

ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมีต้นทุนต่ำจากชีวอิเล็กโทรดทองแดงและอะลูมิเนียม สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์

A Low-cost Electrochemical Biosensor With Copper and Aluminum Electrodes for Alcohol Detection

ชญานาม ไชยชาติ (Chanyamon Chaiyachati)* ทินกร คำแสน (Tinnakorn Kumsaen)**

อรณัฐ ชูชื่น (Oranat Chuchuen)^{1***}

(Received: August 4, 2023; Revised: September 18, 2023; Accepted: September 19, 2023)

บทคัดย่อ

การเมาแล้วขับถือเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่สำคัญที่นำไปสู่การเกิดอุบัติเหตุบนท้องถนนทั่วโลก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแผ่นไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษต้นทุนต่ำสำหรับตรวจวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์โดยใช้หลักการไฟฟ้าเคมีผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา แผ่นไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าแอโนดและแคโทดที่ทำจากเทปทองแดงและอะลูมิเนียมตามลำดับ และถูกออกแบบให้เชื่อมต่อกับโมดูลเซนเซอร์ทางอิเล็กทรอนิกส์สำหรับการอ่านและประมวลผลสัญญาณ จากผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ในการวัดสารละลายแอลกอฮอล์ในช่วงความเข้มข้น 9-36 mM พบว่าเอนไซม์มีความจำเป็นต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์เนื่องจากทำให้สัญญาณไฟฟ้าจากไบโอเซนเซอร์แปรผันอย่างเป็นเส้นตรงต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และมีความไว (sensitivity) ในการวัดสูงกว่าการไม่ใช้เอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการวัดสัญญาณไฟฟ้าเคมีจากแผ่นไบโอเซนเซอร์ด้วยการวัดกระแสไฟฟ้าให้ค่าความไว (0.5499–1.0915 $\mu\text{A}/\text{mM}$) ที่สูงกว่าการวัดด้วยความต่างศักย์ (0.0010–0.0022 V/mM) โดยความไวมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 1.0915 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ($R^2 = 0.8410$) ซึ่งได้จากการวัดกระแสไฟฟ้าที่ใกล้บริเวณการเกิดปฏิกิริยาตรงส่วนกลางของแผ่นไบโอเซนเซอร์ อีกทั้งผลการศึกษายังพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมและทำให้เกิดความไวในการวัดสูงสุดอยู่ที่ 20% v/v โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่ 1.9478 mM แผ่นไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีราคาอยู่ที่ประมาณ 12 บาท ซึ่งถูกกว่าเครื่องวัดแอลกอฮอล์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน อีกทั้งยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้งานในลักษณะแผ่นตรวจวัดแอลกอฮอล์แบบพกพาแบบใช้แล้วทิ้งเพื่อป้องกันอุบัติเหตุจากการเมาแล้วขับต่อไปได้

¹Corresponding author: oranat@kku.ac.th

*นักศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Student, Master of Engineering Program in Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

**อาจารย์ สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Lecturer, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

***อาจารย์ สาขาวิชาวิศวกรรมเคมีและหลักสูตรวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Lecturer, Department of Chemical Engineering and Biomedical Engineering Program, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

ABSTRACT

Drunk driving is one of the leading causes of traffic accidents worldwide.-This research aimed to develop a low-cost paper-based electrochemical biosensor for alcohol concentration measurement utilizing an alcohol oxidation reaction catalyzed by the alcohol oxidase enzyme. The anode and cathode electrodes of the paper-based biosensor were made of copper and aluminum tapes, respectively, and were coupled to electronic sensor modules for signal reading and processing. The results demonstrated that the oxidase enzyme was necessary for the biosensor to function, resulting in a linear signal response with alcohol concentrations ranging from 9 to 36 mM. The sensitivity of the enzyme-coated biosensor was significantly higher than that of the enzyme-free biosensor. Moreover, measuring the biosensor's electrochemical signal by current was found to yield a higher sensitivity ($0.5499 - 1.0915 \mu\text{A}/\text{mM}$) than voltage measurements ($0.0010 - 0.0022 \text{ V}/\text{mM}$). The maximum sensitivity of $1.0915 \mu\text{A}/\text{mM}$ ($R^2 = 0.8410$) was obtained by measuring the current near the reaction zone at the center of the biosensor sheet. The optimum enzyme concentration that gave rise to the maximum sensitivity was found to be 20% v/v with a detection limit of 1.9478 mM. The biosensor was estimated to cost approximately 12 baht, considerably cheaper than the current breathalyzer-based method, and could therefore be further developed as a portable, disposable alcohol test pad to prevent drunk driving accidents.

คำสำคัญ: ไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษ ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี การตรวจวัดแอลกอฮอล์

Keywords: Paper-based biosensor, Electrochemical biosensor, Alcohol measurement

บทนำ

อุบัติเหตุบนท้องถนนนำไปสู่ความเสียหายต่อทั้งชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกเป็นจำนวนมาก สำหรับประเทศไทยนั้นจากสถิติการเกิดอุบัติเหตุบนท้องถนนปี พ.ศ. 2562 ของกระทรวงคมนาคม พบว่าการเมาแล้วขับเป็น 1 ใน 5 ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดอุบัติเหตุทางถนนมากถึง 569 ครั้ง หรือคิดเป็นร้อยละ 2.84 ของสาเหตุการเกิดอุบัติเหตุทั้งหมด [1] อีกทั้งการดื่มแอลกอฮอล์ยังเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักที่ทำให้เกิดอุบัติเหตุบนท้องถนนในช่วงเทศกาลหยุดยาว โดยจากสถิติการเกิดอุบัติเหตุในช่วงวันหยุดยาวของไทย เช่น เทศกาลสงกรานต์และปีใหม่ประจำปี พ.ศ. 2560 การเมาแล้วขับเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอุบัติเหตุทางถนนที่มีผู้ได้รับบาดเจ็บและเสียชีวิตประมาณ 1700 คน [2] เนื่องจากการดื่มแอลกอฮอล์ส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของสมอง ทำให้ความสามารถในการควบคุมการทำงานของร่างกายและความคิดรวมไปถึงการทรงตัวลดลง [3] ซึ่งเมื่อขับขึ้นบนท้องถนนจะเสี่ยงต่อการเกิดอุบัติเหตุได้ กล่าวคือ การมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือด 50, 100, 150 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (10.85 mM 21.7mM และ 32.55 mM) ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดอุบัติเหตุมากขึ้นเป็น 2 เท่า 6 เท่า และสูงถึง 40 เท่า ตามลำดับ [4] ซึ่งจะเห็นว่ายังมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือดมากยิ่งมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดอุบัติเหตุมากขึ้นตามไปด้วย

วิธีการตรวจวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ได้รับความนิยม คือ วิธีเป่าลมหายใจ (breathalyzer method) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในการใช้ภาคสนามจึงนิยมนำมาตรวจวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ของผู้ที่ขับขึ้นบนท้องถนน [5] แต่มีข้อจำกัดในแง่ของราคาเครื่องมือที่ค่อนข้างสูง และอาจได้ค่าที่ไม่แม่นยำ เนื่องจากหากดื่มเครื่องดื่มบางชนิด เช่น นม หรือน้ำเป็นจำนวนมากจะส่งผลทำให้วัดค่าแอลกอฮอล์ได้ลดลง จึงทำให้ได้ผลตรวจที่คลาดเคลื่อน นอกจากนี้การใช้เครื่องเป่า

