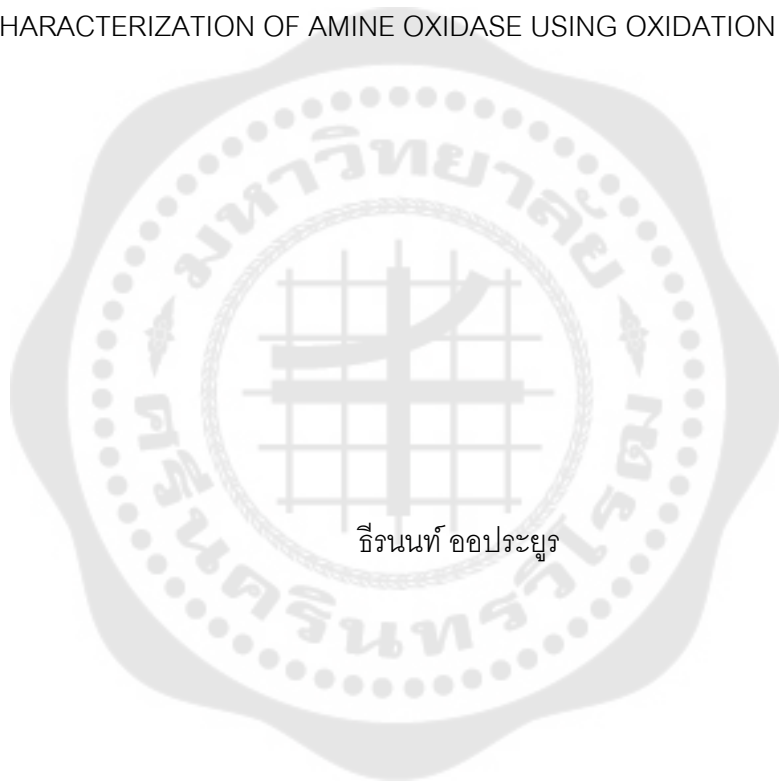




การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ออกซิเดส โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็ก (II)
CHARACTERIZATION OF AMINE OXIDASE USING OXIDATION OF IRON (II)



ธีรนนท์ ออประยูร

การศึกษาลักษณะสมบัติของเอมีนออกไซด์ส โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็ก (II)



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

CHARACTERIZATION OF AMINE OXIDASE USING OXIDATION OF IRON (II)



TEERANON ORPRAYOON

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF EDUCATION

(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาบัตร

เรื่อง

การศึกษาลักษณะสมบัติของเอมีนออกซิเดส โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็ก (II)

ของ

ธีรนนท์ ออประยูร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร

ที่ปรึกษาหลัก

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ ดอนพุดชา)

(ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้ง

ประเสริฐ)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาลักษณะสมบัติของเอมีนออกซิเดส โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็ก (II)
ผู้วิจัย	ธีรนนท์ ออบประยูร
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเชาว์ ดอนพุดชา

เอนไซม์เอมีนออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีแอมมิเนชันของไบโอจีนิกเอมีน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ แอมโมเนีย และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสนี้นิยมทำโดยการติดตามปริมาณของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้น และอาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสร่วมกับซับสเตรตที่ทำให้เกิดสีได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่าง H_2O_2 และเหล็ก (II) ทดแทนการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเริ่มจากการศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยใช้เหล็ก (II) ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่า วิธีการตรวจวัดนี้สามารถหาปริมาณ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ โดยได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 6.25 - 300 μM มีขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.44 μM และ 0.73 μM ตามลำดับ หลังจากนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนรีเอเจนต์จากนอร์ฟลอกซาซินไปเป็นไตรไพริดีลไดรเอซีน (TPTZ) เพื่อใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ผลการทดลองที่ได้พบว่า วิธีการตรวจวัดนี้สามารถหาปริมาณ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ โดยได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 50.0 - 225 μM มีค่า LOD และค่า LOQ เท่ากับ 21.99 μM และ 41.66 μM ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ได้เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ต่อจากนั้นผู้วิจัยได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส โดยใช้ฮีสตามีนเป็นซับสเตรต พบว่าวิธีตรวจวัดที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีสามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธียังคงให้ค่า K_m และ V_{max} ที่มีความคลาดเคลื่อนจากวิธีตรวจวัดโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

คำสำคัญ : ลักษณะสมบัติ เอมีนออกซิเดส ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็ก (II)

Title	CHARACTERIZATION OF AMINE OXIDASE USING OXIDATION OF IRON (II)
Author	TEERANON ORPRAYOON
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Suchao Donpuksa

Amine oxidase is an enzyme that catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines into aldehydes, ammonia and hydrogen peroxide (H_2O_2). Usually, amine oxidase activity is studied by determining the production of H_2O_2 using coupling reactions with peroxidase and chromogenic reagents. Therefore, the aim of this work was to characterize amine oxidase using the oxidation of Fe (II) by H_2O_2 instead of peroxidase. Firstly, the spectrophotometric determination of H_2O_2 was studied using Fe (II) with norfloxacin as a reagent. The results showed that this method was able to detect H_2O_2 at various concentrations. The linear range, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of this method were 6.25 - 300 μM , 0.44 μM and 0.73 μM , respectively. After that, another method was developed by changing the reagent from norfloxacin to tripyridyltriazine (TPTZ) for H_2O_2 determination. The results showed that this method was also able to detect H_2O_2 at various concentrations. The linear range, LOD and LOQ of this method were 50.00 - 225 μM , 21.99 μM and 41.66 μM , respectively. Both methods were available for H_2O_2 determination and the coupling reaction with peroxidase. Eventually, the researchers applied these developed methods to investigate the characterization of amine oxidase, using histamine as a substrate. The results revealed that the both methods were able to use the study of kinetics of amine oxidase. However, they provided inaccurate K_m and V_{max} from the kinetic values, determined by using the coupling method with peroxidase.

Keyword : Characterization Amine Oxidase Oxidation of Iron (II)

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและการให้คำปรึกษาแนะนำจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์น ดอนพุดชา ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกทราบบ้างและขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยรัตน์ ดร.บัณฑิต ประธานหลักสูตร ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำ ในเรื่องการทำดำเนินงานวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยจาก “ทุนงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2562 เลขที่ 089/2563” และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ได้มอบ “ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)” เพื่อเป็นทุนการศึกษาของผู้วิจัย

ท้ายสุดผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้ความกรุณาสนับสนุนด้านการศึกษาและกำลังใจตลอดมา คุณค่าและประโยชน์ของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดามารดา และครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทความรู้ทั้งปวงแก่ผู้วิจัย

ธีรนนท์ ออประยูร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	5
ความสำคัญของงานวิจัย	5
ขอบเขตของงานวิจัย	6
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ Amine oxidase	7
1.1. ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของ Amine oxidase	7
1.2 การเร่งปฏิกิริยาของ Amine oxidase.....	10
1.3 การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase.....	11
1.3.1 หลักการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์.....	11
1.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์	13
1.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase	14
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัด H ₂ O ₂	17

2.1. ลักษณะทั่วไปของ H_2O_2	17
2.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2	18
2.2.1 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Electroanalytical chemistry	18
2.2.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Chromatography	19
2.2.3 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Fluorescence และ Chemiluminescence	19
2.2.4 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Spectrophotometry	20
2.2.4.1 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดยใช้เทคนิค Spectrophotometry ที่ต้องอาศัย Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยา	21
2.2.4.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดยใช้เทคนิค Spectrophotometry ที่ไม่ต้อง อาศัย Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยา	23
3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Oxidation - Reduction ของเหล็ก	24
4. ประเด็นของงานวิจัยที่พัฒนา	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	28
1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	28
1.2 สารเคมี	29
2. วิธีการทดลอง	29
2.1 การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ นอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์	29
2.1.1 การหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร	29
2.1.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์	30
2.1.3 การหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำ ปฏิกิริยา	31

2.1.4 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ นอร์ฟลอกซาซิน.....	32
2.1.5 การตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน รวมทั้งการหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	32
2.2 การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์	33
2.2.1 การหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร	33
2.2.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์.....	34
2.2.3 การหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} และTPTZ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	35
2.2.4 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ TPTZ....	35
2.2.5 การตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ รวมทั้งการหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	36
2.3 การศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase	36
2.4 การนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ Diamine oxidase	37
2.4.1 การหาช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ...	37
2.4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของซับสเตรตต่อความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	40
ตอนที่ 1 การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์.....	40
1.1 ผลของการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร	40
1.2 ผลของการหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์	41
1.3 ผลของการหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.	42

1.4 ผลของการหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน	44
1.5 ผลของการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน รวมทั้งการหา คุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	45
ตอนที่ 2 การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์	46
2.1 ผลของการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร	46
2.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์	47
2.3 ผลของการหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} และ TPTZ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	48
2.4 ผลของการหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ TPTZ	50
2.5 ผลของการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ รวมทั้งการหาคุณลักษณะของ ระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	52
ตอนที่ 3 การทดลองเพื่อศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้วิธี มาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase	53
ตอนที่ 4 การทดลองเพื่อนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้น ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ Diamine oxidase	55
4.1 ผลของการหาช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง	55
4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของซับสเตรตต่อความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	60
ข้อเสนอแนะ	62
บรรณานุกรม	63
ประวัติผู้เขียน	70

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 กลุ่มการทดลองเพื่อใช้ในการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} Fe^{3+} และ นอร์ฟลอกซาซิน โดยผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน	30
ตาราง 2 กลุ่มการทดลองที่ผสมสารละลาย 1.35 mM H_2O_2 สารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} และ สารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซินเข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน	31
ตาราง 3 กลุ่มการทดลองเพื่อใช้ในการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} Fe^{3+} และ TPTZ โดยผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน	33
ตาราง 4 กลุ่มการทดลองที่ผสมสารละลาย 0.10 mM H_2O_2 สารละลาย 0.10 mM Fe^{2+} และ สารละลาย 1.00 mM TPTZ เข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน	34
ตาราง 5 วิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีที่พัฒนาขึ้น	38
ตาราง 6 เปรียบเทียบคุณลักษณะของการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น ...	54
ตาราง 7 ค่า V_{max} และ K_m ที่ได้จากการศึกษาปฏิกิริยาที่มี Diamine oxidase เป็นตัวเร่ง	59

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม Oxidoreductase	8
ภาพประกอบ 2 การทำงานของ L-amino acid oxidase	8
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ <i>E.coli</i> copper-containing amine oxidase homodimer	10
ภาพประกอบ 4 การเร่งปฏิกิริยา Oxidative deamination ด้วย Amine oxidase	10
ภาพประกอบ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์และเวลาในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง	11
ภาพประกอบ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วกับความเข้มข้นของซับสเตรทในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง	12
ภาพประกอบ 7 การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยการใช้ปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reaction) ที่มี 4-AAP และกรดวานิลลิกเป็นรีเอเจนต์	16
ภาพประกอบ 8 การตรวจวัดแอกติวิตีของ CuAO ด้วยการใช้ปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reaction) ที่มี DCHSB และ 4-AAP เป็นรีเอเจนต์	17
ภาพประกอบ 9 หลักการตรวจวัด H ₂ O ₂ โดยใช้ Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นสารตั้งต้น	22
ภาพประกอบ 10 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง [Fe(III)(TPTZ) ₂] ³⁺ เป็น [Fe(II)(TPTZ) ₂] ²⁺	25
ภาพประกอบ 11 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของสารละลายในปฏิกิริยาที่มี Fe ²⁺ และนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์	41
ภาพประกอบ 12 ผลของลำดับการทำปฏิกิริยาต่อค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ผสมสารละลายสองชนิดเข้าด้วยกันก่อน แล้วขั้นตอนที่ 2 จึงเติมสารละลายอีกชนิดหนึ่งเพิ่มลงไป โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาขั้นตอนละ 5 นาที ..	42
ภาพประกอบ 13 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Fe ²⁺ ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซิน และ 0.225 mM H ₂ O ₂ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm	43

ภาพประกอบ 14 ผลของความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซินต่อการเกิดปฏิกิริยากับ สารละลาย 2.25 mM Fe²⁺ และ 0.225 mM H₂O₂ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 440 nm 44

ภาพประกอบ 15 (ก) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาขั้นที่ 1 คือ การผสมสารละลาย Fe²⁺ และ H₂O₂ เข้าด้วยกัน (ข) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 2 คือ การเติมสารละลาย นอร์ ฟลอกซาซินลงในสารละลายผสมระหว่าง Fe²⁺ และ H₂O₂ 45

ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 6.25 - 300 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 440 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H₂O₂ โดยใช้ Fe²⁺ ร่วมกับ นอร์ฟลอก ซาซิน 46

ภาพประกอบ 17 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของสารละลายในปฏิกิริยา ที่มี Fe²⁺ และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์..... 47

ภาพประกอบ 18 ผลของลำดับการทำปฏิกิริยาต่อค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดย แบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ผสมสารละลายสองชนิดเข้าด้วยกันก่อน แล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเติมสารละลายอีกชนิดหนึ่งเพิ่มลงไป โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาขั้นตอนละ 5 นาที.. 48

ภาพประกอบ 19 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Fe²⁺ ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 1.00 mM TPTZ และ 0.225 mM H₂O₂ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ 600 nm 49

ภาพประกอบ 20 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย TPTZ ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 0.50 mM Fe²⁺ และ 0.225 mM H₂O₂ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัด ค่าการดูดกลืน แสงที่ 600 nm 50

ภาพประกอบ 21 (ก) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 1 คือ การผสมสารละลาย Fe²⁺ และ H₂O₂ เข้าด้วยกัน (ข) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 2 คือ การเติมสารละลาย TPTZ ลงในสารละลายผสมระหว่าง Fe²⁺ และ H₂O₂..... 51

ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 50.0 - 225 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H₂O₂ โดยใช้ Fe²⁺ ร่วมกับ TPTZ..... 52

ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 - 1000 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ 4-AAP และ Phenol โดยมี Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	53
ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 กับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้วิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัด H_2O_2	55
ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เมื่อใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ร่วมกับ Peroxidase ในการตรวจวัด H_2O_2	56
ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัด H_2O_2	57
ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 2 ซึ่งมี Fe^{2+} และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัด H_2O_2	57

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เอนไซม์ (Enzyme) เป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสารตั้งต้นหรือซับสเตรต (Substrate) ไปเป็นผลิตภัณฑ์อย่างมีความจำเพาะและทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เอนไซม์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการช่วยให้ปฏิกิริยาทางเคมีต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตสามารถดำเนินไปได้ ตั้งแต่การเปลี่ยนโมเลกุลของสารอาหารให้เป็นพลังงานตลอดจนการสร้างสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่จากโมเลกุลขนาดเล็ก และเนื่องจากเอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะ รวมทั้งภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง จึงทำให้มีการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม เกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะวิทยาศาสตร์, 2557)

แอกติวิตีของเอนไซม์ (Enzyme activity) คือ การวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในปฏิกิริยาหนึ่ง ๆ และสามารถนำไปใช้อธิบายลักษณะสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิดได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ชนิดใดก็ตามสามารถทำได้สองวิธี คือ การวัดปริมาณของสารตั้งต้นที่ลดลงในหนึ่งหน่วยเวลา หรือ การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นในหนึ่งหน่วยเวลา ทั้งนี้วิธีการที่ได้รับความนิยมมากกว่าคือการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์เพียงเล็กน้อยเมื่อนับจากการเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะให้ค่าในการตรวจวัดได้แม่นยำกว่าการลดลงของสารตั้งต้นเมื่อเทียบในหน่วยการเปลี่ยนแปลงที่เท่ากัน (Segel, 1975) โดยวิธีตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์มีอยู่หลายวิธี เช่น สเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) โพลาริกราฟี (Polarography) โครมาโทกราฟี (Chromatography) เรดิโอเมตรี (Radiometry) โฟโตเมตรี (Photometry) และฟลูออโรเมตรี (Fluorometry) โดยวิธีการที่เป็นที่นิยมนำไปใช้ตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ในระยะแรก คือ เรดิโอเมตรี (Radiometric enzyme assays) เนื่องจากมีความจำเพาะ (selectivity) และสภาพไว (sensitivity) สูง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ได้ก่อให้เกิดปัญหาบางประการอันเนื่องมาจากการใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope) และตัวทำละลายอินทรีย์ที่อาจหลงเหลือและตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Callingham & Laverty, 1973; Wurtman & Axelrod, 1963) ในเวลาต่อมาการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์โดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometric enzyme assays) จึงได้รับความนิยมมากขึ้น โดยวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้ Spectrophotometer เป็นเครื่องมือเพื่อใช้ในการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสาร โดยอาศัยกฎของเบียร์ (Beer's law) ทำให้สามารถแปลผลค่าการดูดกลืนแสงเป็นปริมาณสารตั้ง

ต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่สนใจได้ ในปัจจุบัน วิธีการนี้ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและถูกนำไปใช้ในการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์อย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย ไม่อันตราย มีความจำเพาะ และสภาพไวสูงไม่ต่างจากเทคนิคเรดิโอเมตรี ทั้งนี้ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เข้าร่วมหลายปฏิกิริยา การเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจไม่สามารถติดตามได้ด้วยวิธี Spectrophotometry เนื่องจากสารดังกล่าวไม่มีสมบัติในการดูดกลืนแสง ดังนั้นเพื่อให้สามารถศึกษาปฏิกิริยาเหล่านี้ด้วยวิธี Spectrophotometry ได้ จึงต้องอาศัยปฏิกิริยาควบคู่ (Coupling reactions) ระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดกับเอนไซม์หรือสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งต้องไม่มีสมบัติดูดกลืนแสงได้ในตัวเอง เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบชนิดใหม่ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสงได้ โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase

เอมีนออกซิเดส (Amine oxidase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม Oxidase ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยา Oxidative deamination ของไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่อะมิโนอย่างน้อยหนึ่งหมู่ ในสภาวะที่มีน้ำ และ Oxygen ให้เกิดเป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ แอมโมเนีย (NH_3) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ (Mondovi, Pietrangeli, Marcocci, & Toninello, 2009) ไบโอจีนิกเอมีนที่เจือปนอยู่ในอาหารอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเน่าเสียและก่อให้เกิดอาการแพ้ในมนุษย์ เช่น ฮีสตามีน (Histamine) พิวเทรสซีน (Putrescine) และคาร์ดาเวรีน (Cadaverine) เป็นต้น โดยที่ผ่านมาได้มีการนำ Amine oxidase ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไบโอจีนิกเอมีนโดยใช้เทคนิครีเจนเอนไซม์เพื่อใช้เป็นอิเล็กโทรด เรียกว่า ไบโอเซ็นเซอร์ (Biosensor) (Hibi & Senda, 2000; Massimo Di Fusco et al., 2011) หรือวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Rogers & Staruszkiewicz, 2000) ซึ่งเป็นการใช้แอนติบอดีที่มีเอนไซม์ติดฉลากอยู่จับการสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะ ดังนั้นการศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase จึงมีความสำคัญเพราะทำให้ทราบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อออกแบบไบโอเซ็นเซอร์หรือชุดอุปกรณ์ ELISA ในการตรวจวัดไบโอจีนิกเอมีนได้

การศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase นิยมทำโดยการติดตามสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งผลิตภัณฑ์ที่นิยมใช้ในการติดตามมากที่สุด คือ H_2O_2 โดยที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยที่ได้พัฒนาวิธีตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับ Peroxidase และซับสเตรดที่ทำให้เกิดสี ซึ่งมีความสามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 nm เช่น งานวิจัยของ Szutowicz Kobes และ Orsulak ที่ได้ศึกษาลักษณะสมบัติของ Monoamine oxidase โดยตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์จากการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์คือ H_2O_2 โดยใช้การตรวจวัดความเข้ม

ของสีที่เกิดจากรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ซึ่งประกอบด้วย Horseradish peroxidase และ ABTS (2,2'-azino-di(ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) โดย Horseradish peroxidase จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้เกิดเป็น Oxygen และน้ำ Oxygen ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ ABTS เพื่อเปลี่ยนรูปเป็นสารละลายที่ดูดกลืนแสงได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทำให้เกิดสีมีความเป็นพิษน้อย ละลายได้ง่ายในน้ำ ไม่ไวต่อแสง และมีความเสถียรสูง ทำให้วิธีนี้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase ในเวลาต่อมา (Szutowicz, Kobes, & Orsulak, 1984)

การตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase ที่อาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับ Peroxidase และรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสี ยังได้ถูกพัฒนาขึ้นอีกหลายวิธี โดยสิ่งที่แตกต่างกันคือชนิดของรีเอเจนต์ที่เลือกใช้ เช่น การใช้โอ-ไดอะนิซีน (O-dianisidine) ในการตรวจสอบแอกติวิตีของ Diamine oxidase ซึ่งมีฮีสตามีนเป็นสารตั้งต้น โดย H_2O_2 จะทำปฏิกิริยาให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารโอ-ไดอะนิซีนที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำตาล และจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (Benedito, Nakagaki, Saczk, Peralta-Zamora, & Costa, 2003) รีเอเจนต์อีกชนิดที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ควบคู่กับ Peroxidase คือ 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-Aminoantipyrine; 4-AAP) ซึ่ง Oxygen ที่ได้จากการเร่งการสลายตัวของ H_2O_2 ด้วย Peroxidase จะทำให้ 4-AAP เกิดการถ่าย Hydrogen แล้วเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปออกซิไดส์ จากนั้นจะทำปฏิกิริยารวมตัวกับ 2,4-Dichlorophenol เกิดเป็น ควินอยด์ (Quinoid dye) ซึ่งมีสีแดงและสามารถดูดกลืนแสงได้ (Sharp, 1972)

