บทที่ 2

ไบโอเซนเซอร์

บทนำ

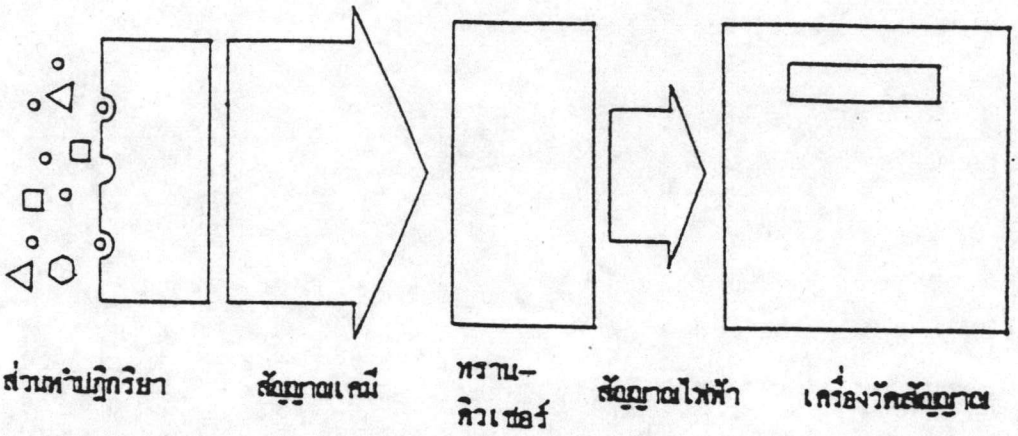
ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารทางชีวเคมีในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นวิธีทางเคมี หรือวิธีทางชีวภาพ จะอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างสารเคมี และสารตัวอย่างที่ใช้ร่วมกันในปฏิกิริยาเคมีนั้นๆ และอาศัยผลของการเปลี่ยนแปลง ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมี โดยนำขนาดของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมาใช้ในการแปลผลเป็นปริมาณสารเคมีที่ต้องการ การวัดปริมาณสารทางชีวเคมีโดยอาศัยไบโอเซนเซอร์ โดยทั่วไปจะถูกเรียกว่าเป็น ระบบการวัดแบบไม่ต้องใช้สารเคมี (reagentless system) ซึ่งทำให้การวัดสามารถทำได้ง่าย และรวดเร็ว แต่ในความเป็นจริงแล้วสารเคมีที่ต้องใช้ในการวัด ได้ถูกรวมไว้เป็นส่วนหนึ่งของไบโอเซนเซอร์เรียบร้อยแล้ว โดยการตรึงสารเคมีที่จำเป็นในปฏิกิริยาลงบนผิวของทรานส์ดิวเซอร์ ทำให้ผู้วัดไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีเหล่านั้นอีก (George and Danial , 1990)

2.1 <u>ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์</u> (มานะ ศรียุทธศักดิ์ และคณะ , 2536)

โดยทั่วไปไบโอเซนเซอร์จะมีส่วนประกอบที่สำคัญๆ อยู่ 4 ส่วน (รูปที่ 2.1) คือ

1. ส่วนทำปฏิกิริยา
2. ส่วนกำเนิดสัญญาณเคมี
3. ทรานส์ดิวเซอร์
4. เครื่องวัดสัญญาณ

สารเคมีที่ถูกตรึงลงบนผิวของทรานส์ดิวเซอร์จะทำหน้าที่ในการทำปฏิกิริยาเคมีกับสารตัวอย่างที่ต้องการวัดค่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา จะถูกทรานส์ดิวเซอร์แปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้า เพื่อส่งต่อไปยังเครื่องวัดสัญญาณต่อไป โดยทั่วไปสารเคมีที่ถูกตรึงลงบนทรานส์ดิวเซอร์จะเป็นเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูงต่อสารเฉพาะอย่าง จึงทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวัดสูง



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์

การตรึงเอนไซม์ลงบนทรานส์ดิวเซอร์มีข้อที่ควรคำนึง คือ

1. การตรึงเอนไซม์จะต้องทำได้ง่าย และไม่ต้องใช้เครื่องมือ หรือสารเคมีที่หาได้ยาก

2. เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะต้องยังคงมีแอกทิวิตี้สูง สามารถใช้วัดความเข้มข้นของสารต้วอย่างที่มีค่าต่ำ ๆ ได้

3. เอนไซม์ที่ถูกตรึง จะต้องให้ผลการวัดที่ถูกต้อง และมีความสม่ำเสมอในการวัด

4. เอนไซม์ที่ถูกตรึง ควรมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน โดยมีการสูญเสียแอกทิวิตี้ช้า

5. เอนไซม์ที่ถูกตรึงลงบนทรานส์ดิวเซอร์ ควรมีเสถียรภาพทางกลดี ไม่ฉีกขาดง่าย และใช้งานได้สะดวก

2.2 ประเภทของการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์โดยทั่วไปสามารถทำได้ 4 วิธี คือ

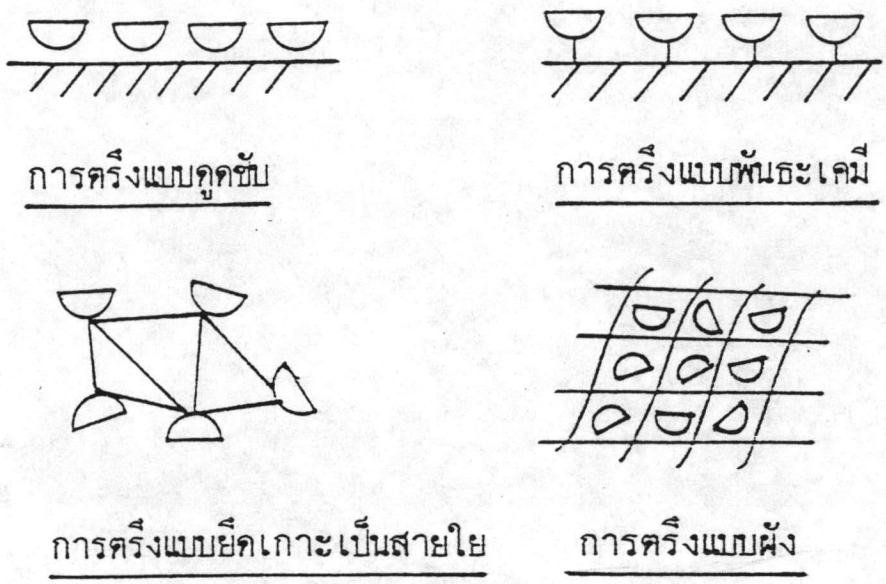
1. การตรึงแบบดูดซับ (physical adsorption)

