# อุปกรณ์แบบกระดาษสำหรับวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยอาศัยการตรวจวัดทางเอนไซม์

## Paper Based Analytical Device For Alcohol Using Enzymatic Detection

กนกวรรณ ฟีสันเทียะ, และ ยุภาพร สมีน้อย*

Kanokwan Feesanthia, and Yupaporn Sameenoi*

*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์ฮอร์สราดิสเปอร์ออกซิเดส โดยมี 3,3′,5,5′-เตตระเมทิลเบนซิดิน เป็นซับสเตรทที่เปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถตรวจวัดความเข้มสีบนอุปกรณ์แบบกระดาษด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ จากการวิเคราะห์เอทานอลด้วยสภาวะที่เหมาะสมพบว่าให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50-1000 µM ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 1.50 µM และมีความสามารถการทำซ้ำที่ความเข้มข้น 100,500 และ 1000 µM ที่มีร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.93, 1.66, 1.24 ตามลำดับ (n=10) จากผลการทดลองเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มสามารถใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่ำ มีราคาถูก และเหมาะสำหรับการตรวจวัดภาคสนาม

**คำสำคัญ** : อุปกรณ์ของไหลจุลภาคแบบกระดาษ / แอลกอฮอล์ / เอทานอล / เอนไซม์

**Abstract**

This research has developed a method for alcohol analysis using a microfluidic paper based analytical device (µPAD) with enzymatic assay using peroxidase in a presence of 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine as a substrate dye with color changing from colorless to greenish blue. The color intensity was analyzed using an imaging software. Using optimal condition to study method performance, the ethanol standard curve was linear in the concentration range of 50-1000 µM with a limit of detection of 1.50 µM. High reproducibility at concentrations of 100, 500 and 1000 µM was observed with % RSD of 1.93, 1.66, and 1.24, respectively (n=10). As indicated by the preliminary results, the developed µPAD assay is promising to be used for alcohol analysis at low concentration level with inexpensive analysis cost and suitable for field-testing.

**Keywords**: Microfluidic Paper Based Analytical Device / Alcohol / Ethanol / Enzyme

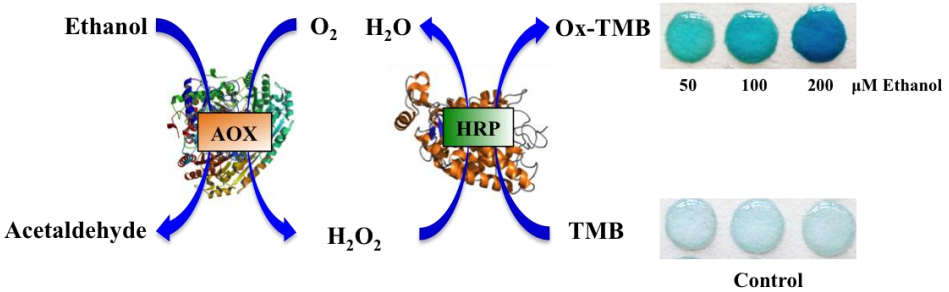
*Corresponding author. E-mail: yupaporn@buu.ac.th

**1. บทนำ**

การบริโภคหรือการสูดดมแอลกอฮอล์ในปริมาณเกินขนาดมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และในบางกรณีอาจทำให้ผู้บริโภคถึงแก่ ชีวิตได้ (Zima *et al*., 2001) etในทางผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางก็มีการใช้เอทานอลเพื่อเป็นตัวทำละลายและเป็นสารฆ่าเชื้อซึ่งอาจจะก่อให้เกิดอาการแพ้ทางผิวหนังในผู้ใช้ผลิตภัณฑ์บางราย (Neuman *et al*., 2002) ทางด้านพลังงานทดแทน มีการใช้เอทานอลมาผสมกับน้ำมันในอัตราส่วนต่างๆเช่น E20 หรือ E85 เพื่อให้ได้เชื้อเพลิง ราคาถูก เพื่อให้ประชาชนได้มีทางเลือกในการใช้พลังงานที่มีราคาถูกลงกว่าน้ำมันเบนซินปกติ อย่างไรก็ตามเนื่องจากราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดปัญหาน้ำมันปลอมปนไม่ได้คุณภาพขายอยู่ในสถานีบริการอยู่บางแห่ง โดยการปลอมปนเกิดจากการนำน้ำมันที่มีราคาถูกกว่ามาผสมปลอมปนแล้วจำหน่ายเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดที่มีราคาแพงกว่า วิธีดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบเสียหายหลายด้าน ทั้งประชาชนผู้บริโภคที่ถูกเอารัดเอาเปรียบในการซื้อน้ำมันที่ไม่มีคุณภาพ เครื่องยนต์เกิดความเสียหาย ประสิทธิภาพการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ลดลง ส่งผลก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ทางภาครัฐต้องสูญเสียรายได้จากการจัดเก็บภาษีเป็นต้น (Karavalakis *et al*., 2012; DiLoreto *et al*., 2012) การวิเคราะห์ตรวจสอบปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบจึงเป็นเรื่องจำเป็นเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนจำหน่ายต่อผู้บริโภค ป้องกันการถูกเอารัดเอาเปรียบจากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐาน และยังเป็นการรับประกันคุณภาพของสินค้าของผู้ผลิตเพื่อส่งเสริมภาพลักษณ์ด้านมาตรฐานการผลิตก่อนนำจำหน่ายอีกด้วย

วิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในตัวอย่างชนิดต่างๆที่มีรายงานได้แก่ วิธีทางการทำปฏิกิริยาการเกิดสี (Azevedo *et al*., 2005) วิธีทางโครมาโทกราฟี (Apers *et al*., 2003) วิธีทางสเปคโทรสโคปี (Mendes *et al*., 2003) เป็นต้น วิธีดังกล่าวสามารถวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในตัวอย่างต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังจำเป็นต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพง ต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ไม่สามารถนำไปตรวจวัดภาคสนามได้ ใช้ตัวอย่างและรีเอเจนท์ปริมาณมากในการวิเคราะห์ ใช้ผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์ ข้อเสียดังกล่าวจึงเป็นข้อจำกัดในการตรวจสอบคุณภาพและอาจเป็นปัจจัยที่เพิ่มราคาผลิตภัณฑ์ของสินค้าหากจำเป็นต้องมีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อย่างละเอียด จากปัญหาดังกล่าวจะเห็นว่ามีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีเครื่องมือหรือวิธีตรวจวัดคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบที่มีราคาถูก เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่พกพาได้ใช้ง่าย มีความไวสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย

เพื่อบรรลุจุดประสงค์ข้างต้น งานวิจัยนี้จะได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเพื่อวิเคราะห์แอลกอฮอล์ โดยที่อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษถูกเริ่มคิดค้นโดยกลุ่มวิจัยของ Whitesides ในปี คศ 2007 (Martinez *et al*., 2007) สามารถสร้างอุปกรณ์ได้ง่ายโดยการสร้างส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) บนกระดาษด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคโฟโต้ลิโธกราฟี (Martinez *et al*., 2007) การพิมพ์ด้วยไข (Carrilho *et al*., 2009) บริเวณที่ยังเป็นกระดาษก็จะยังมีคุณสมบัติชอบน้ำ สามารถเป็นบริเวณที่ทำปฏิกิริยาและทดสอบได้ การใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ มีข้อดีกว่าเทคนิคการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมหลายประการ เช่น อุปกรณ์ทำจากกระดาษซึ่งมีราคาถูก สามารถหาได้แม้กระทั่งประเทศที่กำลังพัฒนา ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์ปริมาณน้อย สามารถใช้ง่ายไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ชำนาญการในการทดสอบ สามารถให้การวิเคราะห์ที่รวดเร็ว อุปกรณ์มีขนาดเล็กและน้ำหนักเบาสามารถพกพาไปทดสอบแอลกอฮอล์ที่สถานีบริการน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ที่มีวางขายในสถานที่ที่ห่างไกลจากห้องปฏิบัติการได้