อย่างไรก็ตาม วิธีการศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยการติดตามปริมาณ H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้กล่าวไปข้างต้นเป็นวิธีที่ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากต้องอาศัย Peroxidase ซึ่งมีราคาสูงเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาควบคู่ ในระยะหลังมานี้จึงมีงานวิจัยที่พัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลายโดยไม่ต้องใช้ Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาควบคู่ขึ้น งานวิจัยเหล่านี้ได้ใช้ประโยชน์จากสมบัติการเป็น Oxidizing agent ที่ดีของ H_2O_2 เพื่อทำปฏิกิริยา Oxidation กับรีเอเจนต์ให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสี และสามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค Spectrophotometry ได้โดยตรง เช่น การใช้กรด 4-ไนโตรฟีนิก โบโรนิก (4-Nitrophenyl boronic acid) หรือ 4-ไนโตรฟีนิก โบโรนิก เอสเทอร์ (4-Nitrophenyl boronic acid pinacol ester) เป็นตัวตรวจวัด โดยสารทั้งสองชนิดสามารถถูก H_2O_2 ออกซิไดส์ให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์คือ 4-ไนโตรฟีนอล (4-Nitrophenol) ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 400 nm (Su, Wei, & Guo, 2011) การใช้วานาเดียมเพนทอกไซด์

(Vanadium pentoxide) ในกรดซัลฟิวริกเป็นรีเอเจนต์เพื่อหาปริมาณ H_2O_2 ในน้ำทิ้งจากสารฟอกขาวที่ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนเพอโรกโซวานาเดต (Peroxovanadate complex) ที่เกิดขึ้นจากการถูกออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 มีสีน้ำตาลแดง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 454 nm (Zhang, Fu, Li, & Liu, 2013) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคตรวจวัดด้วยวิธี UV-visible spectroscopy ไปพัฒนาเป็นวิธีการตรวจวัดไอระเหยของ H_2O_2 ด้วยกระดาษที่เคลือบสารสกัด Anthocyanin จากกะหล่ำปลีม่วงโดยอาศัยผลจากปฏิกิริยาจาก H_2O_2 เข้าไปทำลายโครงสร้างทางเคมีของ Anthocyanin ส่งผลให้เกิดการเจือจางของสีซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่าได้ (สุกัญญา เพชรศิริเวทย์, ปิยนันท์ น้อยรอด, & กรรณิการ์ แก้วกิม, 2560)

ทั้งนี้งานวิจัยที่พัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลายโดยไม่ต้องใช้ Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาควบคุมที่ได้ยกตัวอย่างมาข้างต้น ก็ยังคงมีข้อจำกัดบางประการ ตัวอย่างเช่น การพัฒนาวิธีตรวจวัดโดยใช้กรด 4-ไนโตรฟีนิลโบโรนิก (4-Nitrophenyl boronic acid) หรือ 4-ไนโตรฟีนิลโบโรนิกแอซิดพินาคอลเอสเทอร์ (4-Nitrophenyl boronic acid pinacol ester) เป็นรีเอเจนต์ยังคงมีช่วงความเป็นเส้นตรง (Working range) ที่ค่อนข้างแคบ คือ ใช้ตรวจวัด H_2O_2 ได้ในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 40 μM ในขณะที่วิธีการใช้วานาเดียมเพนทอกไซด์ (Vanadium pentoxide) ในกรดซัลฟิวริกเป็นรีเอเจนต์ต้องใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นในระดับที่อาจเป็นอันตราย และวิธีการตรวจวัดไอระเหยของ H_2O_2 ด้วยกระดาษที่เคลือบสารสกัด Anthocyanin ก็มีข้อจำกัดคือต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวัดนานกว่า 30 นาที ทั้งยังไม่สามารถใช้ตรวจวัด H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำได้

เหล็ก(II) หรือเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+} , Ferrous ion) เป็นไอออนที่สามารถถูกออกซิไดส์ให้อยู่ในรูปเหล็ก(III) หรือเฟอริกไอออน (Fe^{3+} , Ferric ion) ได้ ซึ่งไอออนของเหล็กทั้งสองชนิดจะไม่สามารถสังเกตเห็นสีได้ที่ความเข้มข้นต่ำ อย่างไรก็ตามไอออนเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยารวมตัวกับสารบางชนิดเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีสี และตรวจวัดด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำ Fe^{2+} มาใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัด H_2O_2 โดยอาศัยสมบัติการเป็นตัวออกซิไดส์ที่ดีของ H_2O_2 เปลี่ยน Fe^{2+} ให้อยู่ในรูป Fe^{3+} โดยในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้ไตรไพริดีลไตรเอซีน (Tripyridyltriazine; TPTZ) และนอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) เป็นรีเอเจนต์ในการเปลี่ยน Fe^{2+} และ Fe^{3+} ให้เป็นสารที่มีสีตามลำดับ โดยสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ จะให้สีน้ำเงินแต่ Fe^{3+} -TPTZ เป็นสารประกอบที่ไม่มีสี และสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -Norfloxacin มี

สีเหลืองแต่สารประกอบ Fe^{2+} -Norfloxacin ไม่มีสี ด้วยหลักการดังกล่าวนี้จึงสามารถใช้ Fe^{2+} ติดตามปริมาณ H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ได้

ด้วยเหตุผลข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้ Diamine oxidase เป็นตัวแทนของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ และใช้ฮีสตามีนเป็นซับสเตรต จากนั้นศึกษาแอกติวิตีของ Diamine oxidase จากการติดตามปริมาณของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้นในหนึ่งหน่วยเวลา โดยเปรียบเทียบวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่สองวิธี คือ การตรวจวัด H_2O_2 โดยการใส่ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน และการตรวจวัด H_2O_2 โดยการใส่ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ กับวิธีการติดตาม H_2O_2 แบบดั้งเดิมที่ใช้ปฏิกิริยาควบคู่ซึ่งมี 4-Aminoantipyrine (4-AAP) และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase (Sharp, 1972) โดยผู้วิจัยคาดหวังว่าจะวิธีการตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่ม Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้จะช่วยลดงบประมาณจากการที่ไม่ต้องใช้ Peroxidase เข้าร่วมในปฏิกิริยา ช่วยลดข้อจำกัดของวิธีการตรวจวัด และให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกับวิธีการมาตรฐานที่มีมาอยู่ก่อนแล้วได้เป็นอย่างดี

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์
2. พัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์
3. นำวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase

ความสำคัญของงานวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยการใส่ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ ซึ่งวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จะช่วยลดงบประมาณ ช่วยลดข้อจำกัดของวิธีการตรวจวัด และให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกับวิธีการมาตรฐานที่ต้องใช้ Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาควบคู่

ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ตั้งขอบเขตของการวิจัยเอาไว้ 6 ประการ ดังนี้

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์
2. ตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของการใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินในการตรวจวัด H_2O_2
3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์
4. ตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของการใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ ในการตรวจวัด H_2O_2
5. ตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของการใช้ 4-AAP และ Phenol ซึ่งทำงานร่วมกับ Peroxidase ในการตรวจวัด H_2O_2
6. นำวิธีการตรวจวัด H_2O_2 โดยการใช้ Fe^{2+} ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยการใช้ Fe^{2+} เป็นรีเอเจนต์ ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ดี ช่วยลดข้อจำกัด และช่วยลดงบประมาณ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐานที่ต้องใช้ Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาควบคู่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

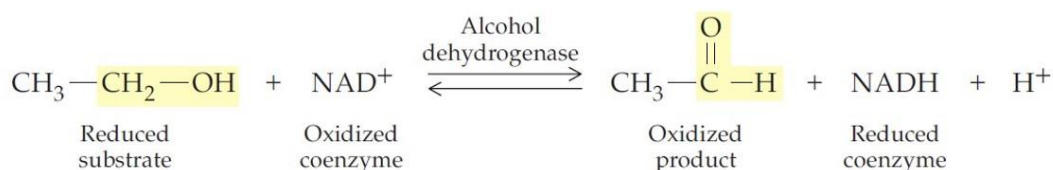
งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้มีความมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ไม่ต้องอาศัย Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาควบคุม โดยใช้เหล็ก(II)เป็นรีเอเจนต์ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษา ทบทวนเอกสาร วารสารกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ Amine oxidase
 - 1.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของ Amine oxidase
 - 1.2 การเร่งปฏิกิริยาของ Amine oxidase
 - 1.3 การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัด H_2O_2
 - 2.1 ลักษณะทั่วไปของ H_2O_2
 - 2.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2
3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Oxidation - Reduction ของเหล็ก
4. ประเด็นของงานวิจัยที่พัฒนา

1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ Amine oxidase

1.1. ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของ Amine oxidase

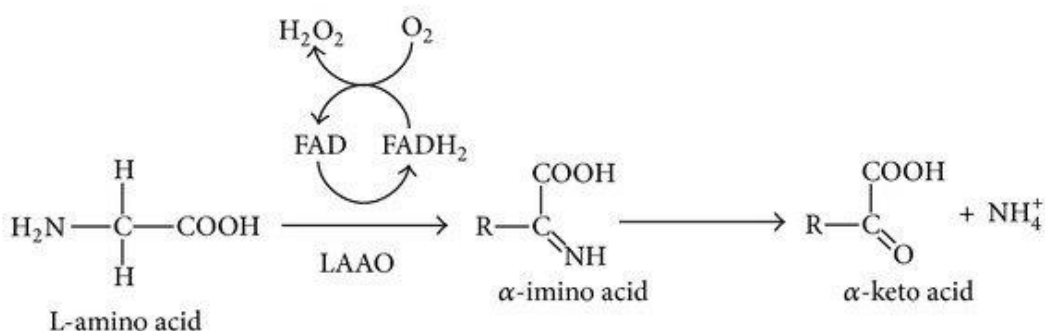
เอนไซม์ในกลุ่ม Oxidoreductase คือเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา Oxidation - Reduction ของโมเลกุลสารตั้งต้น ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะเป็นการเพิ่มหรือลด Oxygen หรือ Hydrogen ในโมเลกุล และเนื่องจากปฏิกิริยา Oxidation และ Reduction มักจะเกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้จึงจำเป็นต้องอาศัย Coenzyme ในการเข้ามาช่วยรับส่งอิเล็กตรอนหรือ Hydrogen ด้วย (McMurry, 1996) ตัวอย่างการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แสดงไว้ในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม Oxidoreductase

ที่มา: McMurry (1996)

จากปฏิกิริยาที่ได้ยกตัวอย่างข้างต้น สารตั้งต้นหรือซับสเตรตในสภาพรีดิวซ์จะถูกเอนไซม์ออกซิไดส์ให้ได้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น ซึ่งตัวเอนไซม์ก็จะกลายเป็นสภาพรีดิวซ์ ซึ่งสามารถกลับสู่สภาพออกซิไดส์อย่างเดิมได้อีก โดยต้องมีตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) มารับเอาอิเล็กตรอนไป ดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะแบ่งได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามชนิดของตัวรับอิเล็กตรอน ได้แก่ 1) ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenases) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะไม่ใช่ Oxygen เป็นตัวรับอิเล็กตรอน แต่จะอาศัยวิธีการดีไฮโดรจีเนชัน (Dehydrogenation) คือกำจัดอิเล็กตรอน 2 ตัวออกไปจากซับสเตรตในสภาพของอิเล็กตรอนอิสระ เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) 2) ออกซิเดส (Oxidases) เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะอาศัย Oxygen เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น แอล-อะมิโนแอซิดออกซิเดส (L-amino acid oxidase; LAAO) ซึ่งมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การทำงานของ L-amino acid oxidase

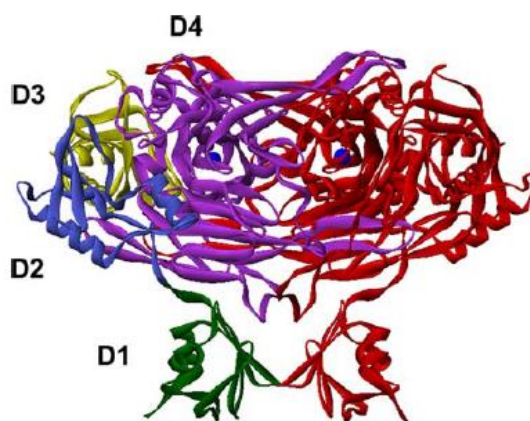
ที่มา: Izidoro et al. (2014)

Amine oxidase (AOs) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม Oxidoreductase ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มย่อย Oxidase มีสารอินทรีย์ในกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines) เป็นสารตั้งต้น โดย Amine oxidase ยังเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นเมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme) เนื่องจากมี Copper ion เป็นองค์ประกอบภายใน โดยถูกยึดไว้ด้วยแรง Coordinate covalent บางครั้งจึงนิยมเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า Copper-containing amine oxidases (CuAOs) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา Oxidative deamination ของสารตั้งต้นที่เป็นเอมีนให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปสารประกอบแอลดีไฮด์ แอมโมเนีย และ H_2O_2 ได้ (McIntire & Hartmann, 1993) Amine oxidase ยังอาจสามารถแบ่งเป็นชนิดย่อยได้ตามชนิดของซับสเตรตที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ ได้แก่ Monoamine oxidase ในกรณีที่จำเพาะต่อซับสเตรตที่เป็นมอนอเอมีน Diamine Oxidase ในกรณีที่จำเพาะต่อซับสเตรตที่เป็นไดเอมีน และ Polyamine Oxidase ในกรณีที่จำเพาะต่อซับสเตรตที่เป็นพอลิเอมีน

Amine oxidase เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย พืช และสัตว์ ข้อมูลของ Amine oxidase ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติ (Characterization) มาแล้วในแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น Phenylethylamine oxidase และ Histamine oxidase จาก *Anthrobacter globiformis* (Hibi & Senda, 2000) และ Amine oxidase จาก *Arthrobacter aurescens* (Lee & Kim, 2013) Amine oxidase ในพืช เช่น Diamine Oxidase จากต้นอ่อนของถั่ว (pea seedling) (Massimo Di Fusco et al., 2011) และ Amine oxidase จากสัตว์ เช่น Plasma amine oxidase ในวัว (bovine) (Lange & Wittmann, 2002) เป็นต้น

โครงสร้างของ Amine oxidase มีลักษณะเป็นโฮโมไดเมอร์ (Homodimer) โดยมีสายพอลิเพปไทด์สองสายเชื่อมเข้าด้วยกัน มีมวลโมเลกุลที่ประมาณ 75 – 90 kDa เอนไซม์ชนิดนี้มี 2,4,5-Trihydroxyphenylalaninequinone (TPQ) ทำหน้าที่เป็น Cofactor ในการทำปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox cofactor) โดยกระบวนการเกิด TPQ นั้นต้องอาศัยโมเลกุลของ Oxygen และ Copper ion ไปสร้างพันธะกับบริเวณ His residues บนเอนไซม์ (Moore et al., 2007)

โครงสร้างของ *E.coli* copper-containing amine oxidase homodimer ซึ่งเป็นตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่ม Amine oxidase ได้แสดงไว้ดังภาพประกอบ 3 โดย Monomer หนึ่งถูกแสดงเป็นส่วนสีแดงทั้งหมด และอีก Monomer ถูกแสดงสีแบ่งออกตามโดเมน (domain) (D1 สีเขียว, D2 สีน้ำเงิน, D3 สีเหลือง และ D4 สีม่วง) ในขณะที่ทรงกลมสีน้ำเงินเป็นตัวแทนของ Copper ion ในโครงสร้างของเอนไซม์

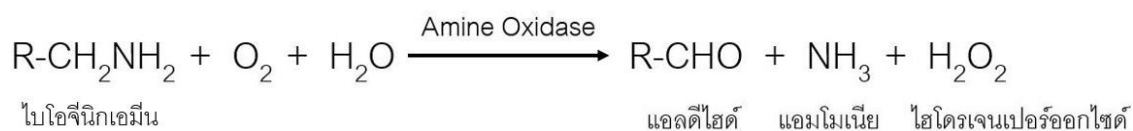


ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ *E.coli* copper-containing amine oxidase homodimer

ที่มา: Brazeau, Johnson, and Wilmot (2004)

1.2 การเร่งปฏิกิริยาของ Amine oxidase

Amine oxidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา Oxidative deamination ของไบโอจีนิกเอมีนซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่อะมิโนอย่างน้อยหนึ่งหมู่ เช่น ฮีสตามีน (Histamine) พิวเทรสซีน (Putrescine) และคาดาเวอริน (Cadaverine) เป็นต้น โดยไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิดก็จะมีเฉพาะกับเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต้องอาศัยน้ำและ Oxygen เข้าร่วมในการทำปฏิกิริยาด้วย โดยไบโอจีนิกเอมีนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ พร้อมทั้งได้แอมโมเนีย และ H_2O_2 เป็นผลิตภัณฑ์ (Mondovi et al., 2009) ดังสมการเคมีที่แสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 การเร่งปฏิกิริยา Oxidative deamination ด้วย Amine oxidase

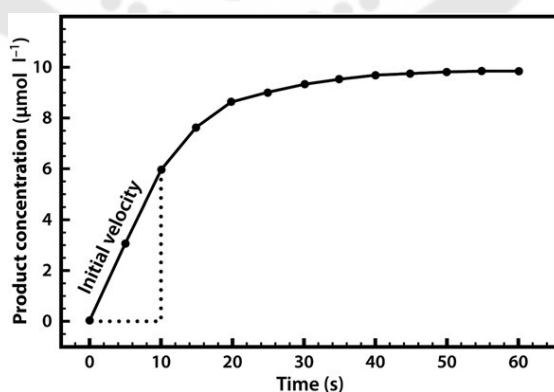
ที่มา: ดัดแปลงจาก Holt and Palcic (2006)

1.3 การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase

1.3.1 หลักการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์

แอกติวิตีของเอนไซม์ คือ การวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีส่วนรวมในปฏิกิริยาหนึ่ง ๆ โดยความสามารถนี้นำไปใช้อธิบายลักษณะสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิดได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ชนิดใดก็ตามสามารถทำได้สองวิธี คือ การวัดปริมาณของสารตั้งต้นที่ลดลงในหนึ่งหน่วยเวลา หรือ การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นในหนึ่งหน่วยเวลา โดยวิธีการที่ได้รับความนิยมคือการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์เพียงเล็กน้อยเมื่อนับจากการเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะให้ค่าในการตรวจวัดได้แม่นยำกว่าการลดลงของสารตั้งต้นเมื่อเทียบในหน่วยการเปลี่ยนแปลงที่เท่ากัน (Segel, 1975)

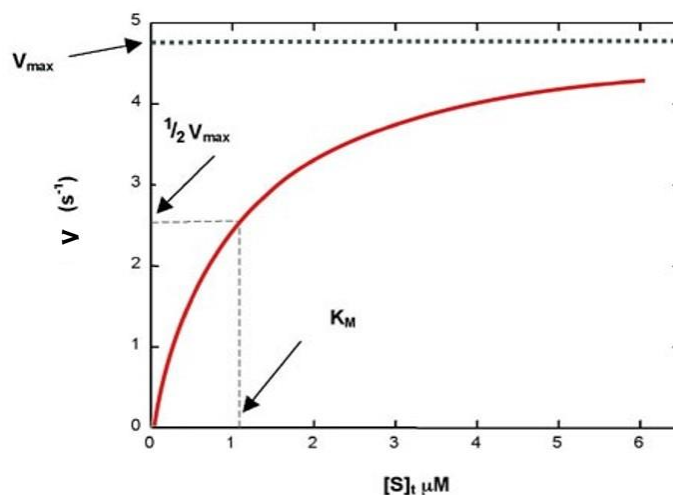
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme kinetics) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้มานานและมีความสำคัญในการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยา โดยเป็นการติดตามความเร็วของปฏิกิริยา เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่าง ๆ โดยความเข้มข้นของซับสเตรต $[S]$ เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมอัตราการเร่งของปฏิกิริยา อย่างไรก็ตาม ในระหว่างที่ปฏิกิริยาดำเนินไป ความเข้มข้นของซับสเตรตจะลดลงเรื่อย ๆ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรต จึงวัดความเร็วที่จุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เรียกว่า ความเร็วเริ่มต้น (initial velocity; v_i) ที่จุดนี้ ความเร็วของปฏิกิริยา v จะเท่ากับ v_i โดยอนุมานได้ว่าความเข้มข้นของซับสเตรตลดลงน้อยมากจนไม่มีการเปลี่ยนแปลง ภาพประกอบ 5 แสดงให้เห็นว่าความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งคือช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรงเมื่อเขียนความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์



ภาพประกอบ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์และเวลาในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

ที่มา: Robinson (2015)

การศึกษากลไกของเอนไซม์ ต้องเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการติดตามการทำงานของเอนไซม์ให้อยู่ในช่วงเวลาที่ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับเวลาที่เพิ่มขึ้น หรือช่วงที่ความเร็วอยู่ในช่วงความเร็วเริ่มต้น (v_i) โดยเมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ แล้วติดตาม v_i ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จะได้ว่าความเข้มข้นของซับสเตรตต่ำ v_i จะเพิ่มขึ้นเมื่อ $[S]$ เพิ่มขึ้นด้วยความสัมพันธ์เกือบเป็นเส้นตรง แต่ที่ความเข้มข้นของซับสเตรตสูง ๆ v_i เพิ่มขึ้นน้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของซับสเตรตที่เพิ่มขึ้น และในที่สุด v_i แทบจะคงที่เมื่อ v_i เข้าใกล้ความเร็วสูงสุด (V_{max}) (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คณะวิทยาศาสตร์, 2557) ซึ่งสามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของซับสเตรตได้ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วกับความเข้มข้นของซับสเตรตในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

ที่มา: https://riasparklebiochemistry.files.wordpress.com/2013/04/article1622_block3142.jpg

