บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

2.1.1 YSI Model 25 oxidase meter และ YSI 2510 oxidase probe ของ Yellow Spring Instrument Co., U.S.A.

2.1.2 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง Spectronic 21 ของ Bausch & Lomb Co., U.S.A.

2.1.3 เครื่องวัดการละลายของออกซิเจน Hanna Model HI 8543 ของ Hanna Instrument Co., Italy

2.1.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Tempette TE-8D ของ Techne (Cambridge) Co., England

2.1.5 เครื่องบันทึกสัญญาณมิลลิโวลต์ Hitachi 561 ของ Hitachi Co., Japan

2.1.6 เครื่องกวนผสมด้วยแรงแม่เหล็ก Corning PC-101 ของ Corning Co.

2.1.7 ผ้าไนลอน ซื้อมาจากร้านร่มฟ้าไทย ราคาเมตรละประมาณ 60 บาท ทดลองนำไปทำอินฟราเรดสเปกตรัม เทียบกับสเปกตรัมมาตรฐานพบว่าเป็นไนลอน 6 (16) (ดูภาคผนวก ก) ผ้าไนลอนมีความหนา 0.1 มิลลิเมตร มีจำนวนเส้นด้าย 37 เส้นต่อ 1 เซนติเมตร แต่ละเส้นด้ายมีเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.06 มิลลิเมตร

2.1.8 ปั๊มลมให้อากาศสำหรับเลี้ยงปลา NS-B1 ของ Nissei Co., Japan

2.2 สารเคมีที่ใช้

2.2.1 ไดเมทิล ซัลเฟต ของ E.Merck

2.2.2 เฮกซาเมทิลีนไดอามีน ของ Fluka

2.2.3 กลูตารัลดีไฮด์ ของ Fluka

2.2.4 กลูโคส ออกซิเดส มีแอคติวิตี 4000 หน่วย/กรัม ของ Sigma

2.2.5 เมทานอล ของ E.Merck

2.2.6 D(+)-กลูโคสโมโนไฮเดรท ของ Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover

2.2.7 ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ ของ E.Merck

2.2.8 ไซโคลเฮกซาโนน ของ E.Merck

2.2.9 ออโธ-ไดอะนิซิดีน ของ Sigma

2.2.10 โซเดียมเบนโซเอท ของ Fluka

2.2.11 เปอร์ออกซิเดส ของ Sigma

2.2.12 เซลลูโลสอะซิเตต No. 398-10 ของ Eastman Kodak

2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขั้นตอนการวิจัยดังนี้

การตรึง GOx บนผ้าไนลอน โดยศึกษาสภาวะการตรึงแต่ละหัวข้อ คือ

1 กระตุ้นผ้าไนลอนด้วยไดเมทิล ซัลเฟต

2 ติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีน

3 ติดกลูตารัลดีไฮด์

4 ตรึง GOx

5 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ตรึงได้

เลือกเอนไซม์ที่ตรึงได้แล้วมีแอคติวิตีดีและคาดว่าเหมาะสมมาศึกษาสภาวะต่าง ๆ ในการวัดปริมาณกลูโคส

ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

2.3.1 การตรึง GOx บนผ้าไนลอนในสภาวะต่าง ๆ มีตัวแปร คือ

2.3.1.1 เวลาสำหรับกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยไดเมทิล ซัลเฟต นำผ้าไนลอนมาตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว ผูกผ้าไนลอนเข้ากับปลายแท่งแก้วตันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรด้วยด้ายไนลอน จุ่มแท่งแก้วผูกผ้าไนลอนลงในหลอดแก้วบรรจุสารไดเมทิล ซัลเฟต 7 ลบ.ซม. ซึ่งแช่อยู่ในน้ำเดือด ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 นาที แล้วนำหลอดแก้วดังกล่าวมาทำให้เย็นโดยจุ่มลงในอ่างน้ำแข็ง 1 นาที นำแท่งแก้ว

