คาดว่าจะมีผลต่อการตรวจวัดไฮโปแซนทีน และเป็นสารที่พบได้ในตัวอย่าง การทดลองใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยปิเปตสารที่ใช้ทดสอบดังกล่าวความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร และสารละลายแซนทีนออกซิเดสลงบนบริเวณตัวอย่าง จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่างฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสและโอโดอะนิซิดีนลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากไฮโปแซนทีนที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 50 มิลลิกรัม/ลิตร



### 3.3.3.7 การศึกษาอายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษของงานวิจัยนี้ อาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ โดยใช้เอนไซม์และสารเคมีในการเกิดปฏิกิริยากับไฮโปแซนทีน ดังนั้น หากแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง หรือสารเคมีเกิดการสลายตัวจะส่งผลต่อการตรวจวัด จึงทำการศึกษา อายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน โดยนำอุปกรณ์ตรวจวัดที่ สร้างขึ้นตรวจวัดสารละลายไฮโปแซนทีนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ตามขั้นตอนที่ศึกษาได้ ในงานวิจัยนี้ ทำการตรวจวัดการตอบสนองทุกๆ สัปดาห์ ในสภาวะการทดลองเดียวกัน โดยเก็บรักษา อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง และเก็บรักษาสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ทำ ปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ได้จากการตรวจวัดในแต่ละสัปดาห์มา หาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน โดย กำหนดให้ค่าการตอบสนองสัปดาห์ที่ 1 ของอุปกรณ์ตรวจวัดมีประสิทธิภาพเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

### 3.3.4 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง

ตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริงด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อปลา เนื้อไก่ ลูกชิ้นเนื้อวัว น้ำปลา ปลาหมึกกระป๋อง ไส้กรอกไก่ แฮมหมู และปูอัด

#### 3.3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อปลา เนื้อไก่ ลูกชิ้นเนื้อวัว ปลาหมึก ในน้ำแร่ ไส้กรอกไก่ แฮมหมู และปูอัด ทำการเตรียมตัวอย่างโดยอ้างอิงวิธีจากงานวิจัยของ Devi และคณะ [35] ทำการชั่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำ ตัวอย่างไปบดละเอียดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกโฮโมจีไนเซอร์เป็นเวลา 10 นาที และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 7 มิลลิกรัม ลงไปในสารละลายผสมที่ได้ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที สูดถ่ายแยกสารละลายใสออกด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร สารละลายใสที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษต่อไป สำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำปลา การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการเจือจางด้วยสารละลาย ฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 7.00

#### 3.3.4.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง

ทำการตรวจวัดไฮโปแซนทีนในสารละลายตัวอย่างจริงที่เตรียมไว้ด้วยสภาวะ ที่เหมาะสม โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง และปิเปต สารละลายแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 7.00 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด ปล่อยให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายผสมระหว่าง

ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 6.50 และโอโดอะนิซิตินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตรวจวัด และให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J คำนวณหาความเข้มข้นของไฮโปแซนทีนที่ตรวจวัดได้ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไฮโปแซนทีนกับค่าความเข้มสี

### 3.3.4.3 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ไฮโปแซนทีนระหว่างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับวิธีทางสเปกโทรสโคปี

วิเคราะห์ปริมาณไฮโปแซนทีนโดยใช้วิธีคัลเลอร์ริเมทริกสเปกโทรสโคปี ทำการทดลองโดย ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายแซนทีนออกซิเดส 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และสารละลายโอโดอะนิซิตินความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในไมโครเซนติฟิวส์ทิวบ์ ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาล นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของไฮโปแซนทีนที่ตรวจวัดได้ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไฮโปแซนทีนกับค่าดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ เปรียบเทียบผลที่ได้จากอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับผลที่ได้จากวิธีทางสเปกโทรสโคปี โดยนำผลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี (แกน x) และปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (แกน y) และพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

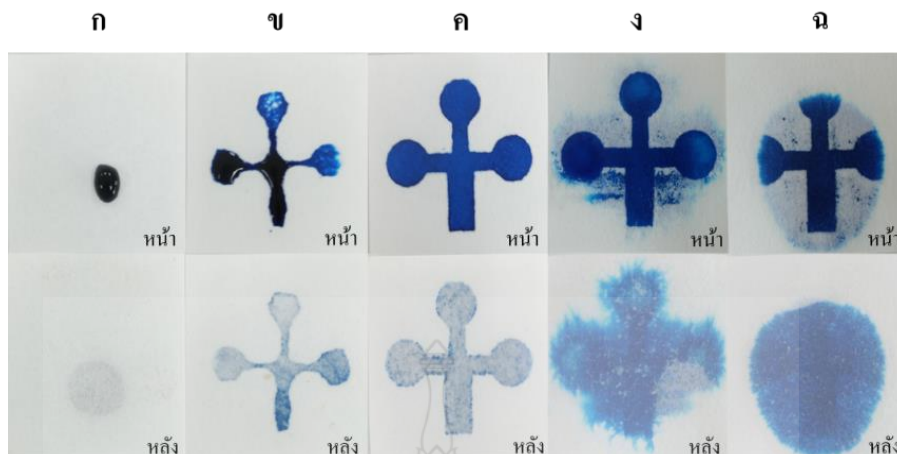
#### 4.1 ผลการศึกษาวิธีสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีพิมพ์สกรีน โดยพิมพ์สารละลายพอลิแลคติกแอซิดลงบนกระดาษโครมาโทกราฟี และทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า และความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง ผลการทดลองดังต่อไปนี้

##### 4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์

###### กระดาษด้านหน้า

ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า ได้แก่ ร้อยละ 1 5 10 15 และ 20 โดยมวล/ปริมาตร โดยใช้สารละลายเมทิลีนบลูเป็นสารทดสอบ ผลการทดลองดังภาพที่ 4.1 พบว่า สารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 โดยมวล/ปริมาตร เมทิลีนบลูไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เต็มรูปแบบ เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดมีความหนืดต่ำ จึงเคลื่อนที่ออกนอกขอบบวมบางส่วนที่ขอบน้ำ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 และ 20 โดยมวล/ปริมาตร สารละลายเมทิลีนบลูไหลออกนอกขอบเขต เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดมีความหนืดสูงจึงทำให้การเคลื่อนที่ไปตามเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษได้ไม่ดี ประสิทธิภาพในการเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำไม่สมบูรณ์ สำหรับที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวล/ปริมาตร สารละลายพอลิแลคติกแอซิดสามารถซึมผ่านกระดาษโครมาโทกราฟีได้ดีและไม่ไหลออกนอกขอบเขต สารละลายเมทิลีนบลูสามารถไหลได้เต็มรูปแบบ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวล/ปริมาตร คือ สภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษต่อไป



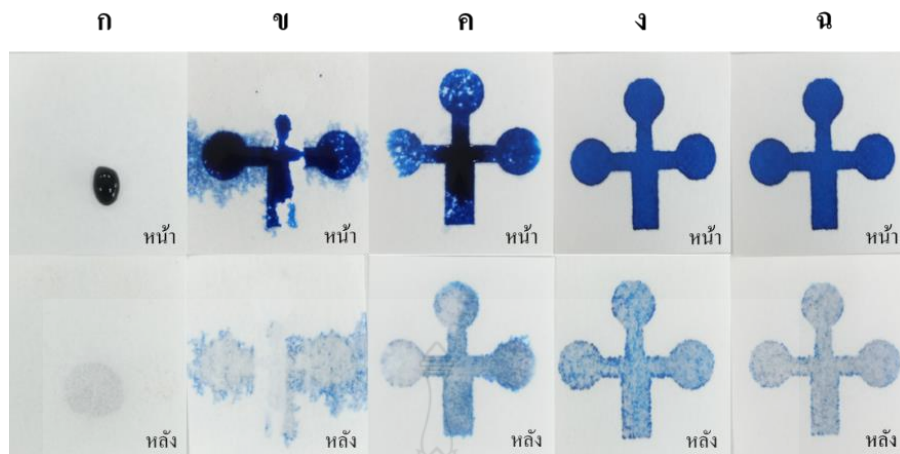
ภาพที่ 4.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหน้า

ก) 1% ข) 5% ค) 10% ง) 15% และ จ) 20% (โดยมวล/ปริมาตร)

#### 4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์

กระดาษด้านหลัง

ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง ได้แก่ ร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 โดยมวล/ปริมาตร โดยใช้สารละลายเมทิลีนบลูหยดเป็นสารทดสอบ ผลการทดลองดังภาพที่ 4.2 พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 10 และ 15 โดยมวล/ปริมาตร เมื่อหยดสารละลายเมทิลีนบลูพบว่าสารละลายไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เต็มรูปแบบ เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์มีความหนืดต่ำ ทำให้การสร้างขอบเขตไม่ตรงตามรูปแบบที่ต้องการ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25 โดยมวล/ปริมาตร สารละลายเมทิลีนบลูสามารถเคลื่อนที่ได้เต็มรูปแบบ เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดมีความหนืดที่มากพอจึงสามารถสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษได้ตรงตามรูปแบบ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวล/ปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง เนื่องจากใช้พอลิแลคติกแอซิดความเข้มข้นต่ำกว่าร้อยละ 25 โดยมวล/ปริมาตร ช่วยประหยัดในการใช้สารเคมี



ภาพที่ 4.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหลัง  
 ก) 5% ข) 10% ค) 15% ง) 20% และ จ) 25% (โดยมวล/ปริมาตร)





## 4.2 ผลการศึกษาวิธีตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สภาวะที่เหมาะสมของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน ได้แก่ ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด ความเข้มข้นของสารละลาย แซนทีนออกซิเดส ความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส ค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายแซนทีนออกซิเดส ค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอไดอะนิซิดีน และความเข้มข้นของสารละลายโอไดอะนิซิดีน ผลการทดลองดังต่อไปนี้

### 4.2.1 ผลการศึกษาปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง

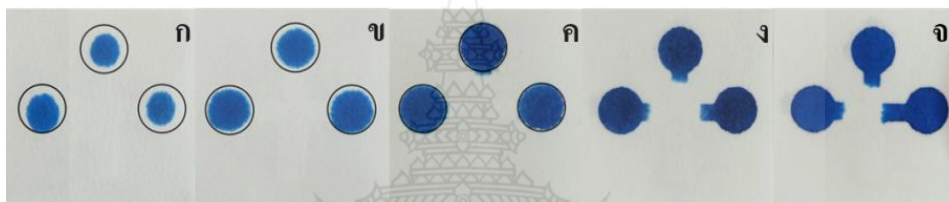
ศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีที่หยดลงบนบริเวณตัวอย่าง ได้แก่ 10 15 20 25 และ 30 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายเมทิลีนบลูหยดเป็นสารทดสอบ ผลการทดลองดังภาพที่ 4.3 พบว่า ที่ปริมาตร 10 15 และ 20 ไมโครลิตร ปริมาตรของสารละลายเมทิลีนบลูเพียงพอสำหรับเคลื่อนที่ไปยังบริเวณตรวจวัดได้ ที่ปริมาตรตั้งแต่ 25 ไมโครลิตร ขึ้นไป สารละลายเมทิลีนบลูสามารถไหลไปยังบริเวณตรวจวัดได้ ดังนั้น จึงเลือกปริมาตร 25 ไมโครลิตร เป็นปริมาตรที่ใช้ในการหยดสารละลายไฮโปแซนทีนหรือสารตัวอย่างลงบนบริเวณตรวจวัดต่อไป



ภาพที่ 4.3 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง ก) 10 ข) 15 ค) 20 ง) 25 และ จ) 30 ไมโครลิตร

#### 4.2.2 ผลการศึกษาปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด

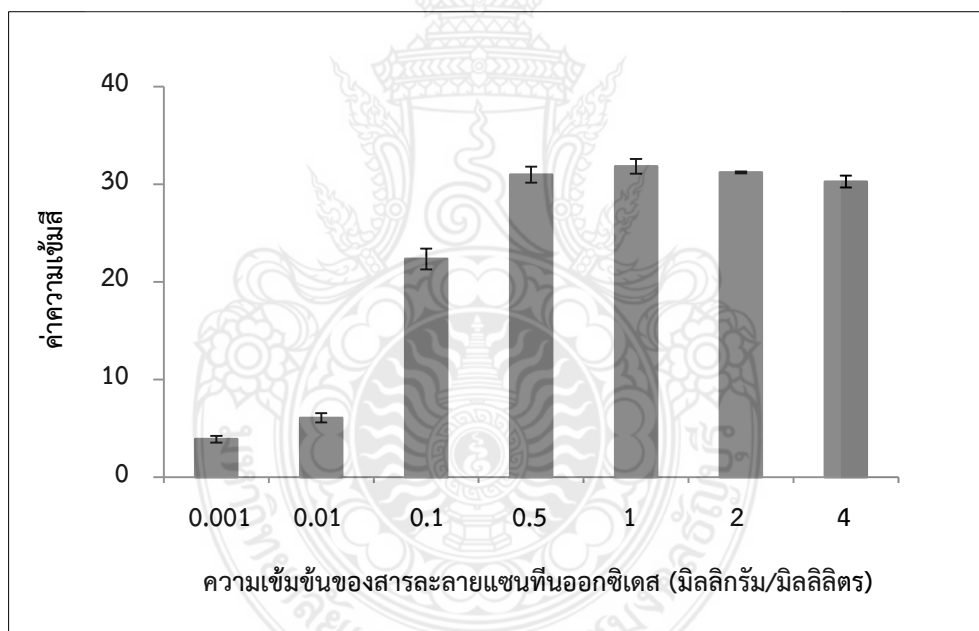
ศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีที่หยดลงบนบริเวณตัวอย่าง ได้แก่ 1 2 3 4 และ 5 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายเมทิลีนบลูหยดเป็นสารทดสอบ ผลการทดลองดังภาพที่ 4.4 พบว่าที่ปริมาตร 1 และ 2 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูแพร่ไม่เต็มบริเวณตรวจวัด เนื่องจากปริมาตรไม่เพียงพอ ที่ปริมาตร 4 และ 5 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูเคลื่อนที่ออกนอกบริเวณตรวจวัด เนื่องจากมีปริมาตรมากเกินไป และที่ปริมาตร 3 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูสามารถเคลื่อนที่ได้เต็มและไม่ออกนอกบริเวณตรวจวัด แสดงให้เห็นว่าที่ปริมาตร 3 ไมโครลิตร คือปริมาตรที่เหมาะสม ดังนั้น จึงเลือกปริมาตรดังกล่าวในการหยดสารเคมีลงบนบริเวณตรวจวัดต่อไป



ภาพที่ 4.4 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตรวจวัด ก) 1 ข) 2 ค) 3 ง) 4 และ จ) 5 ไมโครลิตร

#### 4.2.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแชนทีนออกซิเดส

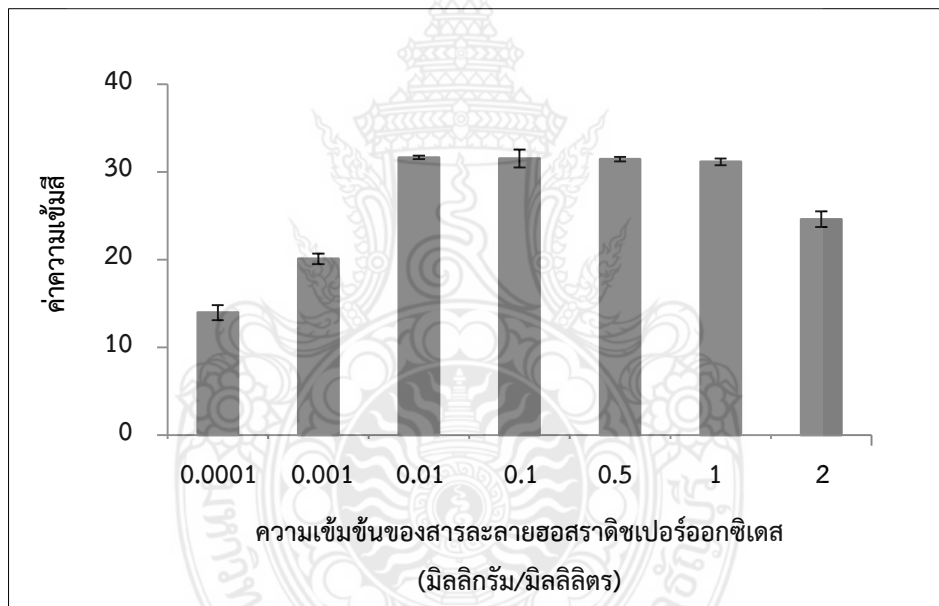
ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแชนทีนออกซิเดส ได้แก่ 0.001 0.01 0.1 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดไฮโปแชนทีนโดยใช้แชนทีนออกซิเดสความเข้มข้นต่างๆและวัดค่าความเข้มสี ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.5 พบว่า ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.001 – 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อความเข้มข้นมากขึ้นจะได้ค่าความเข้มสีมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณแชนทีนออกซิเดสทำให้สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแชนทีนได้มากขึ้น ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีสีน้ำตาลจึงสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณารูปภาพจะเห็นว่าที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ค่าความเข้มสีไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากไฮโปแชนทีนเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้แชนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารละลายแชนทีนออกซิเดส 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร คือความเข้มข้นที่เหมาะสม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าว ในการตรวจวัดไฮโปแชนทีนต่อไป