ในกรณีที่ปฏิกิริยามีซับสเตรตเพียงชนิดเดียว จะสามารถเขียนความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วกับความเข้มข้นของซับสเตรต ได้ดังสมการ

$$v_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

เรียกสมการแสดงความสัมพันธ์ข้างต้นนี้ว่า สมการ Michaelis – Menten เมื่อ v_i คือความเร็วของปฏิกิริยา, V_{max} คือความเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด, $[S]$ คือความเข้มข้นของซับสเตรท และ K_m คือค่าคงที่ของ Michaelis – Menten ซึ่ง K_m มีค่าเท่ากับ ความเข้มข้นของซับสเตรทที่ทำให้ v_i มีค่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของ V_{max} โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่า V_{max} และ K_m เป็นสมบัติเฉพาะตัว ซึ่งจะบ่งบอกถึงความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา กล่าวคือ ถ้า V_{max} มีค่าสูงมาก ๆ และค่า K_m มีค่าต่ำมาก ๆ แสดงว่าเอนไซม์นั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาให้ดำเนินไปได้เร็วมาก นอกจากนี้ K_m ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความชอบ (affinity) ของเอนไซม์ต่อซับสเตรท ถ้าค่า K_m ต่ำแสดงว่าเอนไซม์จับกับซับสเตรทได้ดี

1.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ ควรควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการศึกษ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือ การเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่างอาจส่งผลกระทบต่อข้อมูลและการคำนวณที่คลาดเคลื่อนไป (Sigman, 1992) ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ได้แก่

1.3.2.1 ความเข้มข้นของเกลือ (Salt concentration): หากในสารละลายมีความเข้มข้นของเกลือที่สูงมากเกินไป อาจส่งผลกระทบต่อพันธะเคมีที่เป็นแรงชนิดอ่อนระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท ซึ่งจะส่งผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป

1.3.2.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรท (Enzyme and substrate concentration): แอกติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์อิ่มตัว แม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทจะทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่อัตราของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นหากเอนไซม์อยู่ในสภาวะอิ่มตัว ดังนั้นการคำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรทที่ใช้ในการทดลองให้มีความเหมาะสมจึงมีความสำคัญในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์

1.3.2.3 ค่าพีเอช (pH): เอนไซม์ส่วนใหญ่จะสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชเหมาะสม ซึ่งจะส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นไปได้ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากค่าพีเอชมีผลต่อกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) โดยปกติแล้วเอนไซม์จะมีแอกติวิตีสูงสุดเมื่อค่าพีเอชใกล้เคียงกับ pK_a ของบริเวณเร่งของเอนไซม์ (enzyme's active site)

1.3.2.4 ตัวยับยั้ง (Inhibitors): ตัวยับยั้งสามารถลดความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้จากการเข้าไปแย่งจับในบริเวณเร่งของเอนไซม์ หรือจากการเข้าจับกับบริเวณอื่นของเอนไซม์ซึ่งส่งผลให้ซับสเตรทไม่สามารถเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ และเนื่องจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เข้าร่วมเป็นปฏิกิริยาที่สามารถผันกลับได้ ในบางกรณีสารผลิตภัณฑ์

ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาก็สามารถเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้เช่นกัน เทคนิคที่นิยมใช้ในการกำจัดด้วยยังออกจากปฏิกิริยาคือการทำไดอะไลซิส (dialysis)

1.3.2.5 ตัวเร่ง (Activators): ตัวเร่งคือสารที่สามารถเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ ตัวเร่งมีความจำเป็นอย่างมากในบางปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เข้าร่วมมากกว่าหนึ่งชนิด หากเอนไซม์ที่สนใจขาดตัวเร่งอาจส่งผลให้เอนไซม์ชนิดอื่นมีความสามารถในการแย่งจับกับซับสเตรตได้ดีกว่า

1.3.2.6 อุณหภูมิ (temperature): เอนไซม์โดยส่วนใหญ่มักจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature) ซึ่งทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุด ซึ่งสามารถหาได้จากการทดลองเปลี่ยนอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยปกติแล้วความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้เอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพ (denature) ทำให้ไม่สามารถทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ได้

1.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase

การตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เป็นการตรวจวัดปริมาณของสารตั้งต้นที่ลดลงหรือปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงหนึ่งหน่วยเวลา การติดตามปริมาณดังกล่าวอาจทำได้หลายวิธี เช่น สเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) โพลาริกราฟี (Polarography) โครมาโทกราฟี (Chromatography) เรดิโอเมตรี (Radiometry) โฟโตเมตรี (Photometry) และฟลูออโรเมตรี (Fluorometry) วิธีการที่เป็นที่นิยมมากในระยะแรก คือ เรดิโอเมตรี เนื่องจากมีความจำเพาะและสภาพไวสูง อย่างไรก็ตามการตรวจวัดด้วยวิธีการนี้ก็ก่อให้เกิดปัญหาบางประการตามมาภายหลังอันเนื่องมาจากสารกัมมันตรังสี (radioisotope) และตัวทำลายอินทรีย์ที่เลื้อยและตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Callingham & Laverty, 1973; Wurtman & Axelrod, 1963) จึงส่งผลให้วิธีการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เป็นที่นิยมในเวลาต่อมา คือ การตรวจวัดแอกติวิตีโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometric assay) โดยวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้เครื่อง Spectrophotometer เป็นเครื่องมือเพื่อใช้ตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสาร การใช้หลักการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์และกฎของเบียร์ (Beer's law) ทำให้สามารถแปลผลสัญญาณที่ได้เป็นปริมาณสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่สนใจได้ วิธีการนี้ถูกนำไปใช้ในการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์อย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย ไม่อันตราย มีความจำเพาะ (selective) และสภาพไว (sensitive) สูง

ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เข้าร่วมหลายปฏิกิริยา การเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจไม่สามารถติดตามได้ด้วยเทคนิค Spectrophotometry เนื่องจากสาร

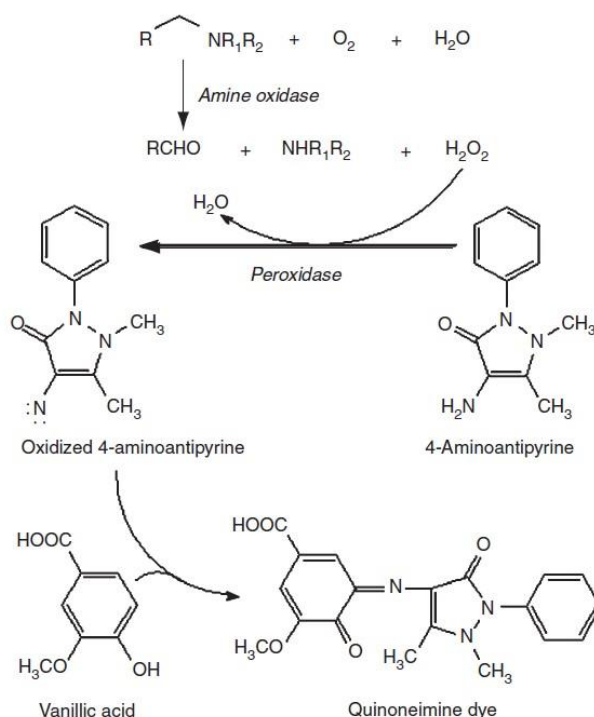
ดังกล่าวไม่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นเพื่อให้สามารถศึกษาปฏิกิริยาเหล่านี้ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ได้ จึงต้องอาศัยปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reactions) ระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดกับเอนไซม์หรือสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งต้องไม่มีสมบัติดูดกลืนแสงได้ในตัวเอง เพื่อให้ เกิดเป็นสารประกอบชนิดใหม่ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยวิธีการดูดกลืนแสงได้

การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase นิยมทำโดยการติดตามสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่นิยมใช้ในการติดตามมากที่สุด คือ H_2O_2 โดยที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยหลายงานได้พัฒนาวิธีศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยใช้อาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับ Peroxidase และซับสเตรตที่ทำให้เกิดสี ซึ่งมีสมบัติในการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 nm เช่น งานวิจัยของ Szutowicz และคณะที่ได้ศึกษาลักษณะสมบัติของ Monoamine oxidase ในไมโทคอนเดรียในตับของหนูโดยใช้ไทรามิน (Tyramine) เป็นซับสเตรต โดยตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์จากการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์คือ H_2O_2 คณะผู้วิจัยได้ใช้การตรวจวัดความเข้มของสีที่เกิดจากรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ซึ่งประกอบด้วย Horseradish peroxidase และ ABTS (2,2'-azinodi(ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) โดย Horseradish peroxidase จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้เกิดเป็น Oxygen และน้ำ จากนั้น Oxygen ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ ABTS เพื่อเปลี่ยนรูปเป็นสารละลายที่ดูดกลืนแสงได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีมีความเป็นพิษน้อย ละลายได้ง่ายในน้ำ ไม่ไวต่อแสง และมีความเสถียรสูง ทำให้วิธีนี้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจแอกติวิตีของ Amine oxidase ในเวลาต่อมา (Szutowicz et al., 1984)

การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ที่อาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับ Peroxidase และรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสี ยังได้ถูกพัฒนาขึ้นอีกหลายวิธี โดยสิ่งที่แตกต่างกันคือชนิดของรีเอเจนต์ที่ใช้ เช่น การใช้โอ-ไดอะนิซีน (O-dianisidine) ในการตรวจสอบแอกติวิตีของ Diamine oxidase ซึ่งมีฮีสตามีนเป็นสารตั้งต้น โดย H_2O_2 จะทำปฏิกิริยาให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารโอ-ไดอะนิซีนที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำตาล (Bieganski, Blasinska, & Kusche, 1977) อย่างไรก็ตามรีเอเจนต์ชนิดนี้จัดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้นำมาใช้

รีเอเจนต์อีกชนิดที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ควบคู่กับ Peroxidase คือ 4-อะมิโนแอนติไพรีน (4-Aminoantipyrine; 4-AAP) (Sharp, 1972) ซึ่ง Oxygen ที่ได้จากการเร่งการสลายตัวของ H_2O_2 ด้วย Peroxidase จะทำให้ 4-AAP เกิดการจ่าย Hydrogen แล้วเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปออกซิไดส์ จากนั้นจะทำปฏิกิริยารวมตัวกับ 2,4-

Dichlorophenol เกิดเป็น ควินอยด์ (Quinoid dye) ซึ่งมีสีแดงและสามารถดูดกลืนแสงได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยวิธีการนี้จะมีปัญหาเมื่อนำไปทดสอบกับ Amine oxidase ชนิด Monoamine oxidase เนื่องจาก 2,4-Dichlorophenol จะเข้าทำปฏิกิริยายับยั้ง (inhibition) เอนไซม์ไม่ได้ ดังนั้นในเวลาต่อมาจึงมีการเปลี่ยนรีเอเจนต์จาก 2,4-Dichlorophenol เป็นกรดวานิลลิก (Vanillic acid) แทน (Holt & Palcic, 2006) การศึกษาแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยวิธีการนี้สามารถแสดงได้ดังภาพประกอบ 7

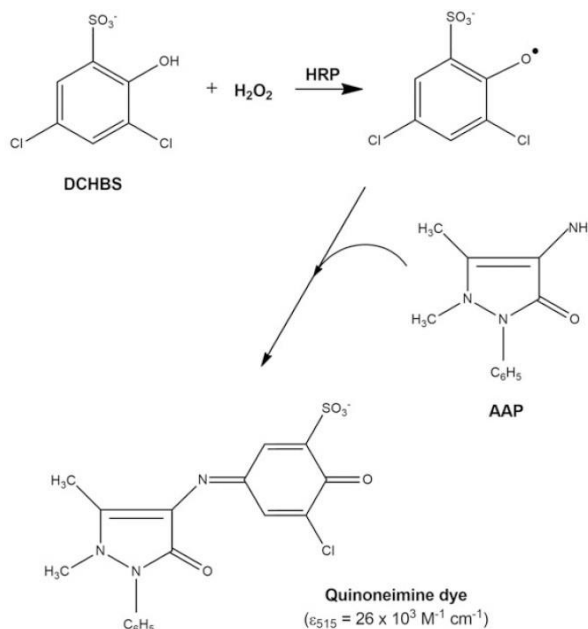


ภาพประกอบ 7 การตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยการเข้าปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reaction) ที่มี 4-AAP และกรดวานิลลิกเป็นรีเอเจนต์

ที่มา: Holt and Palcic (2006)

การพัฒนาวิธีตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ยังคงถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยล่าสุด (Angelini, Cona, & Tavladoraki, 2018) ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดแอกติวิตีของ Copper amine oxidase (CuAO) ในเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยอาศัยการตรวจวัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นด้วยปฏิกิริยาควบคู่กับ Peroxidase ซึ่งมี 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate (DCHBS) และ 4-AAP

เป็นรีเอเจนต์ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารสีชมพูซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยการดูดกลืนแสงได้ ดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 การตรวจวัดแอกติวิตีของ CuAO ด้วยการใส่ปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reaction) ที่มี DCHSB และ 4-AAP เป็นรีเอเจนต์

ที่มา: Angelini et al. (2018)

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัด H_2O_2

2.1. ลักษณะทั่วไปของ H_2O_2

Hydrogen peroxide (H_2O_2) คือ โมเลกุลเคมีขนาดเล็ก มีลักษณะโดยทั่วไปเป็นของเหลว ไม่มีสี มีรสขม สลายตัวเป็นแก๊ส Oxygen และน้ำได้ในภาวะที่มีแสง และอุณหภูมิสูง มีสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ (Oxidizer) ที่มีความรุนแรงแปรผันตามความเข้มข้น จึงนิยมนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น นำไปใช้ฟอกสีในการผลิตน้ำยากัดสีผม ยาสีฟัน และอุตสาหกรรมฟอกหนัง นำไปใช้เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำยาล้างแผล และใช้ในกระบวนการสเตอริไลซ์หรือพาสเจอร์ไรส์นํ้านมดิบเพื่อฆ่าเชื้อโรค และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Toyoda, Ito, Iwaida, & Fujii, 1982) โดย H_2O_2 จะทำให้เกิดปฏิกิริยา Peroxidation ของลิพิดในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้การแพร่ของสารต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความผิดปกติ จนทำให้แบคทีเรียตายได้ในที่สุด (Ansari & Datta, 2003) นอกจากนี้ H_2O_2 ยังนิยมใช้ใน

กระบวนการบำบัดมลพิษทางเคมีในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์เพื่อลดความเป็นพิษของสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น คลอรีน แอลดีไฮด์ ฟีนอล และสารประกอบอะโรเมติกชนิดอื่น ๆ ได้ (Schwake, Ross, & Cammann, 1998) อย่างไรก็ตาม H_2O_2 จัดเป็นสารอันตรายต่อมนุษย์ โดย H_2O_2 ที่มีความเข้มข้นสูงจะก่อให้เกิดอันตรายเมื่อกลืนกินหรือสัมผัสทางผิวหนัง และเป็นพิษเมื่อสูดดมไอรระเหย (Wei & Guo, 2007) องค์การต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องจึงได้กำหนดมาตรฐานค่าสูงสุดสำหรับ H_2O_2 ที่พบได้ในอาหาร โดยเฉพาะในน้ำนมดิบ ตัวอย่าง เช่น องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาได้กำหนดให้มี H_2O_2 เจือปนในผลิตภัณฑ์นมได้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 0.5 ppm

2.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาการตรวจวัด H_2O_2 มีความสำคัญมากขึ้นเนื่องจาก H_2O_2 มักพบเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ของปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการอุตสาหกรรม ในสิ่งแวดล้อม และกระบวนการทางชีววิทยาจำนวนมาก นอกจากนี้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งบางปฏิกิริยาก็ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น H_2O_2 ซึ่งสามารถใช้เป็นอินดิเคเตอร์ของปฏิกิริยาได้ (X.-L. Chen et al., 2001; Tang, Wang, Sun, & Xi Shen, 2002) ดังนั้นเทคนิคการตรวจวัด H_2O_2 จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นหลากหลายวิธี แต่ละวิธีมีจุดเด่นและจุดด้อยต่างกัน การเลือกเทคนิควิธีการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงานเป็นหลัก โดยวิธีการทางเคมีที่นิยมนำไปใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ดังต่อไปนี้

2.2.1 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Electroanalytical chemistry

เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (Electroanalytical chemistry) เป็นการนำหลักการทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด โดยวิธีการวิเคราะห์จะเกี่ยวข้องกับการวัดการตอบสนองทางไฟฟ้าของสารตัวอย่าง อันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารนั้น โดยเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้าที่นิยมนำไปใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ได้แก่ เทคนิคแอมเพอโรเมทรี (Amperometry) และเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี (Potentiometry) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยซึ่งพัฒนาเซนเซอร์โดยใช้ขั้วคาร์บอน (Carbon paste electrode; CPE) มาจุ่มลงในสารละลายแมงกานีสไดออกไซด์ (Manganese dioxide) แล้วใช้เป็นขั้วไฟฟ้า (electrode) ที่สามารถตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ได้ การตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้มีข้อดีคือมีสภาพไว (sensitivity) และมีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) สูง (Zheng & Guo, 2000) อย่างไรก็ตามการตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การรบกวนจากสารเจือปน (interference) ที่อาจส่งผลทำให้ค่าเกิดความคลาดเคลื่อนได้

2.2.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Chromatography

โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่าง (solute) ระหว่างสองเฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ขบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นเมื่อองค์ประกอบในของผสมเกิดอันตรกิริยาระหว่างเฟสเคลื่อนที่ และเฟสอยู่กับที่ได้แตกต่างกัน โดยกระบวนการในการทำโครมาโทกราฟีมีหลายเทคนิค แต่เทคนิคหนึ่งที่ยิยมใช้ในการตรวจวัดสารคือการทำโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เนื่องจากเครื่องมือมีสภาพไว (sensitivity) สูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยและไม่คงตัวต่อความร้อน นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์ลดลงเนื่องจากการใช้แรงดันสูงจากปั๊ม (high pressure pump) เมื่อเทียบกับวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา (conventional column chromatography) โดยหลักการทั่วไปของ HPLC คือ การฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ผ่าน self-septum ขณะที่มีการปั๊มให้ตัวทำละลายไหลสู่คอลัมน์อย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเร็วของการไหลที่เหมาะสม เมื่อสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคบรรจุ (packing material) ที่เหมาะสม จะเกิดการแยกขององค์ประกอบต่าง ๆ และถูกชะออกจากคอลัมน์ผ่านเครื่องตรวจวัด และแปรผลเป็นสัญญาณไฟฟ้าเข้าสู่เครื่องบันทึกสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม

โดยในก่อนหน้านี้ได้มีงานวิจัยที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณ H_2O_2 โดยการใช้เทคนิค HPLC เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ไอโอดีน (Iodide) และกรดวานิลลิก (Vanillic acid) เป็นรีเอเจนต์ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ในรูปกรดไอโอดิวานิลลิก (Iodovanillic acid) ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดแบบ UV detector ได้ (Steinberg, 2013) นอกจากนี้เทคนิค HPLC ยังถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ที่อาจมี H_2O_2 ตกค้างเหลืออยู่จากขั้นตอนการผลิตและฆ่าเชื้อในกระบวนการทางอุตสาหกรรม เช่น ในน้ำยาฆ่าเชื้อที่มี Peracetic acid เป็นองค์ประกอบ (Pinkernell, Effkemann, & Karst, 1997) ในยาสีฟัน (Gimeno et al., 2015) และในน้ำนมวัว (Ivanova, Merkuleva, Andreev, & Sakharov, 2019)

2.2.3 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Fluorescence และ Chemiluminescence

วิธีฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) และเคมีลูมิเนสเซนซ์ (Chemiluminescence) เป็นวิธีการตรวจวัดสารที่ใช้หลักการเกี่ยวกับการเปล่งแสง สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์หลายชนิดเมื่อถูกคลื่นแสงจากภายนอกเข้าไปจะเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นเท่ากับความยาวคลื่นแสงที่ดูดกลืนเข้าไป (resonance radiation) หรือมีความยาวคลื่นมากกว่าออกมาในทุกทิศทาง การ

เปล่งแสงออกมาโดยอาศัยพลังงานจากปฏิกิริยาเคมีจะเรียกว่าการเปล่งแสงทางเคมี หรือ เคมีลูมิเนสเซนซ์ (chemiluminescence) และถ้าเปล่งแสงเนื่องจากคุณสมบัติในตัวของมันเอง จะเรียกว่าการวาวแสง หรือ ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence)

การหาปริมาณสารโดยการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ.1966 เป็นต้นมา แต่การใช้งานยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพง และมีวิธีการประยุกต์ใช้งานน้อย จนกระทั่งในปัจจุบันมีแนวโน้มการใช้เทคนิคดังกล่าวมากขึ้น เพราะเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์มีราคาต่ำลง และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูงขึ้นมาก การตรวจวัดสารด้วยวิธีการนี้มีจุดเด่น คือ มีความจำเพาะสูง (high specificity) เนื่องจากสารประกอบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence compound) แต่ละชนิดเปล่งแสงออกมามีลักษณะคงที่ที่แต่ละความยาวคลื่นของแสงตกกระทบ โดยในทางปฏิบัติพบว่ามีการรบกวนไม่กี่ชนิดที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ และถึงแม้ว่าจะมีสารรบกวนบางชนิดสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ก็ตาม แต่มักจะเป็นความยาวคลื่นอื่นที่ไม่ตรงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้รูปแบบการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีลักษณะจำเพาะของสารแต่ละชนิดเพื่อการจำแนกชนิด (identify) สารตัวอย่างได้ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการที่มีสภาพไวสูง (high sensitivity) สามารถวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ดีกว่าการวัดด้วยการวัดการดูดกลืนแสง โดยเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ขนาดเล็ก (Microfluorimeter) สามารถวิเคราะห์สารได้น้อยถึงระดับ femtomole (10^{-15}) (ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์, 2544)