ติดผ้ามาจุ่มลงในหลอดแก้วที่มีเมทานอลเป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงนำแท่งแก้วมาจุ่มในหลอดแก้วที่มีเมทานอลอีกหลอดหนึ่งเป็นเวลา 1 นาที แกะผ้าออกจากแท่งแก้ว นำผ้าที่ได้มาแช่ไว้ในสารละลายเฮกซาเมทิลีนไดอามีนเข้มข้น 5.5% ในบัฟเฟอร์บอเรต พีเอช 9 ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำผ้ามาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ลบ.ซม. แล้วฉีดล้างด้วยน้ำปราศจากอิออน นำผ้าที่ได้มาแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 6.5% ในบัฟเฟอร์บอเรต พีเอช 9 ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที นำผ้าที่ได้มาล้างด้วยเมทานอลปริมาตร 50 ลบ.ซม. แล้วฉีดล้างด้วยน้ำปราศจากอิออน นำผ้าที่ได้มาแช่ในสารละลาย GOx 0.3% ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงแล้วเก็บเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ ทิ้งไว้ค้างคืน นำผ้าที่ได้มาฉีดล้างด้วยน้ำปราศจากอิออน จะได้ผ้าไนลอนที่ตรึง GOx เรียบร้อยแล้ว

2.3.1.2 ติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีน ใช้ขั้นตอนการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1.1 แต่แปรสภาวะการติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีนด้วย 3 ปัจจัย วางแผนการทดลองแบบ 2^3 แฟกตอเรียล โดยมี

2.3.1.2.1 ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 1 และ 10%

2.3.1.2.2 พีเอช 2 ระดับ คือ พีเอช 8 และ 10

2.3.1.2.3 เวลา 2 ระดับ คือ 1 และ 4 ชั่วโมง

โดยมีจุดกลางร่วมที่ความเข้มข้น 5.5% พีเอช9 เวลา 2.5 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

2.3.1.3 ติดกลูตารัลดีไฮด์ ใช้ขั้นตอนการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1.1 แต่แปรสภาวะการติดกลูตารัลดีไฮด์ด้วย 3 ปัจจัย วางแผนการทดลองแบบ 2^3 แฟกตอเรียล โดยมี

2.3.1.3.1 ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 1 และ 12%

2.3.1.3.2 พีเอช 2 ระดับ คือ พีเอช 8 และ 10

2.3.1.3.3 เวลา 2 ระดับ คือ 30 และ 90 นาที

โดยมีจุดกลางร่วมที่ความเข้มข้น 6.5% พีเอช9 เวลา 45 นาที ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

2.3.1.4 ตรึง GOx ใช้ขั้นตอนการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1.1 แต่แปรสภาวะการตรึง GOx ด้วย 2 ปัจจัย วางแผนการทดลองแบบ 2^2 แฟกตอเรียล โดยมี

2.3.1.4.1 ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 0.1 และ 0.3%

2.3.1.4.2 พีเอช 2 ระดับ คือ พีเอช 6 และ 8

โดยมีจุดกลางร่วมที่ความเข้มข้น 0.2% พีเอช 7 ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.1.5 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ตรึงได้ นำผ้าไนลอนที่ตรึงเอนไซม์แล้วมาติดบนผิวไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์อิเล็กโทรดด้วยวงยาง วัดแอคติวิตีโดยจุ่มอิเล็กโทรดลงในบีกเกอร์ (ขนาด 50 ลบ.ซม. มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ติด baffle 4 อัน กว้าง 4 มิลลิเมตร) ที่มีสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ปริมาตร 40 ลบ.ซม. ที่อุณหภูมิ 35 °ซ กวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กขนาดยาว 23 มิลลิเมตร แล้วอ่านค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ มีหน่วยเป็นนาโนแอมป์ ตามรูปที่ 2.1

2.3.2 เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง GOx บนผ้าไนลอน โดยดูจากผ้าที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ดีใช้เป็นสภาวะมาตรฐานในการตรึงเอนไซม์ตลอดการวิจัย และนำมาศึกษาสภาวะต่าง ๆ ในการวัดปริมาณกลูโคส ดังนี้

2.3.2.1 ผลของพีเอชที่มีต่อการวัดปริมาณกลูโคส วัดแอคติวิตีโดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่มีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่พีเอช 4 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 35 °ซ