แอลกอฮอล์จะต้องมีเจ้าหน้าที่คอยตั้งจุดในการตรวจวัดซึ่งอาจจะไม่ครอบคลุมทุกพื้นที่ ทำให้เป็นช่องโหว่ในการตรวจวัด ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดอุบัติเหตุได้ อีกทั้งยังมีโอกาสที่ก่อให้เกิดการติดต่อโรคผ่านทางเดินหายใจ เช่น โควิด 19 ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ ในการตรวจวัดแอลกอฮอล์ เช่น Khemtonglang et al. [6] ได้ทำการพัฒนาเครื่องมือในการวัดแอลกอฮอล์แบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการตรวจวัดแอลกอฮอล์ผ่านผิวหนัง ด้วยแก๊สเซนเซอร์ที่ทำจากโลหะออกไซด์ (metal oxide gas sensor) โดยความต้านทานของโลหะออกไซด์ในเซนเซอร์จะเปลี่ยนไปเมื่อเกิดการตรวจจับแอลกอฮอล์ซึ่งจะทำให้ความต้านเปลี่ยนและเกิดการไหลของอิเล็กตรอนจึงสามารถวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นได้ โดยกระแสไฟฟ้าจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ทั้งนี้การวัดแอลกอฮอล์ผ่านไอรยะเหยที่ผิวหนังนั้นเป็นวิธีการที่คล้ายกับการเป่าลมหายใจแต่จะสามารถวัดระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์อย่างต่อเนื่องได้ และในงานวิจัยของ Li et al. [7] ได้ทำการออกแบบอุปกรณ์ให้มีช่องที่ทำให้แก๊สสามารถระเหยเพื่อเข้าสู่ตัวเซนเซอร์ โดยเอทานอลในเหงื่อจะเข้าที่ขั้วแอโนดรวมกับออกซิเจนที่เข้าผ่านขั้วแคโทดทำให้เกิดน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะให้อิเล็กตรอนออกมาซึ่งสามารถวัดอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นได้ผ่านการวัดกระแสไฟฟ้า ดังนั้น สัญญาณที่ได้จากการวัดจะบ่งบอกถึงปริมาณเอทานอลในเหงื่อและในร่างกายของผู้สวมใส่ อย่างไรก็ตามเซนเซอร์ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากให้ค่าความแม่นยำในการวัดต่ำเมื่อนำมาทดสอบในมนุษย์ จึงทำให้มีการพัฒนาเทคนิคไฟฟ้าเคมีในการวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงทำให้ความแม่นยำในการตรวจวัดเพิ่มสูงขึ้น โดยมีงานวิจัยที่พัฒนาให้เกิดอุปกรณ์ที่ใช้วัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ ผ่านสารคัดหลั่งต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเหงื่อ เนื่องจากเหงื่อมีอยู่ทั่วร่างกายและเป็นแหล่งที่จับแอลกอฮอล์ออกจากร่างกายจึงสามารถวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือดจากเหงื่อได้ ยกตัวอย่าง เช่น Kim et al. [8] ได้พัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อใช้วัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ผ่านแผ่นแปะลักษณะรอยสัก โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์เพื่อให้สามารถวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาได้ แต่ในงานมีการใช้เครื่องมือผลิตและเครื่องมือวัดสัญญาณที่มีความซับซ้อนและราคาสูง นอกจากนี้ Bhide et al. [9] ได้ทำการวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์แบบสวมใส่ ซึ่งสามารถวัดได้ทั้งแอลกอฮอล์และกลูโคส โดยนำทองคำและซิงออกไซด์มาเป็นอิเล็กโทรด โดยในการวัดแอลกอฮอล์จะใช้ แอลกอฮอล์ออกซิเดสเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ เป็นอะซิเตลดีไฮด์ทำให้เกิดความแตกต่างของประจุในแต่ละชั้นซึ่งสามารถนำค่าความแตกต่างของประจุมาใช้ในหาความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่วัดได้ ข้อดี คือ มีความแม่นยำและสามารถวัดค่าได้รวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องของราคาเนื่องจากใช้ไฟฟ้าทองคำที่ใช้เป็นวัสดุขั้วไฟฟ้าที่มีราคาสูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการออกแบบและพัฒนาแผ่นไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมีที่สามารถวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ โดยกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ แผ่นไบโอเซนเซอร์จะประกอบไปด้วยขั้วไฟฟ้า 2 ชนิด คือ ขั้วไฟฟ้าแคโทดจากอะลูมิเนียมและแอโนดจากทองแดง โดยใช้กระดาษกรองเป็นตัวรองรับการเกิดปฏิกิริยา และมีการออกแบบวงจรไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัดกระแสไฟฟ้าจากปฏิกิริยาเคมีโดยใช้ HX711 ในการแปลงและขยายสัญญาณจากแผ่นไบโอเซนเซอร์ซึ่งเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าและส่งสัญญาณที่ได้ไปยัง ESP32 ซึ่งทำหน้าที่แปลงสัญญาณไปยังหน้าจอแสดงผลเพื่อแสดงผลการวัดแอลกอฮอล์จากแผ่นไบโอเซนเซอร์ทำให้แผ่นไบโอเซนเซอร์นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้วัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ของผู้ขับขี่รถยนต์ รถโดยสารสาธารณะ หรือผู้ที่เป้นโรคแอลกอฮอล์เรื้อรังที่ต้องการทราบความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือดของตนเองตลอดเวลา หรือหน่วยงานต่างๆ ที่ต้องการติดตามความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือดของผู้ที่มีประวัติในฐานความผิดมาแล้ว ขับ ดังนั้นอุปกรณ์ชนิดนี้จะสามารถช่วยลดการเกิดอุบัติเหตุบนท้องถนนต่อไปได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อออกแบบแผ่นไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษจากข้าวโอ๊ตเล็กโพรททองแดงและอะลูมิเนียม พร้อมอุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี
2. เพื่อเปรียบเทียบการวัดสัญญาณไฟฟ้าเคมีระหว่างการวัดความต่างศักย์และการวัดกระแสไฟฟ้าที่ตำแหน่งต่างกันของแผ่นไบโอเซนเซอร์
3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสต่อความไว (sensitivity) ในการวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ของแผ่นไบโอเซนเซอร์

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

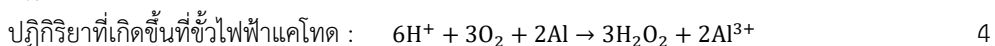
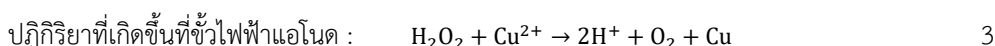
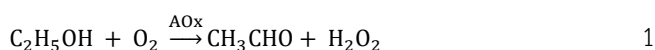
เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสจาก *Pichia pastoris* (10-40 units/mg protein) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 99% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟตแอนไฮดรัส และโซเดียมฟอสเฟตแอนไฮดรัส จากบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย และโพแทสเซียมคลอไรด์ จากบริษัท Kemaus ประเทศออสเตรเลีย สารเคมีเพื่อใช้ทดสอบแผ่นไบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 99.8% จากบริษัท Kemaus ประเทศออสเตรเลีย และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างแอลกอฮอล์เซนเซอร์

อุปกรณ์ในการเตรียมแผ่นไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย เทปอะลูมิเนียมจากบริษัท Duct Excel ประเทศไทย เทปทองแดงจากบริษัท Kidmai store ประเทศไทย และกระดาษกรองเบอร์ 1 จากบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ในการแปลงและส่งสัญญาณประกอบด้วย ESP32 (NodeMCU Gooouu ESP32 DEVKIT Wi-Fi and Bluetooth แบบ 38 ขา) สำหรับใช้เป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ และ HX711 (AD Serial Port Module Single Chip Microcomputer Electronic Scale Weighing Sensor 24-Bit Precision Pressure Sensor) สำหรับขยายสัญญาณอนาล็อกและแปลงสัญญาณอนาล็อกเป็นดิจิตอลจากบริษัท Arduino ประเทศไทย

3. หลักการออกแบบและประดิษฐ์แผ่นไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดแอลกอฮอล์

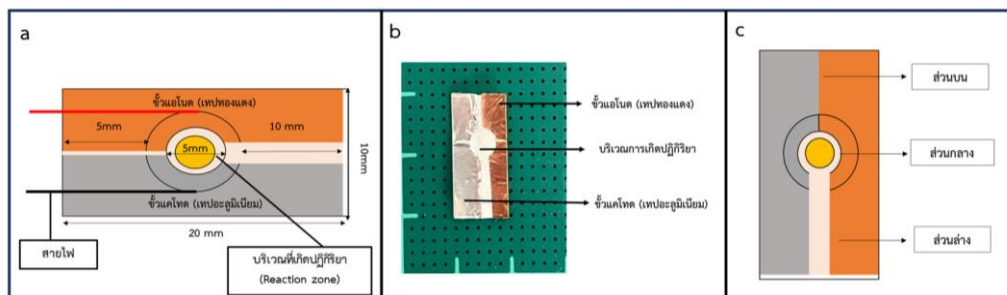
งานวิจัยนี้พัฒนาไบโอเซนเซอร์จากกระดาษโดยใช้หลักการทางไฟฟ้าเคมีในการตรวจวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยา โดยในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์นั้น เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอทานอลกับออกซิเจนเกิดเป็นอะซิตัลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สมการที่ 1) โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่เสถียรทำให้สามารถแตกตัวได้เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน (สมการที่ 2) นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ขั้วแอโนด (สมการที่ 3) และรีดักชันที่ขั้วแคโทด (สมการที่ 4) และทำให้เกิดการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสองจึงสามารถวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ผ่านกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาเคมีที่ 1 และ 2 ได้