ในปี ค.ศ.2006 ได้มีการพัฒนาเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ H_2O_2 ที่เจือปนในน้ำฝนโดยใช้ 3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodide เป็นรีเอเจนต์ โดยวิธีการนี้สามารถตรวจวัด H_2O_2 ได้ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 5.0×10^{-7} ถึง 9.0×10^{-4} โมลต่อลิตร และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างได้จริง (H. Chen, Yu, Zhou, & Wang, 2007) และในปีถัดมาได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากควันทูริโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow injection) ร่วมกับเทคนิคเคมีลูมิเนสเซนซ์ ผลการวิเคราะห์พบว่าวิธีการนี้มีสภาพไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) สูง โดยให้ค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 4.1×10^{-11} โมลต่อลิตร (Hu, Zhang, & Yang, 2007)

2.2.4 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดย Spectrophotometry

Spectrophotometry เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารเป็นหลัก นิยมใช้ในการตรวจวัดเชิงปริมาณและคุณภาพของสารหลายชนิด เนื่องจากมีสภาพไวสูง สามารถวัดสารที่มีความเข้มข้นต่ำในสภาพสารละลายได้ โดยเครื่องมือที่ใช้เรียกว่า

Spectrophotometer ซึ่งมีระบบแยกแสงให้มีลักษณะเป็นลำแสงเดี่ยว (monochrome) ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้นของแสงได้ทั้งช่วงคลื่นอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet light, 200-400 nm) และแถบสีที่มองเห็น (Visible light, 400-750 nm) ซึ่งที่ผ่านมามีงานวิจัยซึ่งนำเทคนิค Spectrophotometry ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 เป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีจุดเด่น เพราะสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำการตรวจวัด และยังเป็นวิธีการที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมืออุปกรณ์ที่มีราคาสูง ซึ่งวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ยังอาจแบ่งออกได้อีกเป็นสองประเภท ดังนี้

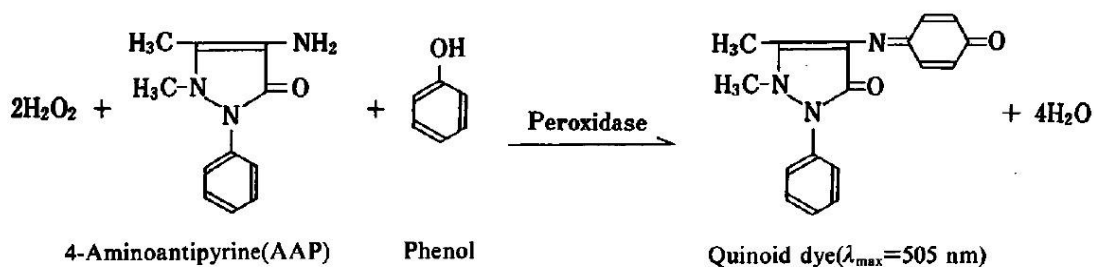
2.2.4.1 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดยใช้เทคนิค Spectrophotometry ที่ต้องอาศัย Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยา

การตรวจวัดด้วยเทคนิค Spectrophotometry ได้ถูกนำไปใช้พัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 โดยอาศัยหลักการของไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) โดยมี Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดย Peroxidase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็น O_2 และ H_2O หลังจากนั้น Oxygen ที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นและให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบซึ่งทำให้สารละลายมีสีเกิดขึ้น ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยวิธีการวิเคราะห์จากการเปรียบเทียบความเข้มของสี (Colorimetric method) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ได้ ดังสมการเคมีที่แสดง (Petersen et al., 2005)



ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้อาศัยหลักการข้างต้น เช่น การพัฒนาวิธีศึกษาแอกติวิตีของ Monoamine oxidase ในไมโทคอนเดรียในตับของหนูโดยใช้ไทรามิน (Tyramine) เป็นซับสเตรต ผู้วิจัยได้ใช้การตรวจวัดความเข้มของสีที่เกิดจากสารเคมีที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ซึ่งประกอบด้วย Horseradish peroxidase และ ABTS (2,2'-azinodi(ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) มาทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 414 nm ข้อดีของวิธีการนี้คือสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีมีความเป็นพิษน้อย ละลายได้ง่ายในน้ำ ไม่ไวต่อแสง และมีความเสถียรสูง ไม่เกิดปฏิกิริยา Oxidation ได้เองตามธรรมชาติ (Szutowicz, Kobes, & Orsulak, 1984) การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 โดยการใช้สารละลายผสมของ 4-Aminoantipyrine (4-AAP) Phenol และ Horseradish peroxidase (HRP) ในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นควินอยด์ (Quinoid dye) ซึ่งได้จาก 4-อะมิโนแอนติไพรีนในรูปออกซิไดส์ (Oxidized 4-AAP) ทำปฏิกิริยารวมตัวกับฟีนอล โดยควินอยด์เป็น

สารละลายที่มีสีแดงและดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 505 nm ในเวลาต่อมา วิธีการนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการเกิดปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Holt และคณะ ที่ได้พัฒนาวิธีการให้ดีขึ้นโดยการใช้กรดวานิลลิก (Vanillic acid) แทนฟีนอล เพื่อลดความเป็นพิษของรีเอเจนต์และนำไปใช้ในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ Monoamine oxidase ได้ (Holt, Sharman, Baker, & Palcic, 1997)



ภาพประกอบ 9 หลักการตรวจวัด H_2O_2 โดยใช้ Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยา
ซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นสารตั้งต้น

ที่มา: Saito et al. (1987)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณของ H_2O_2 ที่เจือปนในตัวอย่างนมโดยใช้ Peroxidase เป็นวัสดุชีวภาพ โดย Peroxidase จะเร่งปฏิกิริยาของ H_2O_2 และโอ-ไดอะนิซีน (O-dianisidine) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารโอ-ไดอะนิซีนที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำตาล และเมื่ออยู่ในสภาวะที่พีเอชเป็นกรดจะให้สารละลายสีชมพู โดยสีชมพูที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ในตัวอย่าง (Benedito et al., 2003) การตรวจวัดหาปริมาณ H_2O_2 และกลูโคส โดยใช้ 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB) เป็นซับสเตรตและมี Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อเกิดปฏิกิริยาขึ้นจะได้สารละลายสีฟ้า ซึ่งสามารถนำไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 655 nm ได้ โดยวิธีการนี้มีจุดเด่นคือมีความจำเพาะเจาะจงสูง และค่าดูดกลืนแสงที่ได้แปรผันโดยตรงกับปริมาณ H_2O_2 (Wang, Zhou, Wu, Wang, & He, 2015)

2.2.4.2 วิธีตรวจวัด H_2O_2 โดยใช้เทคนิค Spectrophotometry ที่ไม่ต้องอาศัย Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยา

วิธีการตรวจวัด H_2O_2 โดยไบโอเซ็นเซอร์ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้กล่าวถึงไปแล้วในหัวข้อข้างต้นยังมีข้อจำกัดเนื่องจากต้องอาศัยเอนไซม์ซึ่งมีราคาสูงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงมีงานวิจัยใหม่ ๆ ที่พัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย โดยไม่ต้องอาศัย Peroxidase ในการเร่งปฏิกิริยาขึ้น งานวิจัยเหล่านี้จะใช้ประโยชน์จากสมบัติการเป็นตัวออกซิไดส์ที่ดีของ H_2O_2 เพื่อทำปฏิกิริยา Oxidation กับรีเอเจนต์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารในรูปออกซิไดส์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบที่มีสี และสามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยตรงได้ เช่น การใช้กรด 4-ไนโตรฟีนิลโบโรนิก (4-Nitrophenyl boronic acid) หรือ 4-ไนโตรฟีนิลโบโรนิกแอซิดพินาคอล เอสเทอร์ (4-nitrophenyl boronic acid pinacol ester) เป็นตัวตรวจวัด โดยสารทั้งสองชนิดสามารถถูก H_2O_2 ออกซิไดส์ให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์คือ 4-ไนโตรฟีนอล (4-nitrophenol) ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 400 nm ได้ โดยผลจากการศึกษาพบว่าวิธีการนี้สามารถตรวจวัด H_2O_2 ได้ในช่วงความเข้มข้น 1 – 40 μM โดยใช้ระยะเวลาในการตรวจวัดเพียง 2 นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 11 และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Su et al., 2011) การใช้วานาเดียมเพนทอกไซด์ (Vanadium pentoxide) ในกรดซัลฟิวริกเป็นรีเอเจนต์เพื่อหาปริมาณ H_2O_2 ในน้ำทิ้งจากสารฟอกขาวที่ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนเพอรอกโซวานาเดต (peroxovanadate complex) ที่เกิดขึ้นจากการถูกออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 มีสีน้ำตาลแดง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 454 nm วิธีการนี้มีข้อดีเนื่องจากสามารถทำได้ง่ายและมีความแม่นยำสูง เหมาะกับการนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการอุตสาหกรรม (Zhang et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคตรวจวัดด้วยวิธี UV-visible spectroscopy ไปพัฒนาเป็นวิธีการตรวจวัดไอระเหยของ H_2O_2 ด้วยกระดาษที่เคลือบสารสกัด Anthocyanin จากกะหล่ำปลีม่วงโดยอาศัยผลจากปฏิกิริยาจาก H_2O_2 เข้าไปทำลายโครงสร้างทางเคมีของ Anthocyanin ส่งผลให้เกิดการเจือจางของสีซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่าได้ (สุกัญญา เพชรศิริเวทย์ et al., 2560)

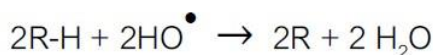
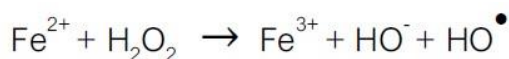
ทั้งนี้งานวิจัยที่พัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลายโดยที่ไม่ต้องใช้ Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาคงคู่ที่ได้อยู่มาข้างต้น ก็ยังคงมีข้อจำกัดบางประการ ตัวอย่างเช่น การพัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยใช้กรด 4-ไนโตรฟีนิลโบโรนิก (4-Nitrophenyl boronic acid) หรือ 4-ไนโตรฟีนิลโบโรนิกแอซิดพินาคอล เอสเทอร์ (4-Nitrophenyl boronic acid pinacol ester) เป็นรีเอเจนต์ยังคงมีช่วงความเป็นเส้นตรง

(Working range) ที่ค่อนข้างแคบ คือ ใช้ตรวจวัด H_2O_2 ได้ในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 40 μM ในขณะที่วิธีการใช้วานาเดียมเพนทอกไซด์ (Vanadium pentoxide) ในกรดซัลฟิวริกเป็นรีเอเจนต์ ต้องใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นในระดับที่อาจเป็นอันตราย และวิธีการตรวจวัดไอระเหยของ H_2O_2 ด้วยกระดาษที่เคลือบสารสกัด Anthocyanin ก็มีข้อจำกัดคือต้องใช้เวลาในการตรวจวัดนานกว่า 30 นาที ทั้งยังไม่สามารถใช้ตรวจวัด H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำได้

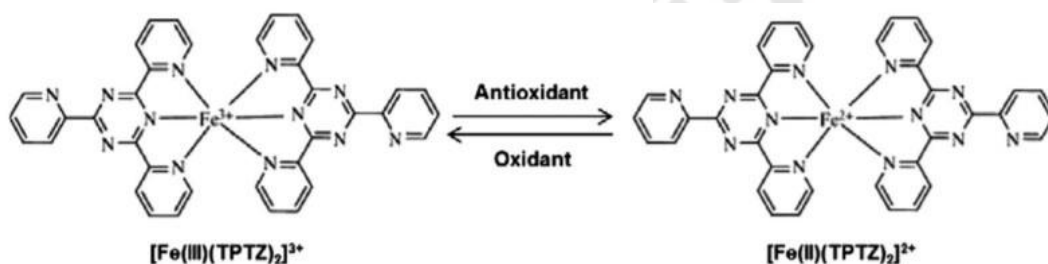
3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Oxidation - Reduction ของเหล็ก

เหล็ก(II) หรือเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+} , Ferrous ion) เป็นแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย แต่มีบทบาทสำคัญในการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด Fe^{2+} เป็นองค์ประกอบสำคัญของ เอนไซม์บางชนิด ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และไซโตโครม (cytochrome) โดย Fe^{2+} ในฮีโมโกลบินทำหน้าที่ที่สำคัญคือการขนส่ง Oxygen ไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (Pubchem, 2004) นอกจากนี้เหล็กยังเป็นธาตุที่พบทั่วไปในดินและหินในธรรมชาติ โดยเหล็กจะเปลี่ยนเป็นรูปของสารละลายในน้ำได้ หากน้ำมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือมีสภาพเป็นกรด ไอออนของเหล็กในรูปเหล็ก(III) หรือ เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+} , Ferric ion) ซึ่งไม่ละลายในน้ำจะถูกรีดิวซ์เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ละลายอยู่ในน้ำภายใต้สภาพไร้อากาศ น้ำที่มีไอออนของเหล็กเจือปนอยู่ จะไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพมากนัก แต่มักเป็นสาเหตุของสภาพที่ไม่พึงประสงค์ของน้ำ เช่น ทำให้น้ำมีรสขม ทำให้น้ำมีสีแดง น้ำตาลหรือดำ หากใช้ซักล้างทำให้เกิดรอยด่างบนเสื้อผ้าหรือมีคราบตกค้างบนสุขภัณฑ์และเครื่องใช้ต่าง ๆ ได้ (กองวิเคราะห์น้ำบาดาล, 2561)

Fe^{2+} มีบทบาทสำคัญอย่างมากในกระบวนการเพนตันซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้บำบัดน้ำเสียที่เกิดจากห้องปฏิบัติการเคมีหรือโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งน้ำเสียที่มาจากแหล่งเหล่านี้มักมีสารประกอบอินทรีย์จำนวนมาก เช่น เอทานอล (ethanol) เฮกเซน (hexane) เมทิลีนคลอไรด์ (methylenechloride) สารกลุ่มแอลกอฮอล์และฟีนอล (alcohol and phenol) สารกลุ่มแอลดีไฮด์และคีโตน (aldehyde and ketone) ตลอดจนสารกลุ่มเอมีน (amine) เป็นต้น โดยกระบวนการเพนตันเป็นกระบวนการ Oxidation ในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งประกอบด้วย รีเอเจนต์สองชนิด คือ H_2O_2 และ Fe^{2+} โดย H_2O_2 จะกระตุ้นปฏิกิริยา Oxidation ของ Fe^{2+} ให้เปลี่ยนเป็น Fe^{3+} พร้อมทั้งสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl Radical; OH^\bullet) ขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลนี้จะเข้าไปเหนี่ยวนำทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation ของสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในน้ำ และจะเกิดการเหนี่ยวนำต่อไปเรื่อย ๆ ในลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้โมเลกุลของสารอินทรีย์ทั้งหมดในน้ำมีขนาดและความเป็นพิษลดลง (สุชนม์ แก้วมาตย์ & บุญสร้าง ดิเรกสถาพร, 2555) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งสองขั้นตอนแสดงได้ดังสมการ



ทั้งนี้เนื่องจาก Fe^{2+} สามารถถูกออกซิไดส์ให้อยู่ในรูป Fe^{3+} และ Fe^{3+} ก็สามารถถูกรีดิวซ์กลับให้อยู่ในรูป Fe^{2+} ได้ ดังนั้นจึงมีการนำไอออนทั้งสองชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวัดสารบางชนิดโดยใช้กระบวนการ Oxidation - Reduction เช่น การทดสอบสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างแก่อนุมูลอิสระซึ่งมีไตรไพริดีลไตรเอซีน (Tripyridyltriazine; TPTZ) เป็นรีเอเจนต์ โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยา Reduction ของ Fe^{3+} -TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} -TPTZ ด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) โดย $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ เป็นไอออนเชิงซ้อนที่ไม่มีสี ในขณะที่ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ มีสีน้ำเงินและดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm (Benzie & Strain, 1996) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ เป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$

ที่มา: Li, Dai, and Shah (2017)

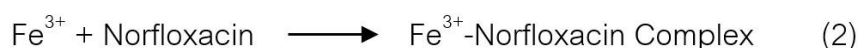
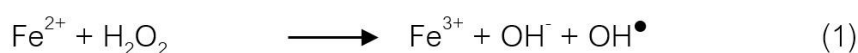
นอกจากนี้ไอออนของเหล็กยังได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ ตัวอย่างเช่น การนำเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous Sulfate; FeSO_4) ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณของ นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin; 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piprazinyl)-3-quinoline carboxylic acid) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งซึ่งถูกใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ และทางเดินหายใจ โดยผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจวัดนอร์ฟลอกซาซินในเภสัชภัณฑ์โดยวิธีสเปกโทรเมตริกอย่างง่าย โดยมีการเติม H_2O_2 ลงไปเพื่อช่วยเพิ่มสัญญาณที่ตรวจวัดได้ ปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างยา เฟอร์รัสซัลเฟต และ H_2O_2 จะให้สารประกอบที่มีสีเหลือง และสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 440 nm (สีไส ปารมี & วิรัช เรื่องศรีตระกูล, 2555)

4. ประเด็นของงานวิจัยที่พัฒนา

จากการทบทวนวรรณกรรม และศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่ม Amine oxidase โดยไม่ต้องอาศัย Peroxidase ในการทำปฏิกิริยาควบคู่ และใช้ไอออนของเหล็กเป็นรีเอเจนต์ เพื่อให้การตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์สามารถทำได้สะดวกขึ้น และช่วยลดค่าใช้จ่ายลงได้จากการไม่ต้องใช้ Peroxidase ซึ่งมีราคาสูง ทั้งนี้ผู้วิจัยจะทำการพัฒนาวิธีตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase โดยใช้ Diamine oxidase เป็นตัวแทนของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ และติดตามปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยา คือ H_2O_2

วิธีการตรวจวัด H_2O_2 หลายวิธี เช่น วิธีการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้า วิธีการตรวจวัดด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) วิธีตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) และเคมีลูมิเนสเซนซ์ (Chemiluminescence) ต่างก็มีข้อจำกัดที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงที่มีราคาแพง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงมีข้อสังเกตว่าการวิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry เป็นวิธีการที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากใช้อุปกรณ์ที่มีราคาไม่สูง ทำได้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และสะดวกกว่าวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถเลือกชนิดของรีเอเจนต์ที่นำมาใช้ตรวจวัดได้หลากหลาย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีตรวจวัดแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ไม่ต้องอาศัย Peroxidase ในการเข้าทำปฏิกิริยาควบคู่ โดยจะนำปฏิกิริยา Oxidation ของ Fe^{2+} มาใช้ร่วมกับรีเอเจนต์สองชนิด คือ นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) และไตรไพริดีลไตรเอซีน (TPTZ) เพื่อติดตามปริมาณของ H_2O_2 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเป็นดังสมการเคมีต่อไปนี้



โดยวิธีตรวจวัดที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นใหม่ทั้งสองวิธีสามารถแบ่งได้เป็นสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกของทั้งสองวิธีเป็นปฏิกิริยา Oxidation ของ Fe^{2+} ด้วย H_2O_2 เกิดผลิตภัณฑ์เป็น Fe^{3+} ไฮดรอกไซด์ไอออน และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ดังแสดงในสมการที่ (1) จากนั้นผู้วิจัยจึงนำ

ปฏิกริยานี้มาประยุกต์ใช้กับรีเอเจนต์แต่ละชนิดเพื่อให้เกิดสารที่มีสีและสามารถตรวจวัดด้วยเทคนิค Spectrophotometry ได้ โดยในวิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ผู้วิจัยได้ใช้นอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ โดยนอร์ฟลอกซาซินจะทำปฏิกริยาเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Fe^{3+} เป็นสารละลายสีเหลืองที่สามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นในปฏิกริยานี้จึงเป็นการตรวจวัดปริมาณ Fe^{3+} ที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยา Oxidation ของ Fe^{2+} เมื่อพิจารณาตามความสัมพันธ์นี้จะได้ว่าค่าดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้จะแปรผันตรงตามปริมาณ H_2O_2 ในขณะที่วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 2 ผู้วิจัยได้ใช้ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ ซึ่ง TPTZ สามารถเกิดไอออนเชิงซ้อนได้ทั้งกับ Fe^{2+} และ Fe^{3+} โดย $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ เป็นไอออนเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน แต่ $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ เป็นไอออนเชิงซ้อนที่ไม่มีสี ดังนั้นในปฏิกริยานี้จึงเป็นการตรวจวัดปริมาณ Fe^{2+} ที่เหลืออยู่จากปฏิกริยา Oxidation เมื่อพิจารณาตามความสัมพันธ์นี้จะได้ว่าค่าดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้จะแปรผกผันกับปริมาณ H_2O_2

ทั้งนี้โดยผู้วิจัยคาดหวังว่าจะวิธิการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่ม Amine oxidase ที่พัฒนาขึ้นนี้จะช่วยลดข้อจำกัด ลดงบประมาณ และมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดได้ใกล้เคียงกับวิธิการมาตรฐานที่มีมาก่อนอยู่แล้วได้เป็นอย่างดี



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหาแอกติวิตีของ Amine oxidase ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยการให้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ โดยผู้วิจัยมีวิธีดำเนินการวิจัยดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์
2. การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์
3. การศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase
4. การนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 เทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของ Diamine oxidase