2. การตรึงแบบพันธะเคมี (chemical bonding)

3. การตรึงแบบยึดเกาะเป็นสายใย (cross linking)

4. การตรึงแบบผัง (entrapment)

การตรึงเอนไซม์แบบต่างๆ แสดงไว้ในรูปที่ 2.2 (มานะ ศรียุทธศักดิ์ และคณะ , 2536)



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของการตรึงเอนไซม์แบบต่างๆ

1. การตรึงเอนไซม์แบบดูดซับ (physical adsorption)

เป็นการดูดซับเอนไซม์บนพาหะเฉื่อย ซึ่งเกิดขึ้นได้จากแรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับพาหะเฉื่อย แรงดึงดูดเหล่านี้ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน และแรงวันเดอร์วาล พาหะเฉื่อยอาจเป็นแก้ว,ซิลิกาเจล,อะลูมินา และเรซิน วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถทำการตรึงเอนไซม์ได้ง่าย ไม่ซับซ้อน แต่แรงดึงดูดที่เกิดขึ้น เป็นแรงที่เกิดขึ้นแบบไม่แข็งแรง จึงเป็นปัญหาอย่างมากสำหรับการตรึงด้วยวิธีนี้ เอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีนี้ไม่มีความเสถียรภาพอาจเกิดการหลุดได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย, สับสเตรทที่ใช้, ค่าพีเอช และอุณหภูมิของสารตัวอย่าง

2. การตรึงแบบพันธะเคมี (chemical bonding)

เป็นการตรึงเอนไซม์กับสารชนิดอื่น โดยใช้สารฟังชั่นคู่ (bifunctional reagent) ทำให้เกิดพันธะเชื่อมระหว่างโมเลกุลเกิดอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น ตัวอย่างของสารฟังชั่นคู่ ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์, บิสไดอะโซเบนซิดีน-2, 2-ไดซัลโฟนิคแอซิด และโทลูอีน-2-ไอโซไซยาเนต-4-ไอโวไทโอไซยาเนต วิธีการตรึงแบบนี้จะทำได้ง่าย ไม่ค่อยซับซ้อน สามารถควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพ และขนาดของอนุภาคที่ตรึงได้ พันธะที่เกิดขึ้น จะมีความเสถียรภาพสูง อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีนี้คือ เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตี้ไปในกระบวนการตรึงด้วยสารพวกนี้ วิธีนี้จึงมีข้อจำกัดในการใช้งาน

3. การตรึงเอนไซม์แบบยึดเกาะเป็นสายใย (cross linking)

เป็นวิธีการตรึงที่คล้ายคลึงกับการตรึงแบบพันธะเคมี แต่จะทำให้เกิดพันธะยึดเหนี่ยวกันระหว่างเอนไซม์แทน การตรึงแบบนี้ จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดพันธะเคมีเข้าช่วย จึงมีข้อเสียเช่นเดียวกับการตรึงแบบพันธะเคมี แต่มีข้อดีคือสามารถตรึงสารหลายๆ ชนิดได้

4. การตรึงเอนไซม์แบบผัง (entrapment)

เป็นวิธีการผังเอนไซม์ หรือสารอื่นๆ ที่ต้องการ ลงไปในร่างแหของสายใยโพลีเมอร์จึงสามารถที่จะผัง หรือตรึงสารหลายชนิดในเวลาเดียวกันได้ โดยไม่จำเป็นต้องมีพันธะเคมียึดระหว่างเอนไซม์กับโพลีเมอร์ ดังนั้นเอนไซม์จึงมีการสูญเสียแอกติวิตี้ระหว่างการตรึงน้อยมาก

2.3 <u>การวัด และวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส</u>

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ที่นิยมทำกันในห้องปฏิบัติการ คือการนำเอาน้ำตาลกลูโคสมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยนำเอารงค์วัตถุ (dye) เป็นตัวทำปฏิกิริยาร่วมด้วย เพื่อใช้เป็นตัวบอกปริมาณของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยสีของรงค์วัตถุจะเปลี่ยนไปตามปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นไปตามสมการที่ (2.1)-(2.3)

$$2\ \text{glucose} + GOD_{ox} \longrightarrow 2\ \text{gluconic acid} + GOD_{red} \quad (2.1)$$

$$2\ H_2O + O_2 + GOD_{red} \longrightarrow H_2O_2 + GOD_{ox} \quad (2.2)$$

$$H_2O_2 + dye_1 \xrightarrow{POD} dye_2 \quad (2.3)$$

GOD_{ox} คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์

GOD_{red} คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่อยู่ในรูปรีดิวซ์

POD คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

รงค์วัตถุ (dye_1) ที่ใช้ในปฏิกิริยาอาจใช้ฟีนอล (phenol) กับออร์โทร-ไดอะนิซิดีน (o-dianisidine)หรือฟีนอล (phenol) กับ4-อะมิโนแอนตี้พิรีน (4-aminoantipyrine) ก็ได้ สีที่เกิดขึ้น(dye_2) จะแปรตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง การวัดความเข้มสีของ dye_2 สามารถทำได้โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากสมการที่ (2.1) -(2.3) จะเห็นได้ว่าสีที่เกิดขึ้น นอกจากจะแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย หากในปฏิกิริยามีสารยับยั้ง (inhibitor) ผสมอยู่ ก็จะทำให้ dye_1 มีการเปลี่ยนแปลงของสีที่ต่ำไปด้วย อันมีผลทำให้การวัดอาจเกิดการผิดพลาดได้