แผ่นไบโอเซนเซอร์มีขนาดกว้าง 10 มิลลิเมตร ยาว 20 มิลลิเมตร ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าแคโทด คือ อะลูมิเนียมขั้วไฟฟ้าแอโนด คือ ทองแดง เนื่องจากมีความสามารถในการนำไฟฟ้าสูง และมีค่าศักย์ไฟฟ้าที่สภาวะมาตรฐาน (E^0 cell) ต่างกันมากทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนระหว่างกันได้ดี โดยทั้งสองขั้วไฟฟ้าต้องไม่ติดกันเนื่องจากป้องกันการเกิดไฟฟ้าลัดวงจร ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถวัดค่าทางไฟฟ้าได้ ขั้วทั้งสองจะถูกติดบนตัวรองรับเดียวกันคือกระดาษกรองซึ่งทำหน้าที่เหมือนสะพานเกลือที่ช่วยถ่ายโอนไอออน เนื่องจากกระดาษกรองเป็นตัวรองรับที่ ง่าย และมีราคาถูก นอกจากนี้กระดาษกรองยังมีเส้นใยเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเซลลูโลสมีความสามารถในการตรึงเอนไซม์เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่บนพื้นผิวจึงทำให้เอนไซม์สามารถยึดเกาะได้ดีบนพื้นผิวของกระดาษ [10-11] ส่วนที่เกิดปฏิกิริยาที่มีการหยุดเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และออกซิเจน จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับในงานวิจัยที่ใช้ไบโอเซนเซอร์ในการวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่อิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) ที่ทำหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยา มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร [12] มีลักษณะเป็นวงกลมเพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสของการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นหากมีเส้นผ่านศูนย์กลางมาก หมายถึงจะมีพื้นที่สัมผัสที่ในการเกิดปฏิกิริยา มาก ส่งผลให้ปฏิกิริยาเกิดได้มากขึ้น จึงทำให้เกิดอิเล็กตรอนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการวัดสัญญาณทางไฟฟ้า แต่เนื่องด้วยแผ่นไบโอเซนเซอร์ถูกออกแบบมาให้มีขนาดเล็กเหมาะสำหรับการพกพาดังนั้น จึงเลือกใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เนื่องจากมีขนาดพอเหมาะกับขนาดของแผ่นไบโอเซนเซอร์ โดยหากเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดใหญ่จะทำให้ใช้ปริมาณเอนไซม์มาก ส่งผลต่อต้นทุนวัสดุในการประดิษฐ์ที่จะเพิ่มมากขึ้นจนทำให้ราคาต่อหนึ่งแผ่นมากเกินไปกว่าราคาควบคุมที่ต้องการ โดยราคาควบคุมที่ต้องการของแผ่นไบโอเซนเซอร์ต่อหนึ่งแผ่นควรมีราคาไม่เกิน 30 บาท และถ้าหากเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กนอกจากจะส่งผลให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสน้อย ยังมีผลต่อการประดิษฐ์แผ่นไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากจะควบคุมขนาดให้เท่ากันทุกแผ่นได้ยาก

ขั้นตอนการประดิษฐ์แผ่นไบโอเซนเซอร์ มีดังนี้

1. ตัดกระดาษกรองขนาด 10 x 20 มิลลิเมตร
2. ใช้เทปทองแดงแปะเพื่อสร้างขั้วไฟฟ้าแอโนดและเทปอะลูมิเนียมแปะเพื่อสร้างขั้วแคโทด โดยเว้นพื้นที่วงกลมตรงกลางขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เพื่อกำหนดบริเวณการเกิดปฏิกิริยา ตามภาพที่ 1a
3. หยดสารละลายเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเนื่องจากมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอลกอฮอล์และออกซิเจน [8] ตรงบริเวณเกิดปฏิกิริยาที่เว้นไว้ โดยตัวอย่างแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมเสร็จพร้อมใช้งานได้แสดงไว้ในภาพที่ 1b
4. นำแผ่นไบโอเซนเซอร์ไปทำการทดสอบกับสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 9-36 mM เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ครอบคลุมในช่วงก่อนมาไปจนถึงช่วงมามากอีกทั้งยังครอบคลุมความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่กฎหมายกำหนด (50mg%) ในน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออนปริมาตร 10 μ l



ภาพที่ 1 แผ่นไบโอเซนเซอร์และอุปกรณ์ในการวัดสัญญาณไฟฟ้าเคมี (a) ส่วนประกอบของแผ่นไบโอเซนเซอร์ (b) ภาพจริงของแผ่นไบโอเซนเซอร์ (c) บริเวณในการวัดสัญญาณบนแผ่นไบโอเซนเซอร์ 3 ตำแหน่ง

4. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายในการสร้างแผ่นไบโอเซนเซอร์

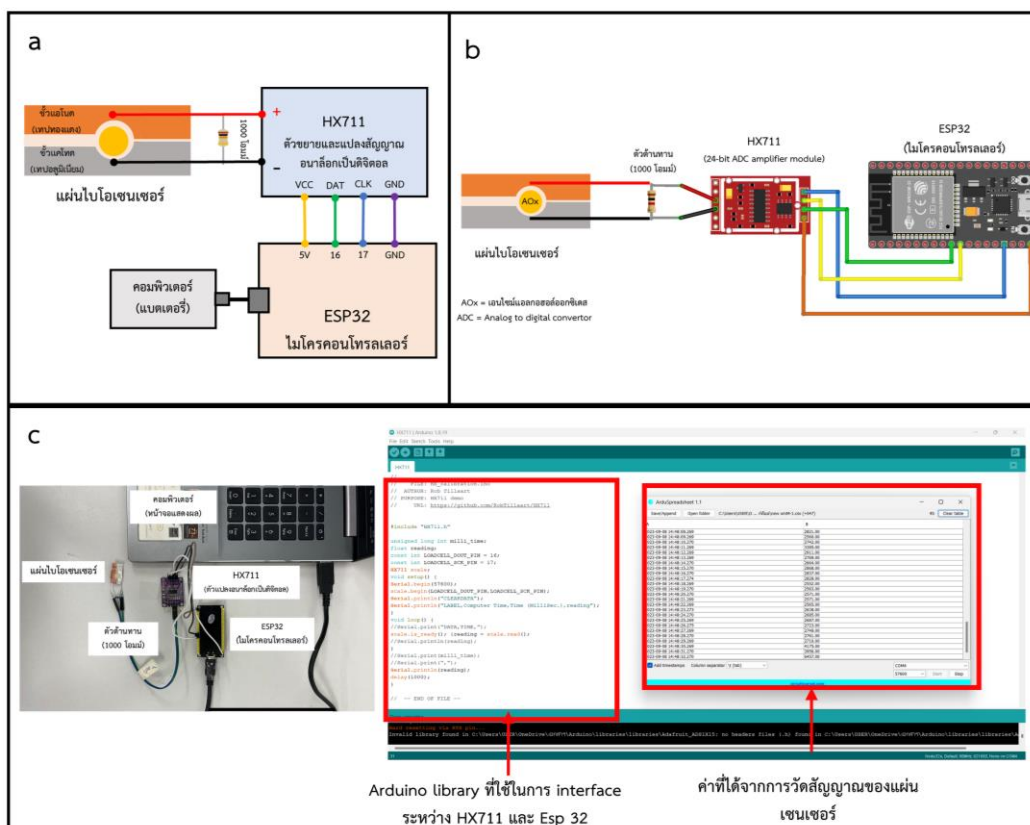
ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสทำให้อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียสและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (0.1 M, pH 7.4) ซึ่งเตรียมได้โดยการผสม NaCl 8 กรัม KCl 0.2 กรัม Na_2HPO_4 1.44 กรัม และ KH_2PO_4 0.245 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. วิธีการทดสอบผลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสต่อการวัดแอลกอฮอล์ของแผ่นไบโอเซนเซอร์

เตรียมสารละลายแอลกอฮอล์ในน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 9, 18, 27 และ 36 mM จากนั้นหยดสารละลายแอลกอฮอล์ปริมาตร 10 μL ลงบนแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่บริเวณการเกิดปฏิกิริยาในแผ่นที่ไม่มีเอนไซม์และแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่มีเอนไซม์ที่เตรียมโดยใช้สารละลายเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส ความเข้มข้น 100% v/v ปริมาตร 6 μL หยดลงบริเวณการเกิดปฏิกิริยาตามภาพที่ 1a ทิ้งไว้ให้แห้ง 10 นาที จากนั้นใช้มัลติมิเตอร์วัดสัญญาณทางไฟฟ้าเคมีที่เกิดขึ้น 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ส่วนบน (ห่างจากปลายกระดาศส่วนบนประมาณ 3 มิลลิเมตร) ส่วนกลาง (ใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยา) และส่วนล่าง (ห่างจากปลายกระดาศส่วนล่างประมาณ 3 มิลลิเมตร) ตามภาพที่ 1b และ 1c สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และสัญญาณทางไฟฟ้าเคมี เพื่อเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ของแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์เพื่อทดสอบผลของเอนไซม์ในการวัดแอลกอฮอล์

6. วิธีการทดสอบความไว (sensitivity) ของแผ่นไบโอเซนเซอร์โดยเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่อกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์