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) Micropipette
- 2) Pipette Tip ขนาด 10, 200 และ 1000 μL
- 3) Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL
- 4) Microplate 96-well
- 5) Quartz Cuvette
- 6) เครื่อง Spectrophotometer แบบ Double-beam
- 7) เครื่อง Spectrophotometer รุ่น UV-1200
- 8) เครื่อง Dry Bath Incubator รุ่น Benchmark™ BSH200
- 9) เครื่อง Shaking Incubator รุ่น ZHWY-100H
- 10) เครื่อง pH meter รุ่น Suntex SP-2100
- 11) เครื่อง Whale Micro-Centrifuge รุ่น PC-200
- 12) เครื่อง Vortex-2 genie
- 13) เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง

1.2 สารเคมี

- 1) Acetic acid (99.7%, CH_3COOH) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- 2) 4-AAP (4-Aminoantipyrine) จากบริษัท TCI
- 3) Diamine Oxidase จากบริษัท Sigma-Aldrich
- 4) Ferric Chloride (FeCl_3) จากบริษัท Carlo Erba
- 5) Ferrous Sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) จากบริษัท SD Fine-Chem
- 6) Histamine Dihydrochloride ($\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl}$) จากบริษัท TCI
- 7) 30% (w/w) Hydrogen Peroxide (H_2O_2) จากบริษัท Carlo Erba
- 8) Nitric acid (HNO_3) จากบริษัท J.T. Baker
- 9) Norfloxacin จากบริษัท TCI
- 10) Peroxidase จากบริษัท TCI
- 11) Phenol จากบริษัท Sigma-Aldrich
- 12) Sodium Hydroxide (98.5%, NaOH) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- 13) Sodium Phosphate buffer ซึ่งเตรียมจาก Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) และ Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) จากบริษัท KEMAUS
- 14) TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) จากบริษัท TCI

2. วิธีการทดลอง

2.1 การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์

ในการทดลองส่วนนี้ ผู้วิจัยได้ใช้ 50.0 mM CH_3COOH เป็นตัวทำละลายของนอร์ฟลอกซาซิน ใช้ 50.0 mM HNO_3 เป็นตัวทำละลายของ Fe^{2+} ซึ่งเตรียมจาก $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ Fe^{3+} ซึ่งเตรียมจาก FeCl_3 โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

2.1.1 การหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร

1) เตรียมสารตัวอย่าง ได้แก่ Fe^{2+} Fe^{3+} นอร์ฟลอกซาซิน และ H_2O_2 แล้วผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน ทั้งหมด 7 กลุ่มการทดลอง ดังแสดงในตาราง 1 โดยผสม Fe^{2+} หรือ Fe^{3+} นอร์ฟลอกซาซินและ H_2O_2 ในอัตราส่วน 1:1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ตาราง 1 กลุ่มการทดลองเพื่อใช้ในการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} Fe^{3+} และ นอร์ฟลอกซาซิน โดยผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน

กลุ่มการทดลองที่	องค์ประกอบของสารตัวอย่าง
1	1.00 mM Fe^{2+}
2	1.00 mM Fe^{2+} + 2.00 mM H_2O_2
3	1.00 mM Fe^{2+} + 2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน
4	1.00 mM Fe^{2+} + 2.00 mM H_2O_2 + 2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน
5	1.00 mM Fe^{3+}
6	1.00 mM Fe^{3+} + 2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน
7	2.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน

2) บ่มสารละลายแต่ละกลุ่มการทดลองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
 3) เจือจางสารละลายในแต่ละหลอดทดลองสองเท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300 – 800 nm

2.1.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์

1) เตรียมสารละลาย 1.35 mM H_2O_2 , สารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} และสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซิน

2) นำสารละลายทั้ง 3 ชนิดมาปริมาตรอย่างละ 1.00 mL ผสมเข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน ดังแสดงในตาราง 2 ซึ่งหลังจากผสมสารในขั้นตอนที่ 1 เข้าด้วยกัน และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีแล้ว จึงนำสารผสมในขั้นตอนที่ 1 มาเติมสารในขั้นตอนที่ 2 ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 5 นาที

3) นำสารผสมทั้งหมดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลาย 2.25 mM Fe^{3+} กับสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซินเป็นตัวควบคุมเชิงบวก

4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

ตาราง 2 กลุ่มการทดลองที่ผสมสารละลาย 1.35 mM H₂O₂ สารละลาย 2.25 mM Fe²⁺ และ สารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซินเข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน

กลุ่มการทดลองที่	สารที่ผสมเข้าด้วยกันในขั้นตอนที่ 1	สารที่เติมเพิ่มเข้าไปในขั้นตอนที่ 2
1	Fe ²⁺ และนอร์ฟลอกซาซิน	H ₂ O ₂
2	นอร์ฟลอกซาซิน และ H ₂ O ₂	Fe ²⁺
3	Fe ²⁺ และ H ₂ O ₂	นอร์ฟลอกซาซิน

2.1.3 การหาความเข้มข้นของ Fe²⁺ และนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

การหาความเข้มข้นของ Fe²⁺ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1) นำสารละลาย 0.225 mM H₂O₂ ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย Fe²⁺ ปริมาตร 1.00 mL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.14, 0.28, 0.56, 1.13, 2.25 และ 3.38 mM ตามลำดับ ป่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2) เติมสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 mL และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm

4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การหาความเข้มข้นของนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1) นำสารละลาย 0.225 mM H₂O₂ ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe²⁺ ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นป่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2) เติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 mL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.14, 0.28, 0.56, 1.13, 2.25 และ 3.38 mM ตามลำดับ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm

4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

2.1.4 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ นอร์ฟลอกซาซิน

การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+}

1) นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที

2) เติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 mL และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm

4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ นอร์ฟลอกซาซิน

1) นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2) เติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 mL และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3, 5 และ 10 นาที

3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm

4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

2.1.5 การตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน รวมทั้ง การหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

1) นำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 300, 400 และ 500 μM ตามลำดับ ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2) เติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 1.00 mL เพื่อทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที

3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm

4) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาคุณลักษณะของระบบ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งาน (Working range) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantification; LOQ) และความเที่ยง

(Precision) ของวิธีตรวจวัด แสดงในรูปความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) โดยรายงานเป็นร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.2 การพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์

ในการทดลองส่วนนี้ ผู้วิจัยใช้ 50.0 mM HNO_3 เป็นตัวทำละลายของ Tripyridyltriazine (TPTZ), Fe^{2+} ซึ่งเตรียมจาก $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ Fe^{3+} ซึ่งเตรียมจาก FeCl_3 โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

2.2.1 การหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร

1) เตรียมสารตัวอย่าง ได้แก่ Fe^{2+} , Fe^{3+} , TPTZ และ H_2O_2 แล้วผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน ทั้งหมด 7 กลุ่มการทดลอง ดังแสดงในตาราง 3 โดยผสมอัตราส่วนของ Fe^{2+} หรือ Fe^{3+} TPTZ และ H_2O_2 ในอัตราส่วน 1:1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ตาราง 3 กลุ่มการทดลองเพื่อใช้ในการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} , Fe^{3+} และ TPTZ โดยผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน

กลุ่มการทดลองที่	องค์ประกอบของสารตัวอย่าง
1	0.10 mM Fe^{2+}
2	0.10 mM Fe^{2+} + 1.00 mM H_2O_2
3	0.10 mM Fe^{2+} + 1.00 mM TPTZ
4	0.10 mM Fe^{2+} + 1.00 mM H_2O_2 + 2.00 mM TPTZ
5	0.10 mM Fe^{3+}
6	0.10 mM Fe^{3+} + 1.00 mM TPTZ
7	1.00 mM TPTZ

2) บ่มสารละลายแต่ละกลุ่มการทดลองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) เจือจางสารละลายลงสามเท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 300 – 800 nm

2.2.2 การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์

1) เตรียมสารละลาย 0.10 mM H_2O_2 , สารละลาย 0.10 mM Fe^{2+} และ สารละลาย 1.00 mM TPTZ

2) นำสารละลายทั้ง 3 ชนิดมาปริมาตรอย่างละ 1.00 mL ผสมเข้าด้วยกัน โดยมี ลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน ดังแสดงในตาราง 4 ซึ่งหลังจากผสมสารในขั้นตอนที่ 1 เข้าด้วยกัน และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีแล้ว จึงนำสารผสมในขั้นตอนที่ 1 มาเติม สารในขั้นตอนที่ 2 ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) นำสารผสมทั้งหมดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยใช้ สารละลายผสมระหว่างสารละลาย 0.10 mM Fe^{2+} กับสารละลาย 1.00 mM TPTZ เป็น ตัวควบคุมเชิงลบ

4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

ตาราง 4 กลุ่มการทดลองที่ผสมสารละลาย 0.10 mM H_2O_2 สารละลาย 0.10 mM Fe^{2+} และ สารละลาย 1.00 mM TPTZ เข้าด้วยกัน โดยมีลำดับการผสมทั้งหมด 2 ขั้นตอน

กลุ่มการทดลองที่	สารที่ผสมเข้าด้วยกัน ในขั้นตอนที่ 1	สารที่เติมเพิ่มเข้าไป ในขั้นตอนที่ 2
1	Fe^{2+} และ TPTZ	H_2O_2
2	TPTZ และ H_2O_2	Fe^{2+}
3	Fe^{2+} และ H_2O_2	TPTZ

2.2.3 การหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} และ TPTZ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา การหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

- 1) นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.13, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 3.00 และ 4.00 mM ตามลำดับ บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 2) เติมสารละลาย 1.00 mM TPTZ ปริมาตร 1.00 mL และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การหาความเข้มข้นของ TPTZ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

- 1) นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 2) เติมสารละลาย TPTZ ปริมาตร 1.00 mL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.13, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 และ 3.00 mM ตามลำดับ และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

2.2.4 การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ TPTZ การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+}

- 1) นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที
- 2) เติมสารละลาย 2.00 mM TPTZ ปริมาตร 1.00 mL และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ TPTZ

- 1) นำสารละลาย 0.225 mM H_2O_2 ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

- 2) เติมสารละลาย 2.00 mM TPTZ ปริมาตร 1.00 mL และทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที
- 3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 4) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

2.2.5 การตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ รวมทั้งการหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

- 1) นำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 และ 300 μM ตามลำดับ ปริมาตร 1.00 mL มาเติมสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} ปริมาตร 1.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- 2) เติมสารละลาย 2.00 mM TPTZ ปริมาตร 1.00 mL เพื่อทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
- 3) เจือจางสารละลายลง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้สีของสารละลายเหมาะสมต่อการวัดค่าดูดกลืนแสง
- 4) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
- 5) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาคุณลักษณะของระบบ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งาน (Working range) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantification; LOQ) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีตรวจวัด แสดงในรูปความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) โดยรายงานเป็นร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.3 การศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase

ในการศึกษาวิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase ผู้วิจัยได้ทดลองหาคุณลักษณะของระบบโดยได้อ้างอิงวิธีการตามแนวทางในงานวิจัยของ Sharp (1972) และ Saito et al. (1987) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

- 1) เตรียมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (chromogen) โดยชั่ง Peroxidase 0.5 mg (2.5 Unit) 4-AAP 10.0 mg และ Phenol 9.4 mg ละลายด้วย 100 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 250 mL และเก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2) นำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250 และ 2500 μM ตามลำดับ ปริมาตร 1.00 mL มาเติม

สารละลายที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ปริมาตร 3.00 mL ลงไป จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

3) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

4) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาคุณลักษณะของระบบ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งาน (Working range) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantification; LOQ) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีตรวจวัด แสดงในรูปความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) โดยรายงานเป็นร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.4 การนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ Diamine oxidase

2.4.1 การหาช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

1) เตรียม Diamine oxidase เข้มข้น 2 mg/mL (0.1 Unit) โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสตลอดเวลา

2) ปิเปต Diamine oxidase ปริมาตร 200 μ L ลงในสารละลายฮีสตามีน (Histamine) เข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากันใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL จำนวน 10 หลอด โดยเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย ทั้งนี้เนื่องจากการเติมเอนไซม์ถือเป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยา

3) นำสารละลายแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที ตามลำดับ

4) เมื่อครบกำหนดเวลาของปฏิกิริยาในแต่ละหลอด หยุดปฏิกิริยาโดยการนำมาบ่มใน Dry Bath Incubator ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

5) ปิเปตสารละลายจากแต่ละหลอดปริมาตร 50 μ L ลงใน Microplate 96-well จำนวน 3 ชุด เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยมีรายละเอียดของวิธีการตรวจวัดดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 วิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีที่พัฒนาขึ้น

กลุ่มการทดลองที่	วิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2	วิธีการตรวจวัด
1	วิธีการมาตรฐาน โดยใช้ 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase	1) เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ปริมาตร 150 μ L ลงในสารละลายจากแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที 2) วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 515 nm
2	วิธีการที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์	1) เติม 2.25 mM Fe^{2+} ปริมาตร 50 μ L ลงในสารละลายจากแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที 2) เติม 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน ปริมาตร 50 μ L แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที 3) วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 440 nm
3	วิธีการที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์	1) เติม 0.50 mM Fe^{2+} ปริมาตร 50 μ L ลงในสารละลายจากแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที 2) เติม 2.00 mM TPTZ ปริมาตร 50 μ L แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที 3) ปิเปตสารละลายมาปริมาตร 50 μ L แล้วเติมน้ำกลั่น 100 μ L เพื่อเจือจางสารละลายลง 3 เท่า 4) วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่เจือจางแล้วที่ 600 nm

6) เปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากแต่ละวิธีให้เป็นความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้น โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของแต่ละวิธี จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ตรวจวัดได้ (แกน y) กับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (แกน x) เพื่อพิจารณาหาช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

7) เปรียบเทียบช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่หาได้จากวิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน

2.4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของซับสเตรตต่อความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

1) เตรียมสารละลายฮีสตามีนที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 μM

2) บีเปิด Diamine oxidase เข้มข้น 2 mg/mL (0.1 Unit) ปริมาตร 200 μL ลงในสารละลายฮีสตามีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามที่ได้เตรียมไว้ ปริมาตร 200 μL ผสมให้เข้ากันใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL

3) นำสารละลายแต่ละหลอดไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

4) เมื่อครบกำหนดเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยการนำมาป้อนใน Dry Bath Incubator ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

5) บีเปิดสารละลายจากแต่ละหลอดปริมาณ 50 μL ลงใน Microplate 96-well จำนวน 3 ชุด เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยใช้วิธีการตรวจวัดตามตาราง 5

6) เปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากแต่ละวิธีให้เป็นความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้น โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของแต่ละวิธี จากนั้นคำนวณให้เป็นความเร็วของการเกิด H_2O_2 ในหน่วย $\mu M/min$ พร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของฮีสตามีนใหม่ให้เป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในปฏิกิริยา

7) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของการเกิด H_2O_2 (แกน y) กับความเข้มข้นสุดท้ายของฮีสตามีน (แกน x) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เบื้องต้นของความเร็วของปฏิกิริยา (v_i) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ($[S]$) ตามสมการของ Michaelis-Menten เพื่อนำมาใช้หาค่า V_{max} และ K_m ทั้งนี้ความเข้มข้นของฮีสตามีนที่ใช้ในการเขียนกราฟคำนวณได้จากความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดทดลอง

8) เปรียบเทียบค่า V_{max} และ K_m ของปฏิกิริยาที่หาได้จากวิธีตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการทดลองตามลำดับ ดังนี้

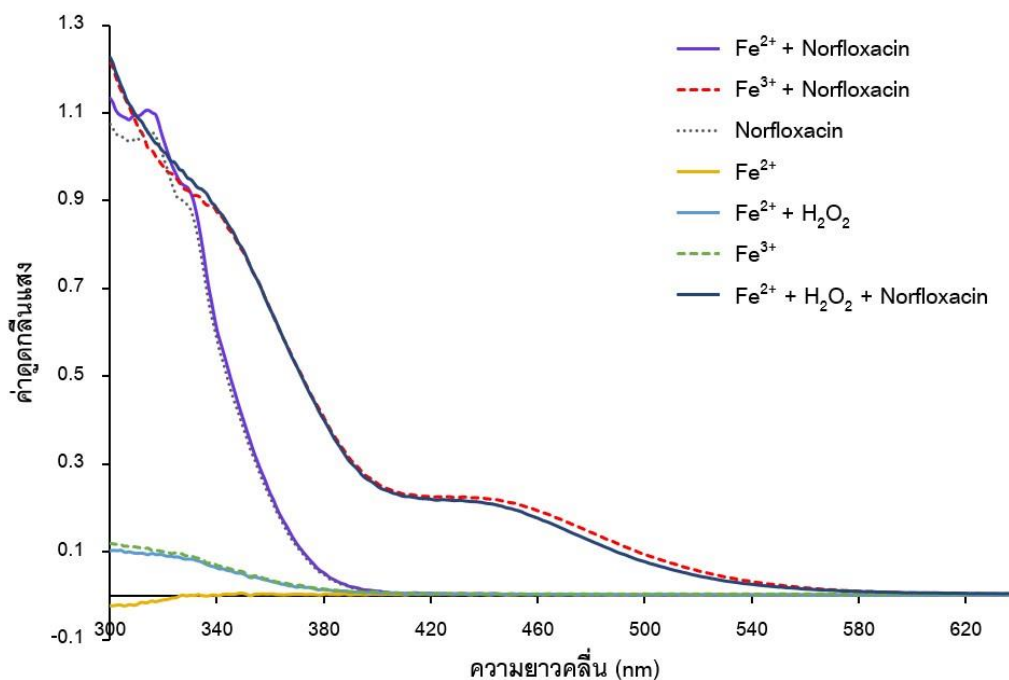
1. การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์
2. การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์
3. การทดลองเพื่อศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase
4. การทดลองเพื่อนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ Diamine oxidase

ตอนที่ 1 การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์

1.1 ผลของการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร

ผลสเปกตรัมของสารละลายชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ในช่วงความยาวคลื่น 300 - 800 nm แสดงดังภาพประกอบ 11 โดยผลการทดลองที่ได้พบว่าสารละลายที่มีส่วนผสมเฉพาะสารละลาย Fe^{2+} และ/หรือสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน พบความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ต่ำกว่า 400 nm ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายผสมระหว่าง Fe^{2+} และ H_2O_2 แต่เมื่อทำการผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกันประกอบด้วย Fe^{2+} , H_2O_2 และนอร์ฟลอกซาซิน ผลการทดลองที่ได้พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการดูดกลืนแสง โดยสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 - 500 nm ได้ โดยสเปกตรัมของสารผสมจากปฏิกิริยาระหว่าง Fe^{2+} , H_2O_2 และนอร์ฟลอกซาซิน ให้ผลการทดลองสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับการสารผสมระหว่างสารละลาย Fe^{3+} และสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน จึงแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 - 500 nm เกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Fe^{3+} และนอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin - Fe^{3+} Complex) โดย H_2O_2 สามารถไปออกซิไดส์ Fe^{2+} ให้กลายเป็น Fe^{3+} ได้ ดังนั้นจึงสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับนอร์ฟลอกซาซิน และสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 - 500 nm ได้ จาก

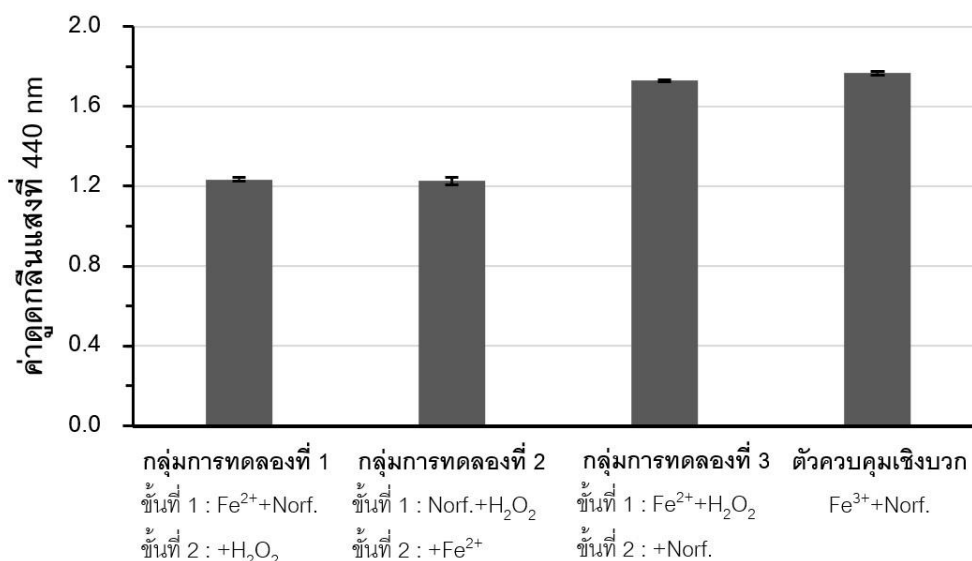
การทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 440 nm เพื่อใช้ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} ร่วมกับการใช้สารฟลักซาซิน ในการหาปริมาณของ H_2O_2 ต่อไป



ภาพประกอบ 11 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของสารละลายในปฏิกิริยาที่มี Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์

1.2 ผลของการหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์

ในการหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโดยการสลับลำดับในการผสมรีเอเจนต์ชนิดต่าง ๆ ดังตาราง 2 และใช้สารละลายผสมระหว่าง Fe^{3+} กับนอร์ฟลอกซาซินเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ผลการทดลองที่ได้พบว่า ถ้านำ Fe^{2+} ไปทำปฏิกิริยากับนอร์ฟลอกซาซิน หรือนำ H_2O_2 ไปทำปฏิกิริยากับนอร์ฟลอกซาซิน ก่อนที่จะนำ Fe^{2+} ไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ลดลงเมื่อเทียบกับการบ่ม Fe^{2+} กับ H_2O_2 ก่อนที่จะเติมนอร์ฟลอกซาซินเพิ่มลงไป ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับสารละลายผสมระหว่าง Fe^{3+} กับนอร์ฟลอกซาซิน ดังแสดงในภาพประกอบ 12 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับการผสมสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาส่งผลต่อความสามารถในการตรวจวัดเช่นกัน โดยการผสม H_2O_2 กับ Fe^{2+} ก่อนแล้วจึงเติมนอร์ฟลอกซาซินจะส่งผลให้ Fe^{2+} ถูกออกซิไดส์เป็น Fe^{3+} ได้อย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาดังกล่าว ในการนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2