2.4 <u>การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ไบโอเซนเซอร์</u>

ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส จะทำการวัดปริมาณสารที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างน้ำตาลกลูโคส กับเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่บนผิวของทรานส์ดิวเซอร์ เอนไซม์ที่ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีอยู่ 2 ชนิด แต่ชนิดที่ใช้งานแพร่หลายและใช้งานได้สะดวกได้แก่ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นไปตามสมการที่ (2.1)-(2.2)

จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น จะเห็นได้ว่าในการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส สามารถเลือกชนิดของสารที่จะวัดได้ดังนี้ คือ

1. วัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไป
2. วัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป

3. วัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น

การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส โดยการวัดปริมาณของออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาเคมี สามารถทำได้โดยอาศัยหัววัดออกซิเจน แต่มีข้อเสียคือ สัญญาณที่วัดได้จะมีขนาดขึ้นกับปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายตัวอย่างด้วย ทำให้ความแน่นอนในการวัดแต่ละครั้งน้อย ส่วนการวัดค่า pH ที่เปลี่ยนไปมีข้อเสียคือ มีผลตอบสนองที่ต่ำ ส่วนการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนั้น เนื่องจากในการวัดจะต้องให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ทรานส์ดิวเซอร์ประมาณ 0.6-0.7 โวลต์ ซึ่งเป็นค่าที่สูงเพียงพอที่จะออกซิไดซ์สารรีดิวซิงค์ต่างๆ ได้ ซึ่งจะเป็นผลให้สัญญาณที่ได้จากการวัดมีค่าผิดพลาด

ในปัจจุบัน ได้มีการใช้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้ามาร่วมในการวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเป็นไปตามสมการที่ (2.4)-(2.6)

$$2\ \text{glucose} + \text{GOD}_{ox} \longrightarrow 2\ \text{gluconic acid} + \text{GOD}_{red} \qquad (2.4)$$

$$2\ \text{Med}_{ox} + \text{GOD}_{red} \longrightarrow 2\ \text{Med}_{red} + \text{GOD}_{ox} \qquad (2.5)$$

$$2\ \text{Med}_{red} \xrightarrow{\text{voltage}} 2\ \text{Med}_{ox} + 2e^{-} \qquad (2.6)$$

GOD_{ox} คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์
GOD_{red} คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่อยู่ในรูปรีดิวซ์
Med_{ox} คือ สารส่งผ่านอิเล็กตรอนที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์
Med_{red} คือ สารส่งผ่านอิเล็กตรอนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์

จากสมการที่ (2.4)-(2.6) จะเห็นได้ว่า สารส่งผ่านอิเล็กตรอนที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์(Med_{ox}) จะไปออกซิไดซ์เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งจะทำให้ตัวเองเปลี่ยนเป็นรูปรีดิวซ์(Med_{red}) และเมื่อนำสารส่งผ่านอิเล็กตรอนมาออกซิไดซ์ด้วยไฟฟ้า จะเป็นผลให้เกิดกระแสอิเล็กตรอนขึ้นตามสมการที่ (2.6) ซึ่งจำนวนอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะมีค่าแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในรูปกระแสไฟฟ้าได้ ข้อดีของการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน คือ ในการทำปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี สามารถทำได้ที่ศักย์ไฟฟ้าเพียง 0.2 โวลต์ จึงทำให้ในการวัด ไม่มีผลรบกวนจาก

สารรีดิวซิงค์ ซึ่งทำให้การวัดให้ผลที่เที่ยงตรงมากยิ่งขึ้น

2.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีของไบโอเซนเซอร์

โดยปกติเอนไซม์จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีให้เกิดเร็วขึ้น ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับสับสเตรทชนิดเดียว หรือสับสเตรทหลายชนิดก็ได้ แต่ในกรณีของการวัดปริมาณสารชีวเคมีด้วยไบโอเซนเซอร์ ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับสับสเตรทเพียงชนิดเดียว

การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ที่มีสับสเตรทชนิดเดียว สามารถแสดงได้ดังสมการที่ (2.7) (Elizabeth , 1990)

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{<\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!>}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad (2.7)$$

เมื่อ k_1, k_2 และ k_3 คือ ค่าคงที่แสดงอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

E คือ เอนไซม์ (enzyme) อิสระ

S คือ สับเสตรท (substrate)

P คือ ผลิตภัณฑ์ (product)

ES คือ สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์ กับสับสเตรท (enzyme-substrate complex)

ตามสมมุติฐานของ Michaelis และ Menten เอนไซม์จะจับกับสับสเตรทเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ES (สมการที่ (2.7)) จากนั้นจึงมีการปลดปล่อยเป็นผลิตภัณฑ์ และเอนไซม์อิสระ ถ้าหากเอนไซม์มีความเข้มข้นต่ำมาก เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสับสเตรท อัตราการเกิดของสารประกอบเชิงซ้อน ES จะเท่ากับอัตราการสลายตัวของสารประกอบเชิงซ้อน ES

อัตราเร็วของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน = อัตราเร็วของการสลายตัวของสารประกอบเชิงซ้อน

$$k_1[S][E] = [ES](k_2+k_3)$$

$$[S][E] = [ES](k_2+k_3)/k_1$$

[E] คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระ

[S] คือ ความเข้มข้นของสับเสตรท

[ES] คือ ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับเสตรท

เมื่อ k_3 มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับ k_2

$$[E] = [ES]k_2/(k_1[S]) \qquad (2.8)$$

$$[E] + [ES] = e \qquad (2.9)$$

โดยที่ e คือความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด

$$e = [ES]k_2/(k_1[S]) + [ES]$$

$$= [ES](1 + k_2/(k_1[S])) \qquad (2.10)$$

$v = k_3[ES]$; v คือ อัตราเร็วของการเกิดผลิตผล

$$= k_3e/(1 + k_2/(k_1[S]))$$

$$= k_3e[S]/([S] + k_2/k_1) \qquad (2.11)$$

เพราะฉะนั้น ถ้าให้ k_m (Michaelis constant) มีค่าเท่ากับ k_2/k_1 V_{max} (อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา) จะมีค่าเท่ากับ k_3e ทำให้สามารถเขียนค่า v ได้เป็น

$$v = V_{max}[S]/([S] + k_m) \qquad (2.12)$$

สมการที่ (2.14) เรียกว่า Michaelis-Menten Equation

จากสมการที่ (2.13) และ(2.14) จะเห็นได้ว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของสับสเตรท

จากสมการของ Mechaelis-Menten เมื่อ [S] มีค่ามากเมื่อเทียบกับ k_m จะเป็นผลให้

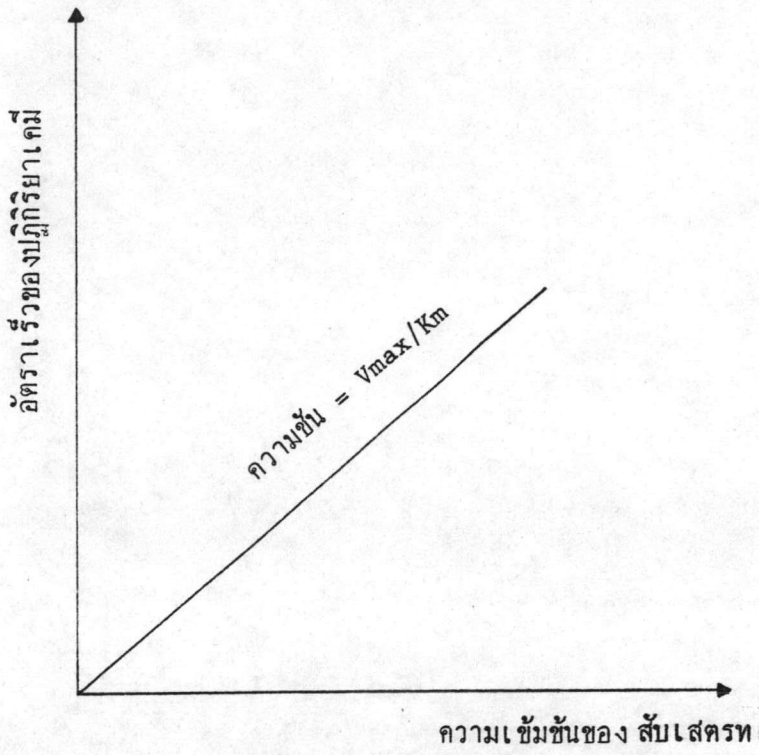
$$v = V_{max}[S]/[S] \qquad (2.13)$$

$$= V_{max}$$

เมื่อ [S] มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับ k_m ดังนั้นเอนไซม์ส่วนใหญ่จึงอยู่ในรูปของ [E]

$$v = V_{max}[S]/k_m \qquad (2.14)$$

กล่าวคือ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะแปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ [S] ซึ่งคือ ความเข้มข้นของสับเสตรท ดังแสดงในรูปที่ 2.3

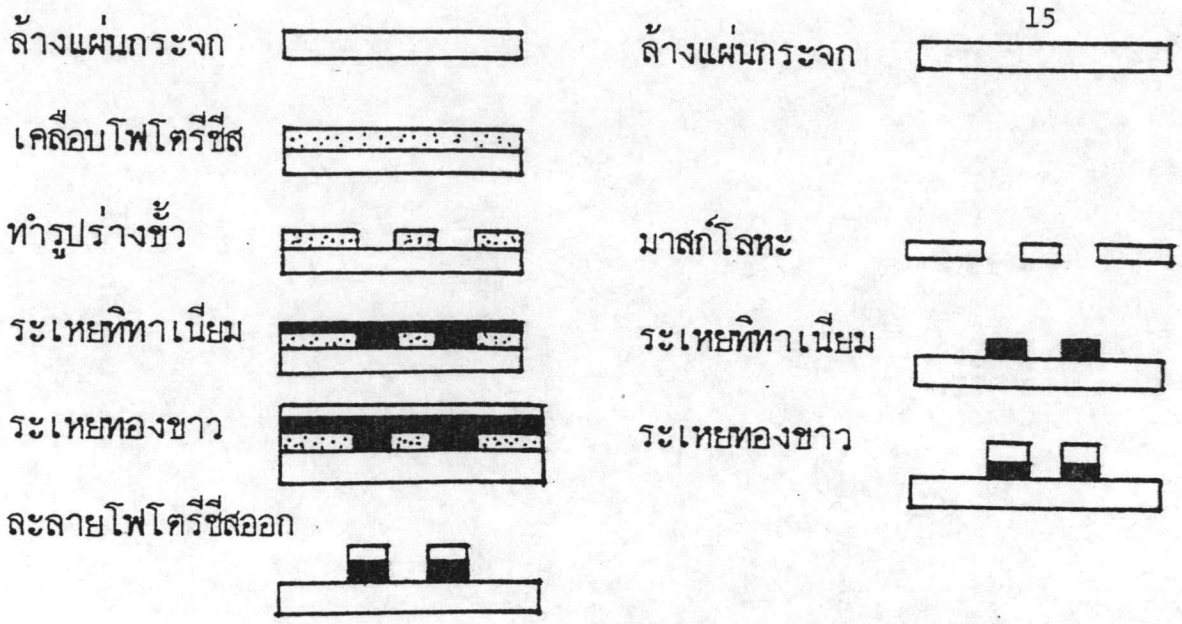


รูปที่ 2.3 ผลของความเข้มข้นของสับเสตรทต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมี

2.6 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

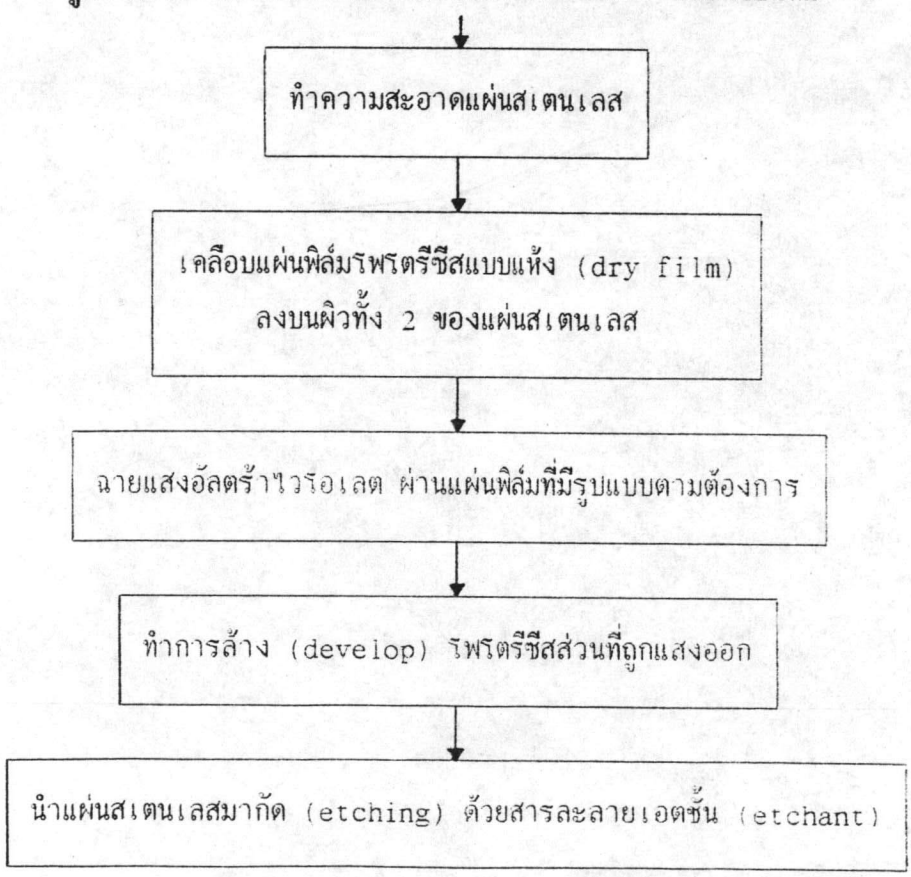
1. ทรานส์ดิวเซอร์ (transducer)

ทรานส์ดิวเซอร์ที่ใช้ในงานวิจัย มีลักษณะเป็นฟิล์มบางของโลหะ โดยได้จากการระเหยโลหะทิทาเนียม และพลาตินัมลงบนแผ่นกระจก แต่เดิมขั้นตอนที่ใช้ในการผลิตทรานส์ดิวเซอร์ทำโดยใช้กระบวนการโฟโตลิโทกราฟี (photolithography) ซึ่งจะต้องผ่านกระบวนการเคลือบโฟโตรีซีส, ฉายแสงอัลตร้าไวโอเลต และทำการลิฟออบ (lift off) หลังจากทำการระเหยโลหะ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ขั้นตอนการประดิษฐ์มีหลายขั้นตอน ทำให้สูญเสียเวลาในการประดิษฐ์ทรานส์ดิวเซอร์มาก ในงานวิจัย จึงได้นำวิธีการประดิษฐ์ทรานส์ดิวเซอร์แบบใหม่มาใช้ คือจะทำการระเหยไอของโลหะทิทาเนียม และพลาตินัมผ่านมาสก์โลหะลงบนแผ่นกระจกโดยตรง



1.กระบวนการสร้างอิเล็กโทรดแบบเก่า 2.กระบวนการสร้างอิเล็กโทรดแบบใหม่

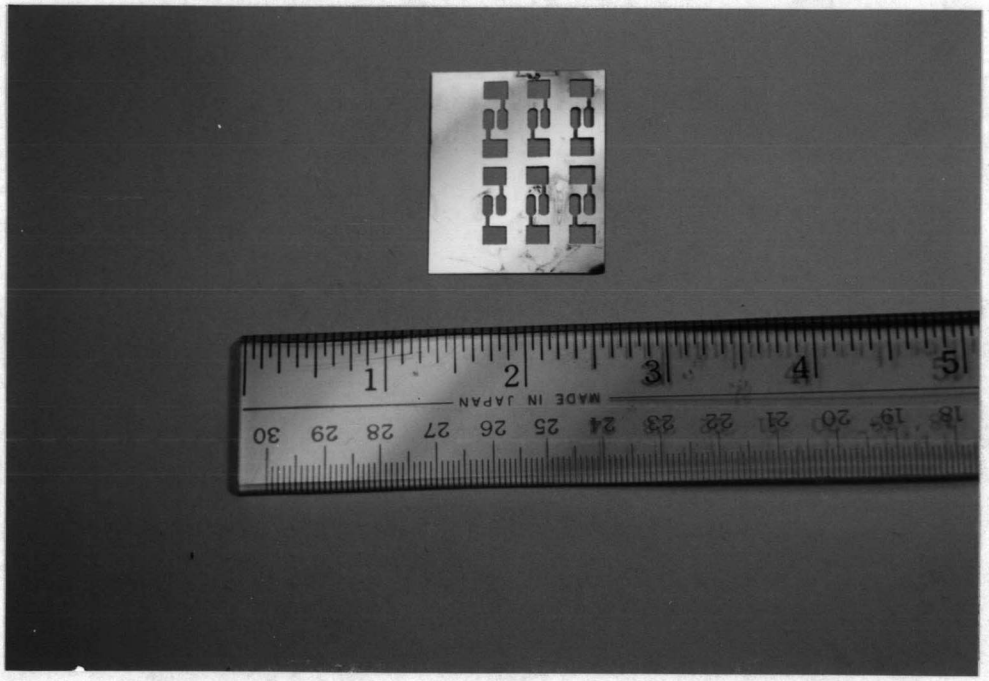
รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการผลิตทรานส์ดิวเซอร์แบบเก่า และแบบใหม่



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนในการทำมาสก์โลหะ

รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนที่ใช้ในการทำมาสก์โลหะ แผ่นสเตนเลสที่ใช้ในการทำมาสก์มีความหนาประมาณ 100 ไมโครเมตร และในขั้นตอนการกัด (etching) แผ่นสเตนเลสที่มีความหนาดังกล่าว จะใช้สารละลายเอตชั้น (etchant) ที่มีส่วนผสมดังนี้

1.	กรดไฮโดรคลอริก (35%)	50 ml
2.	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	50 ml
3.	น้ำบริสุทธิ์ (deionized water)	150 ml