ภาพที่ 4.5 ค่าความเข้มสีเมื่อตรวจวัดไฮโปแชนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายแชนทีนออกซิเดสที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.001 0.01 0.1 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

#### 4.2.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส

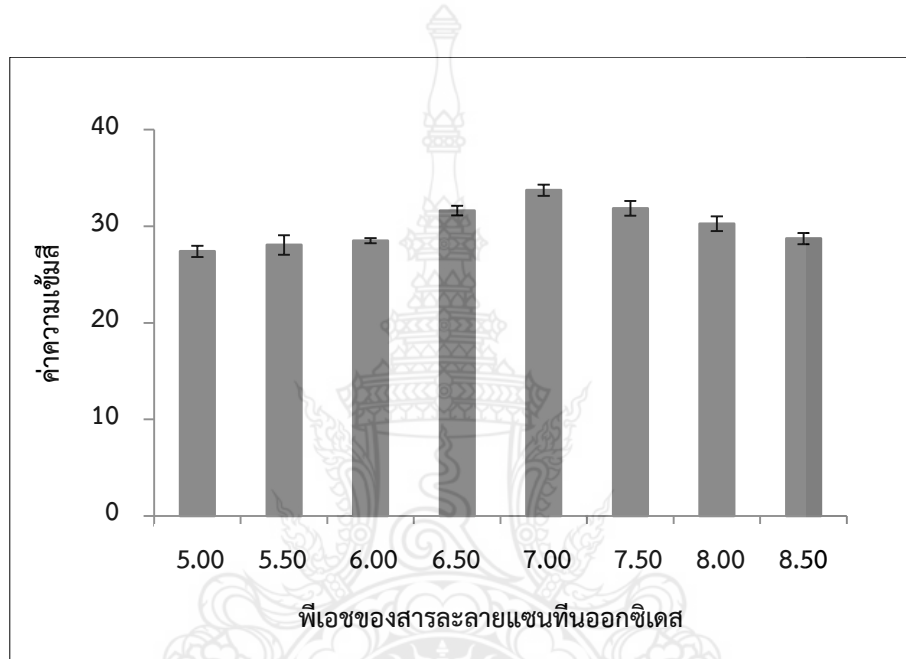
ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ 0.0001 0.001 0.01 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้นต่างๆและวัดค่าความเข้มสี ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.6 พบว่า ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.001 – 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะได้ค่าความเข้มสีมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับไฮโดอะนิซิดีนได้ยิ่งขึ้น ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีสีน้ำตาลจึงสูงขึ้น และเมื่อพิจารณารูปภาพจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าความเข้มสีคงที่ เนื่องจากซบสเตรทอาจถูกใช้ไปหมดจึงไม่ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม



ภาพที่ 4.6 ค่าความเข้มสีเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.0001 0.001 0.01 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

#### 4.2.5 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายแชนทีนออกซิเดส

ทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายแชนทีนออกซิเดส ได้แก่ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 เมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้สารละลายแชนทีนออกซิเดสที่พีเอชต่างๆและวัดค่าความเข้มข้น ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.7 พบว่า ที่ค่าพีเอช ในช่วง 5.00 – 7.00 แนวโน้มค่าความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้น โดยสูงสุดที่พีเอช 7.00 ดังนั้นจึงเลือกพีเอช 7.00 เป็นสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายแชนทีนออกซิเดส

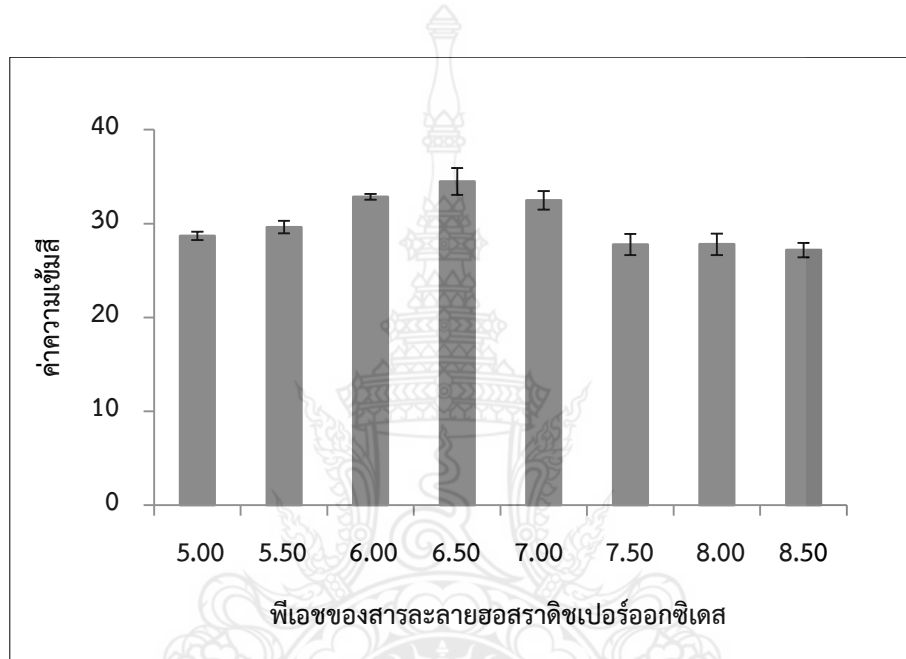


ภาพที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้สารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน ได้แก่ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50



#### 4.2.6 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส

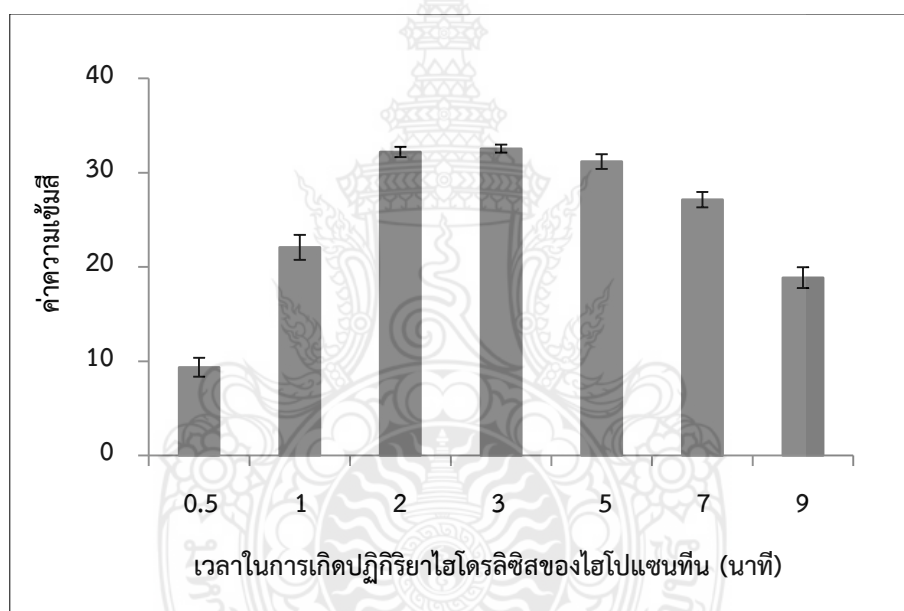
ทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50 เมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้สารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่พีเอชต่างๆและวัดค่าความเข้มข้น ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.8 พบว่าที่พีเอช 6.50 ให้ค่าความเข้มข้นจะสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกพีเอช 7.00 เป็นสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้สารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดสที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน ได้แก่ 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 และ 8.50

#### 4.2.7 ผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน

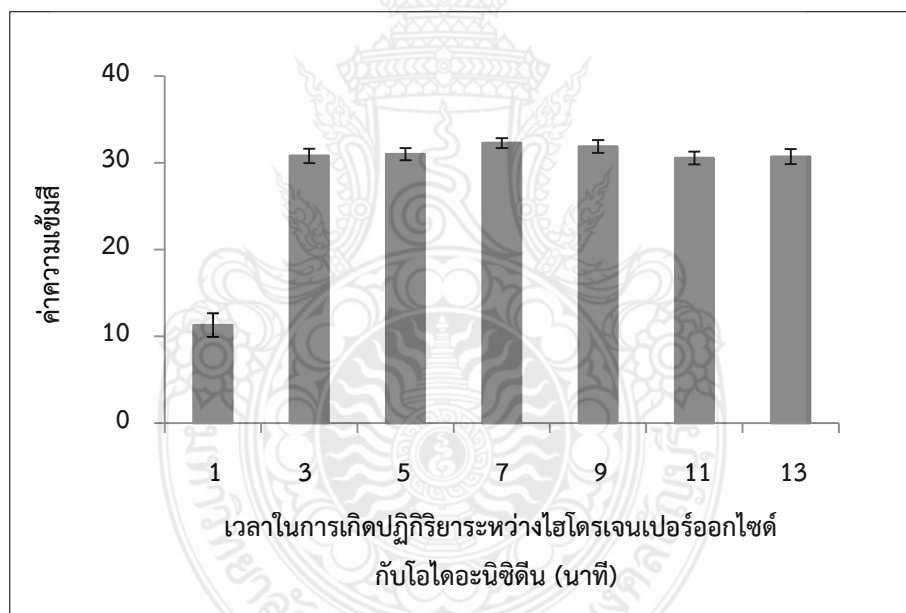
เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดไฮโปแซนทีนจึงทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสม เมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.5 1 2 3 5 7 และ 9 นาที และนำไปวัดค่าความเข้มข้น ผลการทดลองดังภาพที่ 4.9 พบว่า เมื่อให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นค่าความเข้มข้นจะสูงขึ้น เนื่องจากเมื่อเวลามากขึ้นไฮโปแซนทีนจะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้มาก และเมื่อพิจารณากราฟพบว่าเมื่อเวลาที่ 2 นาที ค่าความเข้มข้นที่ได้สูงที่สุด แต่หลังจาก 2 นาที ค่าความเข้มข้นที่ และค่อยๆ ลดลงในนาที่ที่ 5 เนื่องจากการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของสมการขั้นแรกปฏิกิริยาจึงเกิดไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงเลือกเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสม



ภาพที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.5 1 2 3 5 7 และ 9 นาที

#### 4.2.8 ผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับ โอโดะนิซิดีน

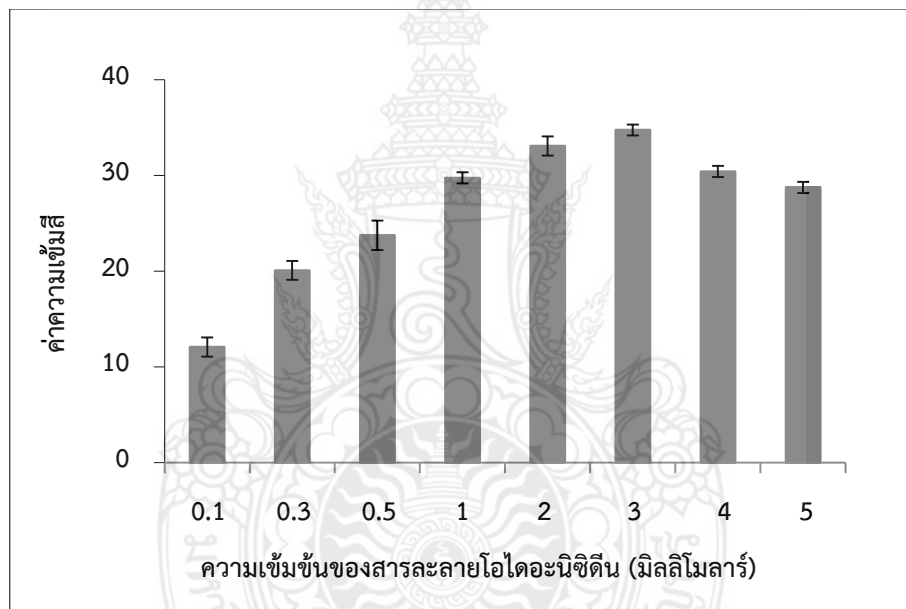
ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอโดะนิซิดีน ได้แก่ 1 3 5 7 9 11 และ 13 นาที และนำไปวัดค่าความเข้มข้น ผลการทดลองดังภาพที่ 4.10 พบว่า เมื่อให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นค่าความเข้มข้นจะสูงขึ้น เนื่องจากเวลามากขึ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยาโอโดะนิซิดีนได้มากขึ้น และพบว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที ค่าความเข้มข้นที่ได้สูงที่สุด เนื่องจากเป็นเวลาที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอโดะนิซิดีนสามารถเกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์พอดี แต่หลังจาก 3 นาที พบว่าค่าความเข้มข้นที่เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดปฏิกิริยาหมดแล้ว ปริมาณผลิตภัณฑ์จึงคงที่ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอโดะนิซิดีนที่ 3 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้สภาวะดังกล่าวในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนต่อไป



ภาพที่ 4.10 ค่าความเข้มข้นเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโอโดะนิซิดีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1 3 5 7 9 11 และ 13 นาที

#### 4.2.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซิดีน

ความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซิดีนมีเป็นผลต่อความเข้มของสีน้ำตาล เมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซิดีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.1 0.3 0.5 1 2 3 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังภาพที่ 4.11 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารละลายโอโดอะนิซิดีนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ จะให้ค่าความเข้มสีสูงขึ้น เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาและเกิดเป็นโอโดอะนิซิดีนในรูปออกซิไดซ์ได้มากขึ้นด้วย ซึ่งมีสีน้ำตาล ดังนั้น จะเห็นว่าสารละลายสีน้ำตาลมีความเข้มสูงขึ้นและสูงสุดที่ 3 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากปฏิกิริยาสามารถเกิดได้สมบูรณ์พอดี แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ คือความเข้มข้นที่เหมาะสม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงใช้ความสภาวะดังกล่าวในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนต่อไป



ภาพที่ 4.11 ค่าความเข้มสีเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซิดีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.1 0.3 0.5 1 2 3 4 และ 5 มิลลิโมลาร์

**ตารางที่ 4.1** สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและการนำ  
ประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน

การทดลอง	สภาวะที่เหมาะสม
1. กระบวนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	
1.1) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับ พิมพ์กระดาษด้านหน้า (ร้อยละโดยมวล/ปริมาตร)	10
1.2) ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับ พิมพ์กระดาษด้านหลัง (ร้อยละโดยมวล/ปริมาตร)	20
2. กระบวนการตรวจวัดไฮโปแซนทีน	
2.1) ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	25
2.2) ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด (ไมโครลิตร)	3
2.3) ความเข้มข้นของสารละลายแซนทีนออกซิเดส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.5
2.4) ความเข้มข้นของสารละลายฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.01
2.5) ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายแซนทีนออกซิเดส (พีเอช)	7.00
2.6) ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายฮอสราดิซ เปอร์ออกซิเดส (พีเอช)	6.50
2.7) เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน (นาที)	2
2.8) เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์กับโอโดอะนิซิน (นาที)	3
2.9) ความเข้มข้นของสารละลายโอโดอะนิซิน (มิลลิโมลาร์)	3



### 4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน

การศึกษหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพและข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์นั้น และเป็นการยืนยันการนำไปใช้วิเคราะห์ได้จริง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาหาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน ดังนี้

#### 4.3.1 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

##### 1) การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น ตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองซ้ำจำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกันทั้งหมด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ไปสแกนเพื่อวัดค่าความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.2 พบว่าค่าที่ได้เท่ากับ 3.5 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ (เกณฑ์ %RSD ต้องไม่เกิน 5 %) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงตรงสูง

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน

ครั้งที่	ค่าความเข้มข้น
1	32.2
2	31.5
3	31.9
4	31.2
5	31.6
6	34.2
7	30.9
ค่าเฉลี่ย	31.9
SD	1.1
%RSD	3.5

## 2) การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น ตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองซ้ำจำนวน 7 ครั้ง ภายใต้สภาวะ การทดลองที่ต่างกัน คือ ใช้ผู้วิเคราะห์ที่ต่างกัน นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้ไปสแกนเพื่อวัดค่า ความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ผลการศึกษาได้ดังตารางที่ 4.3 จากนั้นคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าค่าที่ได้เท่ากับ 4.1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถ ยอมรับได้ (เกณฑ์ %RSD ต้องไม่เกิน 5 %) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงตรงสูง

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน

ครั้งที่	ค่าความเข้มข้น
1	29.5
2	32.3
3	31.7
4	30.9
5	31.4
6	29.0
7	29.7
ค่าเฉลี่ย	30.6
SD	1.3
% RSD	4.1

