การพัฒนาพีโซอิเลกตริกคริสตัลไบโอเซนเซอร์เพื่อ วิเคราะห์ปริมาณยาปราบศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

Development of Piezoelectric Crystal Biosensor for the Determination of Organophosphorus

นางพรพิมล ศรีทองคำ , นางสาวนิษฐนันท์ ธาระวานิช , นายธวัชชัย สุวรรณคำ
นางสาวมรกต ตันติเจริญ และนายกฤษณพงศ์ กีรติกร
*สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ, สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, สายวิชาเทคโนโลยีวัสดุ คณะพลังงานและวัสดุ,
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บทคัดย่อ

พีโซอิเลกตริกคริสตัลไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัส สร้างขึ้นโดยการตรึงเอนไซม์อะเซททิลโคลีนเอสเตอเรสลงบนแผ่นควอทซ์ขนาดความถี่ 10 เมกะเฮิร์ทซ์ที่โมดิฟายด์ด้วยแกมม่าอะมิโนโพรพิลไตรเอทธอกซีไซเลน การวัดปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสทำโดยจุ่มแผ่นควอทซ์ที่เตรียมไว้ลงในสารละลายที่มีออร์กาโนฟอสฟอรัส (ละลายใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7) ที่ระยะเวลาหนึ่งแล้วทิ้งให้แห้งในโถดูดความชื้น ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการเกิดการฟอร์มคอมเพลกซ์ระหว่างเอนไซม์กับออร์กาโนฟอสฟอรัสจะสัมพันธ์กับปริมาณของออร์กาโนฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในสารละลายพีโซอิเลกตริกคริสตัลไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นนี้สามารถตอบสนองต่อออร์กาโนฟอสฟอรัสในระดับที่ต่ำกว่า 100 พีพีบี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Abstract

The pesticide biosensor by enzyme immobilization of acetylcholinesterase on a quartz crystal microbalance was developed. A layer of enzyme was attached onto the surface of a 10 Hz crystal using γ-aminopropyltriethoxy silane. After the enzyme immobilization, the crystal was placed into a solution of organophosphorus for a period of time and then drying. The Frequency change observed after complexation of enzyme and organophosphorus pesticide was measured and related to the organophosphorus concentration. The PZ biosensor responded to organophosphorus at the concentration less than 100 ppb at the temperature 25°C

บทนำ

ในปัจจุบันมีการนำเอาปุ๋ยเคมีและวัตถุมีพิษสำหรับปราบศัตรูพืชมาใช้ในการเกษตรมากขึ้น และเกษตรกรที่นำสารพิษดังกล่าวมาใช้มักไม่ค่อยมีความรู้ความเข้าใจอย่างแท้จริง ทำให้เกิดปัญหาในรูปของการตกค้างของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดินและน้ำ นอกจากนี้ ...งตกค้างอยู่ในพืชผลที่ผลิตได้ ก่อให้

เกิดอันตรายสำหรับผู้บริโภคได้หากสะสมอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน ได้รับปริมาณของสารพิษมากในครั้งเดียวก็อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้

สารเคมีหรือสารพิษที่นำมาใช้กำจัดศัตรูของพืชผักที่มีอายุการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวสั้น มักเป็นสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ซึ่งแม้จะมีการสลายตัวได้เร็วกว่าดีดีที ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนก็ตาม แต่พิษของออร์กาโนฟอสฟอรัสค่อนข้างรุนแรงโดยเฉพาะกับสัตว์เลือดอุ่น สามารถยับยั้งการทำงานของระบบประสาท ถ้าการรบกวนเกิดขึ้นที่กล้ามเนื้อของอวัยวะภายในที่สำคัญ ๆ อาจมีอาการรุนแรงถึงตายได้ โดยปกติแล้วออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ตกค้างในดินจะสลายตัวได้ภายในระยะเวลาประมาณ 7-10 วัน แต่ถ้าทีการตกค้างในดินบางประเภท เช่น ดินทราย สามารถอยู่ได้นานถึง 16 ปี ในกรณีของการเพาะปลูกพืชผักผลไม้เกษตรกรบางคนไม่ทิ้งระยะหลังการฉีดพ่นสารให้สารนั้นสลายตัวเสียก่อน แต่กลับเก็บเกี่ยวและนำไปจำหน่ายทันที ผู้บริโภคจึงได้รับอันตรายจากการกระทำดังกล่าว