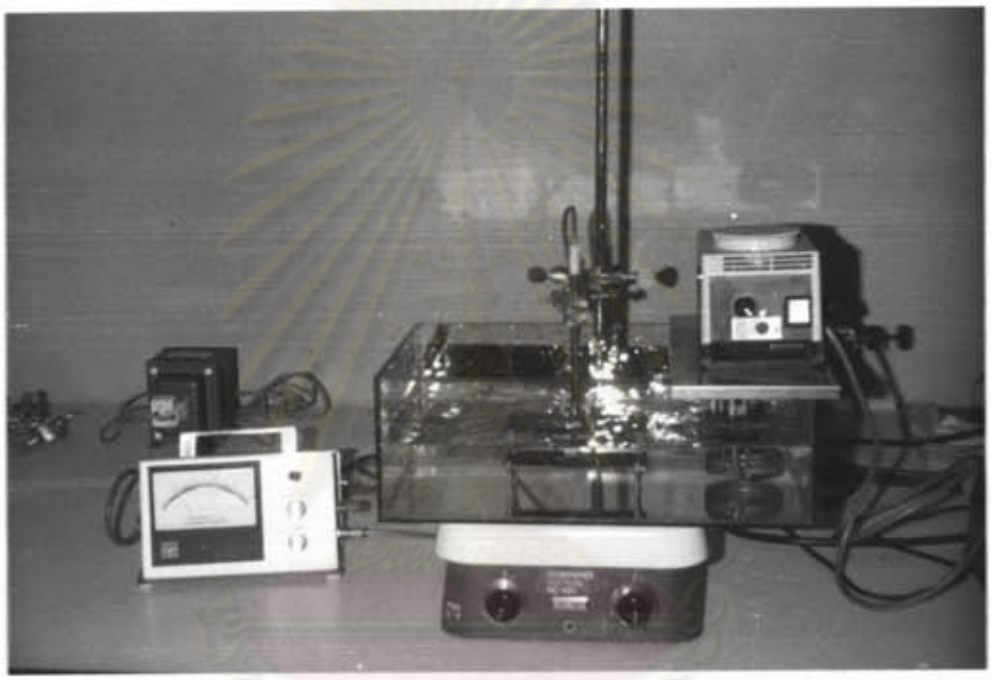
2.3.2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการวัดปริมาณกลูโคส ทดลองเปลี่ยนอุณหภูมิตั้งแต่ 25 ถึง 65 °ซ ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ศึกษาเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 45 °ซ และช่วงอุณหภูมิ 50 ถึง 65 °ซ ช่วงแรกใช้ผ้าตรึง GOx ผืนเดียวกันตลอดวัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ส่วนช่วงอุณหภูมิ 50 ถึง 65 °ซใช้ผ้าวัดแอคติวิตีเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 35 °ซ แล้วนำผ้าไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วงเวลาหนึ่ง นำกลับมาวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 35 °ซอีกครั้ง

2.3.2.3 ผลของพีเอชที่มีต่อเสถียรภาพของGOxที่ถูกตรึงบนผ้าไนลอน นำผ้าไนลอนมาวัดแอคติวิตีเริ่มต้นในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 35 °ซ แล้วนำไปแช่ไว้ในสารละลายของบัฟเฟอร์ที่มีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่พีเอช 3 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำกลับมาวัดแอคติวิตีที่เหลือในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช7 ที่อุณหภูมิ 35 °ซ

2.3.2.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของ GOx ที่ถูกตรึงบนผ้าไนลอนขณะใช้งาน ทดลองที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 °ซ โดยวัดแอคติวิตีเริ่มต้นในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ที่อุณหภูมิใด ๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมินั้น แล้ววัดแอคติวิตีทุกวัน ๆละ 2-3 ครั้ง ดูเสถียรภาพของ GOx ที่อุณหภูมินั้น

2.3.2.5 การหาค่าคงที่ Michaelis ปรากฏ (K_m app) และอัตราเร็วสูงสุดปรากฏ (V_{max} app) โดยเตรียม

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 1%



รูปที่ 2.1 การวัดแอคติวิตีเอนไซม์ตรึงบนผ้าไนลอนด้วยเครื่อง YSI Glucose Analyser

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน 0.2 มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6

3. สารละลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 0.05% (80 Purpurogallin units/ลบ.ซม.)