#### 4.3.2 การศึกษาความถูกต้องของวิธี

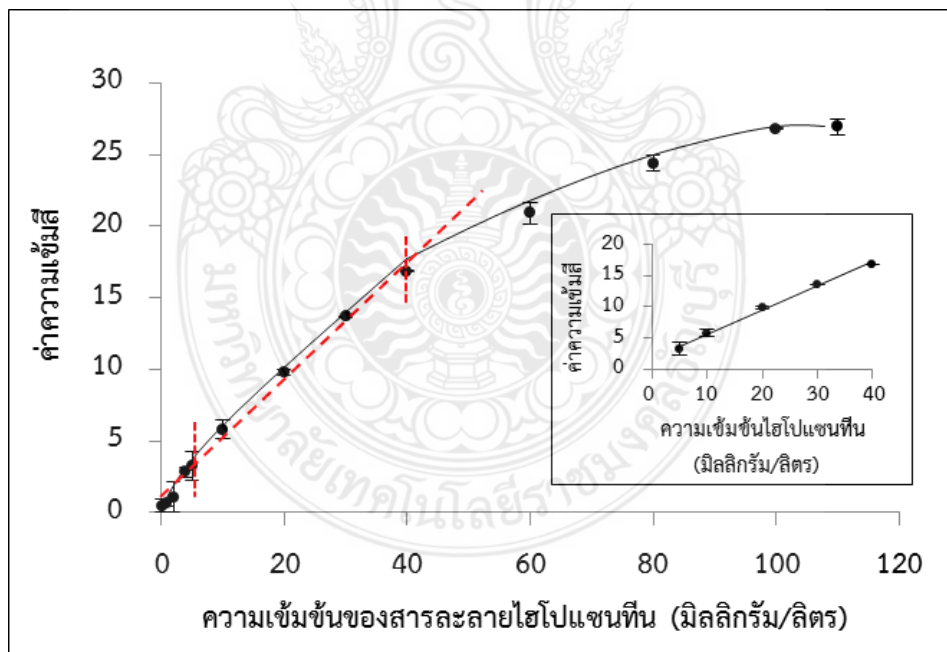
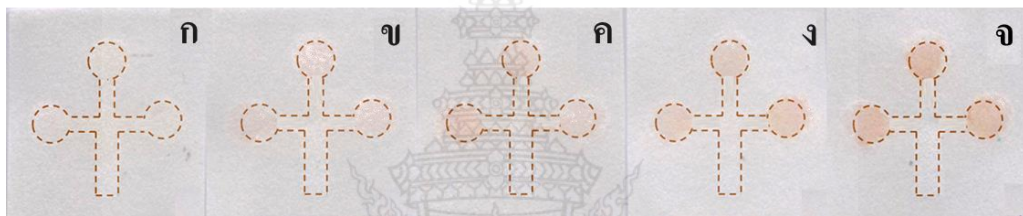
ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%Recovery) เพื่อยืนยันความสามารถของวิธีวิเคราะห์ โดยเติมสารมาตรฐานไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างจริง จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของไฮโปแซนทีน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 89.2 – 104.7 % ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ช่วงที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80 – 120%) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องสูง

**ตารางที่ 4.4** ผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นไฮโปแซนทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)			การได้กลับคืน (%)
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
เนื้อหมู	8.45 ± 0.11	15	22.92 ± 0.37	96.5 ± 2.5
		20	27.05 ± 0.50	93.0 ± 2.5
เนื้อปลานิล	0	15	15.71 ± 0.65	104.7 ± 4.3
		20	20.41 ± 0.75	102.0 ± 3.8
เนื้อไก่	10.23 ± 0.38	15	25.24 ± 0.50	100.1 ± 3.3
		20	29.16 ± 0.96	94.6 ± 4.8
น้ำปลา	6.22 ± 0.88	15	20.55 ± 0.56	95.5 ± 3.8
		20	24.06 ± 0.38	89.2 ± 1.9

#### 4.3.3 การศึกษาความเป็นเส้นตรง

ศึกษาหาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น ตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1 1 2 4 5 10 20 30 40 60 80 100 และ 110 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังภาพที่ 4.12 (ก) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโปแซนทีนเพิ่มขึ้น สารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัดจะมีความเข้มสีมากขึ้น เมื่อวัดค่าความเข้มสีและนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไฮโปแซนทีนกับค่าความเข้มสี ผลที่ได้แสดงดังตารางภาพที่ 4.12 (ข) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายไฮโปแซนทีนแปรผันตรงกับค่าความเข้มสี โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 5 – 40 มิลลิกรัม/ลิตร สมการเส้นตรงที่ได้ คือ  $y = 0.3869x + 1.749$  และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9957



ภาพที่ 4.12 แสดงอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเมื่อตรวจวัดไฮโปแซนทีนที่ความเข้มข้น 0.1 - 100 มิลลิกรัม/ลิตร (ก) และช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (ข)

#### 4.3.4 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ

ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีน โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดไฮโปแซนทีนในสารละลายแบบลงค์ ทำการทดลองจำนวน 7 ครั้ง ค่าความเข้มข้นที่ได้นำมาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบไฮโปแซนทีนมีค่าเท่ากับ 1.8 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางที่ 4.5 การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในสารละลายแบบลงค์

ครั้งที่	ความเข้มข้นของไฮโปแซนทีน ในสารละลายแบบลงค์ (มิลลิกรัม/ลิตร)
1	1.39
2	0.01
3	0.04
4	1.32
5	1.27
6	0.39
7	0.62
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (SD)	0.608

โดยขีดจำกัดการตรวจพบคำนวณได้จากสูตร

$$\text{LOD} = 3\text{SD}$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด  
จะได้

$$\begin{aligned}\text{LOD} &= 3 (0.608) \\ &= 1.8 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร}\end{aligned}$$



#### 4.3.5 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ

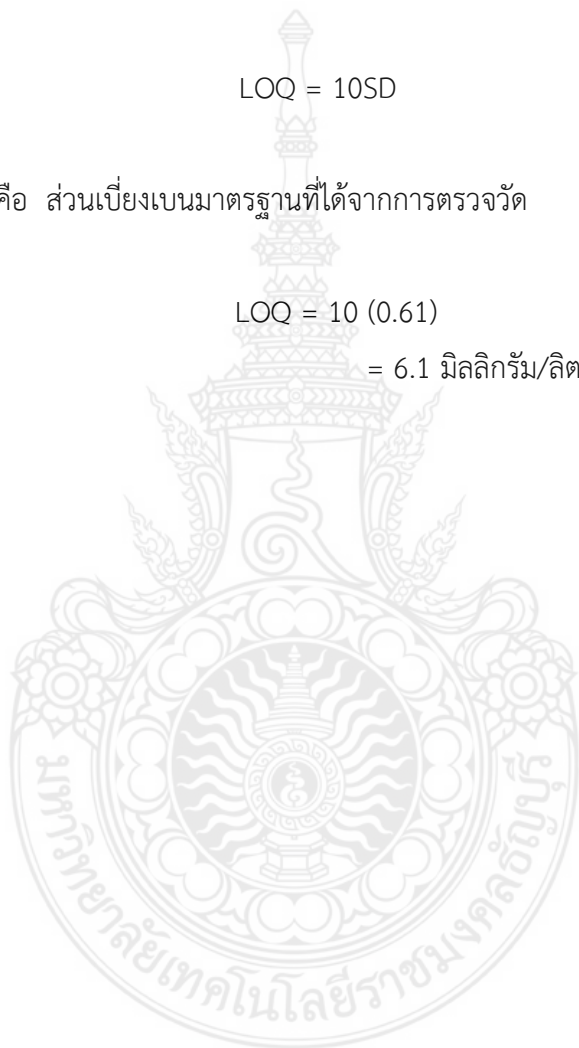
ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษตรวจวัดไอโอแพนทีนในสารละลายแบลงค์ จำนวน 7 ครั้ง พบว่าขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 6.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีความเที่ยง (% RSD) เท่ากับ 4.7 เปอร์เซ็นต์ และมีความถูกต้องจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเท่ากับ 93.2 – 98.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 6.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยคำนวณจากสูตร

$$LOQ = 10SD$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด  
จะได้

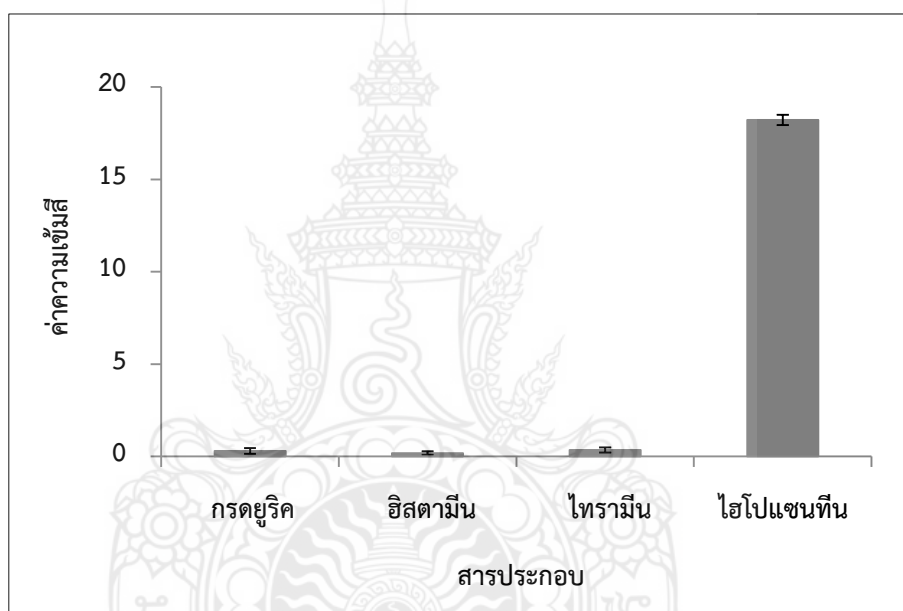
$$LOQ = 10 (0.61)$$

$$= 6.1 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร}$$



#### 4.3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

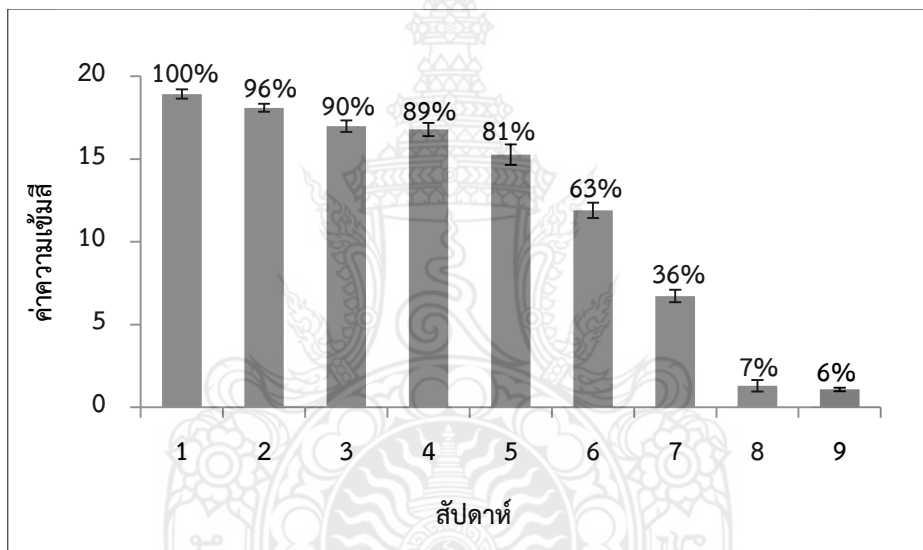
ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษตรวจวัดไฮโปแซนทีนในสารละลายทดสอบ โดยสารที่เลือกมาทดสอบเป็นสารที่คาดว่าจะมีผลต่อการตรวจวัดไฮโปแซนทีน และเป็นสารที่พบได้ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ กรดยูริก ฮิตตามีน และ ไทรามีน เปรียบเทียบผลการตอบสนองต่อวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองดังภาพที่ 4.13 พบว่า กรดยูริก ฮิตตามีน และ ไทรามีน ไม่มีผลต่อการตรวจวัดไฮโปแซนทีน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยอาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์มีความจำเพาะเจาะจงสูง เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง



ภาพที่ 4.13 ผลการตอบสนองของสารทดสอบต่อการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

#### 4.3.7 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ศึกษาอายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยหลักการไบโอเซนเซอร์ โดยเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษไว้ในถุงพลาสติกปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง และเก็บสารเคมีต่างๆไว้ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทำการตรวจวัดไฮโปแซนทีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ทุกๆสัปดาห์ที่สภาวะเดียวกัน ผลการทดลองดังภาพที่ 4.14 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนลดลง และลดลงเหลือ 81 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 5 ผลการทดลองดังกล่าว เกิดขึ้นเนื่องจากแอกติวิตีของแซนทีนออกซิเดสและฮสราติชเปอร์ออกซิเดสลดลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าจะต้องเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาได้ไม่เกิน 5 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



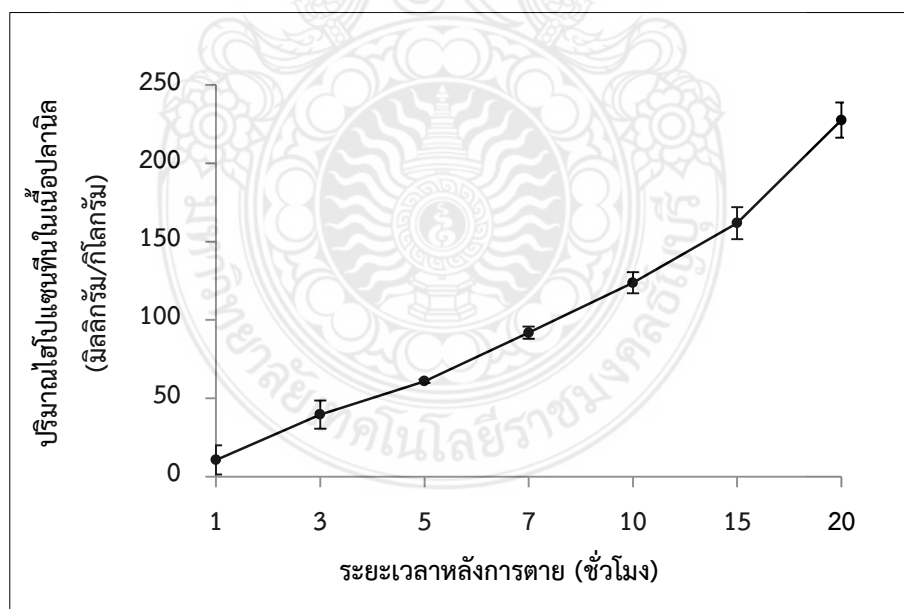
ภาพที่ 4.14 ผลการศึกษาอายุการใช้งานของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

#### 4.4 การตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษแล้ว นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมาใช้กับตัวอย่างจริง ได้แก่ เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ โดยศึกษาปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อปลาที่มีระยะเวลาหลังการตายต่างกัน และตรวจวัดไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง 9 ชนิด ด้วยวิธีสเปกโทรสโคปีและอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ ผลการทดลองดังต่อไปนี้

##### 4.4.1 การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อปลาที่มีระยะเวลาหลังการตายต่างกัน

นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมาใช้กับตัวอย่างจริง โดยเก็บตัวอย่างจากเนื้อปลานิลที่มีระยะเวลาหลังการตายต่างๆ ได้แก่ 1 3 5 7 10 15 และ 20 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อเยื่อ ผลการทดลองดังภาพที่ 4.15 พบว่า เนื้อปลาที่มีระยะเวลาหลังการตายเพิ่มมากขึ้นปริมาณไฮโปแซนทีนที่สะสมในเนื้อเยื่อจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นด้วย เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นภายหลังสัตว์ตายลงและสะสมไว้ในเนื้อเยื่อ การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์จึงสามารถประเมินถึงคุณภาพความสดได้ โดยจากการผลทดลองสรุปได้ว่า ความสดแปรผกผันกับปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์



ภาพที่ 4.15 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อปลานิลที่มีระยะเวลาหลังการตายต่างกัน

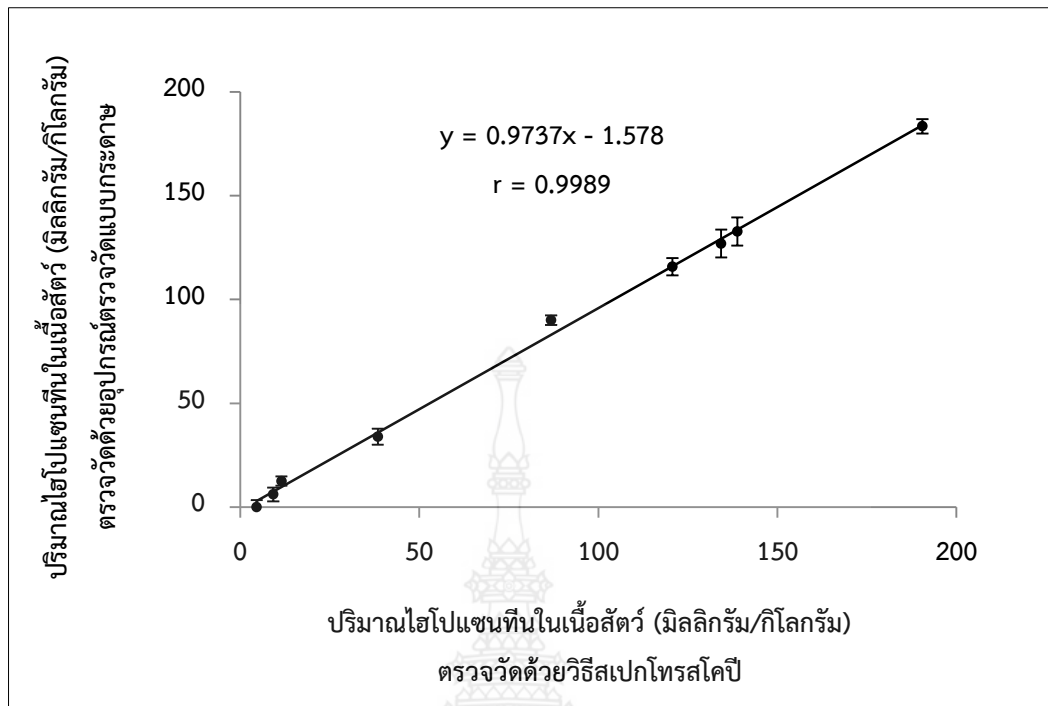
#### 4.4.2 ตรวจสอบวัดหาปริมาณไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ และเปรียบเทียบ กับวิธีทางสเปกโทรสโคปี

ตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริงด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษและวิธีทางสเปกโทรสโคปีเพื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ผลการทดลองดังตารางที่ 4.6 พบว่า อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน เพื่อยืนยันจึงเปรียบเทียบผลการทดลอง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ดังภาพที่ 4.15 โดยให้แกน x เป็นปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี และแกน y เป็นปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ที่ตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ กราฟที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9989 แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 วิธีสามารถตรวจวัดไฮโปแซนทีนได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยได้สามารถตรวจวัดไฮโปแซนทีนได้โดยให้ผลการทดลองที่ถูกต้อง

ตารางที่ 4.6 การตรวจวัดปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างเนื้อสัตว์

ตัวอย่างเนื้อสัตว์	ปริมาณไฮโปแซนทีนในเนื้อสัตว์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	
	อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ	วิธีสเปกโทรสโคปี
เนื้อหมู	6.1 ± 4.2	9.2 ± 3.3
เนื้อปลานิล	1.9 ± 1.5	4.6 ± 3.3
เนื้อไก่	12.5 ± 4.6	11.5 ± 2.2
ลูกชิ้นเนื้อ	33.9 ± 4.9	38.4 ± 3.8
น้ำปลา	183.4 ± 6.4	190.5 ± 3.4
ปลาทูน่าในน้ำแร่	132.7 ± 4.7	138.8 ± 6.8
ไส้กรอกไก่	90 ± 5.9	86.8 ± 2.3
แฮมหมู	115.8 ± 4.2	120.7 ± 4.2
ปูอัด	126.9 ± 3.4	134.3 ± 6.7





ภาพที่ 4.16 ความสัมพันธ์ของปริมาณไฮโปแซนทีนที่ตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี และตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน ซึ่งเป็นสารบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อสัตว์ โดยสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษขึ้นเพื่อให้ได้วิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว วัสดุมีราคาถูก ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ไม่ต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่จึงสามารถวิเคราะห์ที่ภาคสนามได้ การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษของงานวิจัยนี้ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้วิธีพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนกระดาษ ซึ่งทำให้ขั้นตอนการสร้างสามารถทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงหรือใช้ความร้อนในการสร้าง สามารถทำได้ง่ายโดยพิมพ์สารละลายพอลิแลคติกแอซิดผ่านบล็อกสกรีนลงบนกระดาษ และรอให้แห้ง จะได้อุปกรณ์ตรวจวัดตามที่ต้องการแบบไว้ สำหรับการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษจะอาศัยหลักการทางไบโอเซนเซอร์ ทำให้ได้วิธีตรวจวัดที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความถูกต้องสูง และไม่มีปัญหาเรื่องตัวรบกวน การตรวจวัดอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมีของไฮโปแซนทีนกับแซนทีนออกซิเดส ฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส และโอไดอะนิซิดีนเกิดเป็นสีน้ำตาลบนกระดาษ วัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J ค่าความเข้มสีของสารละลายสีน้ำตาลจะแปรผันตรงตามปริมาณไฮโปแซนทีนที่ตรวจพบ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณทำได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของไฮโปแซนทีนกับค่าความเข้มสี

ในขั้นตอนแรกของการวิจัยคือการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้วิธีพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิแลคติกแอซิด เพื่อให้ได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีประสิทธิภาพจึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์ลงบนกระดาษ ด้านหน้าและด้านหลัง พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 โดยมวล/ต่อปริมาตร คือความเข้มข้นที่เหมาะสม ตามลำดับ นำอุปกรณ์ตรวจวัดที่สร้างขึ้นไปใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณไฮโปแซนทีนต่อไป โดยในขั้นตอนนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาของไฮโปแซนทีน พบว่า ปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตัวอย่างและบริเวณตรวจวัด คือ 25 และ 3 ไมโครลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแซนทีนออกซิเดสและฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส คือ 0.5 และ 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของสารละลายแซนทีนออกซิเดสและฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส คือ 7.00 และ 6.50 ตามลำดับ เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไฮโปแซนทีน คือ 2 นาที เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซด์กับไฮโดรเจนซัลไฟด์ คือ 3 นาที และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายไฮโดรเจนซัลไฟด์ คือ 3 มิลลิโมลาร์

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพ โดยผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีความเที่ยงสูง (% RSD = 3.5) มีความถูกต้องสูงโดยคำนวณจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน เท่ากับ 89.2 - 104.7 เปอร์เซ็นต์ มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 5 - 40 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9957 มีขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 1.8 มิลลิกรัม/ลิตร ขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณ เท่ากับ 6.1 มิลลิกรัม/ลิตร และมีความจำเพาะเจาะจงสูงไม่มีปัญหาเรื่องตัวรบกวน

นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมาตรวจวัดหาปริมาณไฮโปแซนทีนในตัวอย่างจริง ได้แก่ เนื้อสัตว์สด และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ โดยได้ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับวิธีทางสเปกโทสโคปี ผลการทดลองพบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดไฮโปแซนทีนได้โดยให้ผลการทดลองที่ถูกต้องเหมือนวิธีมาตรฐาน และสามารถนำมาใช้สำหรับประเมินความสดของเนื้อสัตว์ และตรวจสอบคุณภาพย้อนกลับของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ได้จริง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากพอลิแลคติกแอซิดเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากวัสดุธรรมชาติ มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ง่าย สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ดังนั้น ควรระมัดระวังในการเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ควรเก็บในที่แห้งหรือที่ไม่ความชื้นต่ำ เพื่อรักษาประสิทธิภาพในการกั้นบริเวณบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

5.2.2 เนื่องจากปฏิกิริยาของไฮโปแซนทีนขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ แซนทีนออกซิเดส และฮอสราดิซเปอร์ออกซิเดส ดังนั้นควรควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อเอนไซม์ในทุกๆ ขั้นตอน เพื่อประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยา

5.2.3 เพื่อให้การวัดค่าความเข้มข้นไม่คลาดเคลื่อน ดังนั้น ควรควบคุมปัจจัยต่างๆ ในขั้นตอนการสแกนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษให้เหมือนกันทั้งหมดทุกครั้ง เช่น ตำแหน่งในการวางกระดาษบนเครื่องสแกน

## บรรณานุกรม

- [1] กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2562, *สถิติการนำเข้า-ส่งออกของไทย (ออนไลน์)*, แหล่งที่มา: <http://www.dft.go.th/Default.aspx>, (9 มิถุนายน 2562).
- [2] สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2555, *ข้อปฏิบัติในการส่งออกสินค้าสัตว์น้ำไปประเทศต่างๆ (ออนไลน์)*, แหล่งที่มา: <http://www.thai-frozen.or.th>, (31 พฤษภาคม 2562).
- [3] กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง, 2559, *มาตรฐานผลิตภัณฑ์ส่งออก (ออนไลน์)*, แหล่งที่มา: <http://www.fisheries.go.th/quality>, (9 มิถุนายน 2562).
- [4] สมาคมผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก, 2562, *สถิติการส่งออกเนื้อสุกรไทย (ออนไลน์)*, แหล่งที่มา: <http://www.thaiswine.org>, (9 มิถุนายน 2562).
- [5] กองแผนงานปศุสัตว์, 2562, *ข้อมูลปริมาณและมูลค่าการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ปี 2547-2562 (ออนไลน์)*, แหล่งที่มา: <http://planning.dld.go.th/th>, (9 มิถุนายน 2562).
- [6] T. Huttula, "Adenosine triphosphate breakdown products as freshness indicator of some fish species and fish products," Academic dissertation, Biochemistry department of the faculty of mathematic and natural science, University of Helsinki, Espoo, 1997.
- [7] V.P. Lougovois, E.R. Kyranas, and V.R. Kyran, "Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*)," *Food Research International*, vol. 36, pp. 551–560, March 2003.
- [8] S. Sabrina, E. Teixeira, R. Luiz, R. Maia, and C. Adam, "Chemical Quality Indices for Freshness Evaluation of Fish," *Journal of Food Studies*, vol. 3, pp. 71-87, April 2014.
- [9] C. Riquixo, and M.A. Pescas, "Evaluation of suitable chemical methods for seafood products in Mozambique," Final Project, The United Nation University, Maputo-Mozambique, 1998.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

- [10] D. Farthing, D. Sica, T. Gehr, B. Wilson, I. Fakhry, T. Larus, C. Farthing, and H.T. Karnes, "An HPLC method for determination of inosine and hypoxanthine in human plasma from healthy volunteers and patients presenting with potential acute cardiac ischemia," *Journal of Chromatography B*, vol. 854, pp. 158–164, April 2007.
- [11] Y. Si, J.W. Park, S. Jung, G.S. Hwang, E. Goh, and H.J. Lee, "Layer-by-layer electrochemical biosensors configuring xanthine oxidase and carbon nanotubes/grapheme complexes for hypoxanthine and uric acid in human serum solutions," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 121, pp. 265-271, August 2018.
- [12] B. Roberts, B.A. Morris, and M.N. Clifford, "Comparison of Radioimmunoassay and Spectrophotometric Analysis for the Quantitation of Hypoxanthine in Fish Muscle," *Food Chemistry*, vol. 42, pp. 1-17, October 1990.
- [13] S Hu, C Xua, J Luob, and D. Cuid, "Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode," *Analytica Chimica Acta*, vol. 412, pp. 55–61, May 2000.
- [14] M. Granica, M. Fiedoruk-Pogrebniak, R Koncki, and L. Tymecki, "Flow injection analysis in lab-on-paper format," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 257, pp. 16-22, March 2018.
- [15] G. Zhu, X. Yin, D. Jin, B. Zhang, Y. Gu, and Y. An, "Paper-based immunosensors: Current trends in the types and applied detection techniques," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 111, pp. 100-117, February 2019.
- [16] S.A. Klasner, A.K. Price, K.W. Hoeman, R.S. Wilson, K.J. Bell, and C.T. Culbertson, "Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva," *Analytical Bioanal Chemistry*, vol. 397, pp. 1821–1829, July 2010.



## บรรณานุกรม (ต่อ)

- [17] A.W. Martinez, T.P. Scott, E. Carrilho, S.W. Thomas, H. Sindi, and G.M. Whitesides, "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time off-site diagnosis," *Analytical Chemistry*, vol. 80 (10), pp. 3699–3707, May 2008.
- [18] G. Chitnis, Z. Ding, C.L. Chang, C.A. Savran, and B. Ziaie, "Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 1161–1165, June 2011.
- [19] X. Li, J. Tian, T.H. Nguyen, and W. Shen, "Paper-based microfluidic devices by plasma treatment," *Analytical Chemistry*, vol. 80 (23), pp. 9131–9134, November 2008.
- [20] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C.S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing," *Analyst*, vol. 136 (1), pp. 77–82, January 2011.
- [21] D.A. Bruzewicz, M. Reches, and G.M. Whitesides, "Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper," *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 3387–3392, May 2008.
- [22] L. Baliño-Zuazo, and A. Barranco. "A novel liquid chromatography–mass spectrometric method for the simultaneous determination of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in fishery products," *Food Chemistry*, vol. 196, pp. 1207–1204, April 2016.
- [23] E. Orban, T. Navigato, G. Di Lena, M. Masci, I. Casini, R. Caproni, and M. Rampacci, "Total volatile basic nitrogen and trimethylamine nitrogen levels during ice storage of European hake (*Merluccius merluccius*): A seasonal and size differentiation," *Food Chemistry*, vol. 128, pp. 679–682, October 2011.
- [24] J. Cai, Q. Chen, X. Wan, and J. Zhao. "Determination of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content and Warner–Bratzler shear force (WBSF) in pork using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy," *Food Chemistry*, vol. 126, pp. 1354–1360, June 2011.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

- [25] D. Kantachote, A. Ratanaburee, A. Sukhoom, T. Sumpradit, and N. Asavaroungpipop. "Use of  $\gamma$ -aminobutyric acid producing lactic acid bacteria as starters to reduce biogenic amines and cholesterol in Thai fermented pork sausage (Nham) and their distribution during fermentation," *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 70, pp. 171-177, July 2016.
- [26] J. Paul Bolam, and T. J. Ellender, "Histamine and the striatum," *Neuropharmacology*, vol. 106, pp. 74-84, July 2016.
- [27] C.I. Yeha, S.J. Lina, and D.F. Hwang, "Biogenic amines, histamine and label of dressed fried fish meat products in Taiwan," *Food Control*, vol. 17, pp. 423-428, June 2006.
- [28] L. Mora, A.S. Hernández-Cázares, M.C. Aristoy, and F. Toldra, "Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites," *Food Chemistry*. Vol. 123, pp. 1282-1288, 2010.
- [29] C. Chen, X. Hong, T. Xu, A. Chen, L. Lu, and Y. Gao, "Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto a poly(aniline-co-N-methylthionine) film," *Synthetic Metals*, vol. 212, pp. 123-130, February 2016.
- [30] A.T. Lawal, and S.B. Adeloju, "Progress and recent advances in fabrication and utilization of hypoxanthine biosensors for meat and fish quality assessment A review," *Talanta*, Vol. 100, pp. 217-228, October 2012.
- [31] R. Devi, S. Yadav, R. Nehra, and C.S. Pundir, "An amperometric hypoxanthine biosensor based on Au@FeNPs for determination of hypoxanthine in meat samples," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 62, pp. 629-635, November 2013.
- [32] E. Kostalova, K. Pavelka, H. Vlaskova, and B. Stiburkova, "Hyperuricemia and gout due to deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in female carriers: New insight to differential diagnosis," *Clinica Chimica Acta*, vol. 440, pp. 214-217, February 2015.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

- [33] D.A. Mei, G. J. Gross, and K. Nithipatikom, "Simultaneous Determination of Adenosine, Inosine, Hypoxanthine, Xanthine, and Uric Acid in Microdialysis Samples Using Microbore Column High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector," *Analytical biochemical*, vol. 238, pp. 34–39, June 1996.
- [34] D. Farthing, D. Sica, T. Gehr, B. Wilson, I. Fakhry, T. Larus, C. Farthing, and H.T. Karnes, "An HPLC method for determination of inosine and hypoxanthine in human plasma from healthy volunteers and patients presenting with potential acute cardiac ischemia," *Journal of Chromatography B*, vol. 854, pp. 158–164, July 2007.
- [35] เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน, "การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ," วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท, ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2003.
- [36] จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล, "ดัชนีเคมีเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับคุณภาพความสดของวัตถุดิบ สำหรับซูริมปลาเขตร้อน," รายงานการวิจัย, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2014.
- [37] E. Yoo, and S. Lee, "Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice," *Sensors*, vol. 10, pp. 4558-4576, May 2010.
- [38] R. Rahmanian, S.A. Mozaffari, and M. Abedi. "Disposable urea biosensor based on nanoporous ZnO film fabricated from omissible polymeric substrate," *Materials Science and Engineering C*, vol. 57, pp. 387-396, December 2015.
- [39] Y. Wang, L. Wang, T. Tian, G. Yao, X. Hu, C. Yang, and Q. Xu, "A highly sensitive and automated method for the determination of hypoxanthine based on lab-on-valve approach using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs/b-CD modified electrode," *Talanta*, vol. 99, pp. 840-845, September 2012.
- [40] E. Gonzalez, F. Pariente, E. Lorenzo, and L. Hernandez, "Amperometric sensor for hypoxanthine and xanthine based on the detection of uric acid," *Analytica Chimica Acta*, vol. 242, pp. 267-273, November 1991.