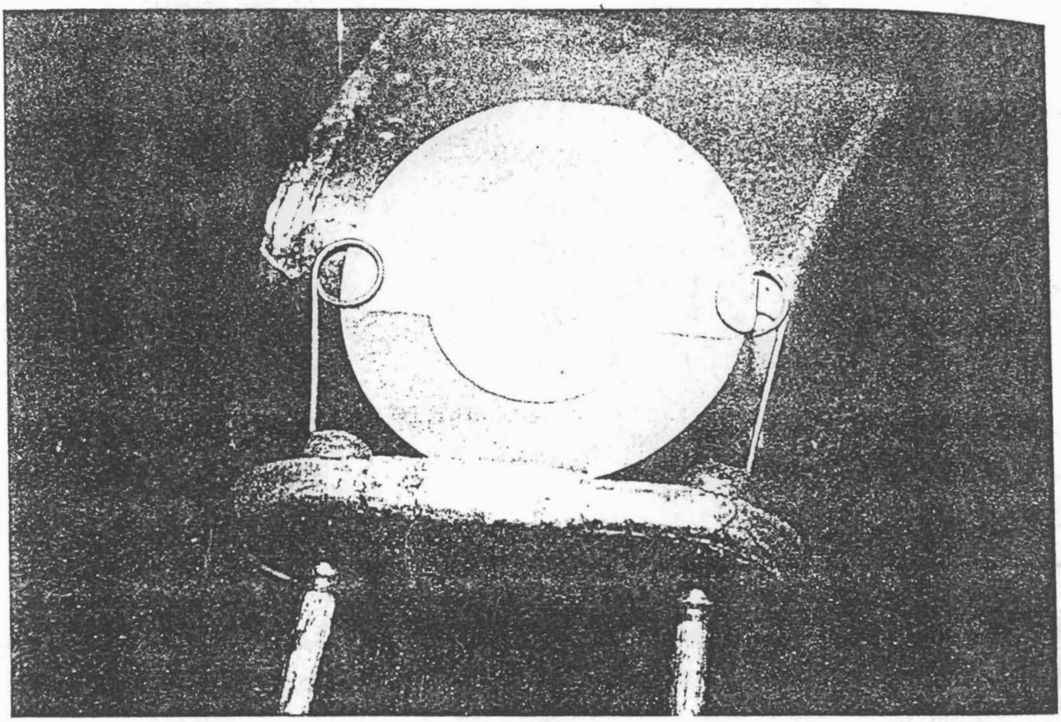
การให้ความรู้ในการใช้สารเคมีทางการเกษตรแก่เกษตรกรเป็นการลดปัญหาที่เกิดจากการใช้สารเคมีนั้นได้อย่างหนึ่ง ในขณะเดียวกันการแก้ไขปัญหาอีกอย่างหนึ่งซึ่งควรปฏิบัติก็คือ การตรวจวิเคราะห์ ปริมาณของสารพิษตกค้างอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเป็นสัญญาณเตือนภัยว่าในขณะนั้น มีสารพิษตกค้างอยู่ในปริมาณที่สามารถทำให้เกิดอันตรายได้หรือไม่ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ทำให้สามารถนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างประเภทออร์กาโนฟอสฟอรัส นิยมใช้วิธีแกสโครมาโตกราฟี (GC) หรือโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แต่วิธีดังกล่าวค่อนข้างซับซ้อน ต้องใช้ผู้ชำนาญการโดยเฉพาะ อีกทั้งต้องเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง ที่สำคัญคือ เครื่องมือมีราคาแพง ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยไบโอเซนเซอร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งมีประสบการณ์ในงานวิจัยด้านนี้มากว่า 8 ปี จึงได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาไบโอเซนเซอร์ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสขึ้น โดยมีพีโซอิเลกตริกคริสตัลเป็นทรานส์ดิวเซอร์ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือ เพื่อผลิตหัววัดปริมาณยาปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม และเพื่อพัฒนาระบบวัดที่มีความไวสูง สามารถวัดปริมาณยาปราบศัตรูพืชที่มีปริมาณต่ำมาก ๆ ได้