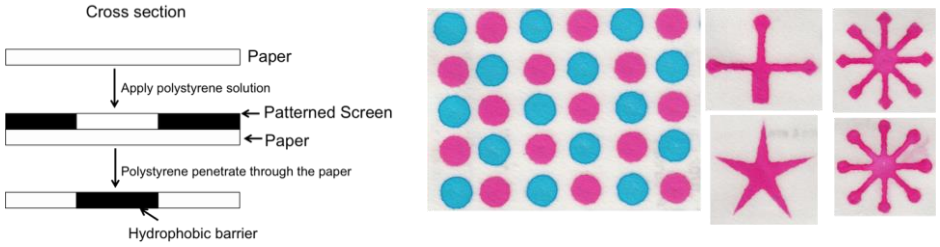

**รูปที่** 1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยวิธีทางเอนไซม์บนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์มีการตรวจวัดแบบอาศัยการเกิดสี มีหลักการในการวิเคราะห์ดังรูปที่ 1 กล่าวคือ เอทานอลจะถูกเร่งให้เกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (AOX) ในสภาวะที่มีออกซิเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) หลังจากนั้นติดตามปริมาณ $H_2O_2$ ที่เกิดขึ้นโดยใช้ซับสเตรทที่เปลี่ยนสีได้ (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine, TMB) และเอนไซม์ฮอร์สราดิสเปอร์ออกซิเดส (HRP) จะทำให้ TMB เปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีเขียวปนน้ำเงิน ความเข้มสีของ TMB ที่เปลี่ยนแปลงไปจะแปรผันตรงกับปริมาณ $H_2O_2$ ที่เกิดจากเอทานอลที่ถูกเร่งด้วย AOX จึงสามารถหาปริมาณเอทานอลที่มีในตัวอย่างได้ ขั้นต้นของงานวิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้นและทดสอบประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ พบว่าสามารถวิเคราะห์ $H_2O_2$ ได้ที่ความเข้มข้นต่ำระดับไมโครโมลาร์ มีความสามารถในการทำซ้ำที่ดี อุปกรณ์ดังกล่าวยังสามารถวิเคราะห์เอทานอลได้ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ มีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ และมีความสามารถในการทำซ้ำสูง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ดังกล่าวมีแนวโน้มสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างแอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 2. วิธีการ

### 2.1 วิธีสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

สร้างส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier) บนกระดาษด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์พอลีสไตรีน (Polystyrene) มีวิธีการสร้างดังนี้ (รูปที่ 2) ละลายโฟมโพลีสไตรีน 1.25 g ในโทลูอีน 5 mL จากนั้นไล่ฟองอากาศด้วยเครื่องไล่ฟองอากาศ (Degasser) เทสารละลายพอลีสไตรีนผ่านบล็อคสกรีนที่วางอยู่บนกระดาษกรอง สารละลายพอลิสไตรีนจะซึมผ่านสกรีนไปยังกระดาษกรองที่อยู่ด้านล่าง ปล่อยให้พอลิเมอร์แห้งจะได้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่มีส่วนตรวจวัดเป็นรูปแบบที่ต้องการ ในงานวิจัยนี้ได้ทำส่วนตรวจวัดเป็นแบบหลุม (well format) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร หลังจากนั้นติดอุปกรณ์กระดาษด้านหลังด้วยเทปใสเพื่อป้องกันการรั่วซึมของสารละลายที่ใช้ทำการวิเคราะห์




(A) (B)

**รูปที่ 2** (A) ขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษด้วยวิธีพิมพ์ผ่านสกรีนด้วยพอลิเมอร์ (B) ลวดลายบนอุปกรณ์ที่ได้ขึ้นกับแบบที่สร้าง บนบล็อคสกรีนโดยบริเวณที่มีสีคือส่วนตรวจวัดที่ชอบน้ำ (Hydrophilic region) และบริเวณสีขาวคือส่วนกั้นที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic barrier)

### 2.2 การวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

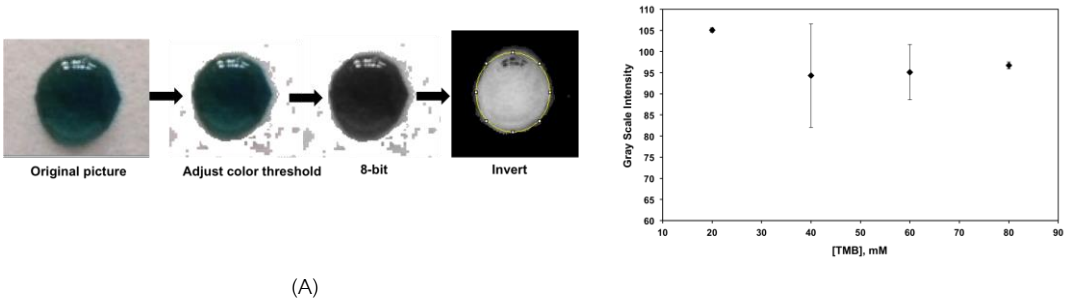
จากปฏิกิริยาการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยวิธีทางเอนไซม์จะเห็นว่า ประสิทธิภาพการตรวจวัดแอลกอฮอล์จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการตรวจวัด $H_2O_2$ ที่เป็นผลิตภัณฑ์ ในขั้นแรกได้ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ โดยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ ได้แก่ ปริมาณของซับสเตรท TMB เวลาในการเกิดปฏิกิริยา pH ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ ด้วยสภาวะที่เหมาะสมสามารถวิเคราะห์ $H_2O_2$ ตามขั้นตอนดังนี้ หยดเอนไซม์ HRP 0.4 U/mL 5 μL ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ตามด้วย สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6 ปริมาตร 5 μL และสารละลาย TMB 20 mM 5 μL จากนั้นหยด $H_2O_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (50-1000 μM) ปริมาตรความเข้มข้นละ 10 μL ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที จะมีสีเขียวปนน้ำเงินเกิดขึ้น จากนั้นถ่ายรูปเพื่อนำเข้าโปรแกรมวิเคราะห์ความเข้มสีและสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น