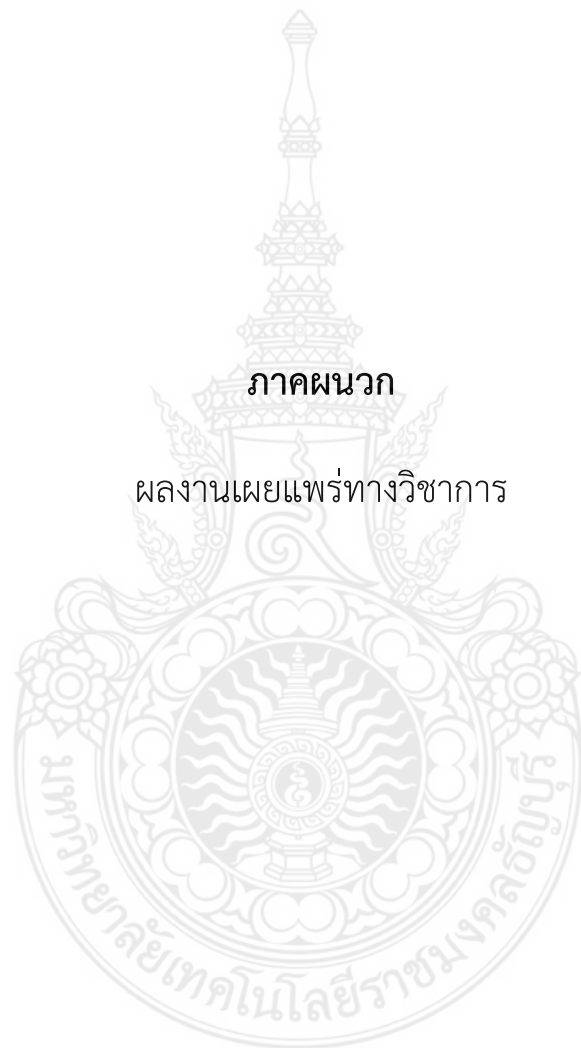
## บรรณานุกรม (ต่อ)

- [41] A.S. Hernández-Cázares, M.C. Aristoy, and F. Toldrá, “Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness,” *Food Chemistry*, vol. 123, pp. 949-954, December 2010.
- [42] R. Devi, S. Yadav, and C.S. Pundir, “Electrochemical detection of xanthine in fish meat by xanthine oxidase immobilized on carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 58-59, pp. 148-153, December 2011.
- [43] P. Mehrotra, “Biosensors, and their applications - A review,” *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, pp. 153-159, January 2016.
- [44] R. L. Caygill, G.E. Blair and P.A. Millner, “A review on viral biosensors to detect human pathogens,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 681, pp. 8-15, November 2010.
- [45] P. Singh, “SPR Biosensors: Historical Perspectives, and Current Challenges,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 229, pp. 110-130, June 2016.
- [46] K. Rathee , V. Dhull , R. Dhull, and S. Singh, “Biosensors based on electrochemical lactate detection : A comprehensive review review,” *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 5, pp. 35–54, March 2016.
- [47] A. Roda, M. Mirasoli, E. Michelini, M. DiFusco, M. Zangheri, L. Cevenini, B. Roda, and P. Simoni, “Progress in chemical luminescence-based biosensors : A critical review,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 76, pp. 164-179, February 2016.
- [48] A. Tereshchenko, M. Bechelany, R. Viter, V. Khranovskyy, V. Smyntyna, N. Starodub, and R. Yakimova, “Optical biosensors based on ZnO nanostructures: advantages and perspectives. A review,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 229, pp. 664-667, June 2016.
- [49] S. Hua, C. Xu, J. Luo, J. Luo, and D. Cui, “Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 412, pp. 55-61, May 2000.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

- [50] S. Zeki Bas, H. Gülceb, and S. Yıldız, “Amperometric xanthine biosensors based on electrodeposition of platinum on polyvinylferrocenium coated Pt electrode,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 72, pp. 282– 288, November 2011.
- [51] K. Thandavan, S. Gandhi, S. Sethuraman, J.B.B. Rayappan, and U. M. Krishnan, “Development of electrochemical biosensor with nano-interface for xanthine sensing – A novel approach for fish freshness estimation,” *Food Chemistry*, vol. 139, pp. 963-969, August 2013.
- [52] C. Desmet, C.A.Marquette, L. J. Blum, and B. Doumèche. “Paper electrodes for bioelectro chemistry : Biosensors and biofuelcells,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 76. pp. 145-163. February 2016.
- [53] R. Devi, S. Yadav, R. Nehra, S. Yadav, and C.S. Pundir, “Electrochemical biosensor based on gold coated iron nanoparticles/chitosan composite bound xanthine oxidase for detection of hypoxanthine in fish meat,” *Journal of Food Engineering*, vol. 115, pp. 201-214, March 2013.
- [54] L. Reverte, B. Prieto-Simon, and M. Campas, “New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems.A review,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 908, pp. 8-21, February 2016.





**ภาคผนวก**

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

## ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

1. นำเสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ระดับชาติ สาขาวิทยาศาสตร์และสิ่งแวดล้อม เรื่อง “การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน” ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ ๑๑ (The 11th Rajamangala University of Technology National Conference) ระหว่างวันที่ 24-26 กรกฎาคม 2562 ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติ อาคารเฉลิมพระเกียรติ 7 รอบพระชนมพรรษา

2. ผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ เรื่อง “A simple and cost-effective microfluidic paper-based biosensor analytical device and its application for hypoxanthine detection in meat samples” วารสาร Food analytical methods





เข้าร่วมงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ ๑๑ (The 11th Rajamangala University of Technology National Conference) ระหว่างวันที่ 24-26 กรกฎาคม 2562 ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติ อาคารเฉลิมพระเกียรติ 7 รอบพระชนมพรรษา เชียงใหม่



รับเกียรติบัตรรางวัลนำเสนองาน ภาคโปสเตอร์ “ยอดเยี่ยม” สาขาวิทยาศาสตร์และสิ่งแวดล้อม  
เรื่อง “การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน”





## Fabrication for Paper-based Device using Screen Print Technique for Detection of Hypoxanthine

Montita Mooltongchun, Sirivan Teepoo, Pattavee Thong-On

### Abstract

This research is the development of paper-based analytical device by screen printing method using polylactic acid for application in the determination of hypoxanthine that indicator of meat freshness. Frist step, the paper-based device was designed to create hydrophobic and hydrophilic area. Then, this pattern was used for screen block fabrication. The polylactic acid solution was applied over chromatography paper to create hydrophobic zone. The optimization conditions for fabrication of paper-based device were studied such as polylactic acid concentration for front printing ranging 1 to 20% w/v and polylactic acid concentration for back printing ranging 5 to 25% w/v. The results were found that, optimal of polylactic acid concentration for front and back printing were 10 and 20 % w/v, respectively. In addition, the optimization conditions of reagent volume on paper-based analytical device were studied including reagent volume on sample zone ranging 10 to 30  $\mu$ L and reagent volume on detection zone ranging 1 to 5  $\mu$ L. The results were found that, the optimal volumes of reagent on sample and detection zone were 25  $\mu$ L and 3  $\mu$ L, respectively. This paper-based device was applied for analysis of hypoxanthine based on the reaction between xanthine oxidase, horseradish peroxidase and *o*-dianisidine. When the reaction was occurred the brown solution were performed. The advantages of this paper-based device by screen printing method using polylactic acid were simple, rapid and low cost.

### Methodology

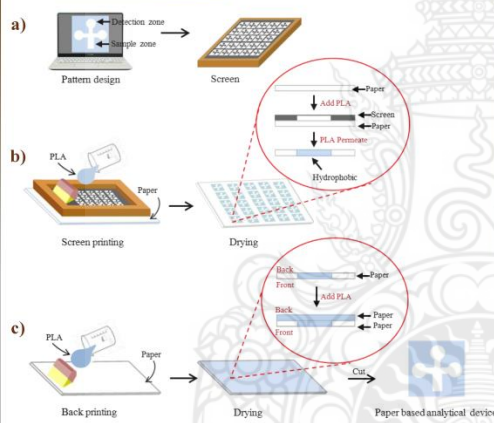


Fig. 1 Schematic diagram of screen-printing for fabrication paper-based device a) designing b) front screen printing c) back screen printing

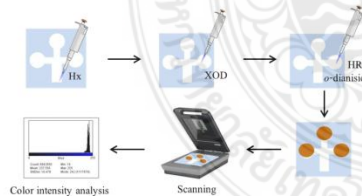


Fig. 2 Schematic diagram of colorimetric assay of hypoxanthine on paper-based analytical device

### Conclusion

The advantages of this paper-based device by screen printing method using polylactic acid were simple, rapid and low cost. This paper-based device was applied for hypoxanthine detection.

### Results

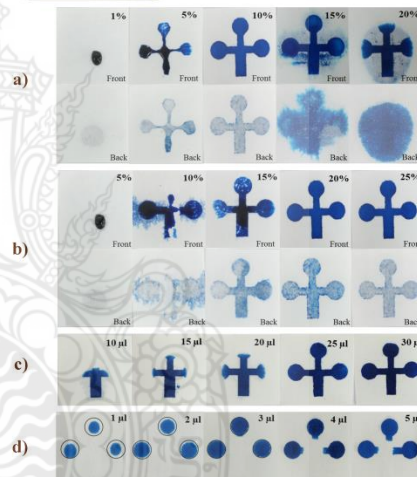


Fig. 3 Optimum condition studies a) concentration of polylactic acid for front screen printing b) concentration of polylactic acid for back screen printing c) volume on sample zone and d) volume on detection zone

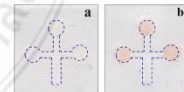


Fig. 4 Detection of hypoxanthine with paper-based analytical device a) 0 ppm b) 100 ppm



โปสเตอร์นำเสนอ เรื่อง “การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีน สำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน”





**การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ  
โดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนสำหรับตรวจวัดไฮโปแซนทีน  
Fabrication for paper-based device using screen print technique  
for hypoxanthine detection**

มณฑิตา มูลทองชุน<sup>1</sup>, สิริวรรณ เต้ภู<sup>1\*</sup>, ปัทรวา ทองอ่อน<sup>2</sup>  
Montita Mooltongchun<sup>1</sup>, Siriwan Teepoo<sup>1\*</sup>, Patravee Thong-On<sup>2</sup>

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์สกรีน โดยใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิด สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนซึ่งเป็นสารบ่งชี้ความสดของเนื้อสัตว์ ชั้นแรกออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อสร้างบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ จากนั้นนำไปสร้างบล็อกสกรีน ใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิดเพื่อสร้างบริเวณไม่ชอบน้ำบนกระดาษโครมาโทกราฟี ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์ด้านหน้า ได้แก่ ร้อยละ 1-20 โดยมวลต่อปริมาตร และศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์ด้านหลัง ได้แก่ ร้อยละ 5-25 โดยมวลต่อปริมาตร ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์ด้านหน้าและด้านหลังที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 10 และ 20 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ นอกจากนี้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารเคมีบนอุปกรณ์ตรวจวัด โดยศึกษาปริมาณของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง ได้แก่ 10-30 ไมโครลิตร และศึกษาปริมาณของสารเคมีบริเวณตรวจวัด ได้แก่ 1-5 ไมโครลิตร ผลการทดลองพบว่า ปริมาตร 25 และ 3 ไมโครลิตร คือปริมาณที่เหมาะสม ตามลำดับ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนี้ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาร่วมกับแซนทีนออกซิเดส สอสราคิซเปอร์ออกซิเดส และ ไอโคโนนิซิน จะเกิดสารละลายสีน้ำตาล ข้อดีของวิธีการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์สกรีนโดยใช้สารละลายพอลิแลคติกแอซิดนี้คือ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก

**คำสำคัญ :** อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ, เทคนิคการพิมพ์สกรีน, พอลิแลคติกแอซิด, ไฮโปแซนทีน

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี  
<sup>2</sup>ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย  
\*E-mail: siriwan@mail.rmutt.ac.th



## ABSTRACT

This research is the development of paper-based analytical device by screen printing method using polylactic acid for application in the determination of hypoxanthine that indicator of meat freshness. First step, the paper-based device was designed to create hydrophobic and hydrophilic area. Then, this pattern was used for screen block fabrication. The polylactic acid solution was applied over chromatography paper to create hydrophobic zone. The optimization conditions for fabrication of paper-based device were studied such as polylactic acid concentration for front printing ranging 1 to 20% w/v and polylactic acid concentration for back printing ranging 5 to 25% w/v. The results were found that, optimal of polylactic acid concentration for front and back printing were 10 and 20 % w/v, respectively. In addition, the optimization conditions of reagent volume on paper-based analytical device were studied including reagent volume on sample zone ranging 10 to 30  $\mu$ L and reagent volume on detection zone ranging 1 to 5  $\mu$ L. The results were found that, the optimal volumes of reagent on sample and detection zone were 25  $\mu$ L and 3  $\mu$ L, respectively. This paper-based device was applied for analysis of hypoxanthine based on the reaction between xanthine oxidase, horseradish peroxidase and *o*-dianisidine. When the reaction was occurred the brown solution were performed. The advantages of this paper-based device by screen printing method using polylactic acid were simple, rapid and low cost.

**Keyword:** paper-based analytical device, screen printing method, polylactic acid, hypoxanthine



## 1. บทนำ

ภายหลังสัตว์ตายลงจะเกิดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากการย่อยสลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate : ATP) เกิดเป็นสารต่างๆและเกิดเป็นไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine : Hx) โดยมีแซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase : XOD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [1-2] ดังนั้นปริมาณไฮโปแซนทีนที่เกิดขึ้นจึงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังการตายหรือการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ โดยปริมาณไฮโปแซนทีนจะแปรผันตรงกับการเน่าเสีย ในทางอุตสาหกรรมอาหารจึงมีการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีนเพื่อใช้เป็นดัชนีวัดความเน่าเสียหรือความสดของเนื้อสัตว์ สำหรับวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแซนทีน ได้แก่ เทคนิคเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry) [3] เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography) [4] และเทคนิคสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) [5] เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความไววิเคราะห์สูง อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากเพื่อกำจัดตัวรบกวน เครื่องมือมีขนาดใหญ่ราคาแพง ต้องทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น และต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการวิเคราะห์

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (Paper-based analytical device) มีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์มากขึ้น ซึ่งเปรียบเสมือนการย่อส่วนห้องปฏิบัติการทดลองลงบนกระดาษเพียงแผ่นเดียว ดังนั้นวิธีนี้จึงมีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ สามารถพกพาไปวิเคราะห์ที่ภาคสนามได้ ใช้สารปริมาณน้อย อีกทั้งกระดาษเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาถูก และน้ำหนักเบา หลักการของอุปกรณ์ตรวจวัดนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสารเคมีบนกระดาษซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) โดยมีบริเวณกันเพื่อกำหนดทิศทางหรือขอบเขตในการเกิดปฏิกิริยา สามารถทำได้โดยการตัดกระดาษตามลวดลายที่ต้องการ หรือการปรับแต่งกระดาษให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เพื่อทำหน้าที่กั้นบริเวณของสารเคมี

การปรับแต่งกระดาษให้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ มีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิคการพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) [6-8] ทำได้โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV light) ผ่านแม่แบบลงบนกระดาษที่เคลือบสารเคมีที่เกิดปฏิกิริยาไวต่อแสง สารเคมีนี้จะเปลี่ยนเป็นพอลิเมอร์และเป็นลวดลายบนกระดาษ ซึ่งมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ การปรับแต่งคุณสมบัติของกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วยไข (Wax printing) [9-10] ทำได้โดยการพิมพ์ไข (Solid wax) ด้วยเครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ทเพื่อสร้างลวดลาย นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ เช่น การปรับสภาพด้วยเลเซอร์ (Laser treatment) [11] การปรับสภาพด้วยพลาสมา (Plasma treatment) [12] การพิมพ์ด้วยเครื่องพล็อตเตอร์ (Plotter) [13] และการพิมพ์ด้วยหมึก [14] การสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยเทคนิคดังกล่าวบางเทคนิคต้องใช้ขั้นตอนและเครื่องมือที่ยุ่งยาก เช่น เครื่องฉายแสง เครื่องฉายเลเซอร์ เครื่องพล็อตเตอร์ เครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ท เป็นต้น จึงมีการพัฒนาการเทคนิคการพิมพ์ผ่านสกรีนขึ้น โดยสร้างแม่แบบหรือบล็อกสกรีน (Screen block) ขึ้นมา ดังในงานวิจัยของ Dungchai และคณะ [15] ที่สามารถสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ โดยใช้วิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยไข (Wax screen printing) ซึ่งทำได้โดยนำบล็อกสกรีนวางบนกระดาษ จากนั้นนำไข (Solid wax) มาถูบนบล็อกสกรีน ไขจะถูกระดาษลงบนผิวหน้าของกระดาษ โดยผ่านรูพรุนของบล็อกสกรีนเป็นลวดลายตามที่ออกแบบไว้ จากนั้นนำกระดาษไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ไขจะละลายและซึมเข้าภายในของกระดาษ เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สำหรับการสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนโดยใช้ไขจะต้องมีขั้นตอนการให้



ความร้อนทำให้โลหะบางกระด้าง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้สนใจพัฒนาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนด้วยสารละลายพอลิเมอร์ คือ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid : PLA) สำหรับตรวจวัดไฮโปแชนทีน

พอลิแลคติกแอซิดสังเคราะห์ได้จากวัตถุดิบทางชีวภาพ [16] เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด และอ้อย เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการหมักและพอลิเมอร์ไรเซชัน ได้เป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ เป็นพอลิเมอร์ที่เข้ากันได้กับสารชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว จึงเหมาะกับการนำมาใช้สร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ งานวิจัยนี้จึงสนใจการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษโดยใช้พอลิแลคติกแอซิดเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยวิธีพิมพ์สกรีน และนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโปแชนทีน ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ความสดของเนื้อสัตว์

