

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคส

DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR GLUCOSE DETECTION



สุรียภา จงจินากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

# การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคส

สุรียภา จงจินากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคส  
Development of Biosensor for Glucose Detection

ชื่อ-นามสกุล

นางสาวสุรียภา จงจินากุล

สาขาวิชา

เคมีนิวตกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ปร.ค.

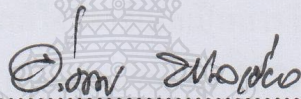
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์สมพร มุลมั่งมี, Ph.D.

ปีการศึกษา

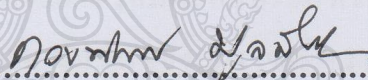
2556

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ฉัตรชัย พลเชียว, D.Eng.)



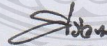
..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดวงทิพย์ มุลมั่งมี, Ph.D.)



..... กรรมการ

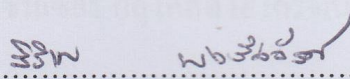
(อาจารย์สมพร มุลมั่งมี, Ph.D.)



..... กรรมการ

(อาจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ปร.ค.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์  
ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิริแซ พงษ์สวัสดิ์, วท.ค.)

วันที่ 6 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2556

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคส
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุริยาภา จงจินากุล
สาขาวิชา	เคมีนวัตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ปร.ค.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สมพร มุลมั่งมี, Ph.D.
ปีการศึกษา	2556

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของระบบไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจหา กลูโคสในตัวอย่างจริง โดยใช้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสเป็นสารชีวภาพ และใช้ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ วัดปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงของสารละลายตัวอย่างหลังเกิดปฏิกิริยาของกลูโคส ศึกษาการ เพิ่มประสิทธิภาพความไววิเคราะห์ของวิธีด้วยอนุภาคนาโนพอลิไพโรล

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ ได้แก่ ปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรล ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นและพีเอชของ สารละลายบัฟเฟอร์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจหา กลูโคสได้ในช่วงความ เป็นเส้นตรง 1 ถึง 25 มิลลิโมลาร์ มีขีดจำกัดในการตรวจวัด 0.46 มิลลิโมลาร์ วิธีที่พัฒนานี้มีความไว- วิเคราะห์เท่ากับ 0.2 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงเอนไซม์สามารถใช้ซ้ำได้ 55 ครั้ง และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เพียง 3 นาที นอกจากนี้ นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาไปวิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคสในตัวอย่างซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีนี้ สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน เมื่อทดสอบด้วยสถิติ ที-เทส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( $P=0.05$ )

ดังนั้น แสดงว่าวิธีไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริงได้ โดยมีข้อดีคือ สามารถใช้ซ้ำได้ ราคาถูก ไม่มีผลรบกวนจาก ออกซิเจน และไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

**คำสำคัญ:** กลูโคส ไบโอเซนเซอร์ กลูโคสดีไฮโดรจีเนส นาโนพอลิไพโรล

**Thesis Title** Development of Biosensor for Glucose Detection  
**Name-Surname** Miss Suriyapha Jongjinakool  
**Program** Innovative Chemistry  
**Thesis Advisor** Mrs. Siriwan Teepoo, Ph.D.  
**Thesis Co-advisor** Mr. Somporn Moonmangmee, Ph.D.  
**Academic Year** 2013

## ABSTRACT

In this study, a biosensor system was developed and evaluated for glucose detection in real samples. Glucose dehydrogenase was used a biological element. The graphite electrode was selected to detect the current change of the sample solution due to the reaction of glucose. The sensitivity of analytical method was enhanced with nanopolypyrroles.

Parameters, such as the amount of nanopolypyrroles, enzyme concentration, buffer solution concentration and pH, which affected the performance of the biosensor were optimized. Under the optimized experimental conditions, this method could detect glucose concentration in a linear range from 1 to 25 mM with a detection limit of 0.46 mM. The sensitivity of the developed method was 0.2  $\mu\text{A}/\text{mM}$ . The number of reuse for enzyme immobilized electrode was 55 times and analysis time was only 3 min. In addition, the developed method was applied for glucose determination in 5 serum samples. When compared with the standard method by t-test, it was found that there was no difference between the results from the two methods at the statistically significant level of 95% ( $P=0.05$ ).

Therefore, the developed biosensor can be successfully applied for determination of glucose concentration in real samples with the following advantages: reuse, low cost, no interference from oxygen and no need for sample preparations.

**Keywords:** glucose, biosensor, glucose dehydrogenase, nanopolypyrroles.



## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือ คุณดูแลเอาใจใส่ เป็นอย่างดีจากหลายๆฝ่าย โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษา คือ อาจารย์ศิริวรรณ ด้งู และ อาจารย์สมพร มุลมั่งมีในการแนะนำ ตรวจสอบแก้ไข ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะ ติดตามความก้าวหน้าในการ ดำเนินงานวิจัยผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านอาจารย์ทั้งสองท่านนี้เป็นอย่างยิ่ง และ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ฉัตรชัย พลเชี่ยว ประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ ข้อเสนอแนะ แก้ไขและให้แนวคิดต่างๆที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ดวงทิพย์ มุลมั่งมี ผู้ทรงคุณวุฒิที่เสียสละเวลาในการตรวจทาน แก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษา ตลอดจนให้ความ ช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ ให้ทุนการศึกษาในโครงการภาคีบัณฑิตศึกษา ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ งานวิจัยและทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ โรงพยาบาลเกษมราษฎร์ สุขุมวิท 3 และ โรงพยาบาลทองผาภูมิ ที่ให้ความ อนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมและข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา บ่มเพาะความรู้จนผู้วิจัย สามารถนำเอาความรู้และหลักการต่างๆ มาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในงานวิจัยนี้ ทำให้ วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือและกำลังใจจาก คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง และเพื่อนๆ ตลอดจนบุคคลต่างๆที่คอยให้ความช่วยเหลืออีกมากที่ผู้วิจัยไม่สามารถ กล่าวนามได้ทั้งหมดในที่นี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและความปรารถนาดีของท่านเป็น อย่างยิ่ง ซึ่งกราบขอบพระคุณไว้ในโอกาสนี้

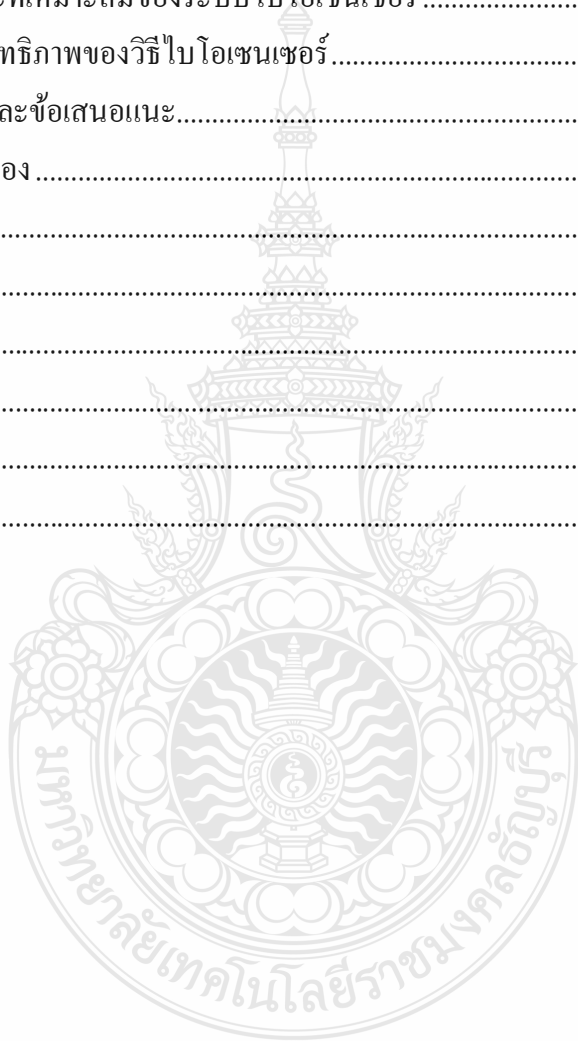
สุริยาภา จงจินากุล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญรูป.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(10)
บทที่ 1 บทนำ.....	11
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	11
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	12
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	12
1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	12
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	14
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
2.1 กลูโคส(Glucose).....	15
2.2 วิธีวิเคราะห์ทั่วไปสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส.....	16
2.3 ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor).....	19
2.4 วิธีการตรึงเอนไซม์ (Immobilization).....	22
2.5 การเชื่อมไขว้ด้วยพันธะ โควเวเลนต์ (Covalant bonding).....	25
2.6 ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical).....	28
2.7 คุณสมบัติของไบโอสเซนเซอร์.....	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	32
3.2 การทดลอง.....	34
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์หรือวิเคราะห์.....	42
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิไพโรลด้วยวิธีอิมัลชันพอลิเมอร์ไรเซชัน.....	42
4.2 การประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าทำงานแอมเพโรเมตรี.....	43

## สารบัญ

	หน้า
4.3 ผลการตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์.....	44
4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี.....	45
4.5 ผลการหาสถานะที่เหมาะสมของระบบไบโอเซนเซอร์.....	47
4.6 ผลการหาประสิทธิภาพของวิธีไบโอเซนเซอร์.....	52
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	64
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	64
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	66
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	84
ประวัติผู้เขียน.....	90





## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 วิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ .....	13
รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างกลูโคส.....	15
รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์ .....	20
รูปที่ 2.3 การตรึงเอนไซม์แบบการห่อหุ้มและการทำแคปซูล.....	23
รูปที่ 2.4 การตรึงเอนไซม์แบบดูดซับ.....	23
รูปที่ 2.5 การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้ .....	24
รูปที่ 2.6 การเกิดปฏิกิริยาของสารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์กับเอนไซม์.....	25
รูปที่ 2.7 โครงสร้างโคโตซาน.....	25
รูปที่ 2.8 โครงสร้างมอนอเมอร์ไพโรล.....	26
รูปที่ 2.9 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยใช้สารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์.....	27
รูปที่ 2.10 เซลล์ไฟฟ้าในเทคนิคโวลแทมเมตรี.....	30
รูปที่ 3.1 การตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าทำงาน.....	35
รูปที่ 3.2 แสดงระบบเคมีไฟฟ้าประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว.....	36
ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (ขั้วไฟฟ้าทำงาน) ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์ คลอไรด์ (ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง) ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (ขั้วไฟฟ้าช่วย) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 7.00 ที่มีสารละลาย เฟอร์โรซีนความเข้มข้น 0.1 mM	
รูปที่ 3.3 แสดงไซคลิก โวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์.....	36
ในสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน	
รูปที่ 4.1 แสดงสูตรโครงสร้างมอนอเมอร์ของไพโรล.....	42
รูปที่ 4.2 ภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	43
แสดงรูปร่างลักษณะของอนุภาคนาโนพอลิไพโรล	

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 4.3 แสดงโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์.....	44
ในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน	
รูปที่ 4.4 แสดงโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์เปล่า (A).....	45
ตรึงด้วยโคโคซานและนาโนพอลิไพโรล/ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (b) ตรึงกลูตารอลดีไฮด์บนโคโคซานและนาโนพอลิไพโรล/ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (c) และเอ็มไซม์/กลูตารอลดีไฮด์/โคโคซานและนาโนพอลิไพโรล/ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (d) ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์: 10 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}$ ในสารละลาย 0.1 M KCl	
รูปที่ 4.5 แสดงโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าทำงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ .....	46
ความเข้มข้น 0.05 mM พีเอช 6.50 เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (a) และเมื่อเติมสารละลายกลูโคส (b) ที่มีสารละลายเพอร์โรซิน ความเข้มข้น 0.1 mM โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน	
รูปที่ 4.6 ผลการศึกษาปริมาณของอนุภาคนาโนพอลิไพโรล.....	48
สำหรับตรึงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์	
รูปที่ 4.7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงาน.....	49
รูปที่ 4.8 ผลการหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม .....	51
รูปที่ 4.9 ผลการหาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม.....	52
รูปที่ 4.10 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายกลูโคส .....	56
รูปที่ 4.11 แสดงผลของตัวรบกวนเปรียบเทียบกับกลูโคส.....	58
รูปที่ 4.12 ผลการหาความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงาน.....	59
รูปที่ 4.13 ผลการเพิ่มความไวเคราะห์ด้วยวัสดุนาโนพอลิไพโรล.....	60
รูปที่ 4.14 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส.....	61

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะของการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส .....	38
ตารางที่ 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ .....	47
ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาปริมาตรของอนุภาคนาโนพอลิไฟโรล .....	48
สำหรับตรึงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์	
ตารางที่ 4.3 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส .....	49
ตารางที่ 4.4 ผลการหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่เหมาะสม .....	50
ตารางที่ 4.5 ผลการหาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่เหมาะสม .....	51
ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธี .....	53
ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธี .....	53
ตารางที่ 4.8 ผลการศึกษาการเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) .....	54
ตารางที่ 4.9 ผลศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง .....	55
ตารางที่ 4.10 ผลการศึกษาของตัวรบกวน .....	57
ตารางที่ 4.11 ผลการหาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า .....	59
ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์กับวิธีมาตรฐาน .....	62
(Enzymatic Colorimetric method) และผลการวิเคราะห์ด้วย สถิติ (t-test)	
ตารางที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอื่นๆ .....	63

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยและของโลก ซึ่งสถานการณ์ของผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศไทยและทั่วโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากข้อมูลรายงานจากองค์การอนามัยโลกได้ประมาณการว่าจะมีจำนวนผู้เป็นโรคเบาหวานทั่วโลกเพิ่มขึ้นมากกว่า 366 ล้านราย ในปี พ.ศ. 2573 [1] โรคเบาหวานเกิดจากความผิดปกติของร่างกายที่มีการผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้น้อยกว่าปกติ ซึ่งจะส่งผลทำให้ระดับน้ำตาล (กลูโคส) ในกระแสเลือดสูงกว่าปกติ (ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานมีปริมาณกลูโคสเฉลี่ยมากกว่า 126 mg/dl) เมื่อร่างกายมีปริมาณกลูโคสมากส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้หมด ซึ่งโดยปกติกลูโคสจะเข้าสู่เซลล์ร่างกายเพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งผู้ที่เป็นโรคเบาหวานร่างกายจะไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้งานได้มีประสิทธิภาพ ผลที่เกิดขึ้นทำให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงขึ้นในระยะยาวจะมีผลในการทำลายหลอดเลือด ถ้าหากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม อาจนำไปสู่สภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้

ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือด วิธีการตรวจวัดกลูโคสที่ดีที่สุดให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว จึงทำให้มีการพัฒนาวิธีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส เช่น วิธีเบนดิคต์ วิธีวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ และวิธีอื่นๆ สำหรับวิธีทั่วไปที่โรงพยาบาลใช้ในการตรวจวัดกลูโคสคือ วิธีเอนไซม์เมตริกัลเลอร์รีเมตริก (Enzymatic colorimetric method) เป็นวิธีที่อาศัยเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส เมื่อเติมสารตัวบ่งชี้จะได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเกิดขึ้นแต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด เช่น ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และใช้สารเคมีมาก จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวัดกลูโคสโดยนำเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคทำให้สามารถลดระยะเวลาในการวินิจฉัยโรคลงได้และทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเทคโนโลยีที่นิยมนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคเบาหวานนี้คือ เทคนิค “ไบโอเซนเซอร์” ที่ใช้สำหรับตรวจวัดกลูโคสในเลือด เทคนิคไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยทั่วไปแล้วการตรวจวัดกลูโคสโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์จะนิยมใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase; GOX) เป็นสารตัวบ่งชี้ภาพ แต่พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะมีผลการรบกวนของออกซิเจน ทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์โดยใช้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส

(Glucose dehydrogenase; GDH) เพื่อลดผลการรบกวนของออกซิเจน และใช้อนุภาคนาโนเพื่อเพิ่มความไววิเคราะห์

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อสังเคราะห์นาโนพอลิไพโรลสำหรับนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์

1.2.2 เพื่อศึกษาวิธีการตรึงนาโนพอลิไพโรลกับเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์

1.2.3 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

1.2.4 เพื่อหาประสิทธิภาพของขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับวิเคราะห์หากลูโคส

1.2.5 เพื่อวิเคราะห์หากลูโคสในตัวอย่างจริง

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 สังเคราะห์นาโนพอลิไพโรลด้วยวิธีอิมัลชันพอลิเมอไรเซชัน (Emulsion polymerization)

1.3.2 ตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ที่ประกอบด้วยนาโนพอลิไพโรล

1.3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสและหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

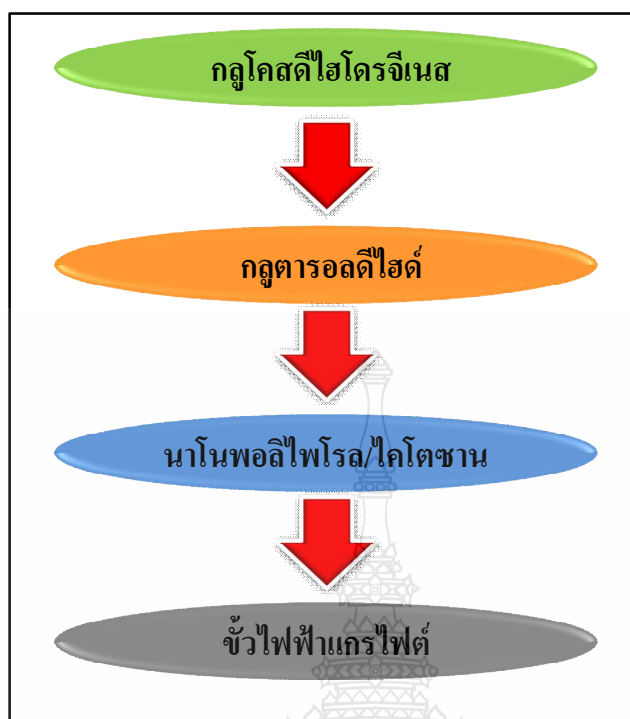
1.3.4 ตรวจหากลูโคสในตัวอย่างจริง

#### 1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย

ในทางการแพทย์การตรวจวัดปริมาณกลูโคสมีความจำเป็นอย่างมากที่จะต้องทำการตรวจวัดเพื่อให้ผลที่ได้มีประสิทธิภาพ ความถูกต้อง แม่นยำและ รวดเร็ว โดยสามารถนำข้อมูลนั้นมาใช้ประกอบกับการวินิจฉัยโรคได้ [2-4] และมีผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวนมากจำเป็นที่จะต้องทำการควบคุมและรักษาระดับกลูโคสในเลือดเพื่อป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น [5-8] สำหรับการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นมีหลายวิธีซึ่งได้ถูกออกแบบและพัฒนาขึ้นเรื่อยๆตามความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยี โดยเทคนิคที่ได้รับความนิยมและถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดกลูโคสคือเทคนิค “ไบโอเซนเซอร์” เพราะเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เป็นวิธีที่ง่าย และให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็วเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวัดกลูโคส

จากข้อดีต่างๆของเทคนิคไบโอเซนเซอร์จึงได้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดกลูโคสโดยใช้วัสดุนาโนมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดให้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากวัสดุนาโนมีคุณสมบัติโครงสร้างขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ด้วยโครงสร้างที่มีขนาดเล็กระดับนาโนนี้จึงทำให้วัสดุนาโนมีพื้นที่ผิวมาก สามารถตรึงกับเอนไซม์บนตัวตรวจวัดได้เพิ่มขึ้น โดยมีแนวความคิดในการตรึงเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 1.1 โดยสามารถตรึงนาโนพอลิไพโรลกับไคโตซานไว้บนขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิค Electrodeposition ให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ +1.5 V และเนื่องจากนาโนพอลิไพโรลและไคโตซานมีหมู่ เอมีนจึงใช้สารเชื่อมไขว้กัลตารอตติไฮด์เพื่อให้เกิดพันธะโคเวเลนต์กับเอนไซม์ ทำให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสต่อไป





รูปที่ 1.1 วิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

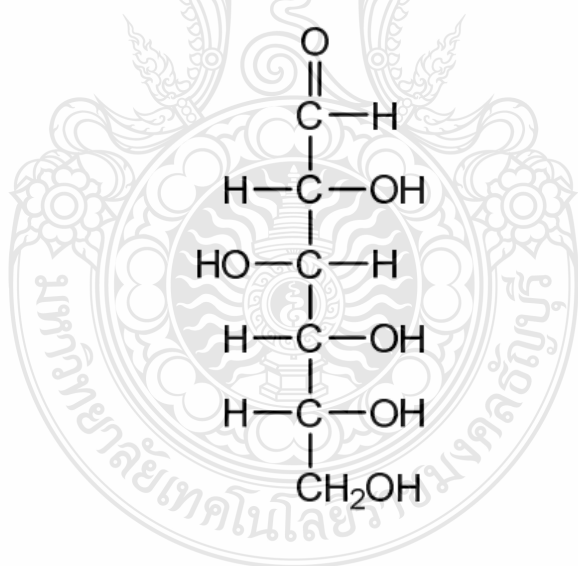
- 1.5.1 ได้พอลิไพโรลที่มีขนาดนาโนเมตร
- 1.5.2 ได้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส
- 1.5.3 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส
- 1.5.4 ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่สามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริง

## บทที่ 2

### วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กลูโคส (Glucose)

กลูโคสเป็นสารชีวโมเลกุลจัดอยู่ในประเภทของคาร์โบไฮเดรต ประกอบด้วยหมู่อัลดีไฮด์ และคาร์บอนจำนวน 6 อะตอม (ดังรูปที่ 2.1) กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบมากในธรรมชาติ และมีความสำคัญเพราะเป็นน้ำตาลพื้นฐานของคาร์โบไฮเดรตทุกตัว หรือเป็นสารผลิตพลังงาน แหล่งอาหารธรรมชาติที่พบกลูโคส คือ แป้ง ข้าว ผัก น้ำตาล และผลไม้ โดยเมื่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพื่อให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ด้วยเหตุนี้กลูโคสจึงเป็นน้ำตาลที่พบมากในร่างกาย ระดับกลูโคส หรือกลูโคสในเลือดโดยปกติจะมีค่าประมาณ 100-125 mg/dl กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ โดยฮอร์โมนที่นำกลูโคสไปใช้คือ ฮอร์โมนอินซูลิน แต่ถ้าป่วยเป็นโรคเบาหวานในร่างกายจะมีปริมาณอินซูลินต่ำกว่าปกติจึงทำให้ร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้ส่งผลให้ร่างกายมีระดับกลูโคสสะสมอยู่ในกระแสเลือดสูง



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างกลูโคส

### 2.1.1. โรคเบาหวาน (Diabetes)

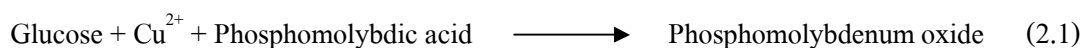
โรคเบาหวานเกิดจากการที่ร่างกายไม่สามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินได้อย่างเพียงพอ หรือร่างกายตอบสนองต่ออินซูลินได้น้อยกว่าปกติ ส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่าปกติ กลุ่มเสี่ยงที่อาจป่วยเป็นโรคเบาหวาน ได้แก่ ผู้ที่ป่วยเป็นโรคอ้วน ผู้ที่มีบุคคลในครอบครัวที่ป่วยเป็นโรคเบาหวาน (กรรมพันธุ์) ผู้สูงอายุ ผู้ที่ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับตับอ่อน ผู้ที่ตั้งครรภ์ และผู้ที่ได้รับยาบางชนิดมากเกินไป เช่น ยาประเภท สเตียรอยด์ ยาคุมกำเนิดบางชนิด และยาขับปัสสาวะ เป็นต้น ซึ่งถ้าหากป่วยเป็นโรคเบาหวานอาจก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆตามมาได้ เช่น หัวใจวาย ตาบอด ไตวาย อัมพฤกษ์ อัมพาต เป็นต้น

โดยปกติก่อนรับประทานอาหารในร่างกายจะมีระดับกลูโคสในเลือด 100-125 mg/dl และเมื่อหลังรับประทานอาหารแล้ว 2 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดความคงทนของกลูโคส (oral glucose tolerance test; OGTT) ระดับกลูโคสในร่างกายจะต้องไม่เกิน 140-199 mg/dl โดยปกติค่าเฉลี่ยในร่างกายถ้ามีระดับกลูโคสมากกว่า 126 mg/dl จัดว่าป่วยเป็นโรคเบาหวาน [9]

## 2.2 วิธีวิเคราะห์ทั่วไปสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส

### 2.2.1 วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

2.2.1.1 การตรวจวัดกลูโคสด้วยกรดฟอสโฟโมลลิบดิก (Phosphomolybdic acid) [10] วิธีนี้เป็นการตรวจวัดหาปริมาณกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยที่โรงพยาบาลใช้ทั่วไป อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสกับสารละลายคอปเปอร์ในสารละลายเบสแก่ พร้อมทั้งให้ความร้อน หลังจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเกิดปฏิกิริยาต่อกับสารละลายกรดฟอสโฟโมลลิบดิก เกิดเป็นสารเชิงซ้อนฟอสโฟโมลลิบดินัมออกไซด์ (Phosphomolybdenum oxide) ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ดังสมการที่ (2.1) และสามารถตรวจวัดความเข้มของสีได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ สารเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นไม่เสถียร ความเข้มของสีจะลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น



2.2.1.2 การตรวจวัดด้วยวิธีเบนดิคต์ (Benedict test) [11] โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสที่มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งกลูโคสจะไปทำปฏิกิริยากับคอปเปอร์ ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ในสถานะเป็นเบสแก่ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคอปเปอร์ (I) ออกไซด์ ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) มีลักษณะเป็นตะกอนสีแดงอิฐ แต่พบว่าวิธีนี้มีข้อด้อยคือ มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ สามารถเกิดผลบวก (positive test) กับน้ำตาลและสารอินทรีย์อื่นที่มีหมู่อัลดีไฮด์ด้วย

## 2.2.2 วิธีการวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์

2.2.2.1 วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ออกซิเดส (Glucose oxidase; GOX) [12] เอนไซม์-กลูโคสออกซิเดสจะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกลูโคโนแลคโตน (Gluconolactone) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ได้ทำปฏิกิริยากับรีดิวซ์โครโมเจน (Reduce-chromogen) มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase; POD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดผลิตภัณฑ์เป็นออกซิไดซ์โครโมเจน (Oxidised chromogen) ที่มีสีน้ำเงินอมเขียว ดังสมการ (2.2) และ (2.3) ปริมาณของกลูโคสจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสีที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีข้อดีคือมีความจำเพาะเจาะจงต่อกลูโคส แต่มีข้อจำกัด เช่น การทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสขึ้นอยู่กับปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลาย และถ้าในตัวอย่างมีกรดยูริก (Uric acid) บิลิรูบิน (Bilirubin) และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) สารดังกล่าวจะไปจับกับโครโมเจนทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ต่ำกว่าค่าจริง



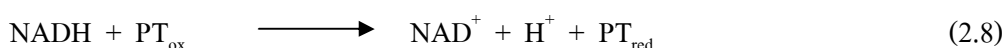
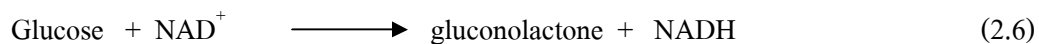
2.2.2.2 วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์เฮกโซไคเนส (Hexokinase) [13] การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือมีความไววิเคราะห์สูงสามารถตรวจหาปริมาณกลูโคสในความเข้มข้นต่างๆได้ โดยมีหลักการคือเอนไซม์เฮกโซไคเนสจะเร่งปฏิกิริยาของกลูโคสที่มีอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (Adenosine-triphosphate; ATP) ได้เป็น กลูโคส-6-ฟอสเฟต (Glucose-6-phosphate;  $\text{Glucose-6-PO}_4$ ) และ อะดีโนซีน ไดฟอสเฟต (Adenosine diphosphate; ADP) หลังจากนั้นเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6PD) จะเร่งปฏิกิริยาต่อเกิดผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคส-6-ฟอสเฟต และ NADH ดังสมการที่ (2.4) และ (2.5) จากปฏิกิริยาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่าง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟ-

โตนมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ถ้าในตัวอย่างมีเม็ดเลือดแดงแตก จะทำให้ปริมาณกลูโคสที่วัดได้ในตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าค่าจริง



2.2.2.3 วิเคราะห์ด้วยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (glucose dehydrogenase; GDH) [14-17] เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่ถูกพัฒนามาแทนที่เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เพื่อแก้ปัญหที่เกิดจากการรบกวนของปริมาณออกซิเจนในสารละลาย การทำงานของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจะต้องทำงานร่วมกับโคเอนไซม์ (Co-enzyme) เช่น Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) [18-22] ,Flavin adenine dinucleotide (FAD) [23-25] และ Pyrroloquinoline-quinine (PQQ) [26-30] เป็นต้น ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เป็นตัวตรวจวัดที่นิยมใช้การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส ทั้งนี้เพราะหลังจากเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจะมีอิเล็กตรอนเกิดขึ้น ทำให้สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า [31-34]

ในปี ค.ศ. 2012 Hoshino และคณะ [35] ได้วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยใช้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก (Amperometric) ซึ่งเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า และใช้ฟีโนไทเอซีน (Phenothiazine; PT) เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน (Mediator) ดังสมการที่ (2.6) (2.7) และ(2.8) เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาของกลูโคส โดยมี NAD<sup>+</sup> เป็นโคเอนไซม์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคโนแลคโตน (Gluconolactone) และ NADH บนขั้วไฟฟ้าตรงคาร์บอนนาโนทิว (Carbon nanotube) ซึ่งคาร์บอนนาโนทิวจะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์ NADH ให้เป็น NAD<sup>+</sup> และอิเล็กตรอน (e<sup>-</sup>) จากนั้นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนจะไปรับอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นส่งไปยังผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ตรวจวัดอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ที่ศักย์ไฟฟ้า +0.2 V



นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค โวลแทมเมตริกเป็นตัวตรวจวัด [36-40] ตัวอย่างเช่น Bai และคณะ [41] ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด โดยใช้ เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และ  $\text{NAD}^+$  เป็น โคเอนไซม์ ตรวจวัดอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ด้วยเทคนิคโวลแทมเมตริก ผลการทดลองพบว่าเกิดกระแสแอโนดิกที่ศักย์ไฟฟ้า 0.06 V เมื่อนำวิธีนี้ ไปตรวจหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างซีรัมจำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนสูง (% Recovery) ในช่วง 99-103 %

ข้อดีของการใช้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสในการวิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคสในตัวอย่างคือ เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูง (High activity) และการทำงานของเอนไซม์ไม่ ขึ้นกับปริมาณออกซิเจนในสารละลาย (ในสารละลายที่มีออกซิเจนละลายอยู่ในปริมาณมากจะทำให้ การส่งผ่านอิเล็กตรอนจากกลูโคสไปยังตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนทำได้ยาก) [42]

### 2.3 ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)

ไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิคที่มีการนำสารชีวโมเลกุลหรือสารชีวภาพ (Biological-substance) ไปติดกับตัวตรวจวัดทางไฟฟ้าหรือทรานสดิวเซอร์ (Transducer) ทำให้วัดปริมาณสาร ตัวอย่างได้ภายในเวลาอันรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งภายในระบบจะประกอบด้วย 2 ส่วน ที่สำคัญคือ ส่วนของสารชีวภาพที่เชื่อมต่อกับส่วนของตัวตรวจวัดสัญญาณ ซึ่งทำหน้าที่แปลง สัญญาณทางไฟฟ้า [43] ดังรูป 2.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ขั้นแรกจะทำการตรึง สารชีวภาพบนตัวตรวจวัด สารที่ต้องการตรวจวัดจะจับกับสารชีวภาพอย่างจำเพาะเจาะจงโดยเรียก ขั้นตอนนี้ว่ากลไกการจดจำทางชีวภาพ (Biological recognition mechanism) จากการเข้าจับกันของ สารที่ต้องการตรวจวัดกับสารชีวภาพทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี ผลจากการเกิดปฏิกิริยาเกิดการ เปลี่ยนแปลง เช่น อิเล็กตรอน แสงและอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะเข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ หลังจากนั้นตัวแปลงสัญญาณรับและเปลี่ยนสัญญาณเฉพาะเป็นสัญญาณไฟฟ้า ผ่านเครื่องอ่าน สัญญาณทำให้สามารถอ่านค่าได้ ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า เทคนิคของการรับและแปลงสัญญาณทาง กายภาพ (Physical transduction technique) และค่าที่ได้ก็ทำให้ทราบปริมาณของสารที่ต้องการ ตรวจวัด





รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์

### 2.3.1 สารชีวภาพ

สารชีวภาพหรือสารไบโอคะตะลิสต์ (Biocatalyst) ที่มีความไวทางชีวภาพถูกนำมาใช้ในงานทางด้านไบโอเซนเซอร์ต้องเป็นสารที่มีคุณสมบัติไวและจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวัดเท่านั้น สารทางชีวภาพเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. เอนไซม์ (Enzyme)
2. แอนติบอดี (Antibody)
3. กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid)
4. รีเซพเตอร์ (Receptors)

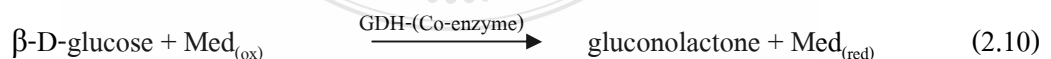
สารชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ทางไบโอเซนเซอร์ส่วนใหญ่คือ เอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง และยังสามารถนำมาตรึงบนตัวตรวจวัดได้ง่าย เอนไซม์จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เฉพาะ โดยจะเข้าจับกับสับสเตรทอย่างจำเพาะเจาะจง สารชีวภาพที่นำมาใช้ใน

เทคนิคไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส ได้แก่ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคส โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นสับสเตรทร่วม (Co-substrate) จากปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์กลูโคโนแลคโตน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ (2.9)



จากปฏิกิริยามีการใช้ออกซิเจนไปเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปจะสัมพันธ์กับปริมาณของกลูโคสที่มีในตัวอย่าง ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสของออกซิเจนได้โดยใช้ขั้วไฟฟ้าออกซิเจน (Oxygen electrode) แต่วิธีดังกล่าวนี้มีข้อจำกัดคือต้องให้ศักย์ไฟฟ้าสูงแก่ขั้วไฟฟ้าออกซิเจน ส่งผลให้กรดแอสคอร์บิก และกรดยูริก ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในตัวอย่างจะไปรบกวนผลการวิเคราะห์ [44] นอกจากนี้การตรวจวัดปริมาณออกซิเจนในสารละลายนั้นทำได้ยากเพราะปริมาณของออกซิเจนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ดังนั้นในการทดลองต้องควบคุมอุณหภูมิจึงไม่เหมาะสมกับการนำมาตรวจวัดกลูโคสในตัวอย่างจริง

เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาแทนที่เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดเนื่องจากผลของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลาย เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคสและไม่มีผลของปริมาณออกซิเจนรบกวน ทำให้ผลการตรวจวัดมีความถูกต้องสูง [45-47] โดยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจะทำงานร่วมกับโคเอนไซม์ (Coenzyme) เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกลูโคโนแลคโตน ดังสมการ (2.10) และ (2.11) ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอิเล็กตรอนในสารละลายทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น และสามารถตรวจวัดสัญญาณได้โดยตัวตรวจวัดทางไฟฟ้า



### 2.3.2 ตัวตรวจวัดสัญญาณหรือทรานสดิวเซอร์ (Transducers)

ตัวตรวจวัดสัญญาณทำหน้าที่เป็นตัวแปลงสัญญาณทางเคมี ฟิสิกส์ และชีวเคมี (สัญญาณที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด) ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าที่สามารถตรวจวัดได้นำไปขยายหรือแสดงผลออกมาในรูปของข้อมูลที่สามารถอ่านค่าได้ ตัวตรวจวัดสัญญาณที่นิยมนำมาใช้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์สามารถแบ่งออกตามลักษณะการทำงานได้ดังนี้คือ ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical) เช่น โปเทนทิโอเมตริก (Potentiometric) โวลแทมเมตริก (Voltammetric) ทางแสง (Optical) เช่น ออปติคคอลลเซนเซอร์ (Optical sensor) คอนดักติเมตริก (Conductimetric) ทางความร้อน (Calorimetric) เช่น เทอร์มิสเตอร์ (Thermistor) ทางคลื่นเสียงหรือความถี่ (Acoustic) เช่น พิโซอิเล็กทริกคริสตัลเซนเซอร์ (Piezoelectric crystals sensor) เป็นต้น สำหรับตัวตรวจวัดที่นิยมใช้สำหรับตรวจวัดกลูโคสในเทคนิคไบโอเซนเซอร์คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะมีข้อดี คือ มีความจำเพาะเจาะจง ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้เวลาน้อย และความไววิเคราะห์สูง [48-50]

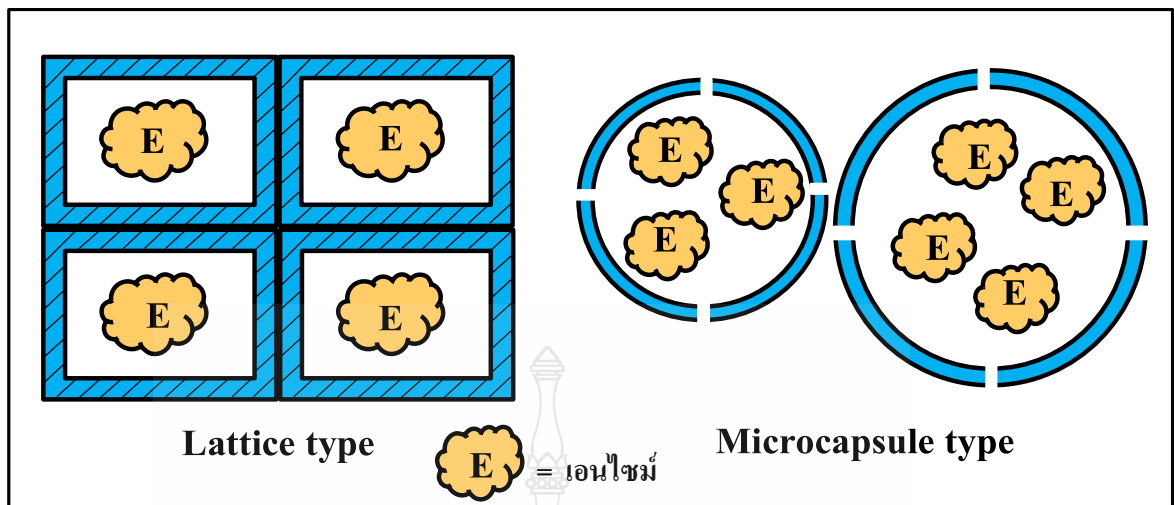
## 2.4 วิธีการตรึงเอนไซม์ (Immobilization)

การตรึงเอนไซม์หมายถึง การกำหนดหรือการทำให้เอนไซม์อยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ โดยโมเลกุลอาจใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะทางเคมีหรือไม่เกิดพันธะเคมี ข้อดีของการตรึงเอนไซม์ให้อยู่กับที่คือ สามารถนำเอนไซม์มาใช้ซ้ำได้ การตรึงเอนไซม์มีหลายวิธี ได้แก่ การห่อหุ้มและทำแคปซูล (Entrapment and Encapsulation) แรงยึดร่วม (Covalent linking) การดูดซับ (adsorption) และการเชื่อมไขว้ (Aggregation) [51]

### 2.4.1 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มหรือทำแคปซูล (Entrapment and Encapsulation)

การทำให้เอนไซม์ไม่ละลายน้ำด้วยวิธีห่อหุ้มหรือการทำแคปซูล โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มเอาไว้ด้วยเจลที่เป็นรูปตาราง (Lattice) หรือแคปซูล (Capsule) สายโซ่พอลิเมอร์ที่ห่อหุ้มเอนไซม์จะต้องสามารถป้องกันการสูญเสียเอนไซม์ได้ และในขณะเดียวกันก็ต้องยอมให้สารสับสเตรทเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ดี และผลิตภัณฑ์ที่ได้จะต้องซึมผ่านแคปซูลได้ง่ายด้วย

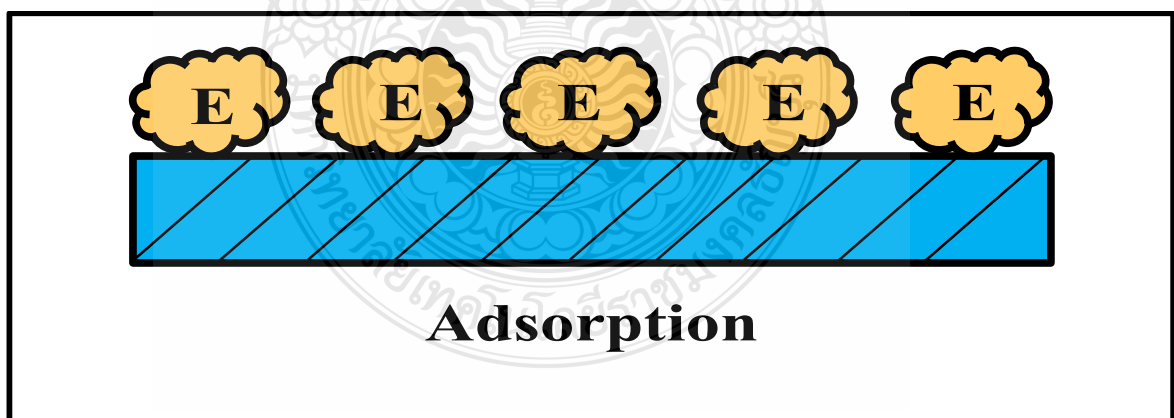
ดั่งรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การตรึงเอนไซม์แบบการห่อหุ้มและการทำแคปซูล

#### 2.4.2 การดูดซับ (Adsorption)

เป็นการตรึงเอนไซม์ด้วยการดูดซับเอนไซม์ไว้บนสารที่ไม่ละลายน้ำโดยอาศัยแรงไฮโดรโฟบิกอิเล็กโตรสแตติก (Hydrophobic electrostatic) หรือแรงยึดจับอื่นๆที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ (Noncovalent affinity) เป็นการดูดซับทางกายภาพเท่านั้น ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงติดอย่างหลวมๆ และไม่แข็งแรง ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การตรึงเอนไซม์แบบดูดซับ

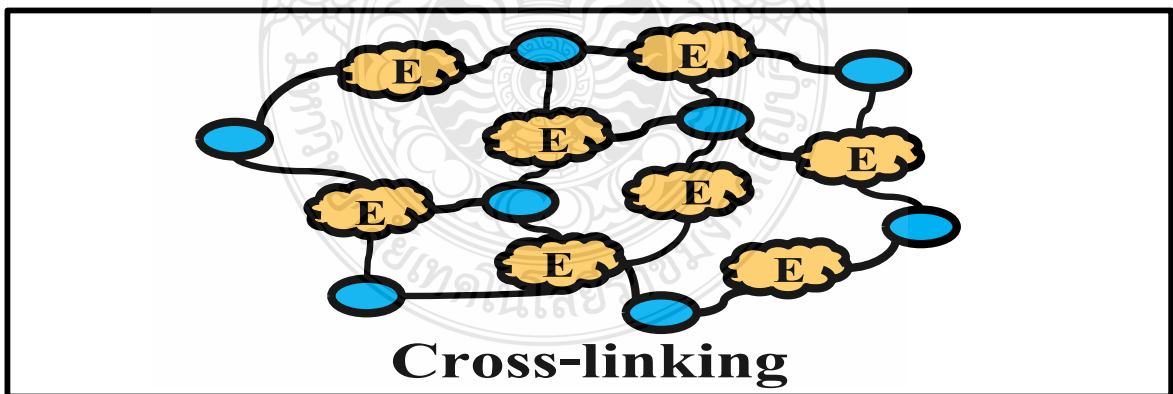
### 2.4.3 การตรึงแบบเชื่อมไขว้ (Cross-linking)

การเชื่อมไขว้เป็นวิธีที่อาศัยสารชนิดไบฟังก์ชันนอล (Bifunctional) หรือมัลติฟังก์ชันนอล (Multifunctional) เพื่อทำหน้าที่เชื่อมสารชีวภาพให้ยึดติดกับตัวตรวจวัด