ปิเปตสารละลายทั้ง 3 มีสารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน 7.9 ลบ.ซม. สารละลายเปอร์ออกซิเดส 0.1 ลบ.ซม. ที่เหลือเป็นสารละลายกลูโคสและน้ำปราศจากอิออน ทำให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 ลบ.ซม. ปรับให้ได้ความเข้มข้นกลูโคสตามต้องการ ใส่สารละลายเหล่านี้ในบีกเกอร์ขนาด 50 ลบ.ซม. จุ่มบีกเกอร์ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35 °ซ แช่ผ้าไนลอนตริง GOx ลงในสารละลายดังกล่าว เริ่มจับเวลาพร้อมกับแกว่งบีกเกอร์ในอ่างน้ำ แล้วหยิบผ้าออกจากบีกเกอร์ที่เวลาต่าง ๆ กัน นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณหาค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เวลาช่วงแรก ๆ เมื่อความเข้มข้นกลูโคสค่าต่าง ๆ กัน นำมาเขียนกราฟLineweaver-Burk หาค่าคงที่ Michaelis ปรากฏ (K_m app) และ อัตราเร็วสูงสุดปรากฏ (V_{max} app)

2.3.2.6 การเตรียมแผ่นเมนเบรนเซลลูโลสอะซีเตต (ใช้อักษรย่อว่าแผ่น CA) เตรียมตามวิธีของ สิริชัย และ บัญญัติ (17) ละลายเซลลูโลสอะซิเตตผงจากบริษัท ไว้ท์กรุ๊ป จำกัด เข้มข้น 4% ในไซโคลเฮกซาโนน นำสารละลายมา 1.5 ลบ.ซม. เทลงบนกระจกเอียงประมาณ 45° ที่จุ่มลงในอ่างซึ่งมีไอโซโพรพานอล 5% ในน้ำ จะได้แผ่นฟิล์มบางลอยอยู่บนผิวหน้า ทิ้งไว้ 30 นาที ใช้ปากคีบคีบแผ่น CA ที่ได้มาล้างด้วยน้ำปราศจากอิออน แล้วเก็บไว้ในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท 0.1% วัดความหนาของแผ่น CA ที่เตรียมได้ด้วยไมโครมิเตอร์ หลังจากนี้จะศึกษาผลการวัดปริมาณกลูโคส โดยนำแผ่น CA มาติดอิเล็กโทรดด้วยเสมอก่อนติดผ้าไนลอนตริง GOx บนผิวอิเล็กโทรด

2.3.2.7 ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส วัดปริมาณกลูโคสโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้วัด แล้วดูผลต่อขนาดสัญญาน และเวลาแสดงสัญญาน

2.3.2.8 ผลของการกวนต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส วัดปริมาณกลูโคสโดยเปลี่ยนความเร็วของรอบที่ใช้กวนสารละลาย แล้วดูผลต่อขนาดสัญญานและเวลาแสดงสัญญาน

2.3.2.9 ผลของการใช้แผ่น CA ในการป้องกันสารรบกวน ทดลองวัดสารโมเลกุลเล็กที่อาจถูกออกซิไดส์ได้ที่อิเล็กโทรด เช่น กรดแอสคอบิค หรือ ตัวอย่างปัสสาวะ ดูผลการป้องกันสารรบกวน

2.3.2.10 ผลการวัดไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ วัดในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 สภาวะต่าง ๆ ดังนี้

2.3.2.10.1 ใช้อิเล็กโทรดเปล่า ๆ

2.3.2.10.2 ใช้อิเล็กโทรดติดด้วยผ้าไนลอน

2.3.2.10.3 ใช้อิเล็กโทรดติดด้วยแผ่น CA

2.3.2.10.4 ใช้อิเล็กโทรดติดด้วยแผ่นCA และผ้าไนลอน

2.3.2.11 ระดับขนาดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดขณะทำการวัดกลูโคสในสภาวะปกติเป็นเวลา 10 นาทีต่อเนื่องกันที่ระดับความเข้มข้นสูง แล้วใช้อิเล็กโทรดวัดไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในสารละลายเพื่อศึกษาปริมาณออกซิเจนที่ต้องการในการเกิดปฏิกิริยา ปริมาณออกซิเจนที่ละลายเหลืออยู่ในสารละลาย การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นกลูโคส แล้วทดลองวัดกลูโคสพร้อมกับใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดวัดการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนที่ละลายเหลืออยู่ในสารละลายด้วย