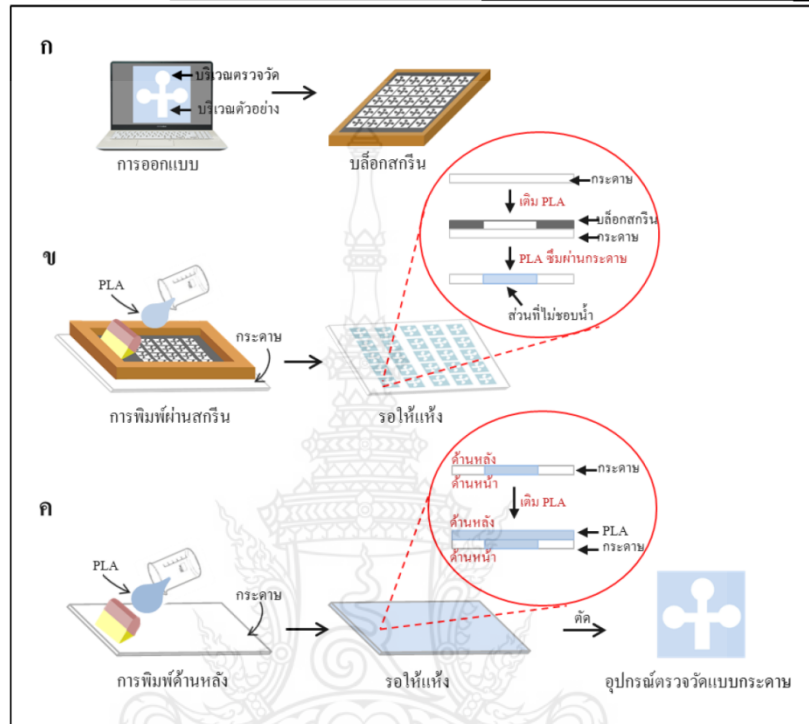
## 2. วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

พอลิแลคติกแอซิด ผลิตโดยบริษัท Nature Work (Blair, NE, USA) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ผลิตโดยบริษัท RCI Labscan (Pathumwan, Bangkok, Thailand) ไฮโปแชนทีน และ โอไดอะนิซิดีน (*o*-dianisidine) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA) แชนทีนออกซิเดส (EC 1.17.3.2, 1.0-2.0 units/mg) ฮอสราดิชเปอร็อกซิเดส (Horseradish peroxidase : HRP, EC 1.11.1.7, type VI, 250-330 units/mg) บล็อกสกรีน ผลิตโดยบริษัท Chaiyaboon Brothers (Lam Luk Ka, Pathum Thani, Thailand) กระดาษโครมาโทกราฟี เบอร์ 4 ผลิตโดยบริษัท GE Healthcare (Little, Buckinghamshire, UK) เครื่องแสกน รุ่น Canoscan lide 120 ผลิตโดยบริษัท Canon (Ha Noi, Vietnam) เครื่องปั่นด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic homogenizer) Vibra-cell รุ่น VCX 130 PB ผลิตโดยบริษัท Sonics & Materials Inc. (Newtown, CT, USA)

### 2.2 การออกแบบและสร้างสกรีน

ออกแบบรูปแบบหรือลวดลาย (Pattern) ของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยโปรแกรม Adobe illustrator ดังรูปที่ 1 (ก) สร้างขอบเขตให้สารเกิดปฏิกิริยาโดยให้มีส่วนชอบน้ำ และส่วนกันที่ไม่ชอบ ส่วนที่ชอบน้ำจะแบ่งออกเป็นบริเวณตัวอย่างและบริเวณตรวจวัด โดยให้บริเวณตรวจวัดมีพื้นที่ 0.5 ตารางเซนติเมตร นำรูปแบบที่ได้ไปสร้างบล็อกสกรีน โดยใช้ผ้าพอลิเอสเตอร์ที่มีรูพรุนขนาด 100 mesh จึงบนจากไม้ด้วยความตั้ง 10 นิ้วต้น



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ก) ขั้นตอนการออกแบบและสร้างบล็อกสกรีน ข) ขั้นตอนการพิมพ์กระดาษด้านหน้าด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีน ค) ขั้นตอนการพิมพ์กระดาษด้านหลังและอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้

### 2.3 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยพอลิแลคติกแอซิด

ทำการพิมพ์พอลิแลคติกแอซิดลงบนด้านหน้าและด้านหลังของกระดาษ โครมา โทกราฟี การพิมพ์ด้านหน้า จะใช้วิธีการพิมพ์ผ่านสกรีน ทำได้โดยวางบล็อกสกรีนที่สร้างขึ้นไว้บนกระดาษ โครมา โทกราฟี ขนาด 25 × 25 เซนติเมตร ดังภาพที่ 1 (ข) จากนั้นเติมสารละลายพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร ลงด้านบนของบล็อกสกรีน ปาดสารละลายพอลิแลคติกแอซิดไปทางเดียวกันให้ซึมผ่านบล็อกสกรีนไปยังกระดาษ โครมา โทกราฟี วางไว้ให้แห้งจึงนำมาพิมพ์ด้านหลัง





สำหรับการพิมพ์ด้านหลังเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารเคมีในส่วนที่ขอบน้ำ ทำให้โดยการทดสอบสารละลาย  
พอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายไคลคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษโครมาโทกราฟีด้านหลังได้โดยตรง  
ดังภาพที่ 1 (ค) จากนั้นปาดสารละลายพอลิแลคติกแอซิดไปทางเดียวกันให้ทั่วแผ่น ทั้งไว้ให้แห้งจึงนำมาตัด จะได้  
อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษขนาด  $3.5 \times 3.5$  เซนติเมตร สำหรับใช้ในการตรวจวัดไฮโปแซนทีนต่อไป

## 2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

### 2.4.1 ศึกษาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เหมาะสม

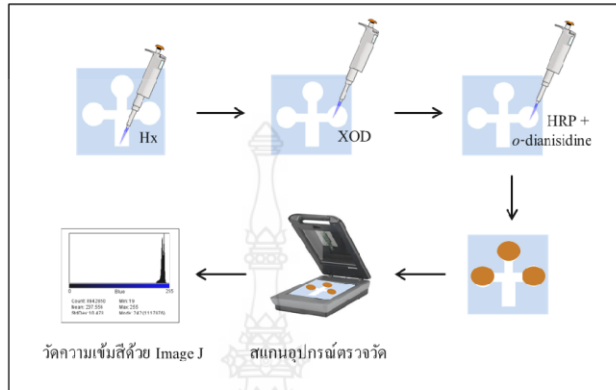
ความหนืดของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้ในการพิมพ์กระดาษ มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจาก  
พอลิแลคติกแอซิดมีหน้าที่เป็นบริเวณกั้นในการเกิดปฏิกิริยาของสารเคมี โดยการพิมพ์ด้านหลังสารละลายพอลิ  
แลคติกแอซิดควรซึมผ่านเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษไปได้ และไม่ไหลซึมเข้าไปยังขอบเขตที่ขอบน้ำ สำหรับการ  
พิมพ์ด้านหลังเพื่อป้องกันการทะลุของสารเคมี สารละลายพอลิแลคติกแอซิดควรเคลือบอยู่ที่พื้นผิวของกระดาษ  
เท่านั้น ความหนืดจึงต้องเหมาะสม ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดมีผลต่อความหนืด ดังนั้น จึง  
ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหลัง ได้แก่ ร้อยละ 1 5 10 15 และ 20  
โดยมวลต่อปริมาตร (% w/v) และศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหลัง  
ได้แก่ ร้อยละ 5 10 15 20 และ 25 โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษทำการหาค่าสารละลาย  
เมทิลีนบลูปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบ

### 2.4.2 ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ปริมาตรของสารเคมีบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยปริมาตรของสารเคมีที่  
หยดลงบริเวณตัวอย่างจะต้องมีปริมาตรมากพอสำหรับการไหลไปยังบริเวณตรวจวัดเพื่อทำปฏิกิริยา นอกจากนี้  
สารเคมีบริเวณตรวจวัดควรไหลและไม่ออกนอกขอบเขตของบริเวณตรวจวัด ดังนั้น จึงศึกษาปริมาตรที่เหมาะสม  
ของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง โดยหยดสารละลายเมทิลีนบลูลงบนบริเวณตัวอย่างที่ปริมาตรต่างๆ ได้แก่ 10 15 20 25  
และ 30 ไมโครลิตร และศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตรวจวัด โดยหยดเมทิลีนบลูลงบนบริเวณ  
ตรวจวัดที่ปริมาตรต่างๆ ได้แก่ 1 2 3 4 และ 5 ไมโครลิตร

## 2.5 ขั้นตอนการตรวจวัดไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

ตรวจวัดไฮโปแซนทีนโดยหยดสารละลายไฮโปแซนทีนปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณตัวอย่าง ดัง  
ภาพที่ 2 จากนั้นหยดแซนทีนออกซิดีส 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2  
นาที จึงหยดสารละลายผสมระหว่างซอสตราคิซเปอร์ออกซิดีส 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ ไอโอดี นิซิดีน 3 มิลลิ  
โมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรวจวัด ให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 3 นาที จะเกิดสีน้ำตาลขึ้นตรงบริเวณ  
ตรวจวัด นำอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เกิดสีน้ำตาลไปสแกนและวัดความเข้มสีด้วย โปรแกรม Image J โดยใช้  
เฉลี่ยสีน้ำเงินในการวิเคราะห์



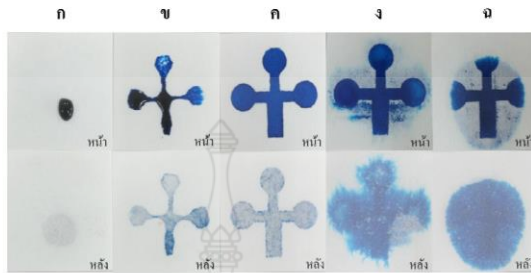
ภาพที่ 2 ขั้นตอนการตรวจวัด ไฮโปแซนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

### 3. ผลการทดลองและอภิปราย

#### 3.1 ผลการศึกษาการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่เหมาะสม

##### 3.1.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหน้า

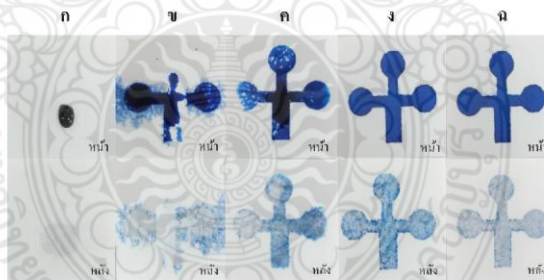
ผลการทดลองดังภาพที่ 3 พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 โดยมวลต่อปริมาตร สารละลายเมทิลีนบลู ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เต็มรูปแบบ เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์มีความหนืดน้อย จึงซึมมายังบริเวณที่ต้องการให้ส่วนที่ชอบน้ำ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 และ 20 โดยมวลต่อปริมาตร สารละลายเมทิลีนบลู ไหลออกนอกรูปแบบหรือขอบเขต เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดมีความหนืดสูงจึงทำให้การเคลื่อนที่ผ่านเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษได้ไม่ดี ประสิทธิภาพในการเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำไม่สมบูรณ์ สำหรับที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร สารละลายพอลิแลคติกแอซิดสามารถซึมผ่านกระดาษ โครมาโทกราฟีได้ดีและไม่ไหลออกนอกขอบเขต เมทิลีนบลูสามารถไหลได้เต็มรูปแบบ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 3 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหน้า ก) 1% ข) 5% ค) 10% ง) 15% และ ฉ) 20% (w/v)

### 3.1.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง

ผลการทดลองดังภาพที่ 4 พบว่าที่ ความเข้มข้นร้อยละ 5 10 และ 15 โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อหยดสารละลายเมทิลีนบลูไม่สามารถไหลได้เต็มรูปแบบ เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์มีความหนืดต่ำ จึงซึมเข้ามาในส่วนที่ต้องการให้เป็นส่วนที่ขอบน้ำ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25 โดยมวลต่อปริมาตร สารละลายเมทิลีนบลูสามารถเคลื่อนที่ได้เต็มรูปแบบ เนื่องจากสารละลายพอลิแลคติกแอซิดมีความหนืดที่มากพอ จึงไม่ซึมเข้ามายังส่วนไม่ขอบน้ำ ดังนั้น จึงเลือกที่ความความข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพิมพ์กระดาษด้านหลัง



ภาพที่ 4 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายพอลิแลคติกแอซิดที่ใช้พิมพ์กระดาษด้านหลัง ก) 5% ข) 10% ค) 15% ง) 20% และ ฉ) 25% (w/v)



### 3.2 ผลการศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตรวจวัดแบบกระจาย

#### 3.2.1 ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง

ผลการทดลองดังภาพที่ 5 พบว่า ที่ปริมาตร 10 15 และ 20 ไมโครลิตร ปริมาตรของสารละลายเมทิลีนบลูไม่มากพอสำหรับไหลไปยังบริเวณตรวจวัดได้ ที่ปริมาตรตั้งแต่ 25 ไมโครลิตร ขึ้นไป สารละลายเมทิลีนบลูสามารถไหลไปยังบริเวณตรวจวัดได้ โดยปริมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นปริมาตรที่เหมาะสม มีปริมาตรที่พอดีไม่มากเกินไป จึงเลือกเป็นปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 5 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง ก) 10 ข) 15 ค) 20 ง) 25 และ จ) 30 ไมโครลิตร

#### 3.2.2 ปริมาตรของสารเคมีบริเวณตรวจวัด

ผลการทดลองดังภาพที่ 6 พบว่า ที่ปริมาตร 1 และ 2 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูแพร่ได้ไม่เต็มบริเวณตรวจวัด เนื่องจากปริมาตรไม่เพียงพอ ที่ปริมาตร 4 และ 5 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูไหลออกนอกบริเวณตรวจวัดเนื่องจากมีปริมาตรมากเกินไป และที่ปริมาตร 3 ไมโครลิตร สารละลายเมทิลีนบลูสามารถไหลได้เต็มและไม่ออกนอกบริเวณตรวจวัด จึงเป็นปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 6 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของสารเคมีบริเวณตัวอย่าง ก) 1 ข) 2 ค) 3 ง) 4 และ จ) 5 ไมโครลิตร

### 3.3 ผลการตรวจวัดไฮโปแชนทีนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระจาย

เมื่อหยดสารละลายไฮโปแชนทีน แชนทีนออกซิเดส ฮอสตราคิซเปอร์ออกซิเดส และ โอไดอะนิซิดีน ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระจาย เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที จะเกิดสารละลายสีน้ำตาลตรงบริเวณตรวจวัด ดังภาพที่ 7 เนื่องจากปฏิกิริยาของไฮโปแชนทีนตั้งในงานวิจัยของ Hu และคณะ [17] โดยแชนทีนออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของไฮโปแชนทีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide :  $H_2O_2$ ) ดังสมการที่ 1







### กิตติกรรมประกาศ

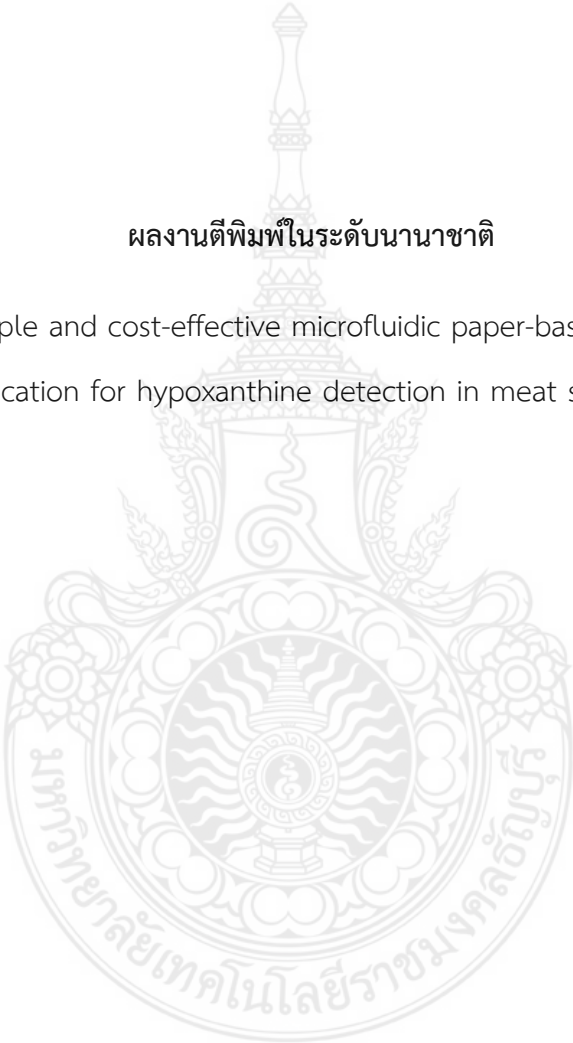
ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการการแยกและวิเคราะห์สารปริมาณน้อย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้เงินทุนวิจัยและให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์