### 2.3 การวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอลด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ

การวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอลทำได้ดังนี้ หยดสารละลาย Polyethylene glycol (PEG) เข้มข้น 10 mg/mL 10 μL ลงบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ และเพิ่มคุณสมบัติความชอบน้ำให้แก่กระดาษ จากนั้นหยดเอนไซม์ HRP 0.4 U/mL 7 μL ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ ตามด้วย สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6 ปริมาตร 5 μL และสารละลาย TMB 20 mM 5 μL สุดท้ายหยดสารละลายที่ผสมกันไว้แล้วเป็นเวลา 10 นาที ของ AOX (0.4 U/mL 10 μL) และเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (50-1000 μM, 15 μL) ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัด ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนถ่ายภาพและนำเข้าโปรแกรมประมวลผลภาพเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสีต่อไป

**2.4 การวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ**

ถ่ายภาพอุปกรณ์ที่ได้ทำการทดลองเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี ควบคุมปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความเข้มแสงบนภาพถ่ายโดย ทำการถ่ายภาพด้วยกล้อง Sony Cybershot ในโหมดถ่ายภาพอัตโนมัติ (Auto) ภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ตำแหน่งเดียวกันทุกครั้ง ให้ระยะห่างระหว่างอุปกรณ์และกล้องถ่ายรูปเท่ากับ 30 เซนติเมตร นำรูปถ่ายที่ได้เข้าโปรแกรม ImageJ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังรูปที่ 3 จากซ้ายไปขวา เริ่มต้นจากรูปถ่ายแต่ละหลุม ทำการปรับสีเพื่อคัดให้ได้สีที่ต้องการซึ่งในที่นี้คือสีเขียวปนน้ำเงินด้วยการปรับ color threshold ของ ImageJ จากนั้นเปลี่ยนรูปเป็นไฟล์ 8 bit gray scale และปรับ invert จะสามารถวัดความเข้มสีเทา (Gray scale intensity) ซึ่งเป็นระดับความเข้มสีในเฉดสีเทาที่มีค่าแปรผันตรงกับความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งในที่นี้คือความเข้มของสีเขียวปนน้ำเงิน




(A) (B)

**รูปที่ 3** (A) ขั้นตอนการประมวลผลภาพด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี (B) ความเข้มสีเทา (Gray Scale Intensity) ที่วัดได้จากแต่ละหลุม จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ และนำมาพล็อตกับความเข้มข้นของซับสเตรท TMB (n=3)

**3. ผลและอภิปราย**

**3.1 การวิเคราะห์ $H_2O_2$ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้น**

ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษกับการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ในการตรวจวัด $H_2O_2$ ที่เป็นสารที่สำคัญซึ่งถูกผลิตจากการทำปฏิกิริยาของแอลกอฮอล์และเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส เริ่มต้นได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ดังกล่าว โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของซับสเตรท TMB ความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP เวลาในการเกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิและผลของ pH