2.3.2.12 การวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดแทนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อิเล็กโทรด ติดGOxตรึงบนผ้าไนลอนเข้ากับปลายอิเล็กโทรดแล้ววัดปริมาณกลูโคสดูช่วงการใช้งานที่เหมาะสม

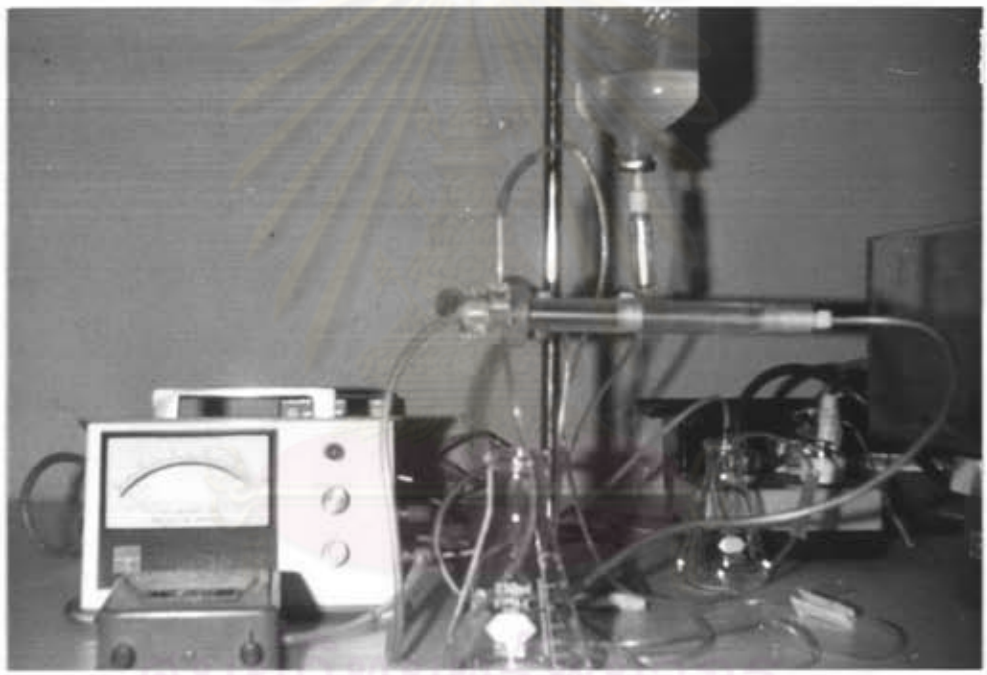
2.3.2.13 จัดสร้างอุปกรณ์ควบคุมการผสม ตามรูปที่ 2.2 และ 2.3 มีลักษณะเป็นกล่องทำด้วยพลาสติกอะครีลิค เจาะท่อกลวงตรงกลางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 มิลลิเมตร ท่อยาวประมาณ 12 มิลลิเมตร ด้านข้างหนึ่งมีไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์อิเล็กโทรดติดอยู่ด้วยเกลียว อีกด้านเป็นแผ่นยางยืดติดด้วยวงแหวนและตะปูควง ใช้กระทุ้งด้วยแรงลมสำหรับให้เกิดการผสมภายในช่องว่างดังกล่าว ด้านบนของกล่องมีท่อเล็กให้บัฟเฟอร์ฟอสเฟตเข้าได้ส่วนด้านล่างมีท่อเล็กสำหรับปล่อยสารละลายทิ้งเมื่อวัดเสร็จแต่ละครั้ง ด้านหน้าบนมีท่อเล็กๆสำหรับใช้ฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสและตัวอย่างเพื่อทำการวัด ศึกษาการวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้อุปกรณ์ดังกล่าวเปรียบเทียบผลการวัดกับระบบเปิดสู่บรรยากาศที่ใช้ก่อนหน้า

2.3.2.14 เสถียรภาพในการเก็บผ้าไนลอนตรึง GOx วัดแอคติวิตีเริ่มต้น แล้วทดลองเก็บผ้าไนลอนในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท 0.1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ดังนี้