เตรียมตัวอย่างสารละลายแอลกอฮอล์ในน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 9, 18, 27 และ 36 mM จากนั้นหยดตัวอย่างสารละลายแอลกอฮอล์ตรงบริเวณการเกิดปฏิกิริยา ตามภาพที่ 1a บนแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมไว้โดยใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 100 %v/v ปริมาตร 6 μL สำหรับการเร่งปฏิกิริยาในบริเวณการเกิดปฏิกิริยา ทิ้งไว้ให้แห้ง 10 นาที วัดผลของสัญญาณที่ได้โดยใช้มัลติมิเตอร์ 3 บริเวณ ได้แก่ ส่วนบน (ห่างจากปลายกระดาศส่วนบนประมาณ 3 มิลลิเมตร) ส่วนกลาง (ใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยา) และส่วนล่าง (ห่างจากปลายกระดาศส่วนล่างประมาณ 3 มิลลิเมตร) ตามภาพที่ 1c จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่อกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของเซนเซอร์ในการวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์โดยเปรียบเทียบระหว่างกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ที่ได้เพื่อประเมินความไว (sensitivity) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ในการวัดแอลกอฮอล์ของแผ่นไบโอเซนเซอร์



ภาพที่ 2 แสดงอุปกรณ์ต้นแบบของเซนเซอร์วัดแอลกอฮอล์ (a-b) การต่อวงจรของอิเล็กทรอนิกส์สำหรับการตรวจวัดแอลกอฮอล์จากแผ่นไบโอเซนเซอร์ (c) ภาพจริงของการต่ออุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์กับแผ่นไบโอเซนเซอร์และหน้าจอการแสดงผลขณะทำการวัดแอลกอฮอล์

7. การออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดกระแสไฟฟ้าจากแผ่นเซนเซอร์

การออกแบบอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ดังแผนภาพที่ 2a และ 2b ประกอบไปด้วย แผ่นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์ต่อกับตัวต้านทานคร่อมขนาด 1000 โอห์ม และต่อกับ HX711 ทำหน้าที่เป็นตัวขยายสัญญาณอนาล็อกและแปลงสัญญาณอนาล็อกเป็นดิจิทัล (Analog to digital convertor, ADC) ต่อเข้ากับ ESP32 ซึ่งเป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2c โดยขา DAT ต่อกับขา GPIO16 ของบอร์ด ESP32, ขา CLK ต่อกับขา GPIO17 ของบอร์ด ESP32, ขา VCC ต่อเข้ากับขา 5V ของบอร์ด ESP32, และ ขา GND ต่อเข้ากับขา GND ของบอร์ด ESP32 และต่อขั้วบวกเข้ากับขั้วแอโนด (เทปทองแดง) และขั้วลบต่อกับขั้วแคโทด (เทปอลูมิเนียม) ของแผ่นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์ และต่อไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้กับบอร์ดและใช้แสดงผลของสัญญาณที่ได้จากการวัดแอลกอฮอล์ผ่านซอฟต์แวร์อาร์ดูโน ไอดีอี (Arduino IDE) โดยใช้ Arduino library ดังแสดงในภาพที่ 2c

8. วิธีการทดสอบเพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายเอโนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์

เตรียมอุปกรณ์ในการวัด คือ แผ่นไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมไว้โดยใช้เอนไซม์ปริมาตร 6 μL ความเข้มข้น 100% และ 0.75, 1.5, 3 μL ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินปริมาตร 3 μL เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 20, 33 และ 50% v/v ตามลำดับ หลังจากการหดยเอนไซม์ที่บริเวณการเกิดปฏิกิริยาจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้วัด วิธีการทดสอบ คือนำแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมไว้ต่อกับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ได้แก่ HX711 สำหรับขยาย

สัญญาณนาฬิกาและแปลงสัญญาณจากนาฬิกาเป็นดิจิทัล โดยต่อกับ ESP32 สำหรับเป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ นำตัวต้านทานขนาด 1000 โอห์มมาต่อคร่อม จากนั้นต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์เพื่อแสดงผล ดังแสดงในภาพที่ 2a-c หลังจากนั้นเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์ในน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 9, 18, 27 และ 36 mM โดยจะหยดตัวอย่างสารละลายแอลกอฮอล์แต่ละความเข้มข้นเริ่มจาก 9 ไปจนถึง 36 mM ปริมาตร 10 μL ตามลำดับ อย่างต่อเนื่องลงบนบริเวณกำหนดปฏิกิริยาของแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมไว้ โดยในการหยดความเข้มข้นถัดไปจะรอจนกว่าสัญญาณของตัวอย่างก่อนหน้าลดลงจนถึงเบสไลน์ (baseline) ก่อน จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณที่ได้เพื่อประเมินความเป็นเส้นตรง (linearity) ความไว (sensitivity) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (limit of detection) โดยการใช้วิธีวัด blank solution 10 ค่า [13] และทำการคำนวณโดยใช้สมการที่ 5 เพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสที่เหมาะสม

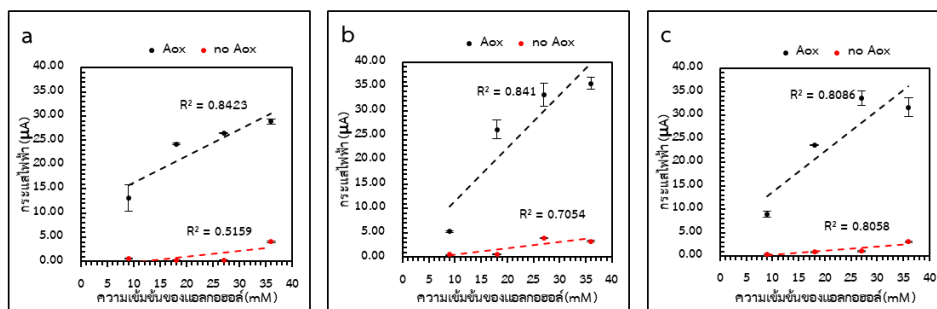
$$\text{limit of detection (LOD)} = 3.3 \times \text{S.D. of blank} / \text{slope} \quad 5$$

(S.D. = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ และ slope = ความชัน)

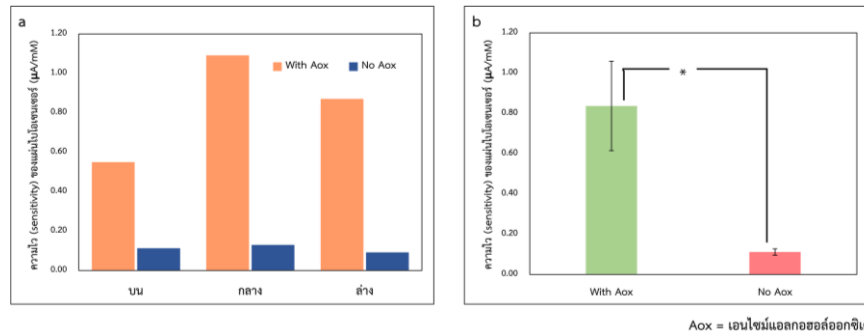
ผลการวิจัย

1. การศึกษาผลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสต่อความไว (sensitivity) ของไบโอเซนเซอร์

จากการทดลองเพื่อศึกษาผลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสต่อความไว (sensitivity) ของไบโอเซนเซอร์ ในการวัดแอลกอฮอล์ในช่วงความเข้มข้น 9-36 mM ซึ่งทำได้โดยวัดกระแสไฟฟ้าด้วยมัลติมิเตอร์ที่บริเวณต่างๆ บนแผ่นไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ ส่วนบน (ห่างจากปลายกระดาศส่วนบนประมาณ 3 มิลลิเมตร) ส่วนกลาง (ใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยา) และส่วนล่าง (ห่างจากปลายกระดาศส่วนล่างประมาณ 3 มิลลิเมตร) พบว่าการใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยามีผลทำให้ค่าความไวในการวัดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงผลการศึกษาในภาพที่ 3-4



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการวัดสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 9, 18, 27, 36 mM ที่ตำแหน่งต่างกันบนแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (With AOX) เส้นสีดำ และไม่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (No AOX) เส้นสีแดง (a) แสดงการวัดบริเวณส่วนบน (b) แสดงการวัดบริเวณส่วนกลาง และ (c) แสดงการวัดบริเวณส่วนล่าง ของแผ่นไบโอเซนเซอร์ แต่ละข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