1. หลักการของพีโซอิเลกตริกครัสตัล

พีโซอิเลกตริกคริสตัลทำงานโดยอาศัยคุณสมบัติ piezoelectricity ของผลึกบางชนิดเช่น ผลึกควอทซ์, ทัวร์มาลีน, โรเซลซอลท์, เซรามิกส์หรือโพลิเมอร์บางชนิด แต่ที่นิยมใช้กันมากคือผลึกควอทซ์[1] เมื่อป้อนแรงดันไฟฟ้าระหว่างขั้วต่อทั้งสอง สนามไฟฟ้าอันเกิดจากแรงดันไฟฟ้านี้ จะทำให้เกิดประจุในโครงสร้างของผลึก ทำให้ผลึกมีการเปลี่ยนรูป ในทางตรงข้ามหากมีแรงกลทำให้ผลึกเปลี่ยน

รูป ประจุมีการกระจายไม่สม่ำเสมอทำให้เกิดแรงดันไฟฟ้าที่ขั้วทั้งสอง ในการใช้งานจะป้อนแรงดันไฟฟ้าที่เป็นรูปคลื่นไปที่ขั้วทั้งสองของผลึก ซึ่งจะทำให้ผลึกนี้สั่น จึงเกิดแรงดันไฟฟ้าขึ้นที่ขั้วทั้งสองของผลึกออกมาต้านกับแรงดันไฟฟ้าที่ป้อนให้กับตัวผลึก แต่จะมีความถี่ค่าหนึ่งของแรงดันไฟฟ้าที่ป้อนให้แก่ผลึกไปทำให้ผลึกสั่นด้วยความถี่เท่ากัน ทำให้รูปคลื่นไฟฟ้าที่ได้มีแรงดันไฟฟ้าเสริมกันพอดี เรียกความถี่จุดนี้ว่า ความถี่เรโซแนนซ์ (resonance frequency) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับ พื้นที่หน้าตัดและความหนาของผลึก [2]



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของผลึกควอทซ์

จากหลักการการทำงานของพีโซอิเลกตริกคริสตัล ทำให้สามารถนำคริสตัลนี้มาสร้างเป็นเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณสารได้ โดยใช้หลักการทางไบโอเซนเซอร์เข้ามาเกี่ยวข้อง การสร้างไบโอเซนเซอร์ที่มีพีโซอิเลกตริกคริสตัลเป็นทรานส์ดิวเซอร์ทำได้โดยนำเอาสารบางชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวัดปริมาณเคลือบลงบนผิวหน้าของคริสตัล เมื่อเกิดปฏิกิริยาหรือการจับกันอย่างจำเพาะ (specific binding) ระหว่างสารทั้งสองชนิดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของมวลขึ้นที่ผิวหน้าของคริสตัล ความถี่ที่เกิดขึ้นก่อนและหลังการ binding จึงเปลี่ยนแปลงไป ค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปนี้จะสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยสมการของ Sauerbrey ดังนี้ [3]

$$\Delta F = -2.3 \times 10^{6} F^{2} \Delta M/A$$

เมื่อ ΔF = ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีแรงมากระทำหรือมีการเปลี่ยนแปลงของมวลเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของคริสตัล (Hz)

F = ความถี่พื้นฐาน (fundamental frequency) ของคริสตัล (Hz)

ΔM = มวลที่ถูก adsorp ลงบนผิวหน้าของคริสตัล (g)

A = พื้นที่ผิวของขั้วอิเลกโทรดบนคริสตัล (cm^2)