2.3.2.14.1 พีเอช 5 6 และ 7 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

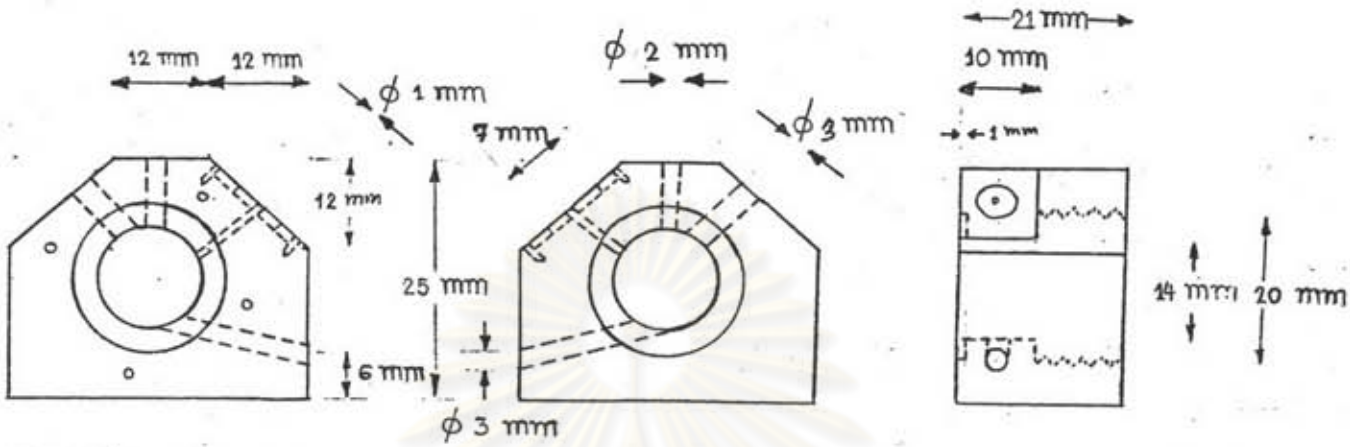
2.3.2.14.2 พีเอช 7 ที่อุณหภูมิห้อง

แล้ววัดแอคติวิตีที่เหลืออยู่ที่เวลาต่าง ๆ กัน

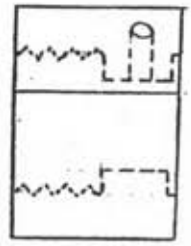


รูปที่ 2.2 รูปถ่ายอุปกรณ์ควบคุมการผสม (อยู่กลางรูป)

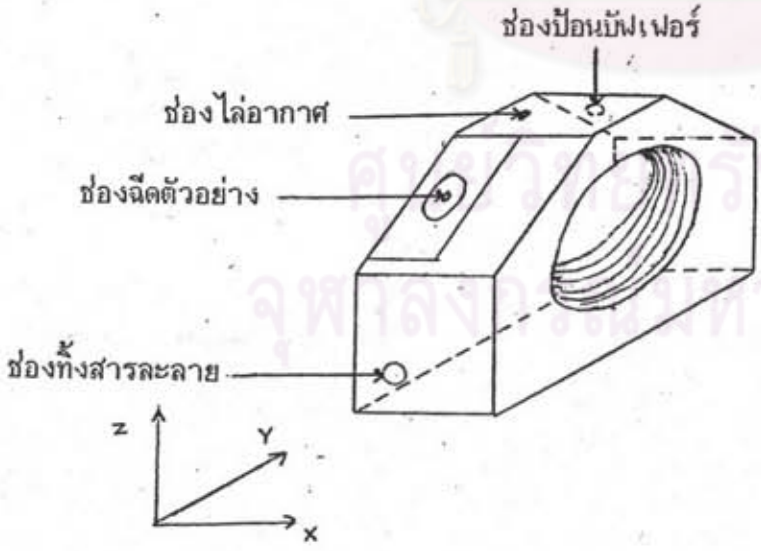
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ระนาบ YZ , X = 0 mm ระนาบ YZ , X = 21 mm ระนาบ XZ , Y = 0 mm



ระนาบ XZ , Y = 36 mm



ระนาบ XY , Z = 0 mm

รูปที่ 2.3 แบบแสดงโครงสร้างอุปกรณ์ควบคุมการผสม