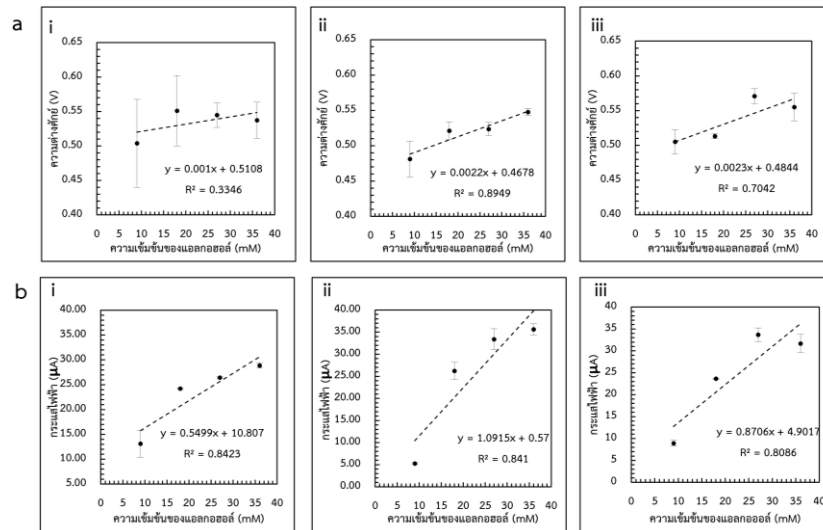


ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ในการวัดแอลกอฮอล์ของแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (With AOX) และไม่มีเอนไซม์ (No AOX) (a) แสดงความไวที่วัดในบริเวณบน กลาง และล่างของแผ่นไบโอเซนเซอร์ และ (b) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความไวจากการวัดทั้งสามตำแหน่ง โดย (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทั้งนี้ในงานวิจัยได้เลือกศึกษาการวัดสารละลายแอลกอฮอล์ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 9 ถึง 36 mM เนื่องจากเป็นช่วงที่ครอบคลุมความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเหียงตั้งแต่การเริ่มต้นสูญเสียความสามารถในการมองเห็นไปจนถึงมากกว่าที่กฎหมายกำหนด (แอลกอฮอล์มากกว่า 50 mg% ในเลือด และ 15.30 mM ในเหียง) จากผลการทดลองภาพที่ 3 จะสังเกตได้ว่า กระแสไฟฟ้าที่วัดได้จากไบโอเซนเซอร์ที่มีการใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยามีค่า อยู่ที่ประมาณ 5-35 μA ซึ่งสูงกว่าไบโอเซนเซอร์ที่ไม่มีการใส่เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสซึ่งให้กระแสไฟฟ้าอยู่ที่ประมาณ 0.6-4 μA อย่างเห็นได้ชัด อีกทั้งยังมีความเป็นเส้นตรง (linearity) สูงดังแสดงให้เห็นจากค่า R^2 ของกราฟที่แสดงในภาพที่ 3 โดย R^2 ของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยามีค่า R^2 เฉลี่ยเท่ากับ 0.8306 ในขณะที่ไบโอเซนเซอร์ที่ไม่มีการใส่เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสจะมีค่า R^2 เท่ากับ 0.6756 นอกจากนี้จากภาพที่ 4 ยังพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความไว (sensitivity) การใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสทำให้ไบโอเซนเซอร์มีความไวในการวัดแอลกอฮอล์สูงกว่าการไม่ใช้เอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) โดยมีค่าความไวเฉลี่ยสูงกว่าประมาณ 7 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และออกซิเจนในอากาศทำให้เมื่อใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยาจะทำให้ไบโอเซนเซอร์มีความไวในการวัดและมีสัญญาณที่แปรผันอย่างเป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ถึงแม้ว่าการไม่ใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาอาจจะสามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ แต่จะให้ค่าความเป็นเส้นตรงและความไวในการวัดที่ต่ำและทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา นั้นหมายความว่าหากต้องการให้ค่าสัญญาณไฟฟ้าสูงและมีค่าความไวสูง ซึ่งหมายถึงความสามารถในการแยกสัญญาณระหว่างความเข้มข้นได้จะต้องใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยามากกว่านี้ซึ่งการใช้เวลามากเกินไปในการรอให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่เหมาะกับการนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่ต้องการการตรวจวัดและแสดงผลทันที ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้เอนไซม์มาช่วงเร่งการเกิดปฏิกิริยาให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ไวขึ้น เพื่อให้สามารถวัดกระแสไฟฟ้าได้อย่างรวดเร็วและเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์เพื่อแสดงผลแบบทันที

2. การเปรียบเทียบการวัดความต่างศักย์และการวัดกระแสไฟฟ้าที่ตำแหน่งต่างกันบนแผ่นไบโอเซนเซอร์

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการวัดสัญญาณไฟฟ้าเคมีของสารละลายแอลกอฮอล์ในช่วงความเข้มข้น 9-36 mM ระหว่างการวัดความต่างศักย์และการวัดกระแสไฟฟ้าด้วยมัลติมิเตอร์ที่ตำแหน่งต่างกันของแผ่นไบโอเซนเซอร์ พบว่าการวัดกระแสไฟฟ้าให้ค่าความไว (sensitivity) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ระหว่างระดับสัญญาณกับความเข้มข้น สูงกว่าการวัดโดยใช้ความต่างศักย์ ดังแสดงผลการทดลองในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบสัญญาณไฟฟ้าเคมีจากแผ่นไบโอเซนเซอร์ในการวัดสารละลายแอลกอฮอล์ด้วยการวัดความต่างศักย์ (a) และกระแสไฟฟ้า (b) ที่ตำแหน่งต่างกัน ได้แก่ (i) บริเวณส่วนบน (ii) บริเวณส่วนกลาง และ (iii) บริเวณส่วนล่าง โดยแต่ละข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

จากผลการศึกษาจะเห็นว่าการวัดสัญญาณไฟฟ้าเคมีจากค่าความต่างศักย์ให้ค่าที่ใกล้เคียงกันในแต่ละความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 5a) ไม่ว่าจะวัดที่ตำแหน่งใดของแผ่นเซนเซอร์ ส่งผลให้ค่าความไว (sensitivity) ในการวัดต่ำ ($0.001-0.0023$ V/mM) นอกจากนี้การวัดความต่างศักย์ทำให้ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่อนข้างสูงซึ่งนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนในการวัดที่สูงตามไปด้วย ดังนั้นการวัดความต่างศักย์จึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้วัดความแตกต่างของความเข้มข้นแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามเมื่อวัดสัญญาณด้วยค่ากระแสไฟฟ้า (ภาพที่ 5b) จะพบว่า ค่าความเป็นเส้นตรง ระหว่างกระแสไฟฟ้าและความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มีค่าใกล้เคียงกันในทุกบริเวณที่ใช้วัด และมีค่าความไวที่สูงกว่าการใช้ความต่างศักย์ในการวัดในทุกตำแหน่งที่วัดอย่างเห็นได้ชัด โดยค่าความไวของการวัดด้วยกระแสไฟฟ้าอยู่ในช่วง $0.5499-1.0915$ $\mu\text{A}/\text{mM}$ ซึ่งสูงกว่าการวัดโดยใช้ความต่างศักย์ถึงประมาณ 379-550 เท่า ส่งผลให้สามารถแยกความเข้มข้นแอลกอฮอล์จากการวัดกระแสไฟฟ้าได้ดีกว่าการวัดความต่างศักย์ อีกทั้งส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดด้วยกระแสไฟฟ้าต่ำกว่าการวัดด้วยความต่างศักย์ ดังนั้นการวัดโดยใช้กระแสไฟฟ้าทำให้ค่าการวัดในแต่ละครั้งที่มีค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยมากกว่า ซึ่งทำให้มีความเที่ยง (precision) มากกว่าการวัดโดยใช้ความต่างศักย์ ด้วยเหตุนี้การวัดสัญญาณจากไบโอเซนเซอร์ด้วยกระแสไฟฟ้าจึงเหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้กับการวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มากกว่าความต่างศักย์ นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งที่เหมาะสมในการวัดสัญญาณ คือ บริเวณตรงกลางของแผ่นไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากให้ค่าความเป็นเส้นตรงระหว่างกระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ($R^2 = 0.8410$) และค่าความไว (1.0915 $\mu\text{A}/\text{mM}$) สูงกว่าการวัดที่บริเวณส่วนบน และบริเวณส่วนล่างซึ่งให้ค่า ค่าความเป็นเส้นตรง ($R^2 = 0.8423$ และ 0.8086) และค่าความไว (0.5499 $\mu\text{A}/\text{mM}$ และ 0.8706 $\mu\text{A}/\text{mM}$) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 4b ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งกลางอยู่ใกล้บริเวณที่เกิดปฏิกิริยามากที่สุด จึงทำให้เป็นบริเวณที่มีอิเล็กตรอนจำนวนมากและเกิดการถ่ายเทของอิเล็กตรอนจากขั้วไฟฟ้าไปยังสายไฟฟ้าได้รวดเร็วกว่าบริเวณอื่นที่ไกลออกไปซึ่งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจะเกิดได้ยากกว่า และอาจเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนระหว่างทางทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ต่ำและมีความคลาดเคลื่อนสูง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความเป็นเส้นตรงของกราฟระหว่างส่วนกลางและส่วนบน พบว่าความเป็นเส้นตรงใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้จากแผ่นไบโอเซนเซอร์บริเวณส่วนบนและส่วนกลางสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มากกว่าการวัดในส่วนล่างเนื่องจากการวัดส่วนบนและส่วนกลางจะอยู่ใกล้บริเวณเกิดปฏิกิริยามากกว่าการวัดในส่วนล่าง แต่เมื่อเปรียบเทียบ