จากหลักการที่กล่าวมา สามารถนำพีโซอิเลกตริกคริสตัลมาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดปริมาณสารต่าง ๆได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะได้กล่าวถึงการใช้พีโซอิเลกตริกคริสตัลไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดปริมาณ ออร์กาโนฟอสฟอรัส

2. หลักการของไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัส

การวัดปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยใช้พีโซอิเลกตริกคริสตัลเป็นทรานส์ดิวเซอร์ ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างออร์กาโนฟอสฟอรัสกับสารชีวภาพ ซึ่งในที่นี้ คือ เอนไซม์acetylcholinesteras โดยทั่วไปแล้วออร์กาโนฟอสฟอรัสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้เนื่องจากออร์กาโนฟอสฟอรัส จะมี phosphoryl หรือ thiophosphoryl เป็นองค์ประกอบ เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์กลุ่ม cholinesterase (เช่น acetylcholinesterase หรือ butyrylcholinesterase) จะเกิดสารประกอบที่เรียกว่า "phosphoryl containing compound" ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งสามารถวัดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้โดยการใช้ทรานส์ดิวเซอร์ที่ใช้หลักการทางเคมีไฟฟ้า แต่ในกรณีที่ใช้ทรานส์ดิวเซอร์เป็นพีโซอิเลกตริกคริสตัลการเกิด "phosphoryl containing compound" บนผิวหน้าของคริสตัล ทำให้มวลบนผิวหน้าเพิ่มมากขึ้นความถี่ที่เกิดขึ้นจากการสั่นจึงลดลง ซึ่งความถี่ที่ลดลงหรือเปลี่ยนแปลงไปนี้เองจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของออร์กาโนฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง

3. การตรึงเอนไซม์เพื่อประกอบเป็นหัววัดออร์กาโนฟอสฟอรัส

ในงานวิจัยนี้ตรึงเอนไซม์ acetylcholinesterase ลงบนขั้วอิเลกโทรดที่เป็นเงินของผลึกควอทซ์ขนาดความถี่ 10 เมกะเฮิร์ทซ์ ขั้นตอนต่าง ๆ ของการตรึงเอนไซม์มีดังนี้

1. โมดิฟายด์ขั้วอิเลกโทรดด้วย aminopropyltriethoxysilane (APTES) โดยจุ่มผลึกควอทซ์ใน 5% APTES (ใน toluene) 2 ชั่วโมง ล้าง, ทำให้แห้ง และอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 4-8 ชั่วโมง

2. จุ่มผลึกควอทซ์ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ใน 2.5% ของ glutaraldehyde (GA) เป็นวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์

3. หยดสารละลายของเอนไซม์ acetylcholinesterase (ความเข้มข้น 30 mg/ml ml) 0.2 l ด้วยไซริง[illegible]ลงบนผิวหน้าของขั้วอิเลกโทรด เกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งให้แห้งประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย

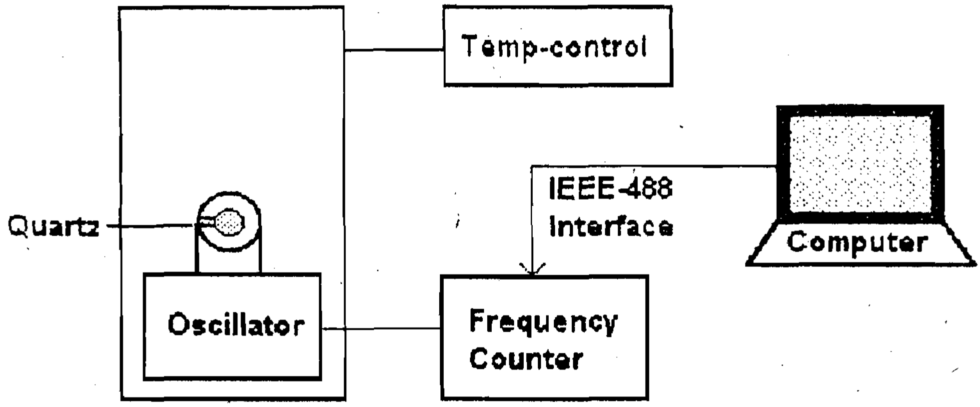
สารละลาย glycine เพื่อบล็อคกลุ่มของ aldehyde ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทิ้งให้แห้งแล้วนำไปใช้วัดปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