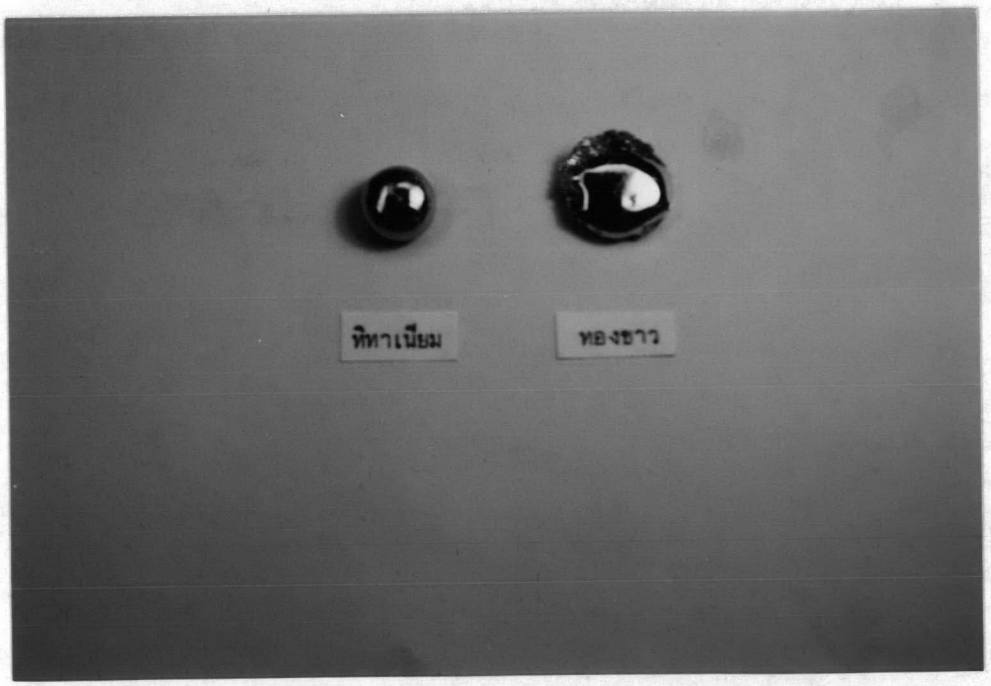


รูปที่ 2.6 รูปมาสก์โลหะที่ทำขึ้น

ในการระเหยไอของโลหะผ่านมาสก์ ในงานวิจัยได้ใช้เครื่องระเหยโลหะแบบลำอิเล็กตรอน โดยโลหะทิทาเนียมที่ใช้มีความบริสุทธิ์ 99.99% ส่วนทองขาวที่ใช้มีความบริสุทธิ์ 99.5% สภาวะที่ใช้ในการระเหยโลหะทั้ง 2 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

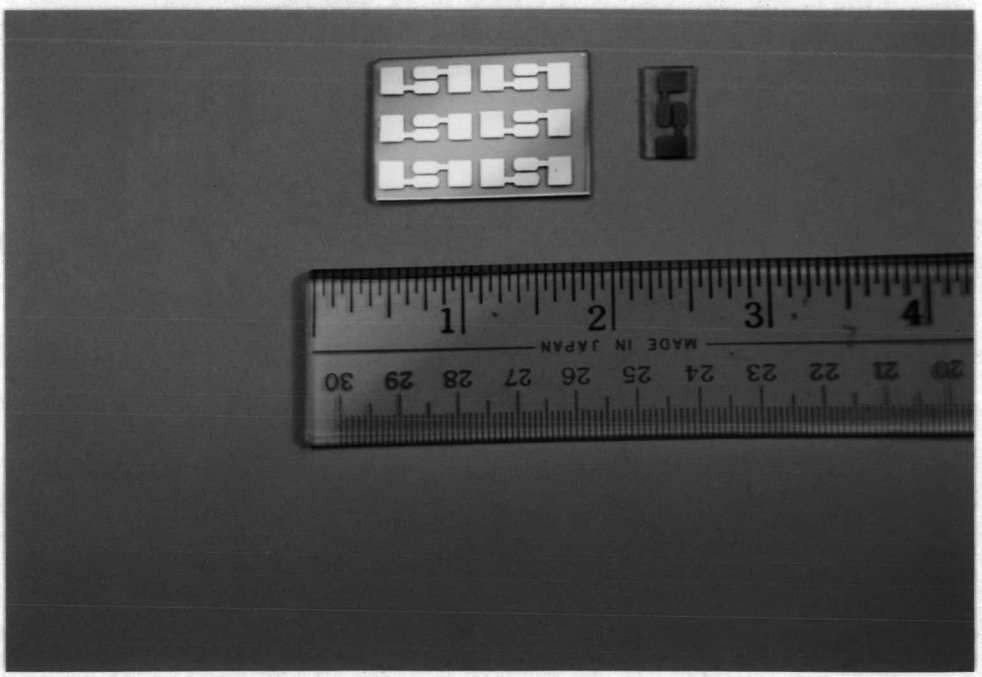
ความเป็นสูญญากาศของระบบ	$1x10^{-6}$	Torr
อัตราการระเหยทิทาเนียม	1	Å/วินาที
อัตราการระเหยทองขาว	0.7-1	Å/วินาที
กระแสของปืนอิเล็กตรอนในการระเหยทิทาเนียม	14	mA
กระแสของปืนอิเล็กตรอนในการระเหยทองขาว	100	mA
ความหนาของทิทาเนียม	1000	Å
ความหนาของทองขาว	1500	Å

ตารางที่ 2.1 สภาวะที่ใช้ในการผลิตทรานส์ดิวเซอร์



รูปที่ 2.7 ทิทาเนียม และทองขาวที่ใช้ในการผลิตทรานส์ดิวเซอร์

รูปที่ 2.8 เครื่องระเหยโลหะแบบลำอิเล็กตรอน



รูปที่ 2.9 ลักษณะของทรานส์ดิวเซอร์ที่สมบูรณ์

2. วิธีการตรึงเอนไซม์ (immobilization technique)