ค่าความไวจะเห็นว่าค่าความไวจากการวัดที่ส่วนกลางจะสูงกว่าการวัดที่ส่วนบนคาดว่าเกิดจากการที่อิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาสามารถไหลผ่านตัวนำไฟฟ้าไปยังสายไฟฟ้าได้เร็วกว่าเพราะใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยาส่งผลให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ดีกว่าจึงทำให้วัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาได้รวดเร็วมากกว่าจึงส่งผลให้ค่าความไวที่ได้สูงกว่า ดังนั้นการติดตั้งสายไฟสำหรับการใช้อ่านกระแสไฟฟ้าจากไบโอเซนเซอร์จึงควรติดตั้งบริเวณส่วนที่ใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยา คือ ตำแหน่งตรงกลางแผ่น โดยอาจจะติดค่อนไปทางส่วนบนแทนการติดออกข้างเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานแต่ต้องให้ปลายสายไฟฟ้าใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยามากที่สุดเพื่อให้อิเล็กตรอนส่งผ่านจากขั้วไฟฟ้าไปยังอุปกรณ์ที่ใช้วัดผ่านสายไฟฟ้าได้ปริมาณมากและรวดเร็ว

3. การออกแบบอุปกรณ์การวัดสัญญาณไฟฟ้าและประมวลผลข้อมูล

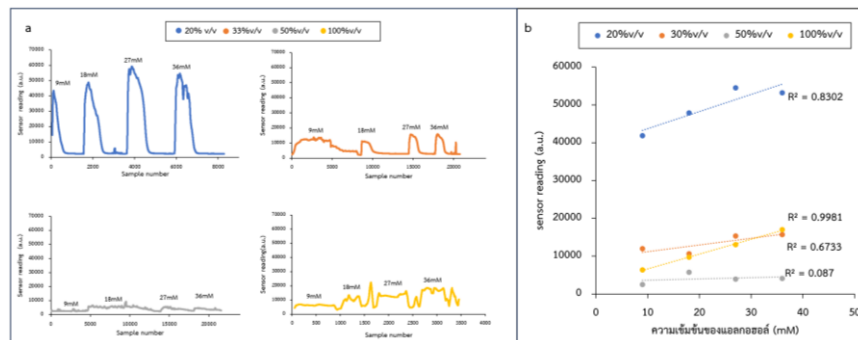
การออกแบบอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ดังแผนภาพที่ 2a และ 2b ประกอบไปด้วย แผ่นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์ต่อกับตัวต้านทานคร่อมขนาด 1000 โอห์ม HX711 ซึ่งเป็นตัวขยายสัญญาณอนาล็อกและแปลงสัญญาณเป็นดิจิทัล (Analog to digital convertor, ADC) เนื่องจากต้องการแปลงสัญญาณอนาล็อกเป็นดิจิทัลที่มีความละเอียดสูง ถึงแม้ในการออกแบบจะมีการต่ออุปกรณ์กับบอร์ด ESP32 ที่ภายในสามารถแปลงสัญญาณอนาล็อกเป็นดิจิทัลได้แต่มีความละเอียดเพียง 12 bit หรือประมาณ 0.8 mV ดังนั้นจึงเลือกใช้โมดูล HX711 เป็น ADC ภายนอกที่มาต่อเข้ากับ ESP32 เพื่อเพิ่มความละเอียดของข้อมูลโดยมีคุณสมบัติของข้อมูลในการแปลงสัญญาณที่มีความละเอียด 24 bit มีตัวขยายสัญญาณที่ใช้กำลังขยาย (gain factor) 128 มีการให้ความต่างศักย์ในการใช้งานที่ 5 V ทำให้ได้ input range ประมาณ ± 20 mV โดยจะแสดงข้อมูลตั้งแต่ 0×800000 ถึง $0 \times 7FFFFF$ hex หรือ -8,388,608 ถึง 8,388,607 [14] ใช้การส่งผ่านข้อมูลดิจิทัลและการอินเตอร์เฟส (interface) ระหว่าง HX711 และ ESP32 แบบโดยอาศัยหลักการสื่อสารแบบอนุกรม (serial communication) แบบหนึ่ง โดยขา DAT ของโมดูล HX711 ต่อกับขา GPIO 16 ของบอร์ด ESP32, ขา CLK ของโมดูล HX711 ต่อกับขา GPIO 17 ของบอร์ด ESP32, ขา VCC ของโมดูล HX711 ต่อเข้ากับขา 5V ของบอร์ด ESP32, และ ขา GND ของโมดูล HX711 ต่อเข้ากับ ขา GND ของบอร์ด ESP32 จากนั้นต่อขั้วบวกเข้ากับขั้วแอโนด (เทปทองแดง) และขั้วลบต่อกับขั้วแคโทด (เทปอลูมิเนียม) ของแผ่นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์ และต่อไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้กับบอร์ดและใช้แสดงผลของสัญญาณผ่านซอฟต์แวร์อาduino ไอดีอี (Arduino IDE)

สำหรับการเตรียมข้อมูล (preprocess) จาก ESP32 ทำได้โดยการใช้ดิจิทัลฟิลเตอร์ (digital filter) ชนิด simple moving average 51 จุด เนื่องจากมีความเหมาะสมในการจัดการข้อมูลดิจิทัล [15] จากนั้นหา สภาวะคงที่ (steady state) โดยคำนวณความชันจากการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) จากการศึกษาพบว่าที่ สภาวะคงที่ ค่าของความชันที่ได้จะต้องไม่ต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value > 0.05) [16-17] จากนั้นนำค่าสัญญาณในช่วงสภาวะคงที่จำนวน 100 จุด มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อเป็นตัวแทนของข้อมูลของสัญญาณของความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์

4. การศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์

จากผลการศึกษาที่ 2 และ 3 ที่ได้ศึกษาการวัดแอลกอฮอล์จากแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ พบว่าการวัดแอลกอฮอล์จากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีผ่านการวัดกระแสไฟฟ้าโดยใช้มัลติมิเตอร์จะให้ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และความไว (sensitivity) สูง โดยตำแหน่งที่ให้ค่าสูงสุดคือตรงกลาง แต่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 3 ดังนั้นจะเห็นว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างแผ่นไบโอเซนเซอร์ จากการศึกษางานวิจัยที่ใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในการสร้างไบโอเซนเซอร์จะใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 100% [8] ทั้งนี้จากต้นทุนวัสดุที่ใช้ผลิตจะเห็นว่าราคาของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสสูง จึงต้องการลดต้นทุนโดยการลดปริมาณของเอนไซม์ลงทีละครั้งเพื่อควบคุมราคาของแผ่นไบโอเซนเซอร์ให้ราคาต่อ 1 แผ่นไม่เกิน 30 บาท จึงได้ศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำงานของแผ่นไบโอเซนเซอร์ โดยในการทดสอบนี้แผ่นไบโอเซนเซอร์ถูกออกแบบให้เชื่อมต่อเข้า