4. การออกแบบและพัฒนาระบบวัด

ระบบวัดในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. วงจรออสซิลเลเตอร์
2. เครื่องวัดความถี่
3. คอมพิวเตอร์
4. โปรแกรมเก็บข้อมูล

ส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบวัดแสดงเป็นไดอะแกรมดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ไดอะแกรมระบบวัด

วงจรออสซิลเลเตอร์

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกผลึกควอทซ์ AT-cut ขนาดความถี่ 10 MHz ชนิดขั้วเป็นทรานสดิวเซอร์ และทำการออกแบบวงจรออสซิลเลเตอร์เพื่อขับผลึกดังกล่าว ลักษณะของวงจรประกอบด้วยวงจรออสซิลเลเตอร์ 2 ส่วน ส่วนแรกทำหน้าที่เป็นผลึกอ้างอิง (reference crystal) และส่วนที่สองเป็นผลึกใช้งาน (working crystal) ในการประยุกต์เป็นไบโอเซนเซอร์ ผลึกใช้งานจะเคลือบหรือตรึงฟิล์มทางชีวภาพ เมื่อสารที่จะตรวจวัดเกิด binding กับฟิล์มทางชีวภาพจะทำให้มวลเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความถี่ของผลึกใช้งานลดลง ความถี่ที่เปลี่ยนแปลงนี้นอกจากเกิดจากมวลที่เปลี่ยนแปลงแล้ว ยังเกิดจากผลของอุณหภูมิและระยะ

และระยะเวลาด้วย ดังนั้นความถี่จากผลึกอ้างอิงจะปรับแก้ผลทั้งสอง ความถี่จากออสซิลเลเตอร์ทั้งสองเมื่อนำเข้าส่วนฟลิบฟลอบ (IC 7474) จะให้เอาท์พุทเป็นผลต่างความถี่ของทั้งสองวงจร และผ่านระบบทางแสงแล้ววัดความถี่ด้วยเครื่องวัดความถี่

เครื่องวัดความถี่

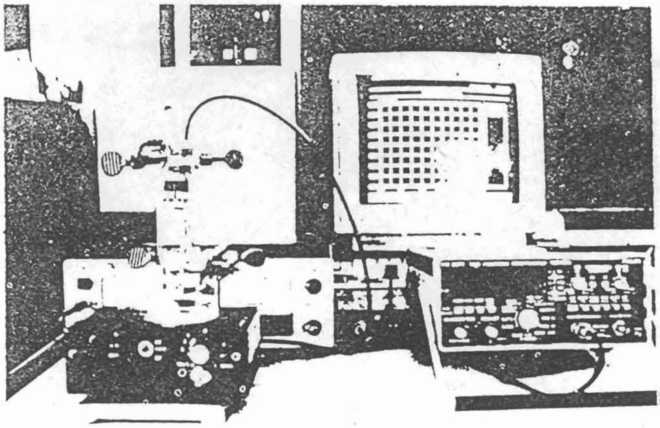
ใช้เครื่องวัดความถี่ของบริษัท PHILIPS โมเดล PM 6670 วัดความถี่ช่วง 0.1 Hz ถึง 120 MHz สามารถเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์โดยใช้ IEEE-488 อินเตอร์เฟส

คอมพิวเตอร์

ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ 32 บิท รับข้อมูลความถี่จากเครื่องวัดความถี่โดย IEEE-488 อินเตอร์ - เฟสการ์ดที่พัฒนาขึ้น

โปรแกรมเก็บข้อมูล

พัฒนาโปรแกรมโดยใช้ภาษาปาสคาล โปรแกรมจะทำการอ่านข้อมูลความถี่จากเครื่องวัดเข้ามาแสดงเป็นกราฟบนจอมอนิเตอร์ และบันทึกข้อมูลลงดิสเก็ต ข้อมูลที่บันทึกสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมโลตัส

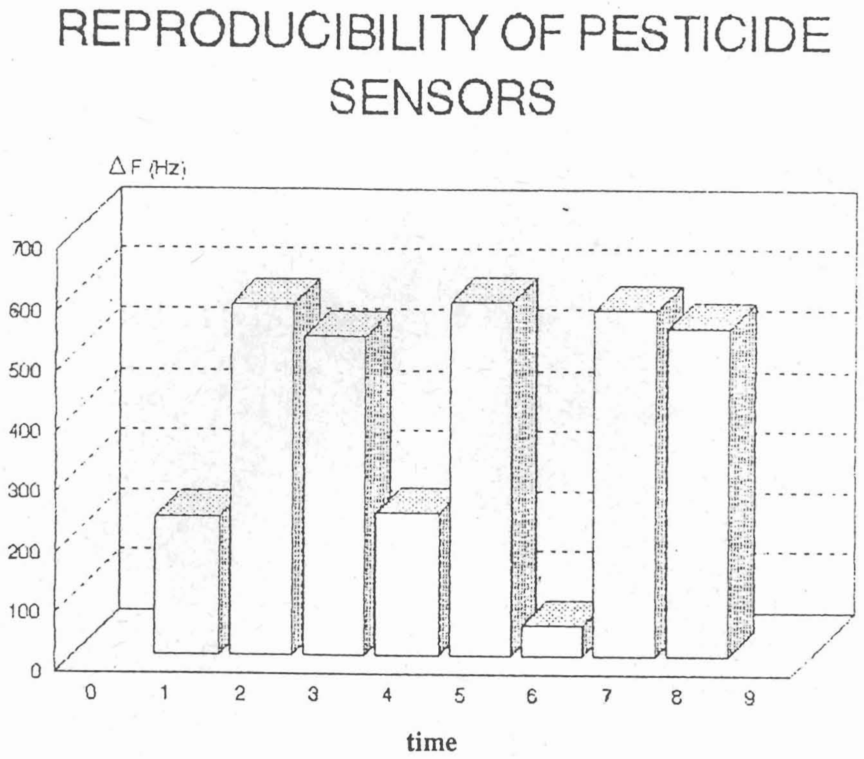


รูปที่ 3 ระบบวัดความถี่

5. การทดสอบหัววัด

ในขั้นต้นนี้การทดสอบการใช้งานของระบบวัดจะใช้วิธีที่เรียกว่า "dip and dry" คือหลังจากที่ได้เตรียมหัววัดแล้ว นำหัววัดไปวัดความาถี่เป็นค่า F_1 จากนั้นจุ่มหัววัดลงในสารละลายที่มีออร์กาโนฟอสฟอรัส ทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่งแล้วจึงทำหัววัดให้แห้ง วัดความถี่ที่เกิดขึ้นเป็นค่า F_2 ค่าความแตกต่างของความถี่ (ΔF) คำนวณจาก $F_1 - F_2$ ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณของออร์กาโนฟอสฟอรัสที่มีในสารละลาย

ออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ Methyl Parathion โดยละลายใน Methyl Cellosolve เตรียมเป็น stock solution เข้มข้น 1000 ppm. เมื่อจะทำการทดสอบจึงเติม Methyl Parathion ลงในเวสเซล (vessel) ที่มี 0.05 โมล่าร์เฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในเวสเซลเป็น 0.1 ppm. จากนั้นแช่หัววัดในสารละลายเป็นเวลา 15 นาที นำขึ้นมาทำให้แห้งแล้วนำมาวัดค่า F_2 ค่าความแตกต่างของความถี่ (ΔF) เมื่อทดสอบกับหัววัด 8 อัน แสดงไว้ในรูปที่ 4