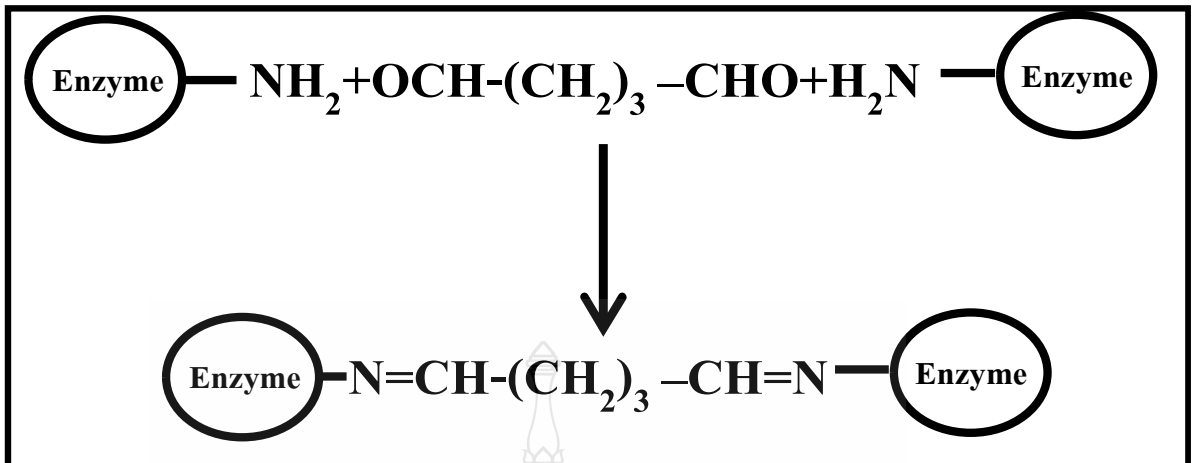
การเชื่อมไขว้กับเอนไซม์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ทั้งเอนไซม์ชนิดเดียวกัน หรือทำให้เกิดลักษณะการเชื่อมติดกันแบบร่างแหของโปรตีนที่แตกต่างกันมากกว่าหนึ่งชนิด ตัวอย่างเช่น การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับเอนไซม์ เอนไซม์กับโปรตีน หรือเอนไซม์ที่มีมากกว่าหนึ่งชนิดกับโปรตีนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้เกิดการเชื่อมติดกันในลักษณะร่างแหหรือตาข่าย ดังรูป 2.5 โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ได้หลายชนิด

กลูตาโรลดีไฮด์เป็นสารชนิดไบฟังก์ชันนอลที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเชื่อมไขว้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ [52] โครงสร้างของกลูตาโรลดีไฮด์ประกอบด้วยหมู่อัลดีไฮด์ 2 หมู่ ที่ปลายทั้ง 2 ข้างสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของเอนไซม์หรือโปรตีน ได้ด้วยพันธะโคเวเลนต์ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารกลูตาโรลดีไฮด์กับเอนไซม์โปรตีน แสดงดังรูปที่ 2.6

การตรึงเอนไซม์โดยวิธีเชื่อมไขว้พบว่า มีข้อดีคือ เอนไซม์จะถูกยึดติดบนตัวตรวจวัดอย่างแข็งแรงเนื่องจากเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับสารเชื่อมไขว้ทำให้เทคนิคไบโอเซนเซอร์มีความคงตัวสูงขึ้นเพราะพันธะโคเวเลนต์เป็นพันธะที่มีความแข็งแรง ตรึงง่ายและราคาถูก [53] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสไว้บนตัวตรวจวัดโดยใช้สารเชื่อมไขว้กลูตาโรลดีไฮด์



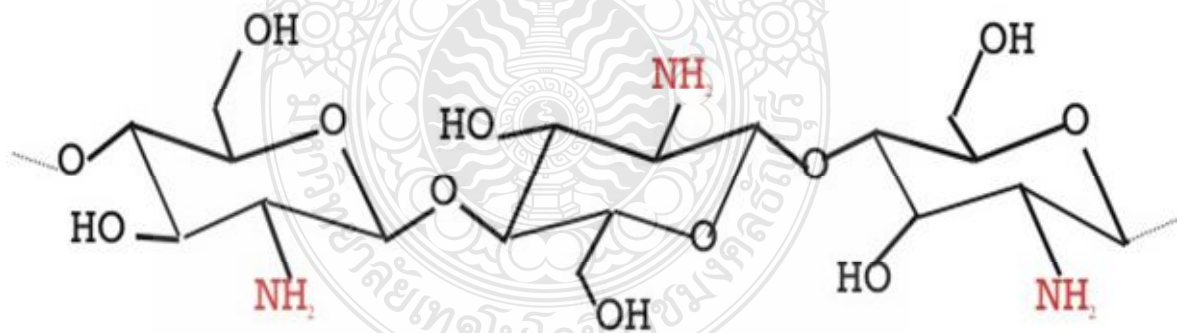
รูปที่ 2.5 การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้



รูปที่ 2.6 การเกิดปฏิกิริยาของสารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์กับเอนไซม์

## 2.5 การเชื่อมไขว้ด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonding)

ไคโตซานเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในรูปของ ดี-กลูโคซามีน (D-glucosamine) ดังรูปที่ 2.7 ไคโตซานมีหมู่เอมีนในสายโซ่ และมีสมบัติไม่เป็นพิษต่อสารชีวภาพด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงได้นำไคโตซานมาประยุกต์สำหรับตรึงเอนไซม์ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ [54-55]



รูปที่ 2.7 โครงสร้างไคโตซาน

เนื่องด้วยพื้นที่ผิวหน้าที่จำกัดของขั้วไฟฟ้า (พื้นที่หน้าตัด ~3 mm) ทำให้ไคโตซานสามารถจับกับเอนไซม์ได้น้อย ดังนั้นจึงได้นำวัสดุนาโนมาประยุกต์ใช้เนื่องจากวัสดุนาโนมีพื้นที่ผิวมาก และสามารถจับกับเอนไซม์ได้ดีจะช่วยเพิ่มปริมาณของเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า จึงทำให้วิธี



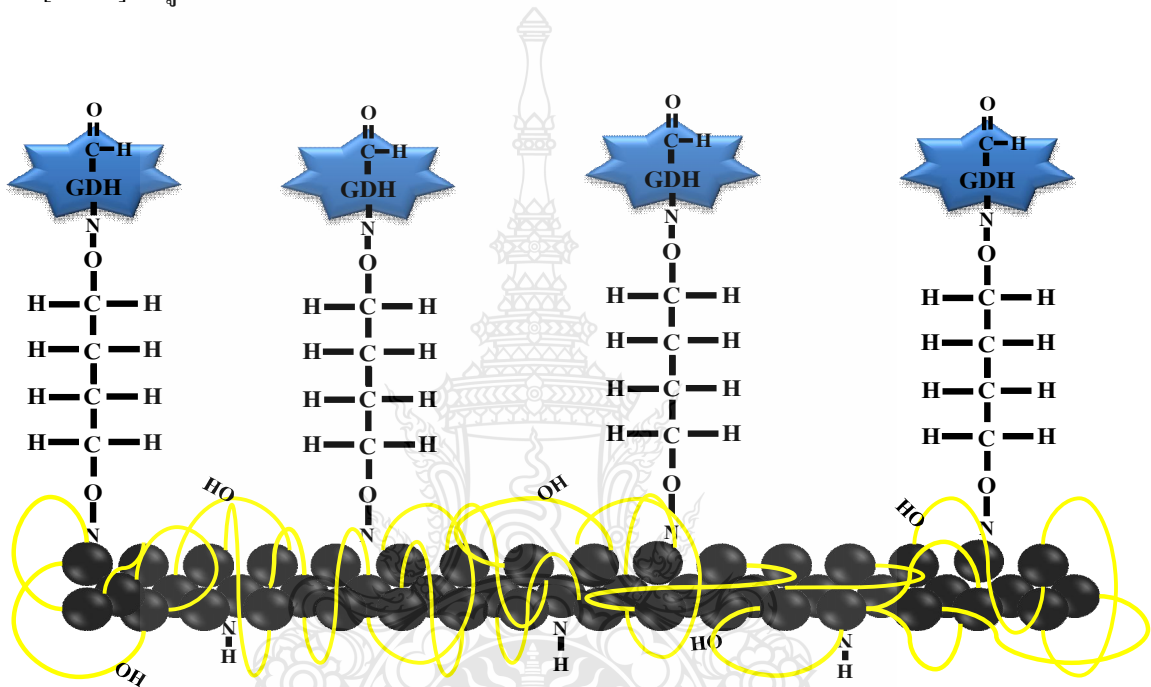
วิเคราะห์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ซึ่งวัสดุนาโนที่สนใจในงานนี้คือ นาโนพอลิไพโรล (Nanopolypyrroles) โดยการนำพอลิไพโรลมาสังเคราะห์ให้มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร พอลิไพโรลที่นำมาสังเคราะห์นี้มีสมบัตินำไฟฟ้าและเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลายในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ เพราะพอลิไพโรลมีคุณสมบัติเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ตีปลดกัยต่อสิ่งแวดล้อมและสังเคราะห์ได้ง่าย [56-59] การสังเคราะห์พอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ไพโรล ดังรูปที่ 2.8 โดยเมื่อเกิดเป็นพอลิไพโรลแล้วจะมีโครงสร้างแบบพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว (conjugated polymers) ซึ่งภายในโครงสร้างจะเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในโมเลกุลได้ ดังนั้นพอลิเมอร์ที่ได้จึงมีสมบัตินำไฟฟ้าได้ (electrically conducting polymers) [60]

การทำให้พอลิเมอร์พอลิไพโรล (Ppy) มีขนาดเล็กกลงในระดับนาโนเมตรนั้นสามารถเตรียมด้วยวิธีอิมัลชันพอลิเมอร์ไรเซชัน (Emulsion polymerization) [61-63] เช่น มาโครอิมัลชัน (macroemulsion) มินิอิมัลชัน (miniemulsion) และไมโครอิมัลชัน (microemulsion) โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือ steric stabilizer [64-66] ที่ใช้ในการสังเคราะห์เมื่อพอลิไพโรลมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรทำให้สมบัติเด่นขึ้น เช่น มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอน และสามารถนำไฟฟ้าได้ [67] จึงมีแนวโน้มที่จะช่วยในการเพิ่มความไววิเคราะห์ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ได้ ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกที่สังเคราะห์พอลิเมอร์ให้มีขนาดนาโนเมตรแล้วนำมาประยุกต์ใช้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์



รูปที่ 2.8 โครงสร้างมอนอเมอร์ไพโรล

สำหรับปฏิกิริยาการเกิดพันธะในแต่ละขั้นตอนของการตรึงไนโตรเจน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของโคโตซานที่ผสมกับนาโนพอลิไพโรล ซึ่งมีหมู่เอมีน ( $R-NH_2$ ) เป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้สามารถเกิดการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ของสารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์ ซึ่งปลายอีกข้างหนึ่งของกลูตารอลดีไฮด์จะไปเกิดพันธะโคเวเลนต์กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ จึงทำให้การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ มีความแข็งแรงสูง สามารถนำเอนไซม์ในสถานะที่ถูกตรึงไปใช้ซ้ำได้หลายครั้ง [68-69] ดังรูป 2.9



รูปที่ 2.9 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยใช้สารเชื่อมไขว้กลูตารอลดีไฮด์

## 2.6 ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical)

หลักการทางเคมีไฟฟ้าที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดสำหรับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ได้แก่

### 2.6.1 โปเทนทิโอเมตรี (Potentiometry)

เทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า ซึ่งในการวัดศักย์ไฟฟ้าจะต้องประกอบด้วย 2 ครึ่งเซลล์ (Half-cell) รวมกันเรียกว่าเซลล์เคมีไฟฟ้า (Electrochemical cell) ในแต่ละครึ่งเซลล์จะประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า (Electrode) และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (Electrode-electrolyte solution)

ครึ่งเซลล์ไฟฟ้าทั้งสองจะมีการเชื่อมกันภายในสะพานนำไฟฟ้า (Electrically-conducting bridge) หรือเมมเบรน (Membrane) และมีการเชื่อมกันภายนอกด้วยอุปกรณ์ที่วัดค่าศักย์ไฟฟ้า เช่น ดิจิตอลโวลต์มิเตอร์ (Digital voltmeter) หรือ DMV ซึ่งค่าความต้านทานภายในสูง (1012  $\Omega$ ) และมีกระแสไหลผ่านน้อยมาก ตัวอย่างเช่น การตรวจวัดยูเรีย (Urea) โดยตรึงเอนไซม์ยูเรียเอส (Urease) บนขั้วไฟฟ้าทำงานที่ประกอบด้วยคาร์บอนนาโนทิวป์ (Multi-walled-carbonnanotubes) และซิลิกา (Silica) โดยตรวจวัดด้วยเทคนิคโปเทนทิโอเมตรี ผลที่ได้คือมีค่ากระแสตอบสนองที่ดีในการตรวจวัดปริมาณยูเรีย ใช้เวลาในการรวดเร็ว และมีความไววิเคราะห์สูง [70]

### 2.6.2 แอมเพอโรเมตรี (Amperometry)

แอมเพอโรเมตรีเป็นวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการคือ ให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าทำงานเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า และวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา การวัดด้วยวิธีแอมเพอโรเมตรีถูกนำมาประยุกต์ใช้ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดกลูโคส ด้วยขั้วไฟฟ้าที่มีความไวต่อกลูโคส โดยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนขั้วไฟฟ้าออกซิเจน (Oxygen electrode) [71] ซึ่งขั้วไฟฟ้านี้จะวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ในปฏิกิริยา นอกจากนั้นยังได้นำวิธีวิเคราะห์ทางแอมเพอโรเมตรีมาประยุกต์ใช้สำหรับวัดออกซิเจน โดยตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนขั้วไฟฟ้าออกซิเจนแล้วนำขั้วไฟฟ้าไปจุ่มในสารตัวอย่างที่มีกลูโคส ออกซิเจนบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์ (ออกซิไดซ์กลูโคส) และปริมาณออกซิเจนบางส่วนจะเข้าสู่ตัวตรวจวัด สำหรับการวัดปริมาณของออกซิเจนด้วยตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยานี้จะแปรผันตรงกับปริมาณของออกซิเจน ดังนั้น การตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ต่อกลูโคส [19] จะขึ้นกับปริมาณของออกซิเจนในสารตัวอย่าง หรือช่วงการตอบสนองต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของออกซิเจนซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้สารตัวอย่างที่มีปริมาตรมากๆ หรือมีการให้ออกซิเจนให้กับสารตัวอย่างที่

ต้องการวัด นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิคแอมเพอโรเมตรีมาใช้ในการตรวจวัดสารชนิดอื่นๆ เช่น ตรวจวัดวิตามิน ซี (Ascorbic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือตรวจวัดไนตริกออกไซด์ (NO) เป็นต้น [72-74]