กับโมดูลอิเล็กทรอนิกส์ เนื่องจากการพัฒนาระบบการตรวจวัดที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดแอลกอฮอล์แบบพกพา โดยเริ่มจากการต่อแผ่นไบโอเซนเซอร์ พร้อมด้วยตัวต้านทานขนาด 1000 โอห์มโดยต่อขาของตัวต้านทานใกล้กับบริเวณการเกิดปฏิกิริยา อ้างอิงจากผลการศึกษาที่ 1 และ 2 ที่วัดสัญญาณทางไฟฟ้าบริเวณตรงกลางใกล้กับตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาจะให้สัญญาณทางไฟฟ้าสูงที่สุด การต่อตัวต้านทานคร่อมเพื่อแปลงกระแสไฟฟ้าเป็นความต่างศักย์ตกคร่อมที่สามารถวัดได้ กล่าวคือเมื่อกระแสไฟฟ้าไหลผ่านตัวต้านทานจะเกิดความต่างศักย์ตกคร่อมตัวต้านทานซึ่งความต่างศักย์นี้จะแปรผันตรงกับกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านตัวต้านทานทำให้สามารถวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นได้โดยผ่านเซนเซอร์ HX711 ซึ่งเป็นตัวขยายและแปลงสัญญาณจากอนาล็อกเป็นดิจิตอล และส่งสัญญาณที่วัดได้ไปยังไมโครคอนโทรลเลอร์ ซึ่งคือ ESP32 เพื่อแสดงผลบนคอมพิวเตอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2c โดยผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากการวัดสารละลายแอลกอฮอล์ ด้วยไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมจากสารละลายเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสความเข้มข้นต่างๆ (a) กราฟของสัญญาณที่ได้จากไบโอเซนเซอร์ที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ความเข้มข้น 20 33, 50, 100 % V/V (ในการวัดแอลกอฮอล์โดยการหยดสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 9, 18, 27 และ 36 mM ตามลำดับ ข้อมูลถูกเตรียม (preprocess) โดยใช้ digital filter แบบ simple moving average (51 points) (b) กราฟสอบเทียบมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นแอลกอฮอล์และสัญญาณโดยหาของสัญญาณที่สภาวะคงที่ จำนวน 100 จุด ของไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมจากสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากผลการศึกษาในภาพที่ 6a จะเห็นว่าสัญญาณที่ได้จากการวัดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 9, 18, 27 และ 36 mM ด้วยไบโอเซนเซอร์ มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่หยดลงไปบนแผ่นไบโอเซนเซอร์อย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่าแผ่นไบโอเซนเซอร์มีความสามารถวัดได้ต่อเนื่อง จากกราฟสอบเทียบมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และสัญญาณที่อ่านได้จากเซนเซอร์ (sensor reading) ในภาพที่ 6b พบว่าไบโอเซนเซอร์ที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 20% V/V ให้ค่าความไว (sensitivity) ของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 20 % v/v ให้ค่าสูงที่สุดคือ 452.09 a.u./mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้น 50% v/v และ 33% v/v ถึงประมาณ 3 และ 13 เท่า นั่นเป็นเพราะไบโอเซนเซอร์ที่เอนไซม์มีความเข้มข้น 50% v/v และ 33% v/v ให้ค่าความไว (sensitivity) ในการวัด 33.827 a.u./mM และ 176.71 a.u./mM ตามลำดับ นอกจากนั้นยัง ที่เอนไซม์ความเข้มข้น 50% v/v และ 33% v/v มีความเป็นเส้นตรงของการตอบสนองของสัญญาณต่ำ ($R^2 = 0.0870-0.6733$) จึงไม่สามารถแยกสัญญาณเซนเซอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 20 %v/v และ 100 %v/v พบว่าให้ค่าความเป็นเส้นตรงสูงใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 2 ที่วัดสัญญาณทางไฟฟ้าโดยใช้มัลติมิเตอร์แล้วพบว่าการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 100% v/v จะให้ค่าความเป็นเส้นตรงสูง แต่ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าความไวพบว่าที่ความเข้มข้น 100%v/v มีค่า 392.15 a.u./mM ซึ่งน้อยกว่าความไวที่ได้จากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 20 %v/v นอกจากนี้จะเห็นว่าที่เอนไซม์ความเข้มข้น 20%v/v จะให้ค่าสัญญาณการวัดที่สูงกว่าความเข้มข้น 33, 50 และ 100 %v/v เนื่องมาจากการมีเอนไซม์จำนวนมากจะเกิดผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ และอาจเกิดการบดบังพื้นที่ในการเร่งปฏิกิริยา

ของเอนไซม์ [18] ส่งผลให้เอนไซม์มีบริเวณในการเร่งปฏิกิริยาลดลง ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาก็จะลดลงตามไปด้วย จากนั้นหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ที่เอนไซม์ความเข้มข้น 20%v/v จะได้ค่าเท่ากับ 1.9478 mM ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาสร้างแผ่นไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากมีช่วงในการวัดและความเข้มข้นต่ำสุดที่ใกล้เคียงงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงในตารางที่ 2 ครอบคลุมในช่วงตั้งแต่ก่อนเมา และการใช้ปริมาตรของเอนไซม์น้อยเป็นการลดต้นทุนของวัสดุในการประดิษฐ์แผ่นไบโอเซนเซอร์ ทำให้สามารถลดต้นทุนต่อ 1 แผ่นลงได้ถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 100% v/v

ตารางที่1 การประเมินราคาของอุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์

องค์ประกอบของแผ่นไบโอเซนเซอร์	ราคา (บาท) / 1 แผ่น
เทปอะลูมิเนียม (แคโทด)	0.02
เทปทองแดง (แอโนด)	0.14
กระดาษกรอง เบอร์ 1	0.10
เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส	11.96
รวมราคาของแผ่นไบโอเซนเซอร์	12.22
องค์ประกอบของอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์	ราคา (บาท) / 1 เครื่อง
ESP 32 (ไมโครคอนโทรลเลอร์)	185
HX711 (ตัวแปลงสัญญาณอนาล็อกเป็นดิจิทัล)	40
ตัวต้านทาน 1000 โอห์ม	0.2
สายไฟ	1.5
รวมราคาของอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์	226.7
รวม	238.92

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซนเซอร์ในการวัดแอลกอฮอล์กับงานวิจัยอื่นๆ

ชื่องานวิจัย	ราคา	LOD (mg/ml)	linear range (mg/ml)	อ้างอิง
A Smart Wristband Integrated with an IoT-Based Alarming System for Real-Time Sweat Alcohol Monitoring	880.79	0.045	0.10–1.05	7
Noninvasive Alcohol Monitoring Using a Wearable Tattoo-Based Iontophoretic-Biosensing System	-	-	0-1.66	9
Cost-Effective Foam-Based Colorimetric Sensor for Roadside Testing of Alcohol in Undiluted Saliva	-	0.237	0.789-19.725	20
A 3D-Printed Breath Analyzer Incorporating CeO ₂ Nanoparticles for Colorimetric Enzyme-Based Ethanol Sensing	-	0.001	0.2 -1.2	21
งานวิจัยนี้	238.92	0.0897	0-1.6	

นอกจากนี้ในงานวิจัยยังแสดงให้เห็นว่า วงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่ออกแบบขึ้นมีความสามารถในการวัดสัญญาณจากแผ่นไบโอเซนเซอร์และส่งสัญญาณเพื่อแสดงผลบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ได้อย่างรวดเร็วทันที โดยแผ่นไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีต้นทุนวัสดุที่ใช้ในการผลิตต่อแผ่นเพียง 12.22 บาท และมีค่าอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ 226.70 บาท ทำให้มีต้นทุนวัสดุอุปกรณ์ในการวัดแอลกอฮอล์รวม 238.92 บาท ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งมีราคาต่ำกว่างานวิจัยก่อนหน้าซึ่งแสดงอยู่ในตารางที่ 2 อย่างไรก็ตามเนื่องจากอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์สามารถใช้ซ้ำได้และตัวแผ่นมีราคาถูก ดังนั้นอุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์นี้จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้งานในลักษณะการใช้แล้วทิ้ง (disposable) และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวัดแอลกอฮอล์ในปัจจุบันพบว่า การวัดแอลกอฮอล์มีหลากหลายวิธีเช่นการเป่า ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วแต่มีราคาสูง หรือการวัดโดยใช้แถบสี (alcohol strip test) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและราคาถูก แต่จะให้ความแม่นยำในการตรวจวัดที่แอลกอฮอล์ความเข้มข้นมากกว่า 200mg% แต่ในขณะเดียวกันหากนำไปวัดที่ความเข้มข้นต่ำคือในช่วงระหว่าง 20-50mg% กลับให้ความแม่นยำต่ำ [19] ซึ่งถือเป็นค่าที่สำคัญเนื่องจากอยู่ในช่วงที่เริ่มมีอาการถึงกฎหมายกำหนด นอกจากนี้แต่ละคนมีการแยกสีที่แตกต่างกันทำให้เกิดการอ่านค่าแถบสีที่คลาดเคลื่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ใช้งานเป็นผู้ปกครองทางการแพทย์มองเห็นสี ทำให้การวัดแอลกอฮอล์ผ่านการวัดโดยใช้แถบสีเหมาะกับการวัดในเชิงคุณภาพ (qualitative) หรือกึ่งปริมาณ (semi qualitative) โดยไม่สามารถวัดเชิงปริมาณ (quantitative) ได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นหากใช้วิธีการวัดแบบที่สามารถบอกค่าได้โดยตรงจะทำให้ผู้ตรวจวัดทราบค่าแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน แม่นยำ และลดความคลาดเคลื่อนในการวัดความเข้มข้นของผู้ใช้งานได้และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดแอลกอฮอล์ด้วยตนเองผ่านระบบวงจรอิเล็กทรอนิกส์แบบพกพาได้ ทำให้ผู้ใช้งานสามารถเข้าถึงการตรวจวัดแอลกอฮอล์ในเชิงปริมาณได้อย่างสะดวกง่ายดายมากยิ่งขึ้นอันจะนำไปสู่การลดอุบัติเหตุจากเมาแล้วขับได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งไบโอเซนเซอร์นี้ยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดแอลกอฮอล์จากเหงื่อแบบสวมใส่ได้ที่สามารถแสดงผลบนสมาร์ตโฟนแบบเรียลไทม์และมีระบบการแจ้งเตือนความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แบบอัตโนมัติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดอุบัติเหตุทางถนนจากการบริโภคแอลกอฮอล์ได้อีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้พัฒนาอุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมีต้นทุนต่ำสำหรับการตรวจวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ โดยออกแบบแผ่นรองรับจากกระดาษกรองและใช้ขั้วไฟฟ้าแคโทดที่ทำจากเทปอะลูมิเนียมและขั้วแอโนดที่ทำจากเทปทองแดง ซึ่งขั้วไฟฟ้ามีการเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ไมโครอิเล็กทรอนิกส์เพื่อวัดและแปลงสัญญาณจากแผ่นไบโอเซนเซอร์ส่งต่อไปยังอุปกรณ์แสดงผล จากการศึกษาพบว่าการใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสทำให้ค่าความไว (sensitivity) ในการวัดแอลกอฮอล์ของไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้นกว่าการใช้เอนไซม์ประมาณ 7 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการวัดสัญญาณไบโอเซนเซอร์จากกระแสไฟฟ้าที่ตำแหน่งกลางแผ่นบริเวณการเกิดปฏิกิริยาให้ค่าความไวสูงสุดอยู่ที่ 1.0915 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ซึ่งสูงกว่าการวัดโดยใช้ความต่างศักย์ประมาณ 475-1092 เท่า และให้การตอบสนองของสัญญาณต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในช่วง 9-36 mM มีความเป็นเส้นตรง (linearity) สูงกว่า นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาวัดแอลกอฮอล์ของแผ่นไบโอเซนเซอร์กับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ เพื่อแสดงผลการวัดไปยังคอมพิวเตอร์ พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์อยู่ที่ 20% V/V อีกทั้งยังให้ความเข้มข้นของสัญญาณและความไวในการวัดสูงกว่าการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 33 และ 50 % V/V ประมาณ 3 และ 13 เท่าตามลำดับ โดยมีค่าความไวใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 100%v/v อีกทั้งยังทำให้ไบโอเซนเซอร์มีการตอบสนองของสัญญาณอย่างเป็นเส้นตรงสูง ให้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ที่ 1.9478 mM ดังนั้นโดยสรุปสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวัดแผ่นแอลกอฮอล์ของแผ่นไบโอเซนเซอร์คือการวัดสัญญาณจากตำแหน่งตรงกลางใกล้บริเวณการเกิดปฏิกิริยา โดยองค์ประกอบแผ่นไบโอเซนเซอร์แบบกระดาษที่ใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 20% v/v ต่อกับไมโคร HX711ซึ่งเป็นตัวขยายและแปลงสัญญาณอนาล็อกเป็นดิจิทัล