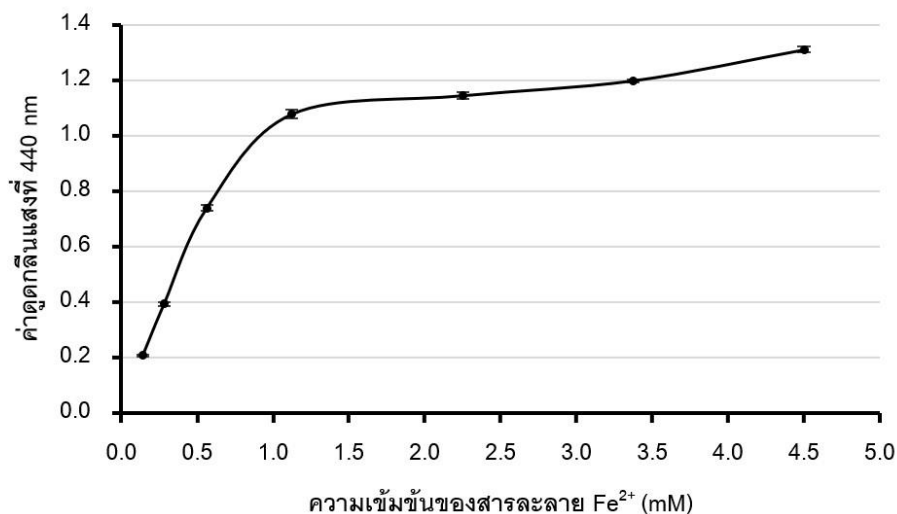


ภาพประกอบ 12 ผลของลำดับการทำปฏิกิริยาต่อค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ผสมสารละลายสองชนิดเข้าด้วยกันก่อน แล้วขั้นตอนที่ 2 จึงเติมสารละลายอีกชนิดหนึ่งเพิ่มลงไป โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาขั้นตอนละ 5 นาที

1.3 ผลของการหาความเข้มข้นของ Fe²⁺ และนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ผลของความเข้มข้นของ Fe²⁺ ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

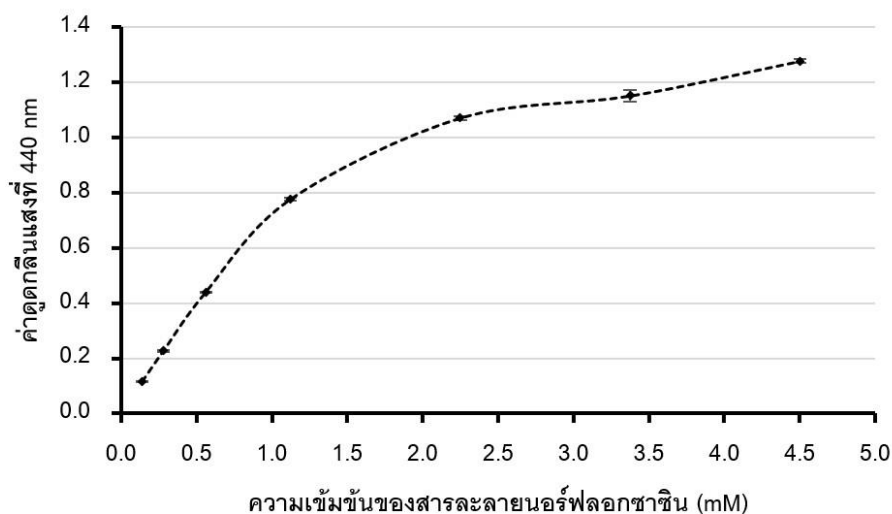
ผลของความเข้มข้นของ Fe²⁺ ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการหาปริมาณของ H₂O₂ เริ่มจากการนำ 0.225 mM H₂O₂ มาเติมด้วยสารละลาย Fe²⁺ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงค่อยเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซินลงไปต่อ และนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย Fe²⁺ จะทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลาย Fe²⁺ มีค่าเท่ากับ 1.13 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ที่วัดได้เริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพประกอบ 13 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลาย Fe²⁺ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.25 mM สำหรับใช้ในการหาปริมาณของ H₂O₂



ภาพประกอบ 13 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Fe²⁺ ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 4.50 mM นอร์ฟลอกซาซิน และ 0.225 mM H₂O₂ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm

ผลของความเข้มข้นของนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

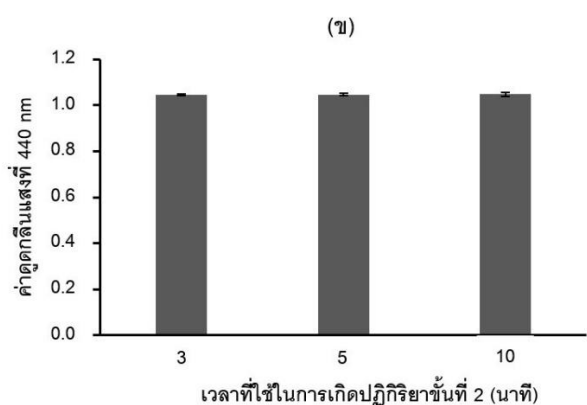
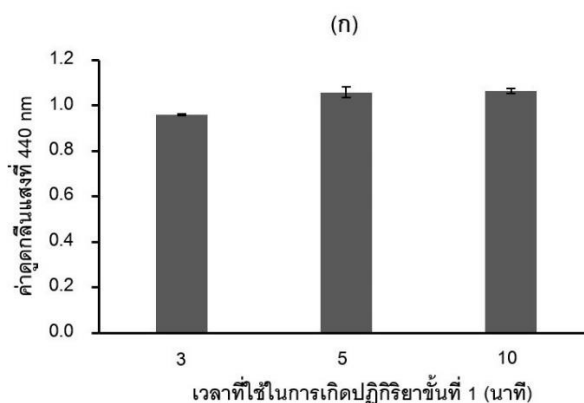
หลังจากที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Fe²⁺ ที่ใช้สำหรับหาปริมาณของ H₂O₂ แล้ว จึงได้ทำการหาความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมต่อไป โดยนำ H₂O₂ มาเติมด้วยสารละลาย 2.25 mM Fe²⁺ จากนั้นจึงเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน จะทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซินมีค่าเท่ากับ 2.25 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ที่วัดได้เริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพประกอบ 14 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลายนอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4.00 mM สำหรับใช้ในการหาปริมาณของ H₂O₂ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไป



ภาพประกอบ 14 ผลของความเข้มข้นของสารละลายนอร์ฟลอกซาซินต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} และ 0.225 mM H_2O_2 ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm

1.4 ผลของการหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน

การศึกษาผลของเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา เริ่มจากนำ H_2O_2 Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน มาผสมกันตามลำดับ โดยมีการบ่มปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ ระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} และระหว่างสารผสมของ H_2O_2 กับ Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน จากนั้นจึงนำสารผสมทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า ถ้าใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} เพียง 3 นาที จะทำให้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ลดลง แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} เป็น 5 นาที จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ที่เพิ่มขึ้นซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} เป็น 10 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 15 (ก) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะแตกต่างกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาเวลาที่ใช้บ่มปฏิกิริยาระหว่างสารผสมของ H_2O_2 กับ Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน โดยทั้ง 3 เวลา คือ 3, 5 และ 10 นาที มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพประกอบ 15 (ข) ดังนั้นเวลาที่ใช้บ่มปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} และระหว่างสารผสมของ H_2O_2 กับ Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน คือ 5 และ 3 นาที ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอสำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณของ H_2O_2

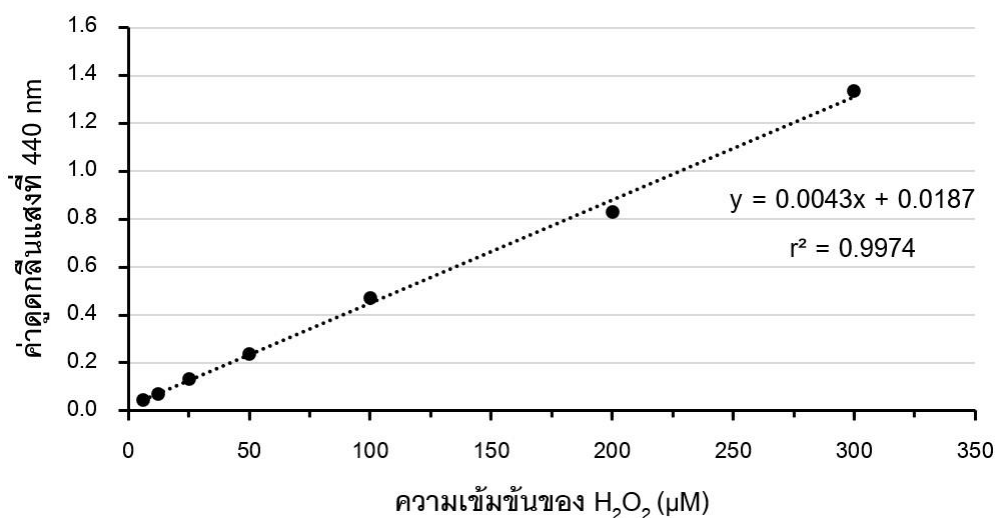


ภาพประกอบ 15 (ก) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาขั้นที่ 1 คือ การผสมสารละลาย Fe^{2+} และ H_2O_2 เข้าด้วยกัน (ข) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 2 คือ การเติมสารละลาย นอร์ฟลอกซาซินลงในสารละลายผสมระหว่าง Fe^{2+} และ H_2O_2

1.5 ผลของการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน รวมทั้งการหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

การตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน เป็นรีเอเจนต์ เริ่มจากนำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2.25 mM Fe^{2+} จากนั้นบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที จึงเติมสารละลาย 4.00 mM นอร์ฟลอกซาซิน และบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm

ผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งานที่ช่วงความเข้มข้น 6.25 - 300 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9974 ดังแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 6.25 - 300 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 440 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H₂O₂ โดยใช้ Fe²⁺ ร่วมกับ นอร์ฟลอกซาซิน

ทั้งนี้ทำการทดลองวัดค่าดูดกลืนแสงของแบลนค์ (Blank) ด้วยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (σ) แล้วนำมาใช้หา LOD จากนิยาม $LOD = 3\sigma$ blank/slope และ $LOQ = 5\sigma$ blank/slope โดยสามารถหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีตรวจวัดได้เท่ากับ 0.44 μM และ 0.73 μM ตามลำดับ หาคความเที่ยง (Precision) ของวิธีตรวจวัดจากการคำนวณความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) โดยตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 150 μM ทดลองซ้ำ 10 ครั้ง ได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.93 %

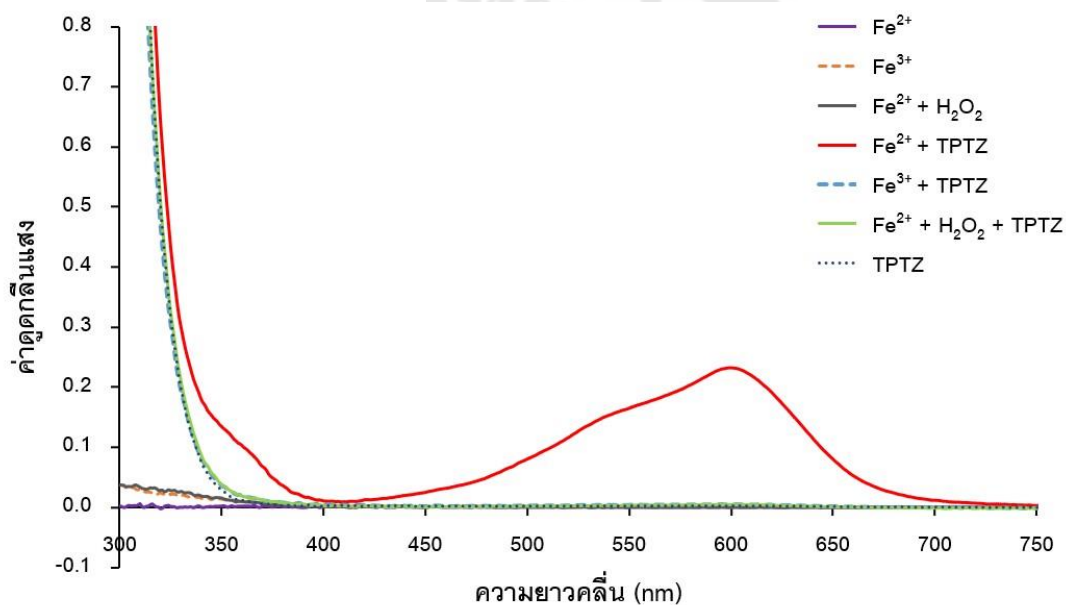
ตอนที่ 2 การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด H₂O₂ ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe²⁺ ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์

2.1 ผลของการหาสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของสาร

ผลสเปกตรัมของสารละลายชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ในช่วงความยาวคลื่น 300 - 800 nm แสดงดังภาพประกอบ 17 โดยผลการทดลองที่ได้พบว่าสารละลาย Fe²⁺ และ Fe³⁺ ไม่มีความสามารถในการดูดกลืนคลื่นแสง ในขณะที่สารละลาย TPTZ สามารถดูดกลืนแสงได้สูงมากในช่วงความยาวคลื่นต่ำกว่า 400 nm และสารละลายที่มีส่วนผสมเฉพาะสารละลาย Fe²⁺ และ

TPTZ เป็นชุดการทดลองเดี่ยวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 nm ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิดไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ โดยสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 600 nm จากการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความยาวคลื่นดังกล่าวในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} ร่วมกับการใช้ TPTZ ในการหาปริมาณของ H_2O_2 ต่อไป

ทั้งนี้เนื่องจาก Fe^{2+} จะถูกออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 กลายเป็น Fe^{3+} ดังนั้นความเข้มข้นของไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ จะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 เพิ่มขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่าค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ดังนั้นการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยวิธีนี้จะใช้หลักการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงเมื่อเทียบกับค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นของไอออนเชิงซ้อนระหว่าง Fe^{2+} และ TPTZ

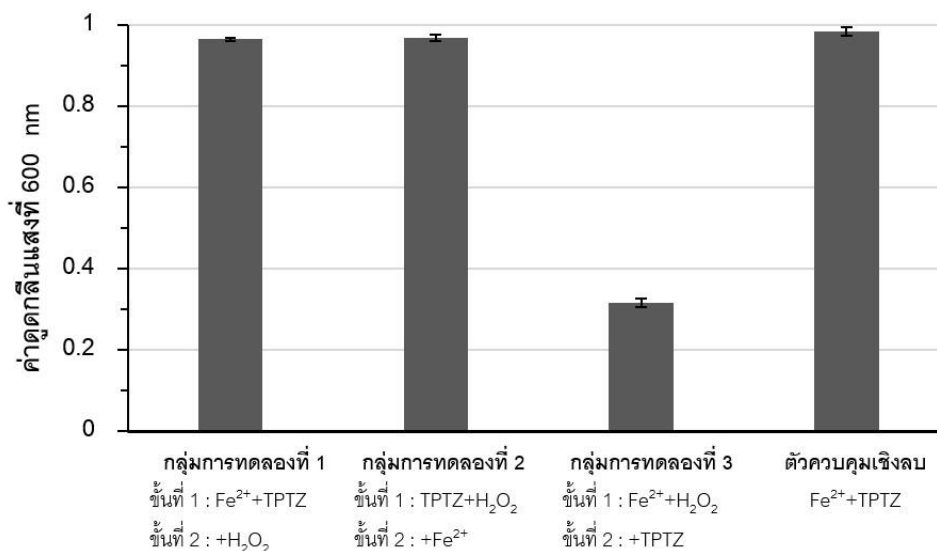


ภาพประกอบ 17 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของสารละลายในปฏิกิริยาที่มี Fe^{2+} และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์

2.2. การหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์

ในการหาลำดับที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโดยการสลับลำดับในการผสมรีเอเจนต์ชนิดต่าง ๆ ดังตาราง 4 และใช้สารละลายผสมระหว่าง Fe^{2+} กับ TPTZ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ ผลการทดลองที่ได้พบว่า ถ้านำ Fe^{2+} ไปทำปฏิกิริยากับ TPTZ หรือนำ H_2O_2 ไปทำปฏิกิริยากับ TPTZ ก่อนที่จะนำ Fe^{2+} ไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ลดลง เมื่อเทียบกับการบ่ม Fe^{2+} กับ H_2O_2 ก่อนที่จะเติม TPTZ เพิ่มลงไปภายหลัง ซึ่งเป็นกลุ่มการทดลองเดี่ยวที่มีค่าดูดกลืนแสง

ลดลง ดังแสดงในภาพประกอบ 18 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับการผสมสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาส่งผลต่อความสามารถในการตรวจวัดเช่นกัน โดยการผสม H_2O_2 กับ Fe^{2+} ก่อนแล้วจึงเติม TPTZ จะส่งผลให้ Fe^{2+} สามารถถูกออกซิไดส์เป็น Fe^{3+} ได้อย่างสมบูรณ์ จึงไม่สามารถเกิดเป็นไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ที่ดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาดังกล่าว ในการนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณ H_2O_2



ภาพประกอบ 18 ผลของลำดับการทำปฏิกิริยาต่อค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ผสมสารละลายสองชนิดเข้าด้วยกันก่อนแล้วขั้นตอนที่ 2 จึงเติมสารละลายอีกชนิดหนึ่งเพิ่มลงไป โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาขั้นตอนละ 5 นาที

2.3 ผลของการหาความเข้มข้นของ Fe^{2+} และ TPTZ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

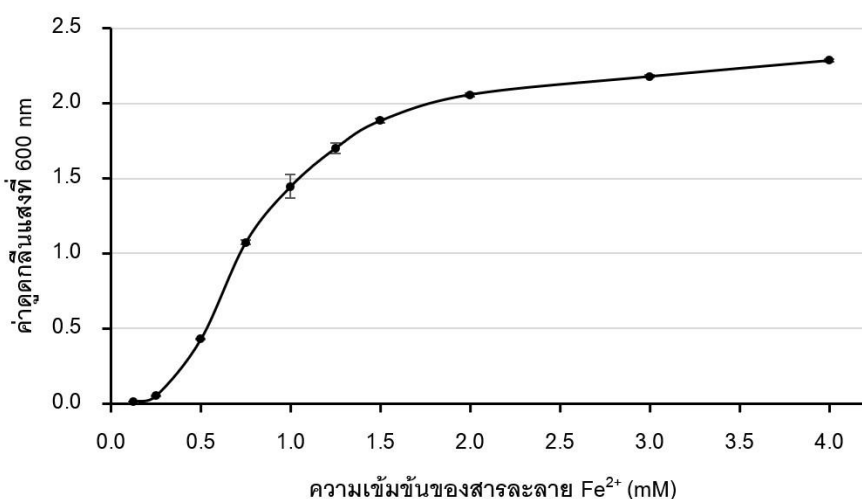
ผลของความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

ผลของความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการหาปริมาณของ H_2O_2 เริ่มจากการนำ 0.225 mM H_2O_2 มาเติมด้วยสารละลาย Fe^{2+} ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงค่อยเติมสารละลาย TPTZ ลงไป และนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} จะทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} มีค่าเท่ากับ 2.50 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ที่วัดได้เริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพประกอบ 19

เมื่อพิจารณาจากภาพประกอบ 19 จะสามารถแบ่งกราฟได้เป็น 3 ช่วง คือ (1) ช่วงแรกของกราฟที่ความเข้มข้นของ Fe^{2+} ต่ำ ๆ ค่าดูดกลืนแสงและความชันของกราฟมีค่าใกล้

ศูนย์ แสดงว่า Fe^{2+} ถูกออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 โดยสมบูรณ์ จึงไม่มี Fe^{2+} เหลือมาทำปฏิกิริยากับ TPTZ เพื่อเกิดเป็นไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ได้ (2) ช่วงที่ความเข้มข้นของ Fe^{2+} เพิ่มสูงขึ้น กราฟเริ่มมีค่าดูดกลืนแสงและความชันเพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงว่า Fe^{2+} ได้ถูกออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 ไปบางส่วน แต่ยังคงมี Fe^{2+} เหลือมาทำปฏิกิริยากับ TPTZ เพื่อเกิดเป็นไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{2+} จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ เพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าในช่วงนี้ Fe^{2+} ที่เหลือจากการออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 ทำหน้าที่เป็นสารกำหนดปริมาณของการเกิดไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ (3) ช่วงที่กราฟมีค่าดูดกลืนแสงตั้งแต่ 2.00 ขึ้นไป และมีความชันลดลงจนเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เหลือจากปฏิกิริยาออกซิไดส์ด้วย H_2O_2 มากเกินไป ส่งผลให้ TPTZ ทำหน้าที่เป็นสารกำหนดปริมาณของการเกิดไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ แทน จึงส่งผลให้ค่าดูดกลืนแสงไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อความเข้มข้นของ Fe^{2+} เพิ่มขึ้น