ในงานวิจัย ได้ทดลองทำการตรึงเอนไซม์โดยวิธีต่างๆ กัน 4 วิธี และได้นำมาทดลองใช้ในระบบวัด วิธีเหล่านั้นได้แก่

1. การตรึงเอนไซม์แบบผัง (entrapment) ในโครงร่างแหของอีพอกซี่
2. การตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมี โดยใช้ไซเลน (silane) และพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ (p-nitrobenzoylchloride)
3. การตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมี โดยใช้ไซเลน (silane) และกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)
4. การตรึงเอนไซม์ โดยวิธีอิเล็กโตรโพลีเมอร์ไรเซชั่นของสาร โพลีพิลโร (polypyrrole)

สำหรับรายละเอียดของการตรึงเอนไซม์แต่ละวิธีที่ใช้ในงานวิจัย จะกล่าวโดยละเอียดอีกครั้งในบทที่ 5

3. เครื่องวัดสัญญาณ

ในงานวิจัย ได้ใช้วงจรที่ทำหน้าที่เดียวกับ วงจรโพเทนชิออสแตท (potentiostat) ในการรับสัญญาณกระแสไฟฟ้า ที่ได้จากปฏิกิริยาเคมี ซึ่งหน้าที่หลักของวงจรโพเทนชิออสแตท (potentiostat) คือ ควบคุมแรงดันที่จ่ายให้กับทรานส์ดิวเซอร์ และจะทำหน้าที่แปลงสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่ได้ให้เป็นแรงดันไฟฟ้า จากนั้นจึงส่งต่อไปยังคอมพิวเตอร์ เพื่อการประมวลผลต่อไป

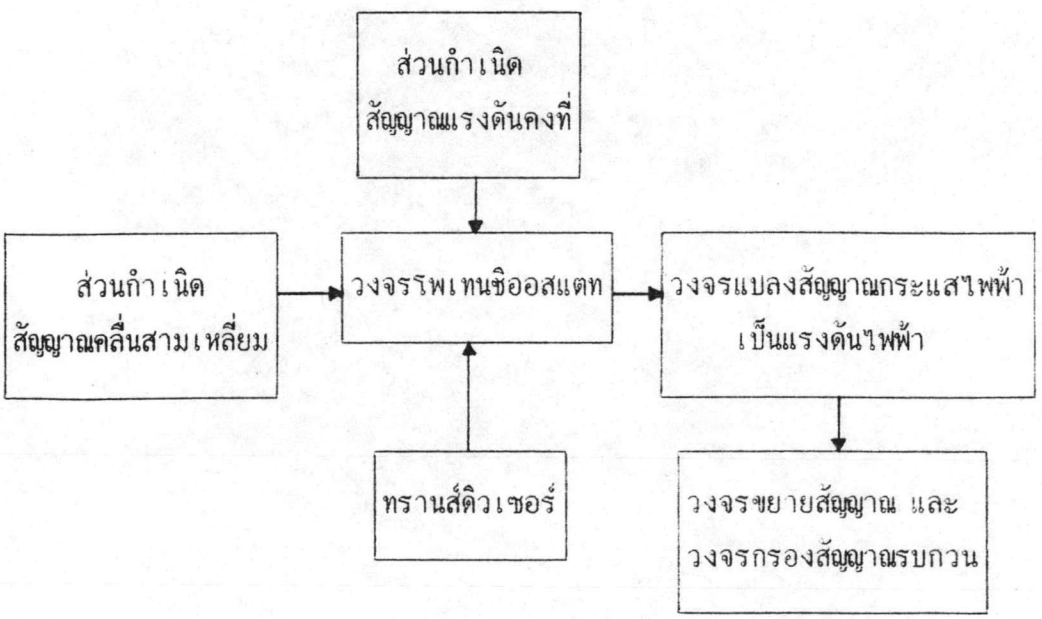
วงจรวัดสัญญาณที่ใช้มีส่วนประกอบที่สำคัญๆ อยู่ 6 ส่วนด้วยกัน คือ

1. ส่วนที่ใช้ในการกำเนิดสัญญาณแรงดันคงที่
2. ส่วนที่ใช้ในการกำเนิดสัญญาณคลื่นสามเหลี่ยม
3. วงจรโพเทนชิออสแตท
4. ส่วนแปลงสัญญาณกระแสไฟฟ้าเป็นแรงดันไฟฟ้า (I to V converter)
5. ส่วนที่ใช้ในการขยายสัญญาณ (amplifier)