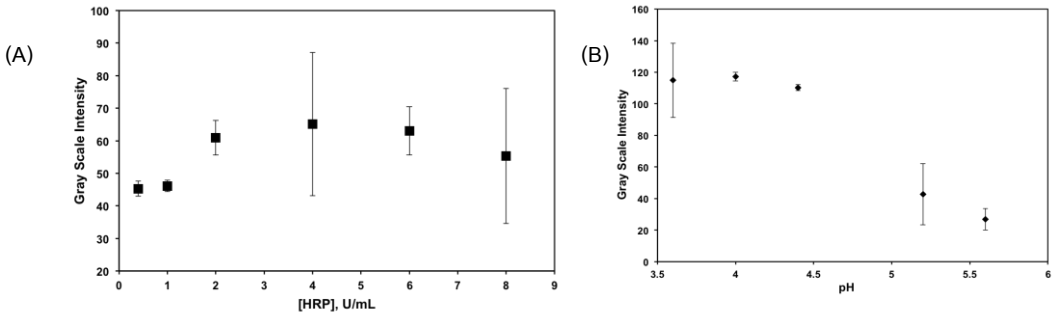
การศึกษาผลของความเข้มข้นของซับสเตรท TMB ต่อการวิเคราะห์ $H_2O_2$ ที่ความเข้มข้น 100 μM พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ TMB มากขึ้น จะทำให้ความเข้มสีของ $H_2O_2$ เพิ่มขึ้น จนถึงที่ความเข้มข้นของ TMB เท่ากับ 60 mM ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี (Guilbault, 1976) อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณ TMB เพิ่มขึ้น สัญญาณของแบลงค์ก็มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน ภายหลังจากที่หักลบกับสัญญาณของแบลงค์ จะได้ความความสัมพันธ์ดังรูปที่ 3B กล่าวคือที่ความเข้มข้นของ TMB 20 mM ให้สัญญาณเหมาะสมที่สุดในการตรวจวัด $H_2O_2$

การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ HRP ต่อการวิเคราะห์ $H_2O_2$ ได้ผลดังรูปที่ 4A พบว่าจากความเข้มข้นต่ำสุด (0.4 U/mL) ถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา ให้สัญญาณการตรวจวัด $H_2O_2$ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.4 U/mL, 5 μL คิดเป็นเอนไซม์ 2 mU) มีปริมาณมากเกินพอในการเปลี่ยน $H_2O_2$ ปริมาณ 1 nmol (100 μM, 10 μL ) ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์

สามารถคำนวณว่าปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาว่าเพียงพอต่อการเร่งปฏิกิริยาหรือไม่ ได้ดังนี้ จากนิยามการทำงานของเอนไซม์ที่กล่าวว่า เอนไซม์ 1 U สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาของซับสเตรทให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ในอัตรา 1 μmol/min ในการทดลองใช้ HRP ปริมาณ 2 mU ดังนั้น อัตราการเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยน $H_2O_2$ ให้กลายไปเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ปริมาณดังกล่าวเท่ากับ 2 nmol/min ในการทดลองใช้เวลา 30 นาที เอนไซม์ปริมาณดังกล่าวจึงสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาของ $H_2O_2$ ได้ถึง 60 nmol แต่ในการทดลองมี $H_2O_2$ เพียง 1 nmol ดังนั้นเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ศึกษาคือ 0.4 U/mL 5 μL จึงมากเกินพอในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นไปเรื่อยๆจึงไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง เพราะถูกจำกัดด้วยปริมาณ $H_2O_2$ ที่มีอยู่เพียง 1 nmol ด้วยเหตุนี้ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ต่ำที่สุดในการศึกษาขั้นต่อไปคือ 0.4 U/mL เพื่อประหยัดรีเอเจนท์ในการวิเคราะห์

การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่อสัญญาณในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ 100 μM พบว่าเมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น สีของ TMB ก็จะเข้มขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ขึ้น จนกระทั่งถึงเวลา 25 นาที ที่ความเข้มสีเริ่มคงที่ ในการทดลองขั้นต่อไป จะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 30 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาในการวิเคราะห์เกิดอย่างสมบูรณ์