### 2.6.3 โวลแทมเมตรี (Voltammetry)

การวิเคราะห์ด้วยหลักการโวลแทมเมตรี อาศัยการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากับวงจรเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วทำการวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา การจัดเซลล์เคมีไฟฟ้าจะจัดแบบอิเล็กโทรไลติกเซลล์ (Electrolytic cells) เซลล์ไฟฟ้าจะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งแตกต่างจากโพเทนทิโอมิตรีคือ ขั้วไฟฟ้าในการทำโวลแทมเมตรีจะประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode) และขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) อุปกรณ์และเครื่องมือของเทคนิคโวลแทมเมตรีประกอบด้วย 2 ส่วนคือ เซลล์เคมีไฟฟ้าและเครื่องมือในการควบคุมสัญญาณไฟฟ้า โดยที่เซลล์เคมีไฟฟ้าประกอบด้วย

2.6.3.1 เซลล์โวลแทมเมตรี หรือเรียกว่าเซลล์เคมีไฟฟ้าจะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ในส่วนของขั้วไฟฟ้าประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วคือ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยขั้วไฟฟ้าทั้ง 3 ชนิดจะจุ่มในสารละลายที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ไม่มีผลในเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.10

#### 1) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode)

ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงจะต้องเป็นขั้วไฟฟ้าที่มีค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ตลอดการทดลอง โดยทำหน้าที่ควบคุมค่าศักย์ของขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าเงิน-เงินคลอไรด์ (Silver-silver chloride electrode; Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าคาโลเมลอิ่มตัว (Saturated-calomel electrode; SCE)

#### 2) ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode)

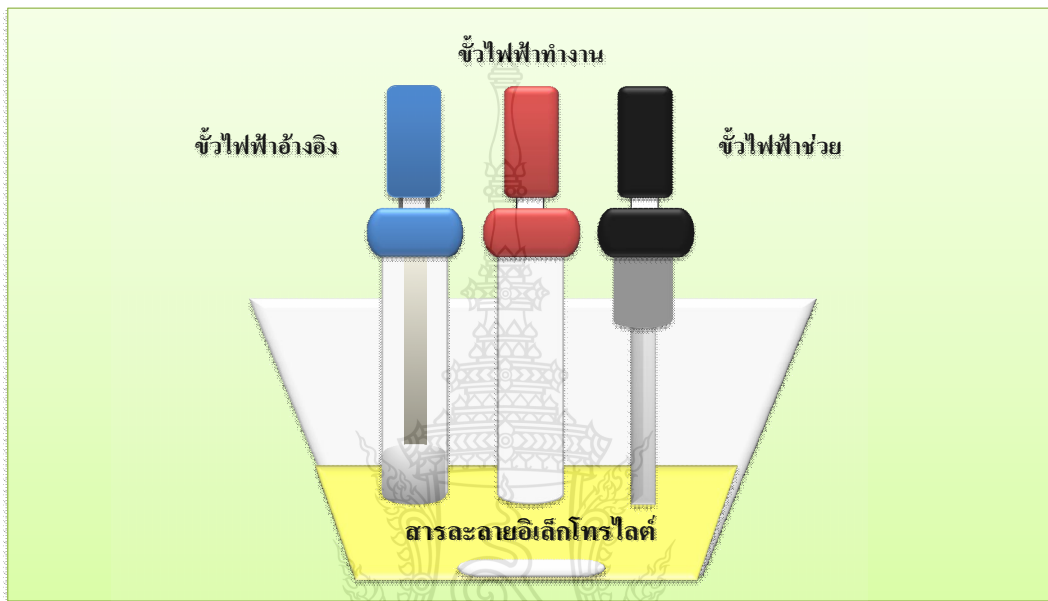
ขั้วไฟฟ้าช่วยเป็นขั้วไฟฟ้าที่รับค่ากระแสไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าอ้างอิงส่งผ่านสารละลายอิเล็กโทรไลต์ไปยังขั้วไฟฟ้าทำงาน ทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี เพื่อให้สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เกิดปฏิกิริยาเคมี โดยขั้วไฟฟ้าช่วยที่ดีในขณะที่เกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างจะต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้น

#### 3) ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode)

ขั้วไฟฟ้าทำงาน มีหน้าที่ให้ความต่างศักย์ หรือกระแสไฟฟ้า เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ผลจากการเกิดปฏิกิริยาขั้วไฟฟ้าทำงานจะทำหน้าที่ส่งความต่าง

ศักย์ หรือกระแสไฟฟ้าไปยังตัวตรวจวัด และตัวแปลงสัญญาณต่อไป เพื่อให้ได้สัญญาณทางไฟฟ้า  
ขั้วไฟฟ้าที่นิยมนำมาใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน เช่น แกรไฟต์ ทอง และแก๊สซีคาร์บอน เป็นต้น [75-80]

ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์จะนำขั้วไฟฟ้าทำงานมาปรับเปลี่ยน (Modified electrode) ด้วยการ  
ตรึงวัสดุชีวภาพเพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับสารที่ต้องการตรวจวัดได้โดยตรง [81-83]



## รูปที่ 2.10 เซลล์ไฟฟ้าในเทคนิคโวลแทมเมตรี

2.6.3.2 สารละลายอิเล็กโทรไลต์คือ สารที่เติมลงไปในการละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์โดยเติมสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในปริมาณที่มากกว่าตัวอย่างประมาณ 50-100 เท่า ทั้งนี้ สารละลายอิเล็กโทรไลต์ต้องไม่มีผลรบกวนในการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง แต่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ของไอออนในสารละลาย ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์ นิยมใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ทั้งนี้ นอกจากสารละลายบัฟเฟอร์จะทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ในสารละลายแล้วยังทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของสารชีวภาพอีกด้วย การเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ขึ้นอยู่กับชนิดและประเภทของสารชีวภาพ สำหรับเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส สารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เนื่องจากเอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดขึ้นขึ้นอยู่กับ พีเอช และความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ [84]

## 2.7 คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์

คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์มีดังนี้

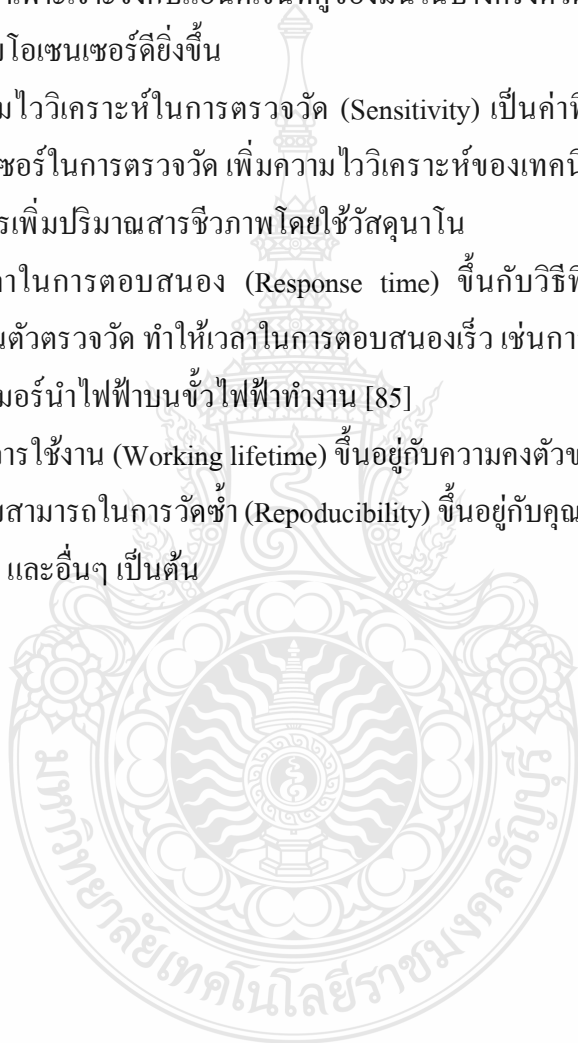
2.7.1 ความสามารถในการคัดเลือก (Selectivity) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเทคนิคไบโอเซนเซอร์ในการจับสับสเตรทที่แตกต่างกัน การจับกันขึ้นกับธรรมชาติของสารชีวภาพที่ใช้ เช่น เอนไซม์จะมีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทที่ต้องการตรวจวัด หรือ แอนติบอดีจะมีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่คู่ของมันในบางครั้งตัวตรวจวัดก็มีส่วนช่วยในการคัดเลือกของเทคนิคไบโอเซนเซอร์ดียิ่งขึ้น

2.7.2 ความไววิเคราะห์ในการตรวจวัด (Sensitivity) เป็นค่าที่แสดงถึงขีดความสามารถของเทคนิคไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัด เพิ่มความไววิเคราะห์ของเทคนิคไบโอเซนเซอร์ส่วนมากทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มปริมาณสารชีวภาพโดยใช้วัสดุนาโน

2.7.3 เวลาในการตอบสนอง (Response time) ขึ้นกับวิธีที่ใช้ในการตรึงสารชีวภาพ การตรึงสารชีวภาพบนตัวตรวจวัด ทำให้เวลาในการตอบสนองเร็ว เช่นการตรึงสารชีวภาพไว้ภายในฟิล์มบางของชั้นพอลิเมอร์นำไฟฟ้าบนขั้วไฟฟ้าทำงาน [85]

2.7.4 อายุการใช้งาน (Working lifetime) ขึ้นอยู่กับความคงตัวของสารชีวภาพ

2.7.5 ความสามารถในการวัดซ้ำ (Reproducibility) ขึ้นอยู่กับคุณภาพในการตรึงสารชีวภาพ วิธีการตรึงสารชีวภาพ และอื่นๆ เป็นต้น



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

##### 3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 ไพโรล (Pyrrole, SAFC)
- 3.1.1.2 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate ; SDS, Sigma)
- 3.1.1.3 ไอโซออกทิลฟีนิลเอเทอร์ (Isooctyl phenyl ether; Triton X-100, Lobachemie)
- 3.1.1.4 เฟอร์ริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต (Iron(III) chloride hexahydrate, Analytical reagent, Ajax Finechem)
- 3.1.1.5 ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์แลคเตต (Chitosan Oligosaccharide Lactate;CS (C<sub>99</sub>H<sub>10000</sub>), Sigma)
- 3.1.1.6 กลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde;HCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHO,Sigma)
- 3.1.1.7 เนฟิออน (Nafion, Sigma)
- 3.1.1.8 เฟอร์โรซีน (Ferrocene, Sigma)
- 3.1.1.9 กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (Glucose dehydrogenase (GDH, from *pseudomonas sp.*, >200 unit mg<sup>-1</sup>), Sigma)
- 3.1.1.10 เบต้าไนโคตินามายด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (β-Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), Sigma)
- 3.1.1.11 ดี-กลูโคส (D-glucose, Analytical reagent, Ajax Finechem)
- 3.1.1.12 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-Potassium hydrogen orthophosphate; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Analytical reagent , Ajax Finechem)
- 3.1.1.13 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Potassium dihydrogen orthophosphate; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Analytical reagent , Ajax Finechem)
- 3.1.1.14 พงอะลูมินา (Alumina powder; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(0.05μm), Metkon)
- 3.1.1.15 กรดอะซิติก (Acetic acid; CH<sub>3</sub>COOH, Analytical reagent, J.T.Baker)
- 3.1.1.16 เมทานอล (Methanol; CH<sub>3</sub>OH, HPLC grad, Carloerba)
- 3.1.1.17 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Analytical reagent, J.T.Baker)
- 3.1.1.18 กาวนำไฟฟ้า (Conductive Epoxy part A, Conductive Epoxy part B: USA)

3.1.1.19 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M พีเอช 6.5 เตรียมจากสารละลาย A คือ  $K_2HPO_4$  ชั่งมา 43.55 กรัม ปรับปริมาตร 500 ml และสารละลาย B คือ  $KH_2PO_4$  ชั่งมา 34.02 กรัม ปรับปริมาตร 500 ml นำสารละลาย A ปริมาตร 38.1 ml ผสมกับ สารละลาย B ปริมาตร 61.9 ml ปรับปริมาตรสุดท้าย 1000 ml ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีของ K.M. Deangelis

3.1.1.20 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 M พีเอช 4.8 เตรียมจากสารละลาย A คือ กรดอะซิติก ปิเปตมา 2.87 ml ปรับปริมาตร 50 ml สารละลาย B คือ โซเดียมอะซิเตต ชั่งมา 6.81 กรัม ปรับปริมาตร 50 ml นำสารละลาย A ปริมาตร 20 ml ผสมกับ สารละลาย B ปริมาตร 30 ml ปรับปริมาตรสุดท้าย 100 ml ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.02 M ชั่งมา 0.1168 กรัม ปรับปริมาตร 100 ml

3.1.1.21 สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 50 ml เตรียมจากการชั่งดี-กลูโคส 29.7256 g แล้วปรับปริมาตร 50 ml ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (3.1.1.19) ที่งัวข้ามคืนก่อนนำมาใช้งาน

3.1.1.22 ตัวอย่างซีรัมได้จากโรงพยาบาลเกษมราษฎร์

### 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.2.1 เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) พร้อมแท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar) ขนาด  $3\text{ cm}^2$

3.1.2.2 ไมโครปิเปต (Micro pipet) ขนาด 100, 1,000 และ 5,000  $\mu\text{l}$

3.1.2.3 ไม้คินสอ (STAEDTLER เยอรมัน) ชนิด 6H เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm

3.1.2.4 กระดาษทรายแบบหยาบ และแบบละเอียด

3.1.2.5 เข็มเจาะรูไม้คินสอ

3.1.2.6 ฉนวนหุ้มไฟฟ้า (ท่อพลาสติก)

3.1.2.7 เครื่องวัดกรดด่าง (pH meter, Denver instrument)

3.1.2.8 เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Particle size analyzer, Delsa nano C, Beckman)

3.1.2.9 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM, JSM-6340F, JEOL)

3.1.2.10 เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า (663 VA Stand  $\Omega$  Metrohm swiss made)

1) ขั้วไฟฟ้าเกรไฟต์เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode)

2) ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference-electrode)

3) ขั้วไฟฟ้าแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (Auxillary electrode)