และส่งผ่านข้อมูลดิจิทัลไปยัง ESP32 จึงสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้งานในการวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แบบพกพาที่สามารถแสดงผลได้ทันที โดยเฉพาะในลักษณะการใช้งานแบบใช้แล้วทิ้ง เนื่องด้วยราคาของแผ่นไมโครคอนโทรลเลอร์ที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งจะทำให้การเข้าถึงการตรวจวัดแอลกอฮอล์มีความสะดวกมากยิ่งขึ้นอันจะนำไปสู่การป้องกันอุบัติเหตุจากการเมาแล้วขับได้ในอนาคต ทั้งนี้ในงานวิจัยยังมีข้อจำกัด คือ การใช้กระดาษเป็นวัสดุรองรับที่เปียกง่ายไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ซ้ำ เนื่องจากไมโครคอนโทรลเลอร์ที่ประดิษฐ์ได้มีราคาถูกเหมาะกับการใช้แล้วทิ้ง หรือเปลี่ยนวัสดุรองรับให้มีความคงทนมากขึ้น เช่นเปลี่ยนให้กระดาษมีความหนาขึ้น หรือเปลี่ยนวัสดุเป็นโพลิเมอร์หรือผ้าที่มีความคงทน นอกจากนี้งานวิจัยยังมีข้อจำกัดที่ระบบการวัดยังไม่ออกแบบให้เป็นระบบปิด เนื่องจากเกิดการระเหยของแอลกอฮอล์ทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดได้ และยังไม่สามารถให้อาณัติผลและแสดงผลอย่างสะดวก ดังนั้นต้องการพัฒนาเพื่อให้สามารถพกพาได้สำหรับตรวจวัดแอลกอฮอล์ควรเป็นระบบปิดเพื่อลดการระเหย เหมาะสมกับการพกพาและเพิ่มการแสดงผลผ่านสมาร์ตโฟนโดยอาจใช้แอปพลิเคชันในการประมวลผล IoT (Internet of Things) เช่น แอปพลิเคชันบลูทูธ เพื่อแสดงผลและแจ้งเตือนหากแอลกอฮอล์เกินกว่ากฎหมายกำหนด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. The Office of Transport and Traffic Policy and planning. Road Accident Situation Analysis Report of the Ministry of Transport 2019 [online] 2019 [cited 2022 sep. 20]. Available from: <https://www.otp.go.th/index.php/post/view?id=3995&id=3995>. Thai.
2. Accident Reduction Network Office. Traffic Accident Statistics Report, New Year - Songkran Festival 2017 [online] 2560 [cited 2022 sep. 20]. Available from: <http://www.accident.or.th/index.php/2017-12-04-07-32-28/56-2560>. Thai.
3. Samajarn J. alcohol-induced brain damage [online] 2562 2019 [cited 2022 sep. 20]. Available from: <https://www.samitivejhospitals.com>. Thai.
4. Chonumpai V, Rujirojkul W. Blood Alcohol Concentration and Road Traffic Accident in Eastern Economic Corridor, 2017. Thai journal of toxicology. 2019; 34(1): 9-19. Thai.
5. Sreeganjant P. A Comparative Study of the Ethyl Alcohol Concentration in Vitreous Humor and Blood with Headspace Gas Chromatography. Journal of Criminology and Forensic Science 2019 6(1): 48-58. Thai.
6. Khemtonglang K, Chaiyaphet N, Kumsaen T, Chaiyachati C, Chuchuen O. A Smart Wristband Integrated with an IoT-Based Alarming System for Real-Time Sweat Alcohol Monitoring. Sensors. 2022; 22(17): 6435.
7. Li B, Downen RS, Dong Q, Tran N, LeSaux M, Meltzer AC, et al. A Discreet Wearable IoT Sensor for Continuous Transdermal Alcohol Monitoring - Challenges and Opportunities. IEEE Sensors Journal 2021; 21(4): 5322-5330.

8. Kim J, Jeerapan I, Imani S, Cho TN, Bandodkar A, Cinti S, et al. Noninvasive Alcohol Monitoring Using a Wearable Tattoo-Based Iontophoretic-Biosensing System. *ACS Sensors* 2016; 1(8): 1011-1019.
9. Bhide A, Muthukumar S, Prasad S. CLASP (Continuous lifestyle awareness through sweat platform): A novel sensor for simultaneous detection of alcohol and glucose from passive perspired sweat. *Biosens Bioelectron* 2018; 117: 537-545.
10. Liu Y, Chen JY. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2016; 31(6): 553-567.
11. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*. 2010; 82(1): 3-10.
12. Chen S-F, Danao M-G. Predictive models of ethanol concentrations in simulated exhaled breath and exhaled breath condensate under varied sampling conditions. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2013; 6: 788-795.
13. Sabzkoohi HA, Dodier V, Kolliopoulos G. A validated analytical method to measure metals dissolved in deep eutectic solvents. *RSC Adv*. 2023; 13(22): 14887-14898.
14. AVIA Semiconductor. 24-Bit Analog-to-Digital Converter (ADC) for Weigh Scales [online] n.d. [cited 2023 sep. 18]. Available from: <http://www.alldatasheet.com/view.jsp?Searchword=HX711&sField=4>
15. Mixed Signal and DSP Design Techniques, W.Kester, Editor. Elsevier, Burlington; 2002
16. Bethea R, Rhinehart RR. Applied Engineering Statistics. *Technometrics*. 1994; 36.
17. Kelly JD, Hedengren JD. A steady-state detection (SSD) algorithm to detect non-stationary drifts in processes. *Journal of Process Control*. 2013; 23(3): 326-31.
18. Ifko D, Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. (Magnetic) Cross-Linked Enzyme Aggregates of Cellulase from *T. reesei*: A Stable and Efficient Biocatalyst. *Molecules* [Internet]. 2023 Jan 30; 28(3): 1305. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031305>
19. Schwartz RH, O'Donnell RM, Thorne MM, Getson PR, Hicks JM. Evaluation of colorimetric dipstick test to detect alcohol in saliva: A pilot study. *Annals of Emergency Medicine*. 1989; 18(9): 1001-1003.
20. Kaewnu K, Promsuwan K, Phonchai A, Thiangchanya A, Somapa D, Somapa N, et al. Cost-Effective Foam-Based Colorimetric Sensor for Roadside Testing of Alcohol in Undiluted Saliva. *Chemosensors* .2021; 9(12).
21. Mustafa F, Carhart M, Andreescu S. A 3D-Printed Breath Analyzer Incorporating CeO₂ Nanoparticles for Colorimetric Enzyme-Based Ethanol Sensing. *ACS Applied Nano Materials*. 2021; 4(9): 9361-9369.