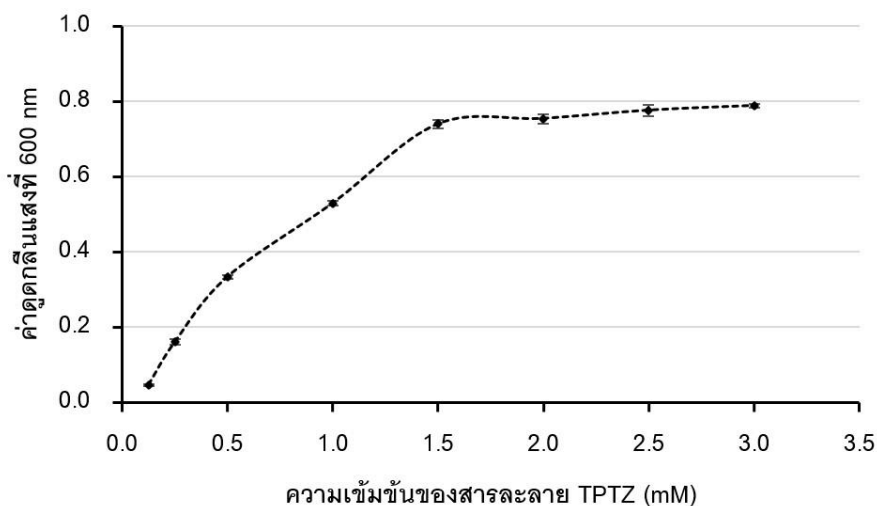
เนื่องจากการพัฒนาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยวิธีนี้มีจุดมุ่งหมายในการตรวจวัด H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} เท่ากับ 0.50 mM เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าดูดกลืนแสงของไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 ลดลง จะส่งผลให้ Fe^{2+} ที่เหลือจากการถูกออกซิไดส์มีมากขึ้น ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็จะมีค่าสูงขึ้นจนถึงจุดที่ผลของความเข้มข้นของ H_2O_2 มีผลต่อการถูกออกซิไดส์ของ Fe^{2+} น้อยมาก ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็จะเริ่มมีค่าคงที่



ภาพประกอบ 19 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 1.00 mM TPTZ และ 0.225 mM H_2O_2 ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

ผลของความเข้มข้นของ TPTZ ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

หลังจากที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย Fe^{2+} ที่ใช้สำหรับหาปริมาณของ H_2O_2 แล้ว จึงได้ทำการหาความเข้มข้นของสารละลาย TPTZ ที่เหมาะสมต่อไป โดยนำ H_2O_2 มาเติมด้วยสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} จากนั้นจึงเติมสารละลาย TPTZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย TPTZ จะทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลาย TPTZ มีค่าเท่ากับ 1.50 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ที่วัดได้เริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพประกอบ 20 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลาย TPTZ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.00 mM สำหรับใช้ในการหาปริมาณของ H_2O_2 เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปพอสำหรับปฏิกิริยาการเกิดไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$



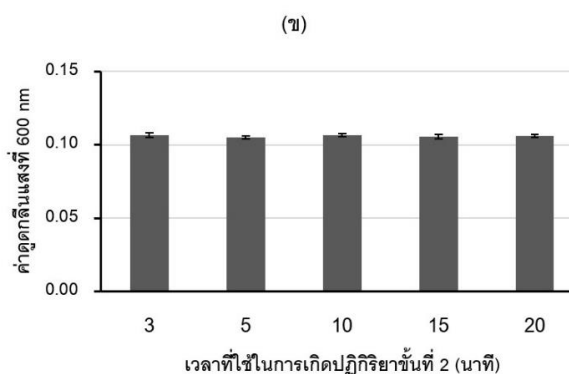
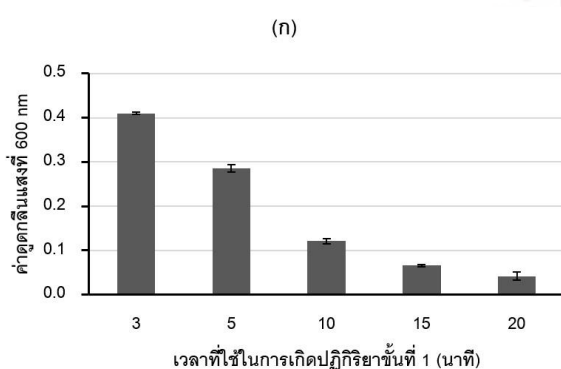
ภาพประกอบ 20 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย TPTZ ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} และ $0.225 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

2.4 ผลของการหาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมระหว่าง H_2O_2 Fe^{2+} และ TPTZ

การศึกษาผลของเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา เริ่มจากนำ H_2O_2 Fe^{2+} และ TPTZ มาผสมกันตามลำดับ โดยมีการบ่มปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ ระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} และระหว่างสารผสมของ H_2O_2 กับ Fe^{2+} และ TPTZ จากนั้นจึงนำสารผสมทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ Fe^{2+} นานขึ้น จะทำให้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ลดลงเรื่อย ๆ โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 - 10

นาที่แรก และจะลดลงด้วยความเร็วที่ช้าลงเมื่อเวลามากกว่า 10 นาทีขึ้นไป ดังแสดงในภาพประกอบ 21 (ก) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะแตกต่างกับผลการทดลองที่ได้จากศึกษาเวลาที่ใช้บ่มปฏิกิริยาระหว่างสารผสมของ H_2O_2 กับ Fe^{2+} และ TPTZ โดยทั้ง 5 เวลา คือ 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพประกอบ 21 (ข)

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเวลามีผลต่อการถูกออกซิไดส์ของ Fe^{2+} ด้วย H_2O_2 ไปเป็น Fe^{3+} โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น Fe^{2+} ก็จะถูกออกซิไดส์เป็น Fe^{3+} ได้มากขึ้นด้วย จึงส่งผลให้การดูดกลืนแสงของไอออนเชิงซ้อน $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ลดลง โดยผู้วิจัยควรเลือกใช้เวลาที่ 15 หรือ 20 นาทีในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ปฏิกิริยา Oxidation ของ Fe^{2+} เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่สุด อย่างไรก็ตาม ที่เวลาดังกล่าว ค่าดูดกลืนแสงมีค่าลดลงจนต่ำกว่า 0.1 จึงอาจส่งผลให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มีความคลาดเคลื่อนและไม่สัมพันธ์กันกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เวลาที่ 10 นาทีในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 ส่วนในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 คือการเติม TPTZ ลงในสารละลายผสม ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ไม่มีผลต่อการดูดกลืนแสง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเวลาที่ใช้บ่มปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้เท่ากับ 3 นาที

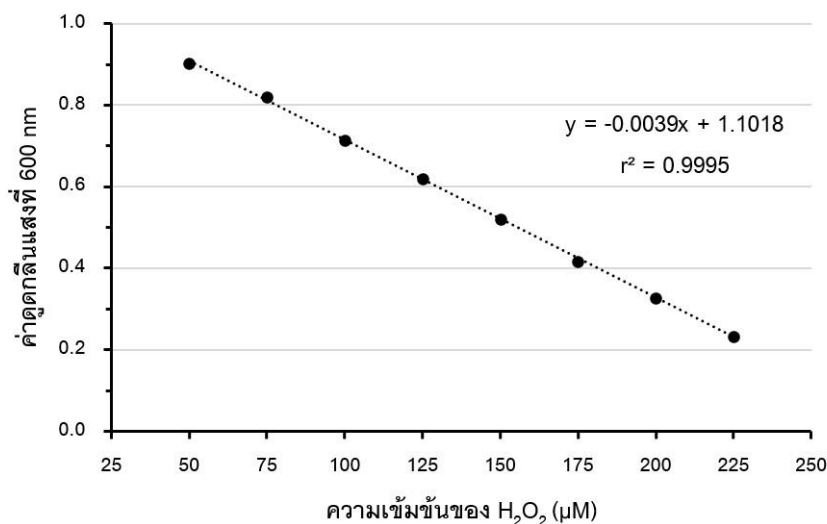


ภาพประกอบ 21 (ก) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 1 คือ การผสมสารละลาย Fe^{2+} และ H_2O_2 เข้าด้วยกัน (ข) ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาในขั้นที่ 2 คือ การเติมสารละลาย TPTZ ลงในสารละลายผสมระหว่าง Fe^{2+} และ H_2O_2

2.5 ผลของการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ รวมทั้งการหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

การตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ เริ่มจากนำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.50 mM Fe^{2+} บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที จึงเติมสารละลาย 2.00 mM TPTZ และบ่มปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปเจือจางลง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้สีของสารละลายเหมาะสมต่อการวัดค่าดูดกลืนแสง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

ผลการทดลองที่ได้พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งานที่ช่วงความเข้มข้น 50.0 - 225 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9995 ดังแสดงในภาพประกอบ 22



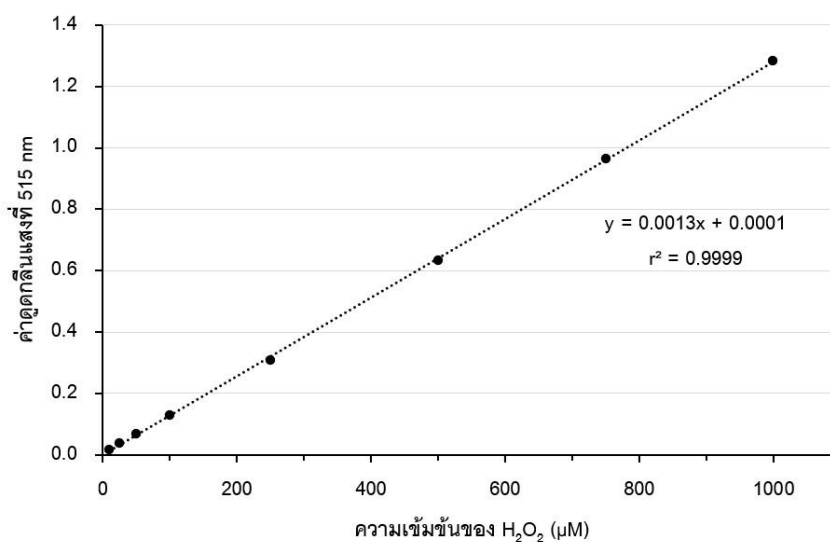
ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 50.0 - 225 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ

ทั้งนี้ทำการทดลองวัดค่าดูดกลืนแสงของแบลนค์ (Blank) ด้วยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (σ) แล้วนำมาใช้หา LOD จากนิยาม $LOD = 3\sigma$ blank/slope และ $LOQ = 5\sigma$ blank/slope โดยสามารถหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีตรวจวัดได้เท่ากับ 21.99 μM และ 41.86 μM ตามลำดับ หาค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีตรวจวัดจากการคำนวณความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) โดยตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 110 μM ทดลองซ้ำ 10 ครั้ง ได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.36 %

ตอนที่ 3 การทดลองเพื่อศึกษาวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase

การตรวจวัดปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีมาตรฐานในงานวิจัยนี้ได้ ผู้วิจัยได้ทดลองหาคุณลักษณะของระบบโดยได้อ้างอิงวิธีการตามแนวทางในงานวิจัยของ Sharp (1972) และ Saito et al. (1987) โดยผู้วิจัยเริ่มจากการเตรียมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ซึ่งประกอบด้วย 4-AAP Phenol และ Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายที่ทำให้เกิดสีไปเติมลงในสารละลาย H_2O_2 ที่ต้องการตรวจวัด ในอัตราส่วน 3 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดย Peroxidase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้เป็น Oxygen (O_2) และน้ำ (H_2O) Oxygen ที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับ 4-AAP และ Phenol แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็น Quinoid dye ซึ่งทำให้สารละลายมีสีแดงเกิดขึ้น และตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงได้

ผลการทดลองที่ได้พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงหรือช่วงการใช้งานที่ช่วงความเข้มข้น 10 - 1000 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9999 ดังแสดงในภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 - 1000 μM กับค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm เมื่อตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยใช้ 4-AAP และ Phenol โดยมี Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ทั้งนี้ทำการทดลองวัดค่าดูดกลืนแสงของแบลนค์ (Blank) ด้วยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (σ) แล้วนำมาใช้หา LOD จากนิยาม $LOD = 3\sigma \text{ blank/slope}$ และ $LOQ = 5\sigma \text{ blank/slope}$ โดยสามารถหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีตรวจวัดได้เท่ากับ 4.62 μM และ 7.74 μM ตามลำดับ หาคความเที่ยง (Precision) ของวิธีตรวจวัดจากการคำนวณความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) โดยตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 400 μM ทดลองซ้ำ 10 ครั้ง ได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.20 %

เมื่อนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วย Fe^{2+} ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบคุณสมบัติของระบบกับวิธีมาตรฐาน สามารถสรุปได้ดังตาราง 6 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์มีข้อดี คือ ให้ค่า LOD และ LOQ ได้ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธียังมีข้อจำกัดคือมีช่วงความเป็นเส้นตรง (Working range) แคบกว่าวิธีมาตรฐานค่อนข้างมาก ซึ่งแก้ไขได้โดยการเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนทำการตรวจวัด ทั้งนี้ทั้งสองวิธีมีความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) อยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ ดังนั้นวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วย Fe^{2+} ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้

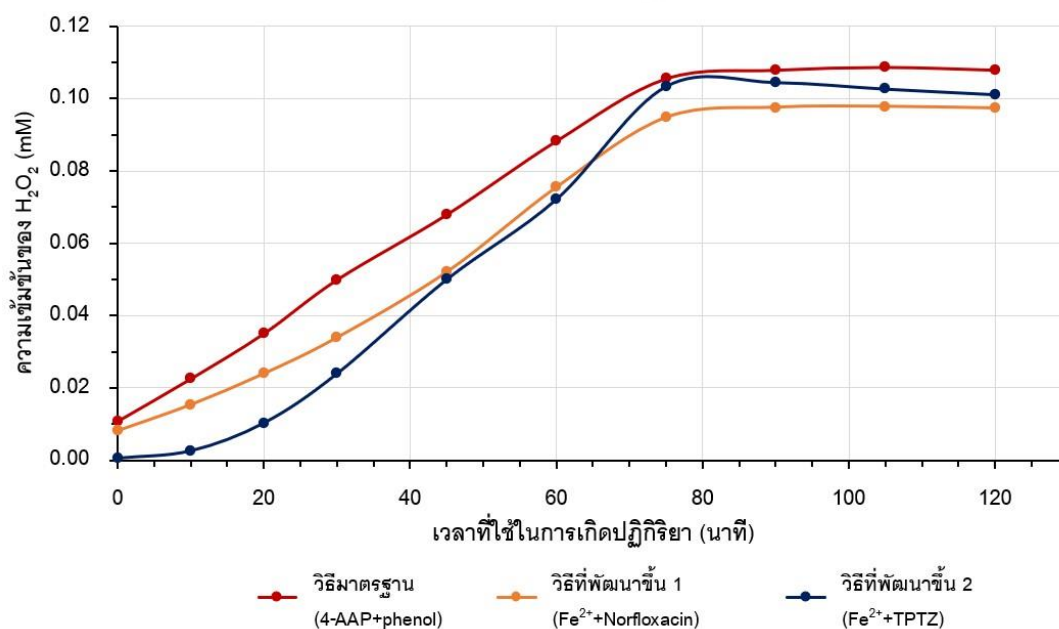
ตาราง 6 เปรียบเทียบคุณสมบัติของการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น

วิธีตรวจวัด H_2O_2	วิธีมาตรฐาน ซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ ร่วมกับ Peroxidase	วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอก- ซาซินเป็นรีเอเจนต์	วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 2 ซึ่งมี Fe^{2+} และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์
สีของสารละลาย	สีแดง	สีเหลือง	สีน้ำเงิน
λ_{max}	515 nm	440 nm	600 nm
ช่วงความเป็น เส้นตรง (μM)	10 - 1000	6.25 - 300	50 - 225
สมการเส้นตรง	$y = 0.0013x + 0.0001$	$y = 0.0043x + 0.0187$	$y = -0.0039x + 1.1018$
ค่าสหสัมพันธ์ (r^2)	0.9999	0.9974	0.9995
LOD (μM)	4.62	0.44	21.99
LOQ (μM)	7.74	0.73	41.86
Repeatability %RSD	0.20 %	1.93 %	1.36 %

ตอนที่ 4 การทดลองเพื่อนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ Diamine oxidase

4.1 ผลของการหาช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

การทดลองหาช่วงความเร็วเริ่มต้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ทำได้โดยการศึกษากิจกรรม Oxidative deamination ของฮีสตามีน (Histamine) โดยมี Diamine oxidase เป็นตัวเร่ง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น Imidazole acetaldehyde NH_3 และ H_2O_2 ซึ่งผู้วิจัยได้ติดตามปฏิกิริยาจากความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธี ได้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 24



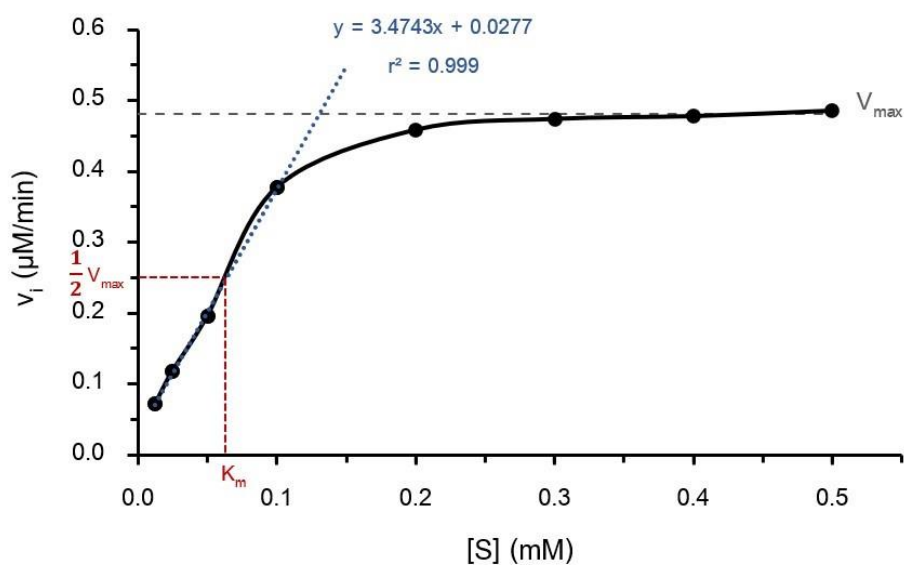
ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 กับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้วิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัด H_2O_2

ผลการทดลองดังภาพประกอบ 24 แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ H_2O_2 เมื่อเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีตรวจวัดทั้งสามวิธี ให้ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันนั่นคือ กราฟมีความชันสูงในช่วง 60 นาทีแรก หลังจากนั้นเมื่อให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานานกว่า 60 นาที กราฟเริ่มมีลักษณะโค้งลง และมีความชันลดลงจนเข้าใกล้ศูนย์ แสดงให้เห็นว่าความเร็วเริ่มต้น (v_i) ของปฏิกิริยาที่มี Diamine oxidase เป็นตัวเร่ง คือ ช่วงเวลาตั้งแต่ 0 – 60 นาที

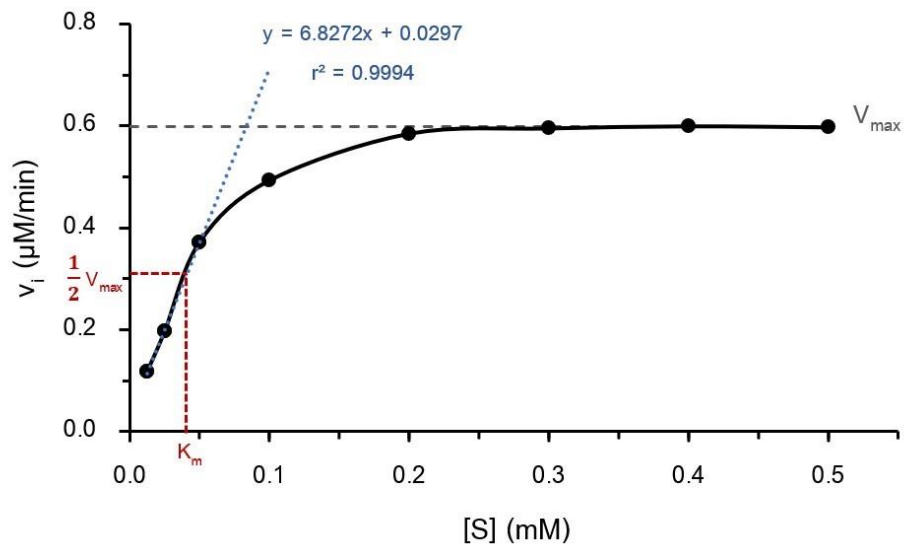
เนื่องจากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ต้องเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการติดตามการทำงานของเอนไซม์ให้อยู่ในช่วงเวลาที่ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับเวลาที่เพิ่มขึ้น หรือช่วงที่ความเร็วอยู่ในช่วงความเร็วเริ่มต้น (v_i) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเวลาที่ 45 นาที เพื่อใช้เป็นเวลาที่เหมาะสมในการศึกษาปฏิกิริยานี้ในขั้นตอนต่อไป

4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของซับสเตรตต่อความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