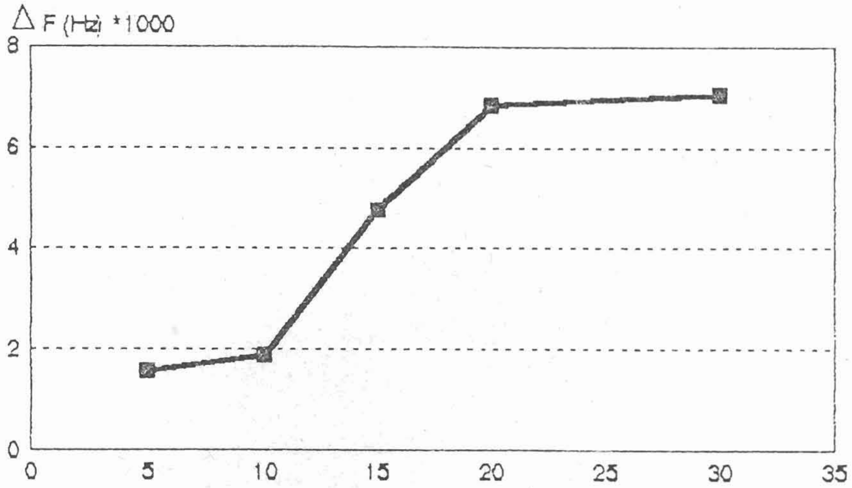


รูปที่ 4 แสดงถึงค่า F ของหัววัดออร์กาโนฟอสฟอรัสที่เตรียมขึ้น จำนวน 8 อัน

จากผลการทดลองที่ได้จะสังเกตเห็นว่ามีหัววัดบางอันที่ค่า ΔF แตกต่างไปจากอันอื่น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหัววัดนั้น ๆ มีเอนไซม์ acetylcholinesterase ตรึงติดอยู่ในปริมาณที่แตกต่างไปจากหัววัดอันอื่น การจับระหว่างเอนไซม์-ออร์กาโนฟอสฟอรัส จึงมีความแตกต่างจากหัววัดอันอื่นด้วย ซึ่งจากผลนี้เองทำให้ต้องปรับปรุงเทคนิคของการตรึงเอนไซม์

เพื่อที่จะหาเวลาที่เหมาะสมในการ incubate หัววัดในสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส จึงได้ทดลองแปรเปลี่ยน incubation time ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (รูปที่ 5) จากผลการทดลองในขั้นต้นนี้พบว่า

เวลา 20 นาที เซนเซอร์จะให้ขนาดของสัญญาณที่สูงกว่าช่วงเวลาอื่นอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตาม incubation time ที่เหมาะสมต้องขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนผลึกควอทซ์ด้วยเช่นกัน ซึ่งในส่วนนี้จะได้ดำเนินการในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง ΔF กับ incubation time

6. สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยที่ระบบทรานส์ดิวเซอร์เป็นพีโซอิเลกตริกคริสตัล ออกแบบและพัฒนาระบบวัด, ระบบเก็บข้อมูลและประมวลผลโดยคอมพิวเตอร์ ในขั้นตอนแรกได้ทำการทดสอบการทำงานขั้นพื้นฐานของหัววัดและระบบวัด ซึ่งสามารถทำงานได้ แต่ต้องทำการปรับปรุงในส่วนของเทคนิคการตรึงเอนไซม์ให้ดีขึ้น ในขั้นต่อไปเป็นการทดสอบถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อหัววัดที่สร้างขึ้น และศึกษาถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะ

สมต่อการทำงานของหัววัดนี้ นอกจากนี้จะมีการพัฒนาระบบวัดที่ปัจจุบันเป็นแบบ "dip and dry" ให้เป็นการวัดที่ทำใน liquid phase

7. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีอิเลกทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้

8. เอกสารอ้างอิง

1. Anthony P.F Turner, Isao Karube and George S. Wilson. 1987. Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press. p.551.
2. เกรียงศักดิ์ แซ่ก๊ง 2539 "สร้างสัญญาณนาฬิกาด้วยคริสตอล" เซมิคอนดักเตอร์, ฉบับประจำเดือน ต.ค. - พ.ย. หน้า 210-214
3. Jerome Ngeh-Ngwainbi, Ahmad A. Suleiman and George G. Guilbault. 1990. "Piezoelectric Crystal Biosensors" Biosensors and Bioelectronics Vol.5, pp. 13-26.