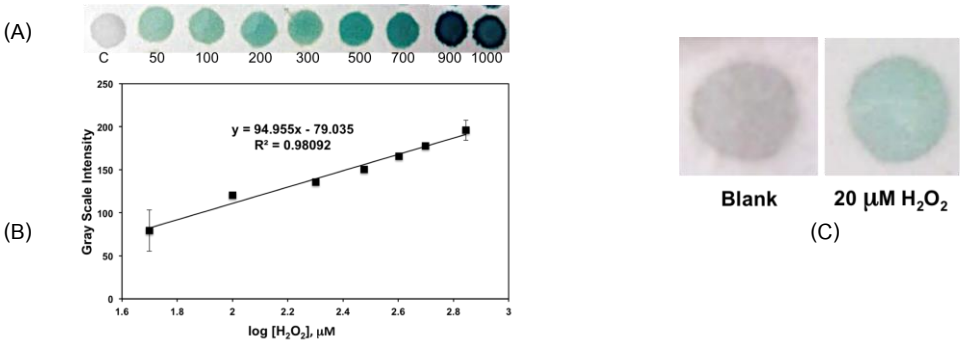
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการวิเคราะห์ $H_2O_2$ 100 μM พบว่าความเข้มสีของการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่สามารถทำงานได้ที่ที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองดังรูป สอดคล้องกับทฤษฎี เนื่องจากความเข้มสีมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37 °C อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง ( ~28 °C) ให้ความเข้มสีใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37 °C ดังนั้น เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ $H_2O_2$ รวมไปถึงแอลกอฮอล์ ไม่จำเป็นต้องใช้ตู้อบเพื่อทำการทดลอง ในการทดลองขั้นต่อไป จะเลือกทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง




**รูปที่** 4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ (A) ผลของปริมาณ เอนไซม์ (n=3), (B) ผลของ pH (n=3)

การศึกษาผลของ pH ต่อการวิเคราะห์ $H_2O_2$ 100 μM ได้ผลดังรูปที่ 4B พบว่าที่ pH 3.6 -4.5 ให้ความเข้มสีการวิเคราะห์ใกล้เคียงกัน และความเข้มสีลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ HRP ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 3-4 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้มีรายงาน (Gao *et al*., 2007) ในการทดลองขั้นต่อไปจะได้เลือกทำการวิเคราะห์ $H_2O_2$ ที่ pH 3.6

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทั้ง 5 ปัจจัย พบว่า ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ค่อนข้างสูงสังเกตได้จากแถบแสดงความคลาดเคลื่อนของข้อมูลในกราฟ สาเหตุของความคลาดเคลื่อนของข้อมูลดังกล่าวอาจมาจากสองสาเหตุ คือ (i) ความคลาดเคลื่อนจากการหยดรีเอเจนท์ เนื่องจากรีเอเจนท์ที่ใช้มีปริมาตรน้อยมากในระดับ 5-10 μL ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ง่าย (ii) การเติมรีเอเจนท์ เช่น เอนไซม์ HRP และ TMB ก่อนการเติม $H_2O_2$ ทำให้กระดาษมีความเป็น Hydrophobic มากขึ้น ส่งผลให้ความชุ่มน้ำของกระดาษลดลงไป เมื่อเติม $H_2O_2$ จึงทำให้เกิดการแพร่ทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับรีเอเจนท์ได้ยาก ทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มสีจึงไม่สมบูรณ์ด้วย ปัญหาข้างต้นสามารถแก้ไขได้โดยการใช้ไมโครปิเปตที่มีลักษณะเป็น multichannel เพื่อควบคุมการหยดสารเพื่อทำปฏิกิริยาบนอุปกรณ์ตรวจวัดแต่ละหลุมได้แม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้ปัญหาความไม่ชุ่มน้ำ ที่เกิดจากการเติมรีเอเจนท์ก่อนการเติมสารตัวอย่าง สามารถแก้ไขได้โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวภายหลังจากเติมรีเอเจนท์ลงบนอุปกรณ์แบบกระดาษเพื่อเพิ่มคุณสมบัติชอบน้ำให้กระดาษก่อนเติมสารตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์