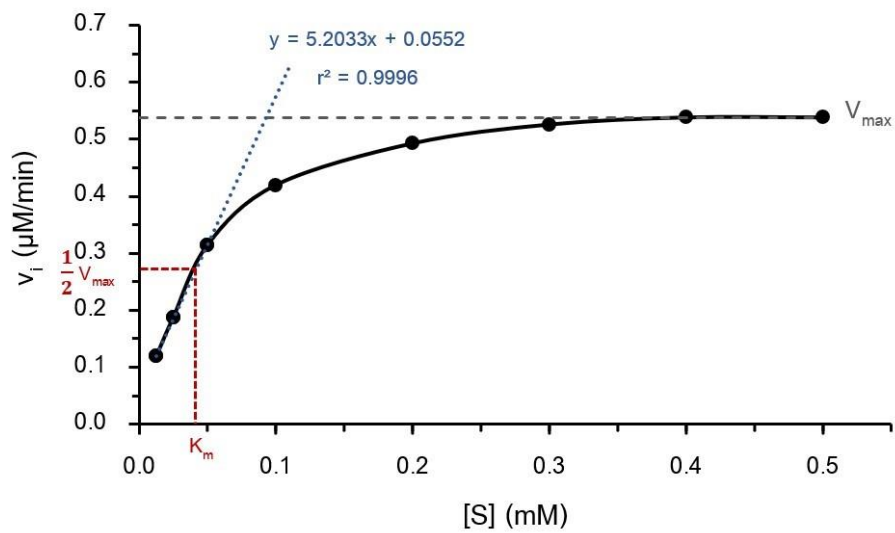
ผลการศึกษาความเข้มข้นของซับสเตรตต่อความเร็วของปฏิกิริยาที่มี Diamine oxidase เป็นตัวเร่ง โดยวิธีการตรวจวัดความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นที่เวลา 45 นาที ด้วยวิธีตรวจวัดทั้งสามวิธี เมื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (v_i) ซึ่งคำนวณได้จากความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นต่อนาที และความเข้มข้นของซับสเตรต คือ ฮีสตามีน ให้ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 25, 26 และ 27



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เมื่อใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ร่วมกับ Peroxidase ในการตรวจวัด H_2O_2



ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัด H_2O_2



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 2 ซึ่งมี Fe^{2+} และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัด H_2O_2

จากภาพประกอบ 25, 26 และ 27 ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีให้ผลการศึกษาแอกติวิตีของ Diamine oxidase ที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน และเป็นไปตามสมการของ Michaelis – Menten โดยความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่มี Diamine oxidase เป็นตัวเร่งจะเริ่มเข้าใกล้ค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตมีค่าตั้งแต่ 0.1 mM ขึ้นไป

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับความเร็วของปฏิกิริยาสามารถนำมาประมาณค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) เพื่อใช้หาค่าคงที่ของ Michaelis – Menten (K_m) ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์โดยคำนวณจากความสัมพันธ์ได้จากความสัมพันธ์ของสมการจากส่วนกลับของสมการ Michaelis – Menten

$$v_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

โดยค่า V_{max} สามารถหาได้จากการลากเส้นตรงสัมผัสผัดกับความเร็วเริ่มต้น v_i ที่เริ่มมีค่าคงที่ เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรต $[S]$ สูงขึ้นจนมีค่ามากเกินไป นั่นคือ $[S] \gg K_m$ จะได้ว่า $v_i = V_{max}$ และค่า K_m สามารถหาได้จากการแทนค่า $v_i = \frac{1}{2} V_{max}$ จะได้ว่า $[S] = K_m$ อย่างไรก็ตามค่าที่ V_{max} และค่า K_m ที่หาได้โดยวิธีการนี้เป็นเพียงค่าประมาณเบื้องต้น เนื่องจากในขณะที่ $v_i = V_{max}$ นั้นเป็นอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของซับสเตรตมากกว่าความเข้มข้นอิมิตัวของเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาค่าของ V_{max} อย่างถูกต้องจากกราฟไฮเพอร์โบลาได้

การคำนวณหาค่า V_{max} และ K_m โดยประมาณในการทดลองนี้ หาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรต $[S]$ กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (v_i) ของปฏิกิริยาที่มี Diamine oxidase เป็นตัวเร่ง ซึ่งสามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ได้ดังภาพประกอบ 25, 26 และ 27 โดยสามารถคำนวณค่า V_{max} และ K_m จากการติดตามปฏิกิริยาด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้ผลการคำนวณดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ค่า V_{max} และ K_m ที่ได้จากการศึกษาปฏิกิริยาที่มี Diamine oxidase เป็นตัวเร่ง

วิธีการ	วิธีมาตรฐาน ซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ร่วมกับ Peroxidase	วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอก- ซาซินเป็นรีเอเจนต์	วิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 2 ซึ่งมี Fe^{2+} และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	0.48	0.60	0.54
K_m (mM)	0.061	0.040	0.041

ข้อมูลจากตาราง 7 แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีให้ค่าความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) ได้สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ร่วมกับ Peroxidase โดยวิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ และวิธีที่ 2 ซึ่งมี Fe^{2+} และ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ มีค่าร้อยละความคลาดเคลื่อนของค่า V_{max} เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานเท่ากับ 24.33 % และ 11.68% ตามลำดับ ในขณะที่ค่า K_m ที่คำนวณได้ยังมีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานค่อนข้างมาก โดยค่า K_m ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 มีค่าร้อยละความคลาดเคลื่อนเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน เท่ากับ 35.56 % และ 32.95 % ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า วิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีสามารถใช้ตรวจวัด H_2O_2 ได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้โดยให้ผลสอดคล้องกันไปทิศทางเดียวกับวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้วิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาแอกติวิตีเบื้องต้นของ Diamine oxidase โดยใช้ในการระบุหาช่วงความเร็วเริ่มต้น (v_i) ของปฏิกิริยา และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (v_i) กับความเข้มข้นของซับสเตรต ($[S]$) ที่สอดคล้องกับสมการของ Michaelis – Menten ได้ อย่างไรก็ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นยังมีข้อจำกัดในด้านการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ คือ ค่า K_m และ V_{max} โดยมีความคลาดเคลื่อนค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ร่วมกับ Peroxidase

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน และ TPTZ รวมทั้งการนำวิธีการตรวจวัด H_2O_2 ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ Diamine oxidase โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งมี 4-AAP และ Phenol เป็นรีเอเจนต์ที่ทำงานร่วมกับ Peroxidase ผู้วิจัยสามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. สภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซินเป็นรีเอเจนต์ คือ นำสารละลาย H_2O_2 ที่ต้องการตรวจวัดปริมาณมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 2.25 mM บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายนอร์ฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 4.00 mM และบ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 440 nm

2. Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน สามารถใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ช่วงความเข้มข้น 6.25 - 300 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9974 ค่า LOD และ LOQ ของวิธีตรวจวัดเท่ากับ 0.44 μM และ 0.73 μM ตามลำดับ โดยความเที่ยงของวิธีตรวจวัดแสดงในรูปความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) ให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าเท่ากับ 1.93 %

3. สภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ Fe^{2+} ร่วมกับ TPTZ เป็นรีเอเจนต์ คือ นำสารละลาย H_2O_2 ที่ต้องการตรวจวัดปริมาณมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Fe^{2+} ความเข้มข้น 0.50 mM บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จึงเติมสารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 2.00 mM และบ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปเจือจางลง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

4. Fe^{2+} และ TPTZ สามารถใช้เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ช่วงความเข้มข้น 50.0 - 225 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9995 ค่า LOD และ LOQ ของวิธีตรวจวัดเท่ากับ 21.99 μM และ 41.66 μM ตามลำดับ โดยความเที่ยงของวิธีตรวจวัดแสดงในรูปความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) ให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าเท่ากับ 1.36 %

5. ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้วิธีการตรวจวัดปริมาณของ H_2O_2 ตามแนวทางในงานวิจัยของ Sharp (1972) และ Saito et al. (1987) เป็นวิธีมาตรฐาน การทดลองหาคุณลักษณะของระบบด้วยวิธีนี้ เริ่มจากการเตรียมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ซึ่งประกอบด้วย 4-AAP Phenol และมี Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายที่ทำให้เกิดสีไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย H_2O_2 ที่ต้องการตรวจวัด ในอัตราส่วน 3 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยวิธีนี้สามารถตรวจวัดหาปริมาณของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ช่วงความเข้มข้น 10 - 1000 μM ให้ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9999 ค่า LOD และ LOQ ของวิธีตรวจวัดเท่ากับ 4.62 μM และ 7.74 μM ตามลำดับ โดยความเที่ยงของวิธีตรวจวัด แสดงในรูปความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) ให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าเท่ากับ 0.20 %

6. เมื่อนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วย Fe^{2+} ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกับคุณลักษณะของระบบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น วิธีที่ 1 ซึ่งมี Fe^{2+} และนอร์ฟลอกซาซิน เป็นรีเอเจนต์มีข้อดี คือ ให้ค่า LOD และ LOQ ได้ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธียังมีข้อจำกัดคือมีช่วงความเป็นเส้นตรงแคบกว่าวิธีมาตรฐานค่อนข้างมาก ซึ่งแก้ไขได้โดยการเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนทำการตรวจวัด ทั้งนี้ทั้งสองวิธีมีความสามารถในการทวนซ้ำ (Repeatability) อยู่ในวงที่สามารถยอมรับได้ ดังนั้นวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วย Fe^{2+} ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้

7. เมื่อนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 โดยการใช้ Fe^{2+} ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแอคติวิตีของ Diamine oxidase โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งสองวิธีสามารถนำไปใช้ในการศึกษาแอคติวิตีของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งได้โดยให้ผลสอดคล้องกันกับวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้วิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาแอคติวิตีเบื้องต้นของ Diamine oxidase โดยใช้ในการระบุหาช่วงความเร็วเริ่มต้น (initial velocity; v_i) ของปฏิกิริยา และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (v_i) กับความเข้มข้นของซับสเตรต ($[S]$) ที่สอดคล้องกับสมการของ Michaelis – Menten ได้ อย่างไรก็ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นยังมีข้อจำกัดในด้านการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ คือ ค่า K_m และ V_{max} ซึ่งยังมีความคลาดเคลื่อนค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีมาตรฐาน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวิธีตรวจวัด H_2O_2 ด้วย Fe^{2+} ร่วมกับนอร์ฟลอกซาซิน และ TPTZ เช่น ค่าพีเอช (pH) และอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ทราบข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมและข้อจำกัดในการตรวจวัด

2. ควรนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นไปศึกษาแอกติวิตีของ Diamine oxidase โดยทดลองเปลี่ยนซับสเตรตของปฏิกิริยา เป็นไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ เช่น พิวเทรสซีน (Putrescine) และคาดาเวอริน (Cadaverine) แล้วศึกษาข้อมูลของการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานเพิ่มเติม เพื่อใช้ยืนยันผลการศึกษาแอกติวิตีของไดเอมีนออกซิเดสด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

3. ควรนำวิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นไปศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดสชนิดอื่น เช่น กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็น H_2O_2 เช่นเดียวกัน เพื่อขยายขอบเขตข้อมูลการใช้งานของวิธีตรวจวัด H_2O_2 ที่พัฒนาขึ้นในการนำไปใช้ศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์



บรรณานุกรม

- Angelini, R., Cona, A., & Tavladoraki, P. (2018). Determination of Copper Amine Oxidase Activity in Plant Tissues. *Methods Mol Biol*, 1694, 129-139. doi:10.1007/978-1-4939-7398-9_13
- Ansari, I. A., & Datta, A. K. (2003). An Overview of Sterilization Methods for Packaging Materials Used in Aseptic Packaging Systems. *Food and Bioproducts Processing*, 81(1), 57-65. doi:<https://doi.org/10.1205/096030803765208670>
- Benedito, F. L., Nakagaki, S., Saczk, A. A., Peralta-Zamora, P. G., & Costa, C. M. M. (2003). Study of metalloporphyrin covalently bound to silica as catalyst in the ortho-dianisidine oxidation. *Applied Catalysis A: General*, 250(1), 1-11. doi:[https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(02\)00663-4](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(02)00663-4)
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. doi:<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bieganski, T., Blasinska, M. Z., & Kusche, J. (1977). Determination of histaminase (diamine oxidase) activity by o-dianisidine test: interference of ceruloplasmin. *Agents Actions*, 7(1), 85-92. doi:10.1007/BF01964886
- Brazeau, B., Johnson, B., & Wilmot, C. (2004). Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Archives of biochemistry and biophysics*, 428, 22-31. doi:10.1016/j.abb.2004.03.034
- Callingham, B. A., & Laverty, R. (1973). Studies on the nature of the increased monoamine oxidase activity in the rat heart after adrenalectomy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25(12), 940-947. doi:10.1111/j.2042-7158.1973.tb09983.x
- Chen, H., Yu, H., Zhou, Y., & Wang, L. (2007). Fluorescent quenching method for determination of trace hydrogen peroxide in rain water. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(3), 683-686. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.07.057>
- Chen, X.-L., Li, D.-H., Yang, H.-H., Zhu, Q.-Z., Zheng, H., & Xu, J.-G. (2001). Study of tetra-

- substituted amino aluminum phthalocyanine as a new red-region substrate for the fluorometric determination of peroxidase and hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta*, 434(1), 51-58. doi:[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00819-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00819-4)
- Gimeno, P., Bousquet, C., Lassu, N., Maggio, A.-F., Civade, C., Brenier, C., & Lempereur, L. (2015). High-performance liquid chromatography method for the determination of hydrogen peroxide present or released in teeth bleaching kits and hair cosmetic products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 386-393. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.018>
- Hibi, T., & Senda, M. (2000). Enzymatic Assay of Histamine by Amperometric Detection of H₂O₂ with a Peroxidase-based Sensor. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64, 1963-1966. doi:10.1271/bbb.64.1963
- Holt, A., & Palcic, M. (2006). A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes. *Nature protocols*, 1, 2498-2505. doi:10.1038/nprot.2006.402
- Holt, A., Sharman, D. F., Baker, G. B., & Palcic, M. M. (1997). A Continuous Spectrophotometric Assay for Monoamine Oxidase and Related Enzymes in Tissue Homogenates. *Analytical Biochemistry*, 244(2), 384-392. doi:<https://doi.org/10.1006/abio.1996.9911>
- Hu, Y., Zhang, Z., & Yang, C. (2007). The determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selective chemiluminescence method. *Analytica Chimica Acta*, 601(1), 95-100. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.018>
- Ivanova, A. S., Merkuleva, A. D., Andreev, S. V., & Sakharov, K. A. (2019). Method for determination of hydrogen peroxide in adulterated milk using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 283, 431-436. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.051>
- Izidoro, L., Sobrinho, J., Mendes, M., Costa, T., Grabner, A., Rodrigues, V., . . . Soares, A. (2014). Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. *BioMed research international*, 2014, 196754.

doi:10.1155/2014/196754

- Lange, J., & Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 372, 276-283. doi:10.1007/s00216-001-1130-9
- Lee, J.-I., & Kim, Y.-W. (2013). Characterization of amine oxidases from *Arthrobacter aurescens* and application for determination of biogenic amines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 673-682. doi:10.1007/s11274-012-1223-y
- Li, S., Dai, S., & Shah, N. P. (2017). Sulfonation and Antioxidative Evaluation of Polysaccharides from *Pleurotus* Mushroom and *Streptococcus thermophilus* Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 282-294. doi:10.1111/1541-4337.12252
- Massimo Di Fusco, Rodolfo Federico, Alberto Boffi, Alberto Maccone, Gabriele Favero, & Franco Mazzei. (2011). Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Anal Bioanal Chem*, 401, 707–716.
- McIntire, W. S., & Hartmann, C. (1993). Copper-containing amine oxidases. *Principles and applications of quinoproteins*, 97-171.
- McMurry, J. (1996). *Fundamentals of general, organic, and biological chemistry* (2nd ed.. ed.): Upper Saddle River, N.J. : Prentice Hall.
- Mondovi, B., Pietrangeli, P., Marcocci, L., & Toninello, A. (2009). Amine Oxidases. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 136-138). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Moore, R. H., Spies, M. A., Culpepper, M. B., Murakawa, T., Hirota, S., Okajima, T., . . . Mure, M. (2007). Trapping of a Dopaquinone Intermediate in the TPQ Cofactor Biogenesis in a Copper-Containing Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Journal of the American Chemical Society*, 129(37), 11524-11534. doi:10.1021/ja0731165
- Petersen, C. E., Anderson, B. J., Kett, N., College of, D., Natural, & Applied Sciences, D.

- (2005). *Investigations in the Biology 1151 laboratory*. Champaign, Ill.: Stipes Pub.
- Pinkernell, U., Effkemann, S., & Karst, U. (1997). Simultaneous HPLC Determination of Peroxyacetic Acid and Hydrogen Peroxide. *Analytical Chemistry*, 69(17), 3623-3627. doi:10.1021/ac9701750
- Pubchem. (2004). Ferrous ion. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferrous-ion>
- Robinson, P. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1-41. doi:10.1042/bse0590001
- Rogers, P. L., & Staruszkiewicz, W. F. (2000). Histamine Test Kit Comparison. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(2), 5-17. doi:10.1300/J030v09n02_02
- Saito, Y., Mifune, M., Nakashima, S., Odo, J., Tanaka, Y., Chikuma, M., & Tanaka, H. (1987). Determination of Hydrogen Peroxide with Phenol and 4-Aminoantipyrine by the Use of a Resin Modified with Manganese-Tetrakis(sulfophenyl)porphine. *Analytical Sciences*, 3(2), 171-174. doi:10.2116/analsci.3.171
- Schwake, A., Ross, B., & Cammann, K. (1998). Chrono amperometric determination of hydrogen peroxide in swimming pool water using an ultramicroelectrode array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 46(3), 242-248. doi:[https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00124-5)
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems* (Vol. 115): Wiley New York:.
- Sharp, P. (1972). Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods. *Clinica Chimica Acta*, 40(1), 115-120. doi:[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(72\)90257-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(72)90257-4)
- Sigman, D. S. (1992). *The enzymes* (3rd ed.. ed.): San Diego : Academic Press.
- Steinberg, S. M. (2013). High-performance liquid chromatography method for determination of hydrogen peroxide in aqueous solution and application to simulated Martian soil and related materials. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(5), 3749-3757. doi:10.1007/s10661-012-2825-4
- Su, G., Wei, Y., & Guo, M. (2011). Direct colorimetric detection of hydrogen peroxide using

- 4-nitrophenylboronic acid or its pinacol ester. *Am. J. Anal. Chem.*, 2(8), 879-884.
doi:10.4236/ajac.2011.28101
- Szutowicz, A., Kobes, R. D., & Orsulak, P. J. (1984). Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 86-94.
doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90773-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90773-5)
- Tang, B., Wang, Y., Sun, Y., & Xi Shen, H. (2002). Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde salicyloylhydrazone (HNSH) as the substrate for horseradish peroxidase (HRP). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58(1), 141-148.
doi:[https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00514-5](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00514-5)
- Toyoda, M., Ito, Y., Iwaida, M., & Fujii, M. (1982). Rapid procedure for the determination of minute quantities of residual hydrogen peroxide in food by using a sensitive oxygen electrode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 346-349.
doi:10.1021/jf00110a033
- Wang, Y., Zhou, B., Wu, S., Wang, K., & He, X. (2015). Colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose using the magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Talanta*, 134, 712-717. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.013>
- Wei, Y., & Guo, M. (2007). Hydrogen Peroxide Triggered Prochelator Activation, Subsequent Metal Chelation, and Attenuation of the Fenton Reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(25), 4722-4725. doi:10.1002/anie.200604859
- Wurtman, R. J., & Axelrod, J. (1963). A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. *Biochemical Pharmacology*, 12(12), 1439-1441.
doi:[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(63\)90215-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(63)90215-6)
- Zhang, Q., Fu, S., Li, H., & Liu, Y. (2013). A novel method for the determination of hydrogen peroxide in bleaching effluents by spectroscopy. *BioResources*, 8(3), 3699-3705, 3697 pp. doi:10.15376/biores.8.3.3699-3705
- Zheng, X., & Guo, Z. (2000). Potentiometric determination of hydrogen peroxide at MnO₂-doped carbon paste electrode. *Talanta*, 50(6), 1157-1162.

doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00223-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00223-4)

กองวิเคราะห์น้ำบาดาล. (2561). Retrieved from <http://www.dgr.go.th/dga/th/about/352>

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คณะวิทยาศาสตร์, ภ. (2557). ชีวเคมี = *Biochemistry* (พิมพ์ครั้งที่ 1..

ed.): กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. (2544). เครื่องมือวิทยาศาสตร์ Retrieved from

<https://home.kku.ac.th/chuare/12/fluorometer.pdf>

สีไล ปารมี, & วิรัช เรืองศรีตระกูล. (2555). การวิเคราะห์นอร์ฟลอกซาซินในเมสซ์กัณฑ์โดยวิธีสเปค

โทรโฟโตเมตริกอย่างง่าย, 186 - 189. Retrieved from <https://he01.tci->

thaijo.org/index.php/IJPS/article/download/242541/164861/

สุกัญญา เพชรศิริเวทย์, ปิยนันท์ น้อยรอด, & กรรณิการ์ แก้วกิม. (2560). การพัฒนาวิธีการตรวจวัด

ไธระเหยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยกระดาษแอนโทไซยานิน, 601-606. Retrieved

from

http://sci-database.hcu.ac.th/science/file/rsID192_F1_20170706161305.pdf

สุชนม์ แก้วมาตย์, & บุญสร้าง ดิเรกสถาพร. (2555). การบำบัดน้ำเสียจากสีย้อมผ้าด้วยกระบวนการ

เฟ้นต้นแบบฉายแสงโดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์, 190-197.

Retrieved from

http://frc.forest.ku.ac.th/frcdatabase/bulletin/kuconfer/50/Oral/10_041_O167.pdf

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายธีรนนท์ ออประยูร
วัน เดือน ปี เกิด	20 มกราคม 2538
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี : เคมี (กศ.บ.) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มัธยมศึกษาตอนต้น-ปลาย : ร.ร.สวนกุหลาบวิทยาลัย รังสิต จ.ปทุมธานี ประถมศึกษา : โรงเรียนพระดุงศิษย์พิทยา จ.กรุงเทพฯ
ที่อยู่ปัจจุบัน	387/788 เตาปูนแมนชั่นอาคารบี ถ.เตชะวณิช แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กทม. 10800