### เอกสารอ้างอิง

- [1] Andrade SCS, Mársico ET, Godoy RLO, Franco RM, Junior CAC. 2014. Chemical quality indices for freshness evaluation of fish. **Journal of Food Studies** 3 : 71
- [2] Lawal AT, Adeloju SB. 2012. Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode. **Food Chemistry** 135 : 2982–2987
- [3] Albelda JAV, Uzunoglu A, Santos GNC, Stanciu LA. 2017. Graphene-titanium dioxide nanocomposite based hypoxanthine sensor for assessment of meat freshness. **Biosensors and Bioelectronics** 89 : 518–524
- [4] CzauDEM M, Kowalczyk J. 2000. Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. **Journal of Chromatography B** 744 : 129–138
- [5] Roberts B, Morris BA, Clifford MN. 1991. Comparison of Radioimmunoassay and Spectrophotometric Analysis for the Quantitation of Hypoxanthine in Fish Muscle. **Food Chemistry** 42 : 1-17
- [6] Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. 2007. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie International Edition** 46 : 1318–1320
- [7] Martinez AW, Scott TP, Carrilho E, Thomas SW III, Sindi H, Whitesides GM. 2008. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry** 80 (10) : 3699–3707
- [8] Klasner SA, Price AK, Hoeman KW, Wilson RS, Bell KJ, Culbertson CT. 2010. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. **Analytical Bioanal Chemistry** 397 : 1821–1829
- [9] Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. 2009. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry** 81 : 7091–7095



- [10] Lu Y, Shi W, Jiang L, Qin J, Lin B. 2009. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. **Electrophoresis** 30 : 1497–1500
- [11] Chitnis G, Ding Z, Chang CL, Savran CA, Ziaie B. 2011. Lasertreated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform. **Lab Chip** 11 : 1161–1165
- [12] Li X, Tian J, Nguyen TH, Shen W. 2008. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment. **Analytical Chemistry** 80 (23) : 9131–9134
- [13] Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. 2008. Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. **Analytical Chemistry** 80 : 3387–3392
- [14] Li X, Tian J, Garnier G, Shen W. 2010. Fabrication of paperbased microfluidic sensors by printing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 76 (2) : 564–570
- [15] Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. 2011. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. **Analyst** 136 (1) : 77–82
- [16] Ye J, Wang S, Lan W, Qin W, Liu Y. 2018. Preparation and properties of polylactic acid-tea polyphenol-chitosan composite membranes. **International Journal of Biological Macromolecules** 117 : 632-639
- [17] Hu S, Xu C, Luo J, Luo J, Cui D. 2000. Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode. **Analytica Chimica Acta** 412 : 55-61



ผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

เรื่อง “A simple and cost-effective microfluidic paper-based biosensor analytical device and its application for hypoxanthine detection in meat samples” วารสาร Food analytical methods



## A Simple and Cost-effective Microfluidic Paper-Based Biosensor Analytical Device and its Application for Hypoxanthine Detection in Meat Samples

Montita Mooltongchun<sup>1</sup> · Siriwan Teepoo<sup>1</sup>

Received: 10 May 2019 / Accepted: 6 August 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

### Abstract

In this paper, we combined lab-on-paper technology with biosensor techniques to fabricate a new analytical tool for hypoxanthine detection. The combination of these two technologies produces a quick, selective, and cost-effective analytical metrology for detection of hypoxanthine in meat samples. The paper-based colorimetric biosensor was developed based on dienzyme catalytic reactions. In presence of hypoxanthine, xanthine oxidase (XOD) catalyzes to form hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Then H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> couples with *o*-dianisidine in the presence of horseradish peroxidase (HRP), resulting in a brown color. The color intensity of the detection zone on the paper was imaged using a scanner. For quantitative analysis of hypoxanthine, the images of the colorimetric results were analyzed with ImageJ software using a blue histogram. Under optimum conditions, the developed paper-based biosensor was found to detect hypoxanthine with a detection limit of 1.8 mg L<sup>-1</sup> and a quantitative limit of 6.1 mg L<sup>-1</sup>. The proposed assay exhibited a linear dynamic in the range of 5–40 mg L<sup>-1</sup>. The analysis time was 5 min for triplicate measurement. This method was further evaluated by measuring the recovery of hypoxanthine added to meat samples. Finally, this method was applied to detect hypoxanthine in fresh and processed meat samples, and the results were validated against spectrophotometric detection, showing good accuracy. This simple method is cost-effective and requires no advanced instruments, offering an alternative to conventional methods.

**Keywords** Microfluidic paper-based analytical device · Biosensor · Hypoxanthine · Meat sample

### Introduction

Meat freshness is an indicator of product quality. After fish die, adenosine triphosphate degrades into adenosine diphosphate, adenosine 5' phosphate, inosine 5' phosphate, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid, respectively (Andrade et al. 2014; Lougovois et al. 2003; Mora et al. 2010). Hypoxanthine imparts a bitter “off” taste, and this compound increases with prolonged storage (Devi et al. 2013; Hernández-Cázares et al. 2010; Lawal and Adeloju 2012a). When hypoxanthine concentration exceeds 102 mg kg<sup>-1</sup>, the fish begins to deteriorate, and when it exceeds 144 mg kg<sup>-1</sup>, the fish is completely deteriorated (Chen et al. 2017). Thus, hypoxanthine concentration

detection has been used to evaluate fish freshness in the food industry. The quantification of hypoxanthine in food samples is mainly performed using complex instruments, such as high-performance *liquid chromatography* (Czauderna and Kowalczyk 2000; Farthing et al. 2007; Mei et al. 1996), spectrophotometric (Roberts et al. 1991; Giacomello and Salernot 1977; Johnson et al. 1997), and electrochemistry techniques (Hu et al. 2000; Si et al. 2018; Wang et al. 2012). Classical high-performance *liquid chromatography* has been widely used to detect hypoxanthine concentration in various types of food samples. Although high-performance *liquid chromatography* provides high sensitivity, it requires expensive instruments, is time consuming, requires sample pretreatment, and relies on highly skilled personnel. Such equipments constitute major disadvantages. A simple, cost-effective, and selective hypoxanthine detection method has considerable value to control the quality of meat. Biosensor techniques offer a rapid, selective, and cost-effective analytical method (Caygill et al. 2010; Mehrotra 2016; Roda et al. 2016). Biosensors have been developed for various uses in

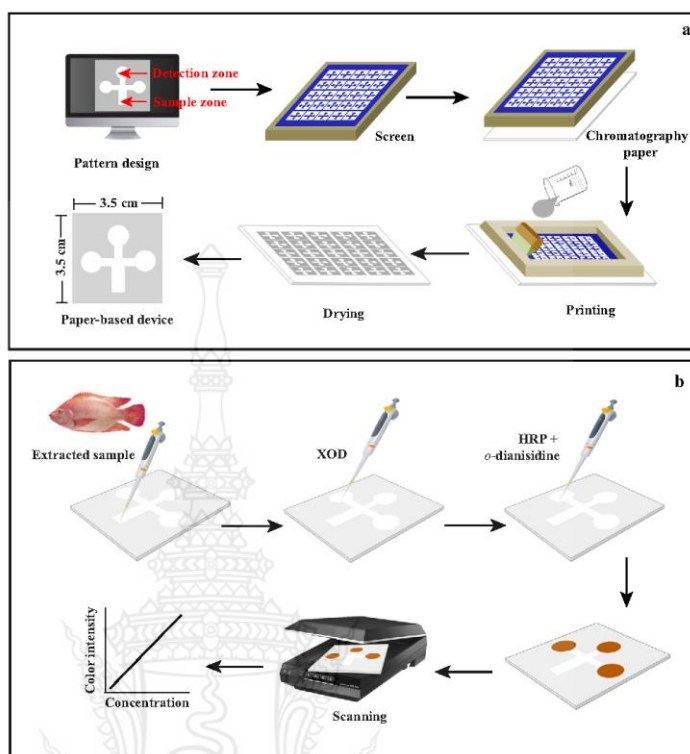
✉ Siriwan Teepoo  
siriwan@mail.rmutt.ac.th

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,  
Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum  
Thani 12110, Thailand





**Fig. 1** **a** Schematic diagram of screen-printing for fabrication of  $\mu$ PAD biosensor and **b** schematic diagram of colorimetric assay of hypoxanthine on a  $\mu$ PAD biosensor



incubated for 3 min. Subsequently, a brown solution was obtained on the detection zone. The color changes on the paper were measured by a scanner and analyzed using ImageJ to obtain intensity value. Briefly,  $\mu$ PADs were scanned and the image was  $2550 \times 3507$  pixels and was saved as a TIFF image. Then the JPEG image was opened with ImageJ software. Then the second step was done by selecting a circular icon for selecting the reader area of detection zone on the  $\mu$ PAD which set the specific position in circular ( $90$  width  $\times$   $90$  height). Next step, the cropped images were analyzed to obtain the RGB channel intensities. The mean value in blue channel of histogram was measured. The mean intensity value of each detection zone was obtained by subtracting the intensity from that of the background. Then these values were used for construction of calibration standard curve or calculation of hypoxanthine concentration in real samples.

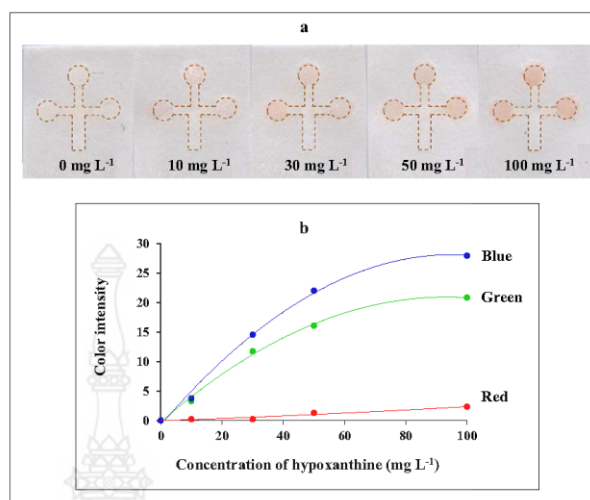
#### Optimization of Hypoxanthine $\mu$ PAD Biosensor

To evaluate the optimum conditions of the  $\mu$ PAD biosensor, XOD and HRP concentration, pH value of XOD and HRP, reaction time, and concentration of *o*-dianisidine were studied to obtain high analytical signals. Only the investigated parameter was varied; all other parameters were fixed for detection of hypoxanthine  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### Evaluation of Analytical Performance of $\mu$ PAD Biosensor

The following parameters were studied to evaluate the  $\mu$ PAD biosensor's performance: precision, accuracy, linear range, detection limit, limit of quantification, selectivity, and stability of the  $\mu$ PAD biosensor.

**Fig. 2** a Color change in the  $\mu$ PAD biosensor using various concentrations of hypoxanthine from 0 to 100  $\text{mg L}^{-1}$  and b RGB intensity values results



#### Analysis of Hypoxanthine in Meat Samples

To validate the proposed method, the developed  $\mu$ PAD biosensor was used to detect hypoxanthine in nine meat samples including fresh and processed meat such as pork, chicken, fish meat, and fish sauce. The extraction method was carried out according to the procedure described in Devi et al. (2013). All solid meat samples (1 g of each sample) were minced, mixed with 3 mL of chilled distilled water, and homogenized using an ultrasonic homogenizer for 10 min. The homogenous mixture was diluted with 7 mL chilled distilled water. The solution was then centrifuged, and supernatant was filtered using 0.45  $\mu\text{m}$  of filter paper for further analysis of hypoxanthine using the  $\mu$ PAD biosensor. In the case of fish sauce, the sample was only diluted with 0.1 M phosphate buffer with a pH of 7.00.

#### Colorimetric Assay of Hypoxanthine Using Spectrophotometric Method as a Reference Method

To detect hypoxanthine using the colorimetric spectrophotometric method, 30  $\mu\text{L}$  of extracted sample solution was added to a microcentrifuge tube. Then, a mixture of 30  $\mu\text{L}$  of 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  XOD, 15  $\mu\text{L}$  of 0.01  $\text{mg mL}^{-1}$  HRP, and 15  $\mu\text{L}$  of 3 mM *o*-dianisidine was added to the above solution and incubated for 3 min. The absorption of this solution was then measured at 430 nm wavelength using a UV-visible spectrophotometer.

#### Results and Discussion

##### Response of the $\mu$ PAD Biosensor During Hypoxanthine Detection

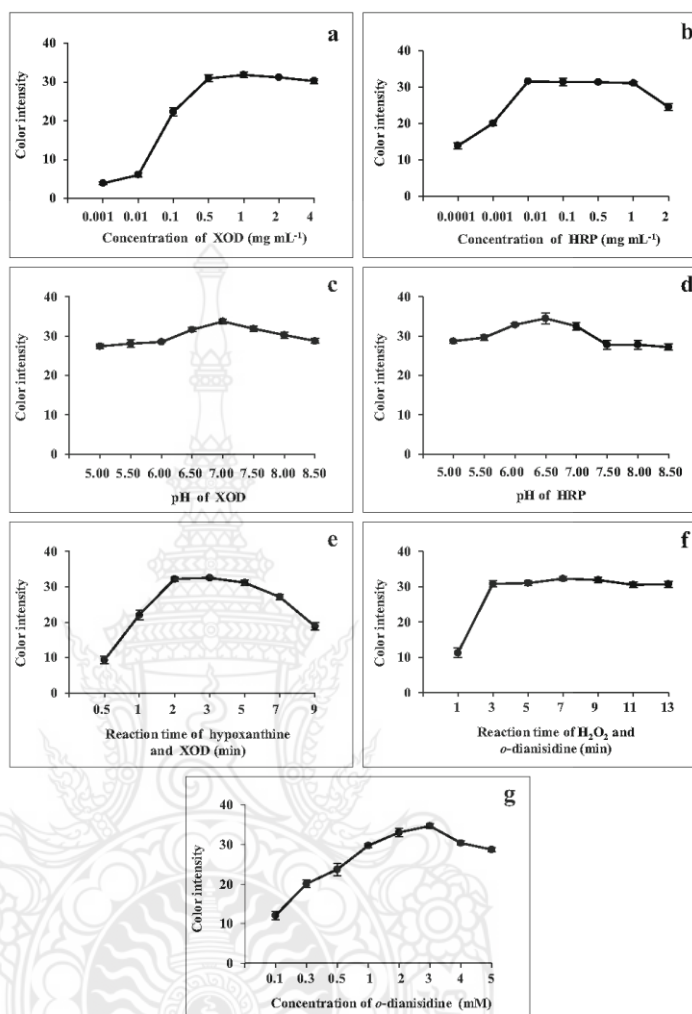
Hypoxanthine detection was performed using the  $\mu$ PAD biosensor. The hypoxanthine standard solution was dropped onto the sample zone and reached the detection zone by capillary penetration, resulting in enzymatic reactions. In the presence of water and oxygen, hypoxanthine reacts with XOD to product  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the detection zone. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  then reduces *o*-dianisidine to oxidized *o*-dianisidine by reacting with HRP, resulting in a color change in the detection zone from colorless to brown within 5 min. As can be seen in Fig. 2a, the gradual increase in color intensity corresponds to the increasing hypoxanthine concentration. Figure 2b shows the results of RGB values. It is seen that the blue intensity analysis was the best sensitive among the RGB color. Thus, a blue histogram was used for analysis of color intensity value.

##### Optimum Hypoxanthine Detection Conditions Using the $\mu$ PAD Biosensor

##### Effects of XOD and HRP Concentrations

Because XOD and HRP concentrations may affect biosensor performance, the effects of XOD and HRP were examined in the range of 0.001 to 4  $\text{mg mL}^{-1}$  and 0.0001 to 2  $\text{mg mL}^{-1}$ , respectively. As seen in Fig. 3a, when XOD concentration

**Fig. 3** Optimum conditions of hypoxanthine detection using the  $\mu$ PAD biosensor device. **a** Concentration of XOD. **b** Concentration of HRP. **c** Effect of pH value of XOD. **d** Effect of pH value of HRP. **e** Reaction time of hypoxanthine reacting with XOD. **f** Reaction time of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacting with *o*-dianisidine. **g** Concentration of *o*-dianisidine



increased from 0.001 to 0.5 mg L<sup>-1</sup>, the biosensor's response increased due to increasing enzymatic reactions. However, XOD concentration higher than 0.5 mg L<sup>-1</sup> yielded no significant response change because all substrate molecules were bound to enzymes. As such, an optimized XOD concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> was selected to achieve the best response. The optimization of HRP concentration was also investigated, and the results are shown in Fig. 3b. Color intensity increased with increased HRP concentration, but no significant change was

obtained when the concentration of HRP exceeded 0.01 mg mL<sup>-1</sup>. Hence, the concentration of 0.01 mg mL<sup>-1</sup> HRP was chosen as optimal.