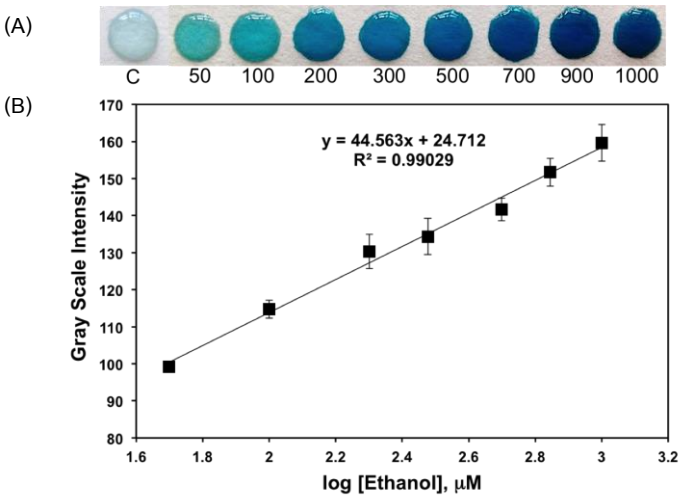

**รูปที่** 5 (A) ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษประกอบด้วยบริเวณตรวจวัดหลายหลุมที่ทำการทดลองโดยเพิ่มความเข้มข้นของ $H_2O_2$ หลุมที่เป็นแบลงค์ (กำกับด้วยสัญลักษณ์C) คือความเข้มข้นของ $H_2O_2$ เป็นศูนย์ (B) กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ $H_2O_2$ (n=3) (C) เปรียบเทียบความเข้มสีของแบลงค์กับความเข้มสีเมื่อมี $H_2O_2$ ที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับขีดจำกัดการตรวจวัด (18.56 µM)

ขั้นตอนต่อมาได้ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ โดยทำการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมดังได้ศึกษาข้างต้น จากการสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น $H_2O_2$ เท่ากับ 50-700 µM (รูปที่ 5) มีขีดจำกัดการตรวจวัด ($3SD_{blank}$/slope) เท่ากับ 18.56 µM มีขีดจำกัดการหาปริมาณ ($10SD_{blank}$/slope) เท่ากับ 61.86µM มีความสามารถ ในการทำซ้ำที่ความเข้มข้น $H_2O_2$ 50, 300และ 600 µM บอกด้วยค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.46, 2.16 และ 2.75 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ $H_2O_2$ ดี

**3.2 การวิเคราะห์สารมาตรฐานแอลกอฮอล์**

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษที่ได้พัฒนาขึ้นได้ถูกนำมาวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยปฏิกิริยาทางเอนไซม์โดยใช้เอทานอลเป็นสาร-มาตรฐานในการศึกษา จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น เกี่ยวข้องกับการการทำงานเอนไซม์สองชนิดคือเอนไซม์ AOX และเอนไซม์ HRP มีรายงานว่าเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7.5 (Azevedo *et al*., 2005) แต่จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัด $H_2O_2$ ในงานวิจัยนี้ดังแสดงข้างต้น พบว่า สามารถตรวจวัดได้ดีที่ pH 3.6 ดังนั้น เพื่อเป็นการรักษาสภาพการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้ทำงานได้ดีที่ pH ที่เหมาะสม การทดลองเบื้องต้นจึงได้ผสม AOX และเอทานอลในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 ในหลอดเหวี่ยงขนาดเล็ก และทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น $H_2O_2$ หลังจากนั้นจึงได้นำของผสมดังกล่าว หยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษซึ่งได้ตรึงเอนไซม์ HRP และ TMB ที่ pH 3.6 ไว้แล้ว เพื่อวิเคราะห์ $H_2O_2$ ที่เกิดขึ้น ดังนั้นความเข้มสีที่ได้จะแปรผันตรงกับปริมาณเอทานอล จากการทดลองด้วยสภาวะดังกล่าวพบว่า สามารถวิเคราะห์เอทานอลได้ที่ช่วงความเป็นเส้นตรง ที่ 50-1000 µM (รูปที่ 6) มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (3SD/Slope) และการหาปริมาณ (10SD/Slope) เท่ากับ 1.50 และ 3.89 µM ตามลำดับ มีความสามารถในการทำซ้ำที่ดีโดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 เท่ากับ 1.93, 1.66 และ 1.24 ตามลำดับ (n=10) การวิเคราะห์เอทานอลได้ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ ที่ระดับความสามารถในการทำซ้ำที่ดีข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้วิเคราะห์เอทานอลที่ความเข้มข้นต่ำๆในตัวอย่างจริงได้ เช่น การตรวจสอบปริมาณแอลกอฮอลล์ในปัสสาวะและเลือดของผู้ดื่มแอลกอฮอล์ขณะ

ขับรถ (17 mmol/L) (Winek *et al*., 1984) หรือการใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์ปนเปื้อนในน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อตรวจสอบคุณภาพของน้ำมัน (ต้องมีปริมาณแอลกอฮอล์ปนเปื้อนไม่เกิน 0.2 %mol/mol) (Boog *et al*., 2011)