## 3.2 การทดลอง

### 3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิไพโรลด้วยวิธีอิมัลชันพอลิเมอร์ไรเซชัน

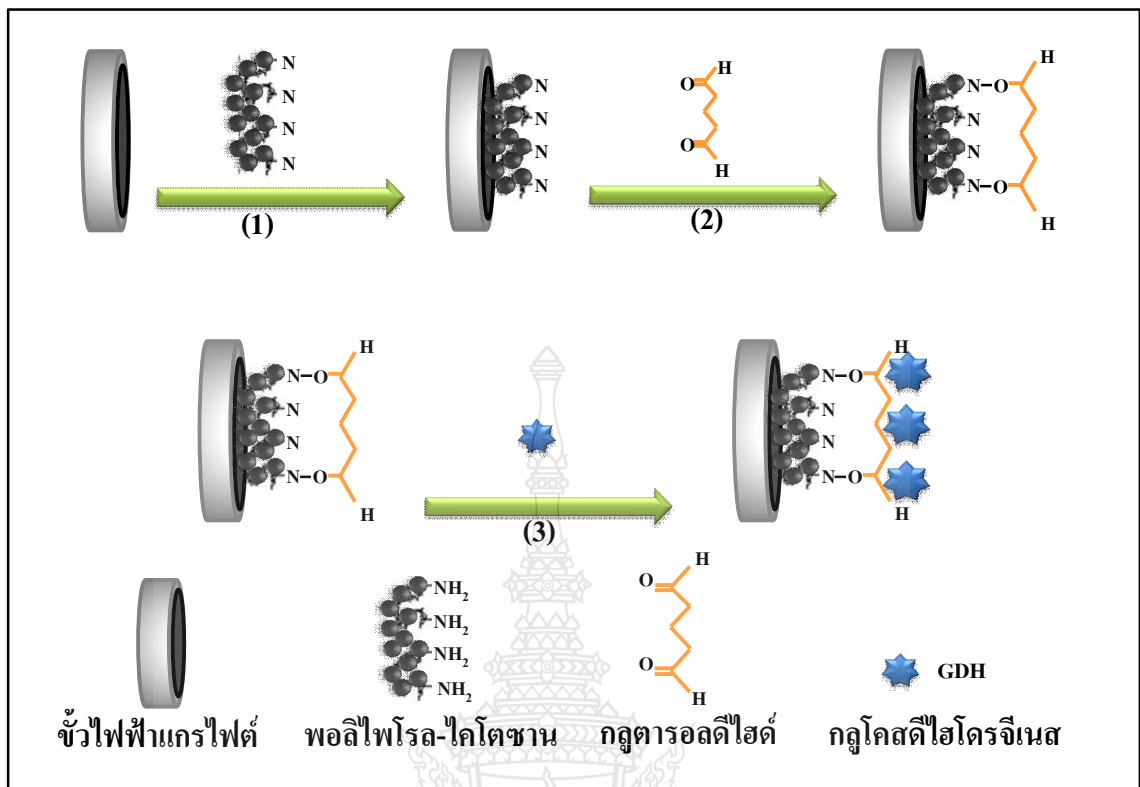
ผสมโซเดียมโคเดกซิลซัลเฟต จำนวน 4.1818 g และไอโซออกทิลฟีนิลเอสเทอร์ ปริมาตร 3,529  $\mu\text{l}$  ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 40 ml ที่อุณหภูมิ 3 °C ภายใต้สภาวะการคนตลอดเวลา จากนั้นหยดไพโรล 0.5 g ลงในสารละลายดังกล่าวผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ต่อไปเติมเฟอร์ริกคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต 17.39 mM ปริมาตร 5 ml คนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากนั้นล้างด้วย น้ำกลั่น อะซิโตน และเมทานอล ตามลำดับ สุดท้ายนำไปอบในตู้อบสูญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.2.2 ประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าทำงานเกรฟไฟต์

เตรียมขั้วไฟฟ้าทำงานโดยการตัดไส้ดินสอด 6H ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ให้มีความยาว 2  $\text{cm}^2$  แล้วเจาะรูไส้ดินสอดให้ลึก 2 mm หลังจากนั้นนำลวดนำไฟฟ้ามาต่อลงไปกับไส้ดินสอดแล้วทาด้วยกาวนำไฟฟ้า ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำท่อพลาสติกความยาว 10  $\text{cm}^2$  ซึ่งเป็นฉนวนมาหุ้ม นำขั้วไฟฟ้าทำงานที่เตรียมได้ไปขัดด้วยกระดาษทรายทั้งแบบหยาบและละเอียด จากนั้นนำมาขัดกับผงอะลูมินา 0.5  $\mu\text{m}$  แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ล้างด้วยน้ำกลั่นก็จะได้ขั้วไฟฟ้าทำงานจากไส้ดินสอดก่อนใช้งานต้องนำไปกระตุ้นผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 M และให้ศักย์ไฟฟ้าที่ +1.8 V เป็นเวลา 5 นาที

### 3.2.3 เครื่องมือเครื่องมือโคสตีไฮโดรเจนสบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

ขั้นตอนการเตรียมเครื่องมือโคสตีไฮโดรเจนส ดังรูปที่ 3.1 โดยขั้นแรกนำขั้วไฟฟ้าทำงานจุ่มลงในสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลายโคโคซานความเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 2,000  $\mu\text{l}$  ผสมกับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลปริมาตร 1,000  $\mu\text{l}$  และให้ศักย์ไฟฟ้าที่ +1.5 V เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมตรี ขั้นที่ 2 นำขั้วไฟฟ้างดังกล่าวไปจุ่มในสารละลาย กลูตาโรลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที ขั้นที่ 3 นำขั้วไฟฟ้าทำงานมาจุ่มลงในเอ็นไซม์กลูโคสไฮโดรเจนส ความเข้มข้น 2.50 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดโคเอนไซม์เบต้า-นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ลงบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้นสุดท้ายหยดสารละลายเนฟิออนความเข้มข้น 1% (V/V) ปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

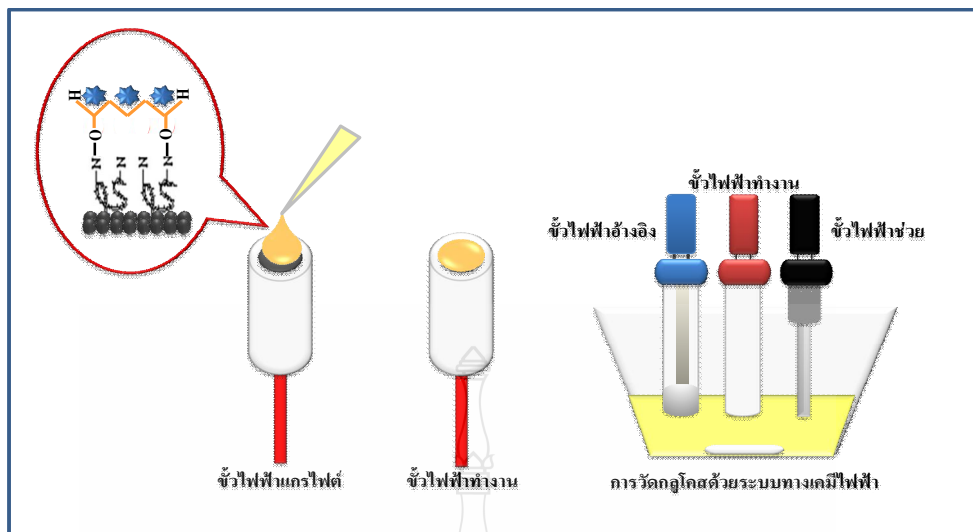


รูปที่ 3.1 การตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส บนขั้วไฟฟ้าทำงาน ชั้นที่ 1 ตรึงนาโนพอลิไพโรล

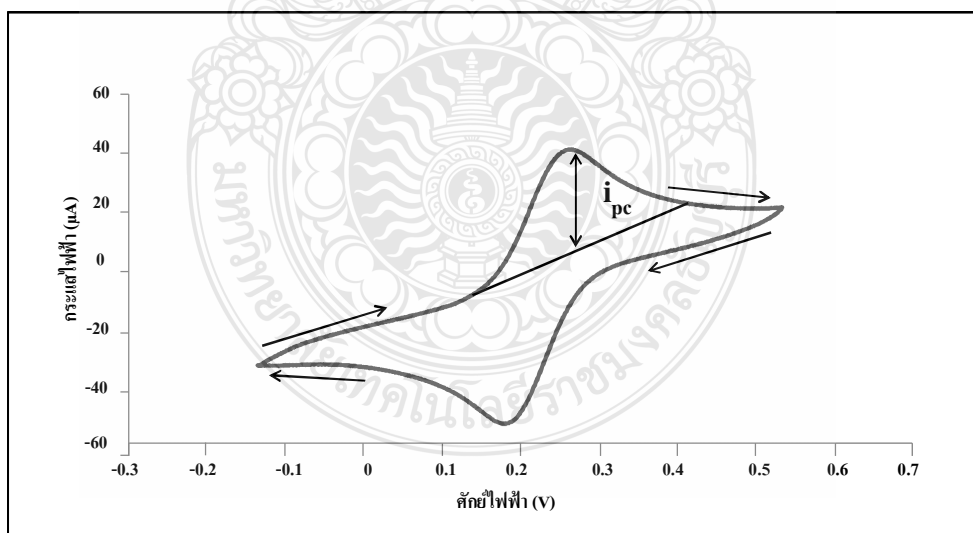
ผสมกับสารละลายโคโตซานบนขั้วไฟฟ้า ชั้นที่ 2 ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์/อนุภาคนาโนพอลิไพโรลผสมกับสารละลายโคโตซานจุ่มลงในสารละลายกลูตารอลดีไฮด์ ชั้นที่ 3 ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์/อนุภาคนาโนพอลิไพโรลผสมกับสารละลายโคโตซาน/สารละลายกลูตารอลดีไฮด์จุ่มลงในเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส

### 3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

ระบบเคมีไฟฟ้าประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ดังรูปที่ 3.2 ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (ขั้วไฟฟ้าทำงาน) ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง) และขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (ขั้วไฟฟ้าช่วย) โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งหมดไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 7.00 ที่มีสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu$ l โดยตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคส 3 M ปริมาตร 50  $\mu$ l ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 ถึง +0.6 V ด้วยอัตราการสแกน 50 mV/s และเมื่อเติมกลูโคสจะเกิดค่ากระแสไฟฟ้าแคโทดิกขึ้น ดังรูป 3.3 ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จะแปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของกลูโคส



รูปที่ 3.2 แสดงระบบเคมีไฟฟ้าประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (ขั้วไฟฟ้าทำงาน) ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง) ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (ขั้วไฟฟ้าช่วย) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 7.00 ที่มีสารละลายเพอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM โดยตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคส 3 M ปริมาตร 50  $\mu$ l โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 ถึง +0.6 V ด้วยอัตราการสแกน 50 mV/s



รูปที่ 3.3 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยานิด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.10 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 mV/s

### 3.2.5 หาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไบโอเซนเซอร์

#### 3.2.5.1 หาปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่เหมาะสมในการตรึง

ศึกษาปริมาณของอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่ปริมาตร 100 500 1,000 และ 1,500  $\mu\text{l}$  โดยใช้ปริมาตรของสารละลายโคโคซานคงที่ที่ปริมาตร 2,000  $\mu\text{l}$  ผสมกับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่ปริมาตรต่างๆ จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน นำขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้วไปจุ่มในสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสความเข้มข้น 2.50 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และหยดสารละลายโคโคซานความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  และสารละลายเนฟิออนลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าความเข้มข้น 5% (v/v) ปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และขั้วไฟฟ้าช่วย ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 7.00 ที่มีสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ให้ศักย์ไฟฟ้า ในช่วง -0.2 ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในแต่ละขั้วไฟฟ้า

#### 3.2.5.2 หาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสม

ศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับตรึงลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานด้วยเทคนิคการตรึงแบบสารเชื่อมไขว้กับสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ โดยศึกษาเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.80, 1.25, 2.50 และ 5.00 mg/ml โดยนำขั้วไฟฟ้าทำงานจุ่มในสารละลายโคโคซานปริมาตร 2,000  $\mu\text{l}$  ผสมกับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลปริมาตร 1,000  $\mu\text{l}$  ได้จาก (3.2.5.1) ให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 V นาน 5 นาที นำขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละขั้วจุ่มในสารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้วหยดโคโคซานกับสารละลายเนฟิออนลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ขั้นตอนต่อไปนำขั้วไฟฟ้าไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าทำงานลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.10 M พีเอช 7.00 ที่มีสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ให้ศักย์ไฟฟ้า ในช่วง -0.2 ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s วัดค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในแต่ละขั้ว

#### 3.2.5.3 หาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ในการทดลองทำการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 1.50 และ 2.00 M พีเอช 7.00 นำขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละขั้วจุ่มลงในสารละลาย

ฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งมีสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu$ l ให้ ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s และเติมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 50  $\mu$ l เพื่อหาค่ากระแสการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าทำงาน

#### 3.2.5.4 หาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่เหมาะสม

ศึกษาหาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์หา ปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีที่พีเอช 5.00, 5.50, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 และ 8.00 นำขั้วไฟฟ้าทำงานจุ่มลงในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น (3.2.5.3) ที่พีเอชค่าต่างๆ ซึ่งมีสารละลาย เฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu$ l ให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s และเติมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 50  $\mu$ l เพื่อหาค่ากระแสการตอบสนองของขั้วไฟฟ้า ทำงาน

#### 3.2.6 หาประสิทธิภาพของวิธีไบโอเซนเซอร์

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 3.1 เพื่อทำการหาประสิทธิภาพของขั้วไฟฟ้า ทำงานดังต่อไปนี้

##### ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะของการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

การทดลอง	สภาวะที่เหมาะสม
1. ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส	2.5 mg/ml
2. พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์	พีเอช 6.50
3. ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์	0.05 M
4. ศักย์ไฟฟ้า	-0.2 ถึง +0.6 V
5. สารละลายอิเล็กโทรไลต์	10 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}$
6. อัตราการสแกน	50 mV/s

### 3.2.6.1 ศึกษาการทำซ้ำของการวิเคราะห์ (Repeatability)

นำขั้วไฟฟ้าทำงานมาวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.6 M ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ทำการวัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยสารละลายในเซลล์ไฟฟ้าเคมีประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M พีเอช 6.50 ที่ผสมด้วยสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu$ l ให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 V ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s นำค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อกลูโคสในแต่ละครั้งคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.2.6.2 ศึกษาการทวนซ้ำของการวิเคราะห์ (Reproducibility)

ทำการทวนสอบวิธีโดยใช้ขั้วไฟฟ้าทำงาน 5 ขั้ว เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.6 M แล้วนำค่ากระแสการตอบสนองของขั้วไฟฟ้าทำงานแต่ละขั้วไปคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.2.6.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธี

ทำการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของวิธี (% Recovery) เพื่อศึกษาความถูกต้องแม่นยำของวิธี โดยเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 5.00 mM ลงในตัวอย่างเลือดจำนวน 3 ตัวอย่าง แล้วนำค่ากระแสที่วัดได้จากการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ

### 3.2.6.4 จิตจำกััดในการตรวจพบ

ทำการวัดแบลนด์สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่าง (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M ที่พีเอช 6.50) จำนวน 7 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณหาค่าจิตจำกััดในการตรวจพบ

### 3.2.6.5 จิตจำกััดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ

ทำการวัดแบลนด์สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่าง (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M ที่พีเอช 6.50) จำนวน 7 ครั้ง นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณหาค่าจิตจำกััดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ จากนั้นหาความถูกต้องของวิธีและความเที่ยงของวิธีที่ความเข้มข้นกลูโคสที่เป็นจิตจำกััดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ

### 3.2.6.6 ช่วงความเป็นเส้นตรง

นำขั้วไฟฟ้าทำงานมาวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.10, - 0.50, 1.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 35.00, 40.00, 45.00, 50.00, 55.00 และ 60.00 mM แล้วนำค่ากระแสที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับกลูโคสในแต่ความเข้มข้น เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดและสมการเส้นตรง