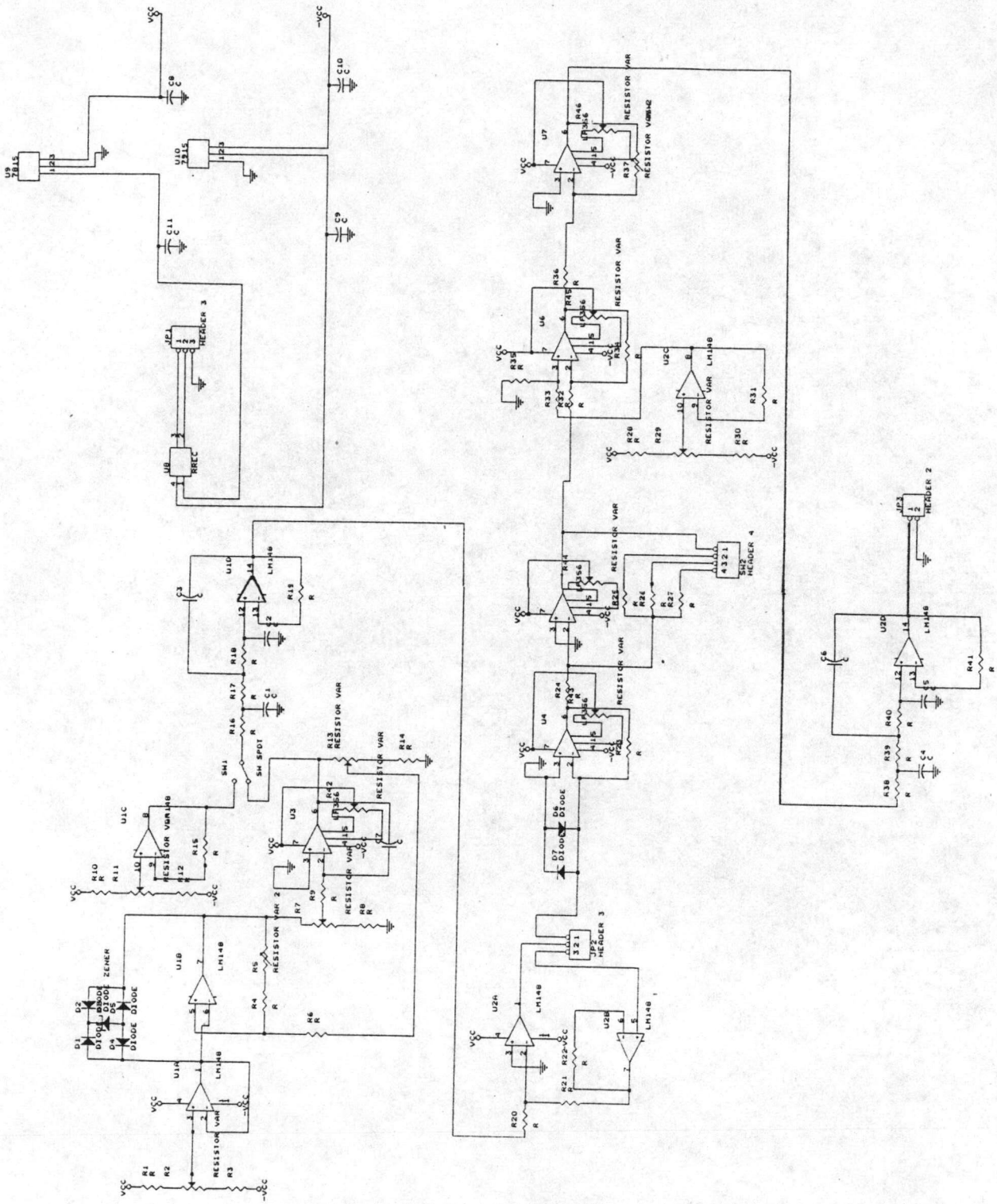
6. ส่วนที่ใช้ในการกรองสัญญาณรบกวน (noise filter)

วงจรในส่วนแรก จะทำหน้าที่จ่ายแรงดันไฟฟ้าค่าคงที่ให้แก่ทรานส์ดิวเซอร์ และจะทำการแปลงสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ให้เป็นสัญญาณแรงดันไฟฟ้า เนื่องจากสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่าน้อยมาก ($\sim 10^{-6}$ แอมแปร์) จึงจำเป็นต้องผ่านสัญญาณที่ได้เข้าสู่วงจรขยายต่อไป อัตราขยายของวงจรขยายที่ใช้มีค่า 10^6 เพื่อที่จะได้สัญญาณหลังจากผ่านวงจรขยายอยู่ในช่วง 0-10 โวลต์ (เนื่องจากในการนำสัญญาณเข้าสู่คอมพิวเตอร์ ได้ใช้วงจรแปลงสัญญาณแอนะลอกเป็นสัญญาณดิจิตอล ซึ่งได้เลือกโหมดที่จำกัดสัญญาณขาเข้าอยู่ในช่วง 0-10 โวลต์)

ในการวัดสัญญาณที่ได้จากระบบวัดจริง มักจะมีสัญญาณรบกวนเกิดขึ้น ซึ่งสัญญาณรบกวนที่เกิดขึ้น อาจจะเป็นสัญญาณรบกวนที่เกิดจากปั๊มที่ใช้ในการผลักดันสารละลาย สัญญาณรบกวนแบบนี้ มักจะเป็นสัญญาณที่มีความถี่ต่ำ และมีขนาดไม่สูงจึงมีผลรบกวนต่อการวัดน้อย นอกจากนั้นสัญญาณรบกวนยังอาจเกิดขึ้นจากสัญญาณที่ถูกเหนี่ยวนำมาจากที่อื่นๆ เช่นสัญญาณรบกวนที่มีความถี่ 50 เฮิรตซ์ ดังนั้นในงานวิจัย จึงได้ใช้วงจรกรองสัญญาณรบกวนประเภทผ่านต่ำ (low pass filter) ซึ่งมีค่าความถี่ตัดขอบ (cut off frequency) อยู่ประมาณ 10 เฮิรตซ์



รูปที่ 2.10 บล็อกไดอะแกรมของเครื่องวัดสัญญาณ



รูปที่ 2.11 วงจรรวมของเครื่องวัดสัญญาณ

4. ส่วนเก็บ และวิเคราะห์สัญญาณ

ในงานวิจัย จะใช้คอมพิวเตอร์ในการประมวลผล โดยซอฟต์แวร์ที่จะพัฒนาขึ้น จะมีส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ 2 ส่วน คือ

1. ส่วนรับข้อมูล
2. ส่วนที่ทำการวิเคราะห์สัญญาณ

4.1 ส่วนรับข้อมูล

ในส่วนนี้ จะทำการเก็บข้อมูลแบบเวลาจริง (realtime) จากวงจรโพเทนชิออสแตท ซึ่งในที่นี้ จะใช้การ์ดแปลงสัญญาณแอนะลอกเป็นดิจิตอล (A/D converter) เป็นส่วนเชื่อมต่อสัญญาณระหว่างวงจรโพเทนชิออสแต กับคอมพิวเตอร์ โปรแกรมในส่วนนี้จะนำข้อมูลที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง ไปเขียนลงบนจอภาพของคอมพิวเตอร์ในแบบเวลาจริงด้วย

4.2 ส่วนที่ทำการวิเคราะห์สัญญาณ

ซอฟต์แวร์ในส่วนนี้ จะนำเอาข้อมูลที่เก็บได้ในส่วนรับข้อมูล มาทำการวิเคราะห์ ซึ่งจะทำหน้าในการคำนวณค่ายอดของสัญญาณ เพื่อใช้ในการหาพารามิเตอร์ของกราฟปรับเทียบ และใช้ในการคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารตัวอย่าง

สำหรับรายละเอียดของส่วนวิเคราะห์สัญญาณจะกล่าวโดยละเอียดอีกครั้งในบทที่ 4