#### Effects of pH Value of XOD and HRP

The value of pH affects the function of the enzyme. Therefore, the pH value of XOD was investigated by using 0.1 M phosphate buffer ranging from 5.00 to 8.50. The results shown in

**Fig. 4** Calibration curve for hypoxanthine under optimal conditions. Inset: Linear range of the calibration curve for 5–40 mg L<sup>-1</sup>

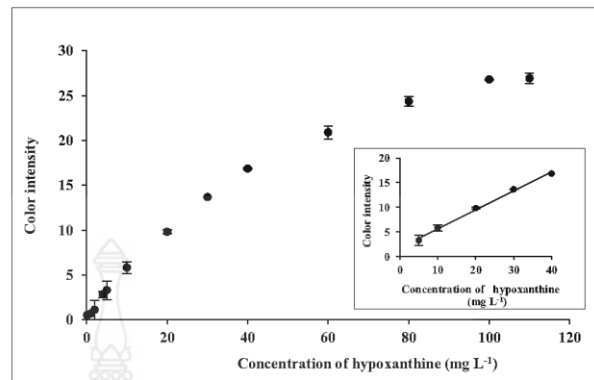


Fig. 3c indicate that color intensity decreases from pH 7.00 to 8.50. Thus, pH 7.00 was used as the optimal pH value for hypoxanthine detection. The effect of pH value on HRP activity was also optimized by investigating pH ranges from 5.00 to 8.50 in 0.1 M phosphate buffer. As shown in Fig. 3d, the intensity increased with increased pH value. The color intensity reached peak value at pH 6.50. Hence, the pH of HRP was set at 6.50.

#### Reaction Time

Reaction time is an important factor that influences the reaction of Eqs. 1 and 2. Therefore, reaction times were studied. Figure 3e shows the results of reaction time during the hydrolysis of hypoxanthine when catalyzed by XOD to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the substrate of the second reaction. Color intensity increased as the reaction time increased from 1 to 2 min and decreased as the reaction time increased from 2 to 9 min. Thus, 2 min was chosen as the optimum reaction time between hypoxanthine and XOD. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated from the first reaction is used to oxidize *o*-dianisidine in secondary reaction with HRP, resulting in a color change to brown. Therefore, the

reaction time of this reaction was optimized. In Fig. 3f, color intensity reached maximum at 3 min and remained constant from 3 to 13 min. Thus, 3 min was selected as the reaction time for the catalysis reaction of HRP, as shown in Eq. 2.

#### Concentration of *o*-Dianisidine

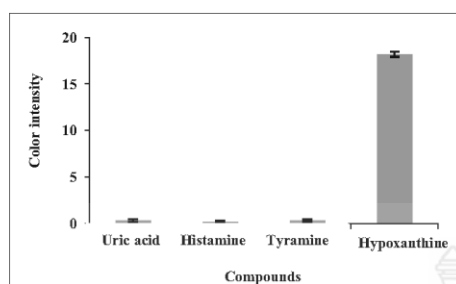
The concentration of *o*-dianisidine has a significant influence on color reaction. Thus, the concentration of *o*-dianisidine was optimized, and the results are shown in Fig. 3g. From Fig. 3g, it is observed that the highest color signal was obtained at 3 mM. Therefore, 3 mM of *o*-dianisidine was used for the next experiment.

#### Analytical Performance of the $\mu$ PAD Biosensor

The performance of the  $\mu$ PAD biosensor was verified using optimum conditions based on the above parameters. The developed  $\mu$ PAD biosensor exhibited a linear range of 5–40 mg L<sup>-1</sup>, as shown in Fig. 4. The linear regression equation was  $y = 0.3869x + 1.749$  with a correlation coefficient of 0.9957. A low detection limit of 1.8 mg L<sup>-1</sup> was

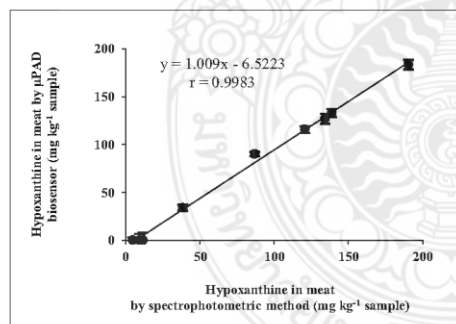
**Table 1** Recovery of hypoxanthine in meat samples using the  $\mu$ PAD biosensor

Sample	Concentration of hypoxanthine (mg L <sup>-1</sup> )			Recovery (%)
	Original	Spiked	Found	
Pork	8.45 ± 0.11	15	22.92 ± 0.37	96.5 ± 2.5
		20	27.05 ± 0.50	93.0 ± 2.5
Nile tilapia fish	0	15	15.71 ± 0.65	104.7 ± 4.3
		20	20.41 ± 0.75	102.0 ± 3.8
Chicken	10.23 ± 0.38	15	25.24 ± 0.50	100.1 ± 3.3
		20	29.16 ± 0.96	94.6 ± 4.8
Fish sauce	6.22 ± 0.88	15	20.55 ± 0.56	95.5 ± 3.8
		20	24.06 ± 0.38	89.2 ± 1.9



**Fig. 5** Selectivity test with uric acid, histamine, and tyramine ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) using the developed  $\mu\text{PAD}$  biosensor

evaluated using a signal-to-noise ratio of 3, which was corresponding to  $18 \text{ mg kg}^{-1}$  in the meat sample (Nardo et al. 2016). The quantification limit was  $6.1 \text{ mg L}^{-1}$  with an acceptable precision (% RSD = 4.75) and accuracy (% recovery = 95.8) (Taverniers et al. 2004). To evaluate the precision of the  $\mu\text{PAD}$  biosensor, intra- $\mu\text{PAD}$  biosensor repeatability and inter- $\mu\text{PAD}$  biosensor reproducibility were studied using the same concentration of hypoxanthine ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) expressed as RSD ( $n = 7$ ). The results showed that % RSD repeatability and reproducibility were 3.5 and 4.1, respectively, indicating good precision (Taverniers et al. 2004). The accuracy of the  $\mu\text{PAD}$  biosensor was evaluated through a recovery test. Four real samples (pork, fish, chicken, and fish sauce) were spiked with three different concentrations of hypoxanthine. As shown in Table 1, recovery values ranged between 89.2 and 104.7%, indicating good accuracy of the developed  $\mu\text{PAD}$  biosensor (Taverniers et al. 2004). These results showed the capability of the developed  $\mu\text{PAD}$  biosensor to detect hypoxanthine in real samples without clean-up and pre-concentration sample steps.



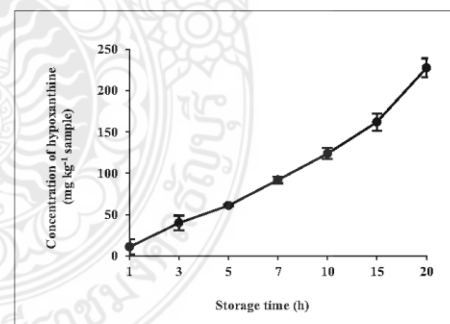
**Fig. 6** Correlation curve between hypoxanthine concentrations as detected by standard spectrophotometric ( $X$ -axis) method and the present  $\mu\text{PAD}$  biosensor ( $Y$ -axis)

### The Selectivity and Stability of the $\mu\text{PAD}$ Biosensor

The selectivity of the  $\mu\text{PAD}$  biosensor toward hypoxanthine was studied by testing with uric acid, histamine, and tyramine in the same concentration as hypoxanthine ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Minimal color intensity was observed with uric acid, histamine, and tyramine, but significant color intensity was shown with hypoxanthine (Fig. 5). These results indicated very good selectivity for the analytical device even in the presence of other compounds in real samples. The long-time stability of  $\mu\text{PAD}$  biosensor was also studied. The  $\mu\text{PAD}$  biosensor was stored at  $4^\circ\text{C}$  in a refrigerator and tested every week by measuring the response to  $50 \text{ mg L}^{-1}$  hypoxanthine. The long-term stability of this  $\mu\text{PAD}$  biosensor showed that the response yielded about 96% of the initial response after 2 weeks. The reduction in response may be caused to the loss of enzyme activity of XOD. After 4 weeks, the  $\mu\text{PAD}$  biosensor response still retains 89% which may due to the short life time of XOD (Albelda et al. 2017).

### Detection of Hypoxanthine in Meat Samples

To test the performance of  $\mu\text{PAD}$  biosensor in real sample applications, nine meat samples were chosen and analytical results were compared with that spectrophotometric method. All analytical results of two methods were tested with a linear regression and statistic  $t$  test. Figure 6 shows the results that an excellent correlation coefficient ( $r = 0.9983$ ) was obtained between the hypoxanthine concentrations by these two methods. The mean values of the two methods were also compared using a statistic  $t$  test at 95% confidence. The results showed that calculated  $t$  values for all samples were less than the  $t$  critical value, so it can be concluded that there is no statistically significant



**Fig. 7** Detection of hypoxanthine in Nile tilapia fish sample during storage for 20 h at room temperature



difference between the methodologies. These observations expressed accuracy of the present  $\mu$ PAD biosensor. Moreover, Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) was chosen as the sample to test the performance of the developed  $\mu$ PAD biosensor for monitoring fish freshness. After the death of the fish, the amount of hypoxanthine increased, affecting the quality of the fish. Thus, the developed  $\mu$ PAD biosensor was used to detect hypoxanthine concentration in Nile tilapia fish at various times ranging from 1 to 20 h after death. Hypoxanthine level increased as the storage time increased, as shown in Fig. 7. After 20 h, hypoxanthine concentration was very high, meaning that the Nile tilapia was completely deteriorated. These results showed that the developed  $\mu$ PAD biosensor has potential applications for evaluating meat freshness.

### Conclusion

In conclusion, we have successfully developed a new colorimetric biosensor method and microfluidic paper-based analytical device to create a simple, selective, and cost-effective  $\mu$ PAD biosensor for hypoxanthine detection in meat samples. This colorimetric  $\mu$ PAD biosensor was based on multienzyme reactions on paper that produced a brown color. Color intensity was recorded using a scanner and exported to ImageJ software to create average intensity. The  $\mu$ PAD biosensor was found to be highly selective toward hypoxanthine and shows 89.2–104.7% recovery of hypoxanthine from meat samples. The limit of detection of the proposed  $\mu$ PAD biosensor for hypoxanthine detection was  $1.8 \text{ mg L}^{-1}$ , which is lower than the previous works (Nguyen and Luong 1993). A test using our  $\mu$ PAD biosensor, which can measure hypoxanthine samples, requires just 5 min to complete and requires no special equipment. Thus, this  $\mu$ PAD biosensor provides a rapid, cheap, and simple method of  $\mu$  analysis.

**Funding** This study was financially supported by the Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi.

### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** Montita Mooltongchun declares that she has no conflict of interest. Siriwan Teepoo declares that she has no conflict of interest.

**Ethical Approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Informed Consent** Not applicable in this study.

### References

- Albelda JAV, Uzunoglu A, Santos GNC, Stanciu LA (2017) Graphene-titanium dioxide nanocomposite based hypoxanthine sensor for assessment of meat freshness. *Biosens Bioelectron* 89:518–524
- Andrade SCS, Mársico ET, Godoy RLO, Franco RM, Junior CAC (2014) Chemical quality indices for freshness evaluation of fish. *J Food Stud* 3:1–17
- Caygill RL, Blair GE, Millner PA (2010) A review on viral biosensors to detect human pathogens. *Anal Chim Acta* 681:8–15
- Chen Z, Lin Y, Ma X, Guo L, Qiu B, Chen G, Lin Z (2017) Multicolor biosensor for fish freshness assessment with the naked eye. *Sensors Actuators B* 252:201–208
- Czaundera M, Kowalczyk J (2000) Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J Chromatogr B* 744:129–138
- Devi R, Yadav S, Nehra R, Pundir CS (2013) An amperometric hypoxanthine biosensor based on Au@FeNPs for determination of hypoxanthine in meat samples. *Int J Biol Macromol* 62:629–635
- Devi R, Batra B, Lata S, Yadav S, Pundir CS (2013) A method for determination of xanthine in meat by amperometric biosensor based on silver nanoparticles/cysteine modified Au electrode. *Process Biochem* 48:242–249
- Farthing D, Sica D, Gehr T, Wilson B, Fakhry I, Larus T, Farthing C, Karnes HT (2007) An HPLC method for determination of inosine and hypoxanthine in human plasma from healthy volunteers and patients presenting with potential acute cardiac ischemia. *J Chromatogr B* 854:158–164
- Giacomello A, Salemot C (1977) A continuous spectrophotometric assay for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Anal Biochem* 79:263–267
- Granica M, Fiedoruk-Pogrebniak M, Koncki R, Tymecki Ł (2018) Flow injection analysis in lab-on-paper format. *Sensors Actuators B Chem* 257:16–22
- Gonzalez E, Pariente F, Lorenzo E, Hernandez L (1991) Amperometric sensor for hypoxanthine and xanthine based on the detection of uric acid. *Anal Chim Acta* 242:267–273
- He L-L, Cheng L, Lin Y, Cui HF, Hong N, Peng H, Kong D-R, Chen C-D, Zhang J, Wei G-B, Fan H (2018) A sensitive biosensor for mercury ions detection based on hairpin hindrance by thymine-Hg (II)-thymine structure. *J Electroanal Chem* 814:161–167
- Hernández-Cázares AS, Aristoy MC, Toldrá F (2010) Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness. *Food Chem* 123:949–954
- Hu S, Xua C, Luob J, Luoc J, Cuid D (2000) Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode. *Anal Chim Acta* 412:55–61
- Johnson LA, Gordon RB, Emmerson BT (1997) Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: a simple spectrophotometric assay. *Clin Chim Acta* 80:203–207
- Lawal AT, Adeloju SB (2012a) Progress and recent advances in fabrication and utilization of hypoxanthine biosensors for meat and fish quality assessment: a review. *Talanta* 100:217–228
- Lawal AT, Adeloju SB (2012b) Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode. *Food Chem* 135:2982–2987
- Lougois VP, Kyranas ER, Kyranas VR (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Res Int* 36:551–560
- Lv M, Liu Y, Geng J, Kou X, Xin Z, Yang D (2018) Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection. *Biosens Bioelectron* 106:122–128

- Mehrotra P (2016) Biosensors and their applications—a review. *J Oral Biol Craniofac Res* 6:153–159
- Mei DA, Gross GJ, Nithipatikom K (1996) Simultaneous determination of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in microdialysis samples using microbore column high-performance liquid chromatography with a diode array detector. *Anal Biochem* 238:34–39
- Metkar SK, Girigoswami K (2019) Diagnostic biosensors in medicine – a review. *Biocatal Agric Biotechnol* 17:271–283
- Mora L, Hernández-Cázares AS, Aristoy M-C, Toldrá F (2010) Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites. *Food Chem* 123:1282–1288
- Nardo FD, Anfossi L, Giovannoli C, Passini C, Gofman VV, Goryacheva IY, Baggiani C (2016) A fluorescent immunochromatographic strip test using quantum dots for fumonisins detection. *Talanta* 150:463–468
- Nguyen AL, Luong JHT (1993) Development of mediated amperometric biosensors for hypoxanthine, glucose and lactate: a new format. *Biosens Bioelectron* 8:421–431
- Peng B, Fang S, Tang L, Ouyang X, Zeng G (2019) Chapter 8 - nanohybrid materials based biosensors for heavy metal detection. *Micro Nano Technologies* 233–264
- Pierini GD, Robledo SN, Zon MA, Nezio MSD, Granero AM, Fernández H (2018) Development of an electroanalytical method to control quality in fish samples based on an edge plane pyrolytic graphite electrode. Simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid. *Microchem J* 138:58–64
- Rebelo R, Barbosa AI, Caballero D, Kwon IK, Oliveira JM, SuKundu SC, Reis RL, Correlo VM (2019) 3D biosensors in advanced medical diagnostics of high mortality diseases. *Biosens Bioelectron* 130:20–39
- Roberts B, Morris BA, Clifford MN (1991) Comparison of radioimmunoassay and spectrophotometric analysis for the quantitation of hypoxanthine in fish muscle. *Food Chem* 42:1–17
- Roda A, Mirasoli M, Michelini E, Fusco MD, Zangheri M, Cevenini L, Roda B, Simoni P (2016) Progress in chemical luminescence – based biosensors: a critical review. *Biosens Bioelectron* 76:164–179
- Si Y, Park JW, Jung S, Hwang GS, Goh E, Lee HJ (2018) Layer-by-layer electrochemical biosensors configuring xanthine oxidase and carbon nanotubes/graphene complexes for hypoxanthine and uric acid in human serum solutions. *Biosens Bioelectron* 121:265–271
- Taverniers I, Loose MD, Bockstaele EV (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal Chem* 23:553–552
- Wang Y, Wang L, Tian T, Yao G, Hu X, Yang C, Xu Q (2012) A highly sensitive and automated method for the determination of hypoxanthine based on lab-on-valve approach using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs/β-CD modified electrode. *Talanta* 99:840–845
- Ye Y, Guo H, Sun X (2019) Recent progress on cell-based biosensors for food safety and quality control. *Biosens Bioelectron* 126:389–404
- Zai-Hui DU, Xiang-Yang LI, Jing-Jing TIAN, Yang-Zi Z, Hong-Tao TIAN, Wen-Tao XU (2018) Progress on detection of metals ions by functional nucleic acids biosensor. *Chin J Anal Chem* 46:995–1004
- Zhu G, Yin X, Jin D, Zhang B, Gu Y, An Y (2019) Paper-based immunosensors: current trends in the types and applied detection techniques. *TrAC Trends Anal Chem* 111:100–117

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน	มณฑิตา มูลทองซุน
วัน เดือน ปีเกิด	2 มิถุนายน 2535
ที่อยู่	66/1 หมู่ 1 ตำบลหินมูล อ.บางเลน จ.นครปฐม 73190
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เบอร์โทรศัพท์	065-9371822
อีเมล	montita0206@gmail.com