### 3.2.6.7 ศึกษาผลของตัวรบกวน

ทำการศึกษาผลของตัวรบกวนโดยนำขั้วไฟฟ้าทำงานมาวิเคราะห์หาปริมาณตัวรบกวนที่สามารถพบได้ในตัวอย่างเลือด เช่น ซูโครส, ฟรุกโทส, กรดยูริก และ แอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.6 M ปริมาตร 50  $\mu$ l แล้วนำค่ากระแสที่วัดได้จากตัวรบกวนแต่ละตัวมาเปรียบเทียบกับค่ากระแสที่วัดได้จากกลูโคส ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 50  $\mu$ l ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M พีเอช 6.50 ที่ผสมด้วยสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50  $\mu$ l ให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2V ถึง +0.6V อัตราการสแกน 50 mV/s

### 3.2.6.8 ศึกษาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า

นำขั้วไฟฟ้าทำงานมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ความเข้มข้น 0.6 M แล้วนำค่ากระแสที่ได้มาเปรียบเทียบกับระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ในครั้งแรกและค่ากระแสที่วัดได้ในครั้งสุดท้าย

### 3.2.6.9 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพด้วยวัสดุนาโนพอลิไพโรล

นำขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์จำนวน 2 ขั้ว มาทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส โดยขั้วไฟฟ้าขั้วแรกใช้สารละลายโคโคซานปริมาตร 3,000  $\mu$ l และขั้วไฟฟ้าขั้วที่สองใช้สารละลายโคโคซานที่ปริมาตร 2,000  $\mu$ l ผสมกับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่ปริมาตร 1,000  $\mu$ l ตามลำดับ จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้วไปให้ศักย์ไฟฟ้า +1.5 V และจุ่มในสารละลาย กลูตาโรลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสความเข้มข้น 2.50 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ หยดสารละลายโคโคซานความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 10  $\mu$ l และสุดท้ายหยดสารละลายเนฟิออนลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ความเข้มข้น 5% (v/v) ปริมาตร 5  $\mu$ l นำขั้วไฟฟ้าทั้ง 2 ขั้วไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ความเข้มข้น 0.6 M แล้วนำค่ากระแสที่ได้มาเปรียบเทียบกับ

### 3.2.6.10 หาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างเลือด

สร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20 mM จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างเลือด จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยทำการเจือจางตัวอย่างเลือดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M พีเอช 6.50 ก่อนทำการวิเคราะห์ แล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากกลูโคสในตัวอย่างเลือดมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Enzymatic Colorimetric method) ทดสอบความแตกต่างของสองวิธีด้วยค่าทางสถิติ t-test





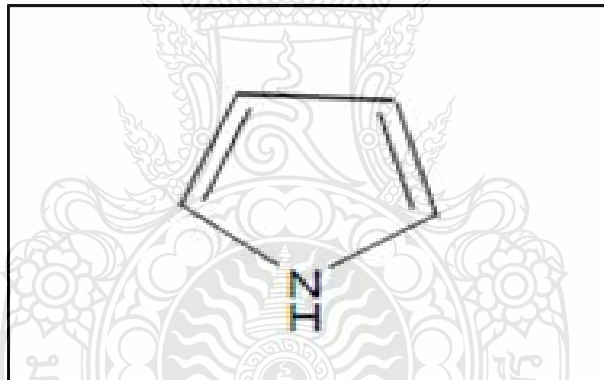
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจัยหรือวิเคราะห์ผล

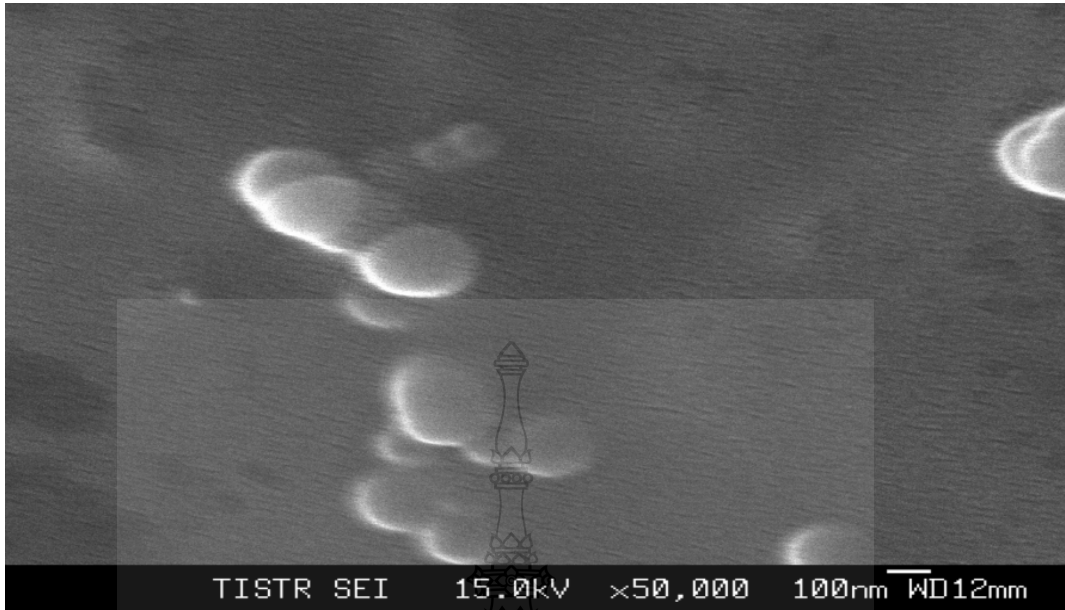
#### 4.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิไพโรลด้วยวิธีอิมัลชันพอลิเมอร์ไรเซชัน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิไพโรลจากมอนอเมอร์ของไพโรล รูปที่ 4.1 ด้วยวิธีการสังเคราะห์แบบอิมัลชันพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิดคือ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต) และสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ (ไอโซออกทิลฟีนิล เอสเทอร์) ในอัตราส่วน 0.3 M และ 0.15 M ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ผลการสังเคราะห์เมื่อนำอนุภาคที่ได้จากการสังเคราะห์ไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดังรูปที่ 4.2 พบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลม และมีขนาดเฉลี่ย 100 nm



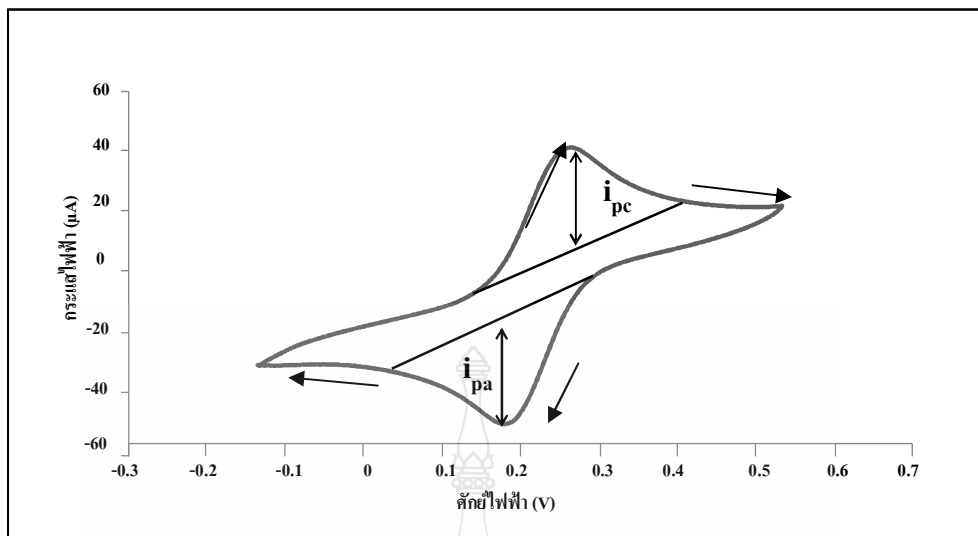
รูปที่ 4.1 แสดงสูตรโครงสร้างมอนอเมอร์ของไพโรล



รูปที่ 4.2 ภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงรูปร่างลักษณะของอนุภาคนาโนพอลิไพโรล

#### 4.2 การประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าทำงานแกรไฟต์

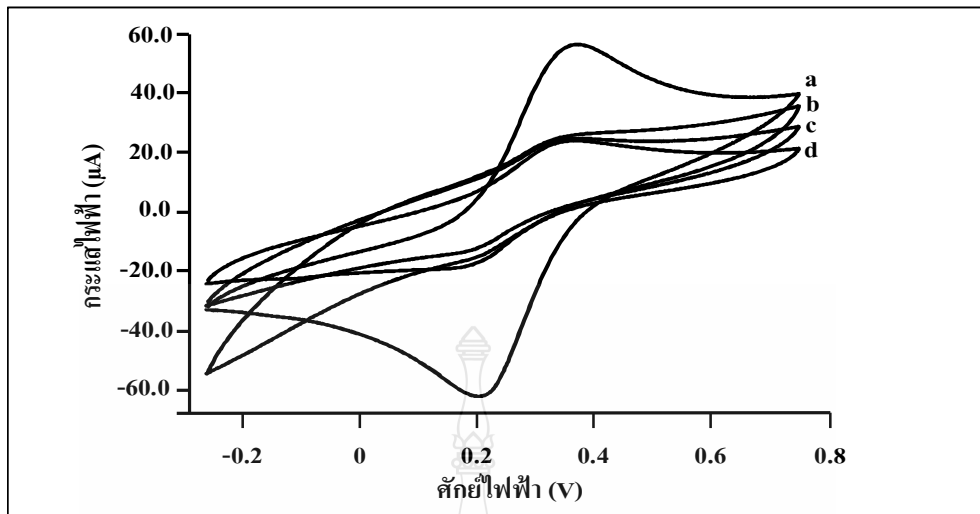
ประสิทธิภาพของขั้วไฟฟ้าทำงานแกรไฟต์ที่ประดิษฐ์ขึ้นสำหรับนำมาใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานต่อไป โดยพิจารณาจากค่ากระแสแอโนดิกและแคโทดิกที่เกิดขึ้น ด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรีในสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ผลการทดลองพบว่าค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นทั้งกระแสแอโนดิก และแคโทดิกมีค่าเท่ากันดังรูปที่ 4.3 เกิดเนื่องจากในสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างสารละลายไปยังผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้ดีหรือเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้สมบูรณ์แสดงว่าขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาสามารถทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานได้ดี



รูปที่ 4.3 แสดงโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ ความเข้มข้น 10 mM ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 mV/s

#### 4.3 ผลการตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์

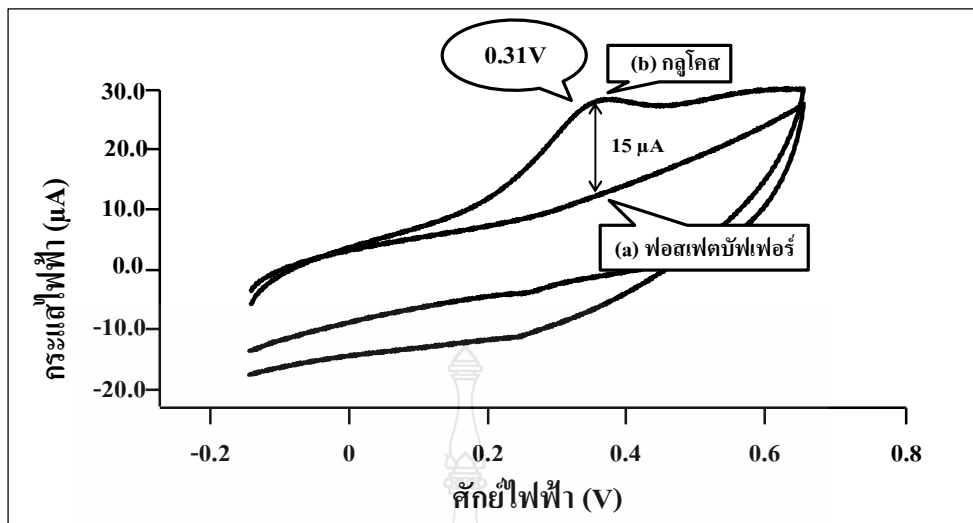
การตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยใช้กลูตารอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้เชื่อมต่อบetween เอนไซม์กับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลแต่ละขั้นตอนของการตรึงเอนไซม์สามารถตรวจสอบการเกาะติดบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำงานด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี โดยนำขั้วไฟฟ้าทำงานจุ่มลงในสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.4 ขั้วไฟฟ้าเปล่าให้ค่ากระแสไฟฟ้ารีดอกซ์ได้สมบูรณ์ (4.4 a) ทั้งนี้เพราะที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าไม่มีสิ่งใดปกคลุมจึงสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้สมบูรณ์ เมื่อตรึงขั้วไฟฟ้าด้วยโคโตซานที่ผสมกับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลและกลูตารอลดีไฮด์ (4.4 b และ 4.4 c) ค่ากระแสไฟฟ้าที่แคโทดิกและแอนอดิกลดลง ตามลำดับ แสดงว่าทั้งโคโตซานที่ผสมกับอนุภาคนาโนพอลิไพโรลและกลูตารอลดีไฮด์สามารถตรึงบนขั้วไฟฟ้าได้ ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ลดน้อยลง จากนั้นขั้นสุดท้ายตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้า ค่ากระแสไฟฟ้าที่แคโทดิกและแอนอดิกลดลง แสดงว่าเอนไซม์สามารถตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงานได้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสได้ต่อไป



รูปที่ 4.4 แสดงโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์เปล้า (a), ตรึงด้วยไคโตซานและนาโนพอลิไพโรล/ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (b), ตรึงกลูตารอลดีไฮด์บนไคโตซานและนาโนพอลิไพโรล/ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (c) และเอมไซม์/กลูตารอลดีไฮด์/ไคโตซานและนาโนพอลิไพโรล/ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ (d) ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์: 10 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}$  ในสารละลาย 0.1 M KCl อัตราการสแกน 50 mV/s

#### 4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

ผลจากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยนำขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส จุ่มลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายเฟอร์โรซีนทำหน้าที่เป็นสารส่งผ่านอิเล็กตรอน ในช่วงศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V ดังรูปที่ 4.5 เมื่อเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์กระแสไฟฟ้าแคโทดิกไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้เพราะฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสได้จึงไม่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ค่ากระแสไฟฟ้าจึงไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่เติมสารละลายกลูโคสจะเกิดค่ากระแสไฟฟ้าแคโทดิก 15.0  $\mu\text{A}$  ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.31 V แสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสมีการตอบสนองกับกลูโคสสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้จึงมีการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนทำให้เกิดค่ากระแสไฟฟ้าขึ้นที่ศักย์ไฟฟ้า 0.31 V ดังนั้นสัญญาณกระแสไฟฟ้าตอบสนองของกลูโคสจึงวัดที่ 0.31 V ตลอดการทดลอง