**รูปที่** 6 (A) ภาพถ่ายอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษในการวิเคราะห์เอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลุมที่เป็นแบลงค์ (กำกับด้วยสัญลักษณ์C) คือความเข้มข้นของเอทานอลเป็นศูนย์ (B) กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น (n=3)

**4. บทสรุป**

อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษร่วมกับวิธีทางเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ $H_2O_2$ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้การวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำด้วยการทดลองที่ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ทำการศึกษา อุปกรณ์ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์เอทานอลได้ในระดับความเข้มข้นไมโครโมลาร์ ที่มีค่าความสามารถในการทำซ้ำอยู่ในช่วงที่ดีคือมีร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละไม่เกิน 2 การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ดังกล่าวในการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อยู่ในขั้นการทดลอง และจะได้ศึกษาผลของตัวรบกวน (Interferences) ต่อการวิเคราะห์ด้วย จะเห็นว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ใช้รีเอเจนท์และตัวอย่างระดับไมโครลิตร มีกระดาษเป็นวัสดุหลักในการวิเคราะห์ ซึ่งมีราคาถูก ทำให้ค่าในการวิเคราะห์มีราคาถูกตามไปด้วย อุปกรณ์มีน้ำหนักเบาและขนาดเล็ก เหมาะกับการพกพาไปตรวจวัดภาคสนามได้ วิธีวิเคราะห์สามารถทำได้ง่าย ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องเป็นผู้ชำนาญการ จึงทำให้อุปกรณ์ดังกล่าวมีแนวโน้มสามารถใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่สนใจได้เป็นอย่างดีในอนาคต

**5. กิตติกรรมประกาศ**

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และนอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น ที่ให้คำแนะนำเบื้องต้นเกี่ยวกับโครงการวิจัย

**6. เอกสารอ้างอิง**

Apers, S., Van Meenen, E., Pieters, L., and Vlietinck, A. (2003). Quality control of liquid herbal drug preparations: ethanol content and test on methanol and 2-propanol. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis *33*, 529-537.

Azevedo, A.M., Prazeres, D.M.F., Cabral, J., and Fonseca, L.P. (2005). Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. Biosensors and Bioelectronics *21*, 235-247.

Boog, J. H. F., Silveira, E. L. C., De Caland, L. B., & Tubino, M. (2011). Determining the residual alcohol in biodiesel through its flash point. Fuel *90*, 905-907.

Carrilho, E., Martinez, A.W., and Whitesides, G.M. (2009). Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. Analytical Chemistry *81*, 7091-7095.

DiLoreto, J.T., Siegel, M., Hinchey, D., Valerio, H., Kinzel, K., Lee, S., Chen, K., Shoaff, J.R., Kenney, J., and Jernigan, D.H. (2012). Assessment of the average price and ethanol content of alcoholic beverages by brand—United States, 2011. Alcoholism: Clinical and Experimental Research *36*, 1288-1297.

Gao, L.Z., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J.B., Zhang, Y., Gu, N., Wang, T.H., Feng, J., Yang, D.L., Perrett, S., et al. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. Nature Nanotechnology. *2*, 577-583.

Guilbault, G.G. (1976). Handbook of enzymatic methods of analysis, New York: M. Dekker.

Karavalakis, G., Durbin, T.D., Shrivastava, M., Zheng, Z., Villela, M., and Jung, H. (2012). Impacts of ethanol fuel level on emissions of regulated and unregulated pollutants from a fleet of gasoline light-duty vehicles. Fuel *93*, 549-558.

Martinez, A.W., Phillips, S.T., Butte, M.J., and Whitesides, G.M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angewandte Chemie-International Edition *46*, 1318-1320.

Mendes, L.S., Oliveira, F.C., Suarez, P.A., and Rubim, J.C. (2003). Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries. Analytica Chimica Acta *493*, 219-231.

Neuman, M.G., Haber, J.A., Malkiewicz, I.M., Cameron, R.G., Katz, G.G., and Shear, N.H. (2002). Ethanol signals for apoptosis in cultured skin cells. Alcohol *26*, 179-190.

Winek, C. L., Murphy, K. L., & Winek, T. A. (1984). The unreliability of using a urine ethanol concentration to predict a blood ethanol concentration. Forensic Science International *25*, 277-281.

Zima, T., Fialová, L., Mestek, O., Janebová, M., Crkovská, J., Malbohan, I., Štípek, S., Mikulíková, L., et al. (2001). Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. Journal of biomedical science *8*, 59-70.