รูปที่ 4.5 แสดงโวลแทมโมแกรม ของขั้วไฟฟ้าทำงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M พีเอช 6.50 เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (a) และเมื่อเติมสารละลายกลูโคส (b) ที่มีสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 0.1 mM โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้อัตราการสแกน 50 mV/s

#### 4.5 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไบโอเซนเซอร์

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริงได้ โดยสภาวะที่ทำการศึกษาได้แก่ การหาปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่เหมาะสมในการตรึง การหาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสม การหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และการหาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สรุปได้ดังตารางที่ 4.1 ทุกสภาวะที่ศึกษาทำการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ต้องการศึกษาส่วนสภาวะอื่นๆคงที่

##### ตารางที่ 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

สภาวะที่ศึกษา	การทดลอง
1. การหาปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่เหมาะสมในการตรึงด้วยวิธี Deposition	100 500 1,000 และ 1,500 $\mu\text{l}$
2. การหาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสม	0.80, 1.25, 2.50 และ 5.00 mg/ml
3. การหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม	0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 1.50 และ 2.00 M พีเอช 7.00
4. การหาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	5.00, 5.50, 6.00, 6.50, 7.00 และ 7.50

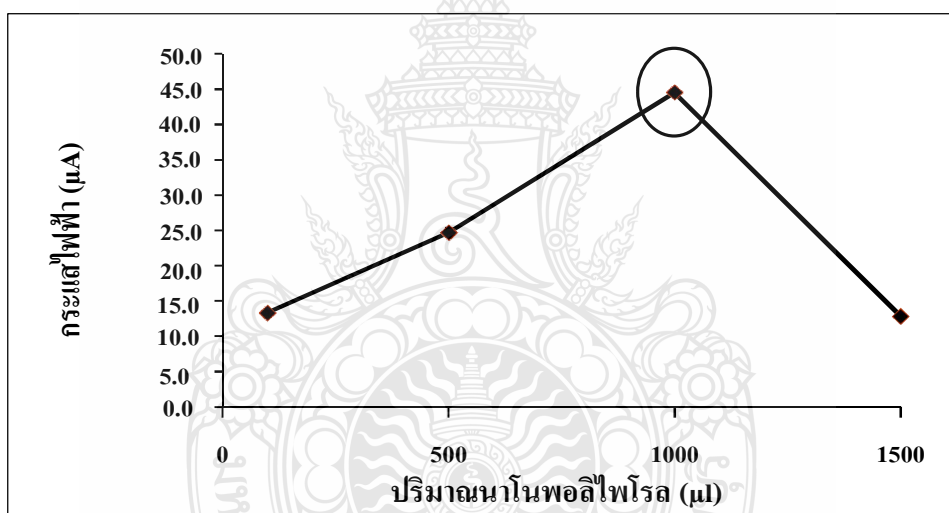
##### 4.5.1 ผลการหาปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่เหมาะสมในการตรึง

อนุภาคนาโนพอลิไพโรลมีสมบัติที่สามารถนำไฟฟ้าได้จึงช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาที่ได้ไปยังขั้วไฟฟ้าทำงาน แต่เนื่องด้วยพื้นที่หน้าตัดของขั้วไฟฟ้ามีจำกัดทำให้อนุภาคนาโนพอลิไพโรลสามารถเกาะติดได้ในปริมาณที่เหมาะสมเท่านั้น จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.6 เมื่อปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรลเพิ่มขึ้นค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้เพิ่มขึ้น และที่ปริมาตรอนุภาคนาโนพอลิไพโรล 1,000  $\mu\text{l}$  ให้ค่าการตอบสนองสูงสุดแต่เมื่อปริมาณอนุภาคนาโนพอลิไพโรลมากกว่า 1,000  $\mu\text{l}$  ค่ากระแสไฟฟ้าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลความเกาะกั (Steric effect) และความหนาในการเกาะติดของเอนไซม์และอนุภาคนาโนพอลิไพโรลบนขั้วไฟฟ้า ซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพในการส่งผ่านอิเล็กตรอนเป็นไปได้ยากจึงทำให้ค่ากระแสลดลงเมื่อใส่อนุภาคนาโนพอลิไพโรลมากกว่า 1,000  $\mu\text{l}$

ดังนั้นจึงเลือกอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่ปริมาตร 1,000  $\mu\text{l}$  สำหรับใช้ในการตรึงเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาปริมาตรของอนุภาคนาโนพอลิไพโรลสำหรับตรึงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์

ปริมาณนาโนพอลิไพโรล ( $\mu\text{l}$ )	กระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
100	13.2	13.7	13.0	13.3	0.0
500	25.3	24.0	24.8	24.7	0.1
1,000	43.4	44.9	45.2	44.5	0.0
1,500	13.9	12.7	12.0	12.9	0.1



รูปที่ 4.6 ผลการศึกษาปริมาตรของอนุภาคนาโนพอลิไพโรลสำหรับตรึงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์

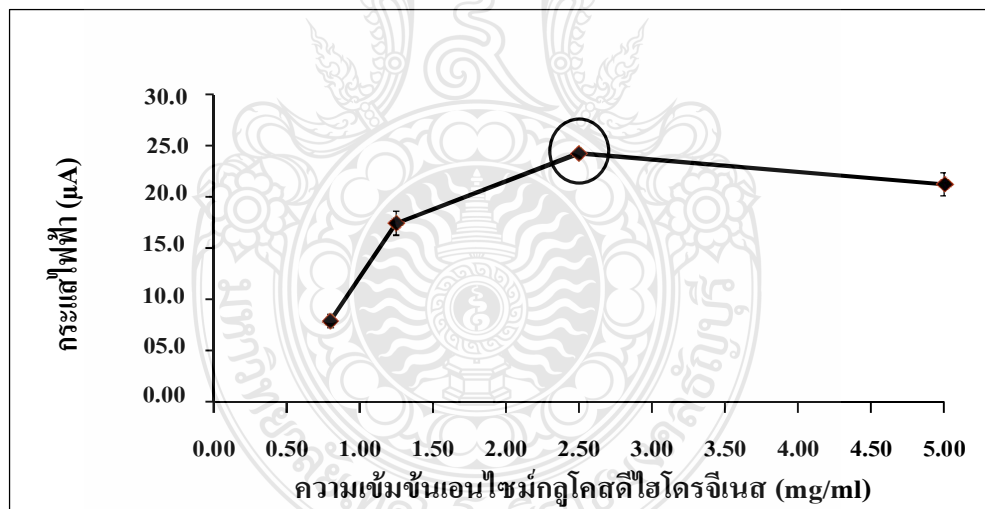
#### 4.5.2 ผลการหาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสม

จากการศึกษาปริมาณของเอนไซม์พบว่าเมื่อผลต่อการวัดปริมาณกลูโคส ซึ่งถ้าปริมาณของเอนไซม์มีน้อยจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของขั้วไฟฟ้าลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาได้น้อยและถ้าปริมาณของเอนไซม์มีมากอาจจะทำให้บดบังการส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างสารละลายกับขั้วไฟฟ้า จึงต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการศึกษาเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.80-5.00 mg/ml ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.7 พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส

ที่ 2.50 mg/ml ให้ค่าการตอบสนองมากที่สุดและเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 2.50 mg/ml ค่าการตอบสนองลดลง ทั้งนี้เพราะพื้นที่บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ามีจำกัดจึงทำให้ไม่มีผลเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปมากขึ้น และนอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการบดบังทำให้เกิดปฏิกิริยากับกลูโคสและการส่งผ่านอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้ยากอีกด้วยทำให้สัญญาณการตอบสนองลดลง ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml สำหรับทำการทดลองครั้งต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส

ความเข้มข้น เอนไซม์	กระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
0.80	7.3	8.6	7.8	7.9	0.1
1.25	18.7	17.1	16.4	17.4	1.2
2.50	24.2	24.3	24.3	24.2	0.0
5.00	20.6	22.5	20.6	21.2	1.1



รูปที่ 4.7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำงาน

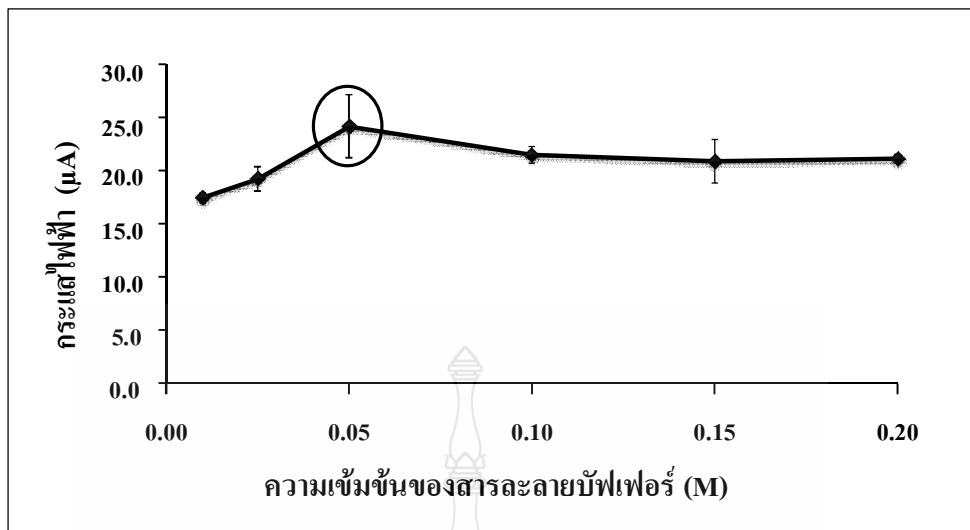


#### 4.5.3 ผลการหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.8 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีผลต่อค่ากระแสไฟฟ้า ถ้าความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์น้อยเกินไปทำให้สารละลายมีความเป็นอิเล็กโทรไลต์น้อยค่ากระแสก็น้อย แต่ถ้าความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มากเกินไปจะทำให้ในสารละลายมีค่า buffer capacity มากเกินไปทำให้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสได้ยาก ผลการทดลองพบว่า สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M ให้ค่ากระแสการตอบสนองมากที่สุด ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 M

ตารางที่ 4.4 ผลการหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ความเข้มข้น (M)	กระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
0.01	16.9	18.0	17.4	17.4	0.5
0.025	20.2	18.0	19.5	19.2	1.1
0.050	27.6	22.7	22.2	24.2	2.9
0.100	22.1	20.6	21.7	21.5	0.7
0.150	22.3	18.5	21.8	20.9	2.0
0.200	20.7	21.5	21.1	21.1	0.4



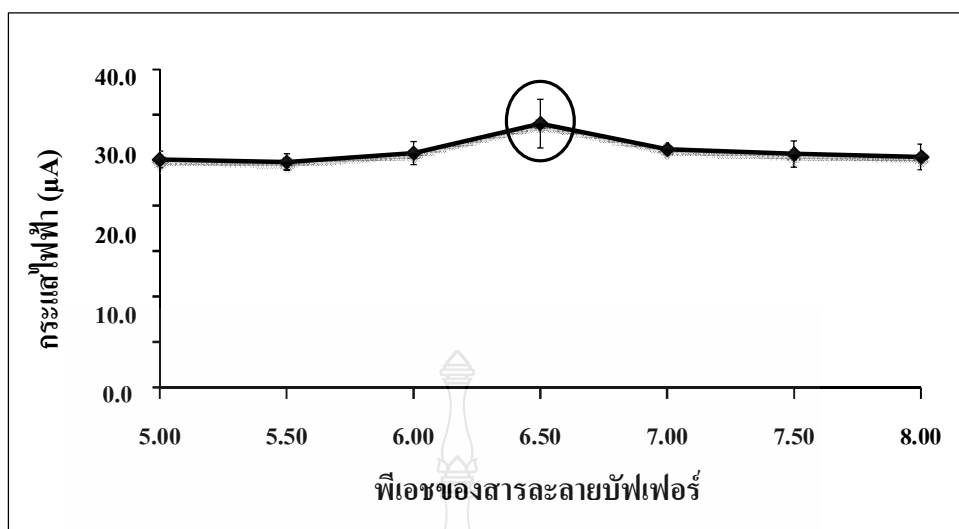
รูปที่ 4.8 ผลการหาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

#### 4.5.4 ผลการหาพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลาย เอนไซม์ กลูโคสดีไฮโดรจีเนส มีพีเอชที่เหมาะสมที่ พีเอช 7.00 แต่เมื่อนำเอนไซม์มาตรึงบนขั้วไฟฟ้าทำให้พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจึงจำเป็นต้องหาพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์สภาวะตรึงใหม่ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.9 พบว่าที่พีเอช 6.50 ให้ค่ากระแสการตอบสนองสูงสุด ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6.50

ตารางที่ 4.5 ผลการหาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

พีเอช	กระแสไฟฟ้า (µA)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
5.00	26.1	24.7	24.4	25.0	0.9
5.50	25.7	24.7	24.0	24.8	0.8
6.00	27.2	25.3	24.8	25.7	1.2
6.50	32.0	26.8	28.3	29.0	2.6
7.00	26.5	26.3	25.8	26.2	0.3
7.50	27.3	25.2	24.5	25.6	1.4
8.00	26.9	25.0	24.2	25.3	1.3



รูปที่ 4.9 ผลการหาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

#### 4.6 ผลการหาประสิทธิภาพของวิธีไบโอเซนเซอร์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา โดยทำการศึกษา การทำซ้ำของการวิเคราะห์ การทวนซ้ำของการวิเคราะห์ ความแม่นยำของวิธี ช่วงความเป็นเส้นตรง จิตจำกัดในการตรวจพบ จิตจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ตัวรบกวน และความเสถียรของขั้วไฟฟ้า มีขั้นตอนการทดลองดัง 3.2.4 ซึ่งทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

1. ปริมาณของอนุภาคนาโนพอลิไพโรล 1,000  $\mu\text{l}$
2. ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส 2.50 mg/ml
3. ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M
4. พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 6.50
5. ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s

##### 4.6.1 ผลการทำซ้ำของการวิเคราะห์

ใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานซ้ำเดียวกันวัดปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.6 M โดยทำการวัดซ้ำจำนวน 5 ครั้ง แล้วนำค่ากระแสที่วัดได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากตารางที่ 4.6 พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.6 สอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับ โดยเกณฑ์ปกติ  $\% \text{RSD} \leq 5$  [86] ซึ่งค่าที่ได้จากการวัดซ้ำกันหลายๆครั้งมีค่าใกล้เคียงหรือเท่ากันแสดงว่า

วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมามีความแน่นอนจากการวัดสูงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริงได้

**ตารางที่ 4.6** ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธี

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )
1	29.2
2	28.3
3	28.3
4	28.9
5	27.2
%RSD = 2.6	

#### 4.6.2 ผลการทวนซ้ำของการวิเคราะห์

ใช้ขั้วไฟฟ้าทำงานจำนวน 5 ขั้ว วัดปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.6 M นำค่ากระแสที่วัดได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากตารางที่ 4.7 พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.3 ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับโดยเกณฑ์ปกติ  $\% \text{RSD} \leq 5$  [86] ซึ่งถ้าค่า  $\% \text{RSD}$  มีค่าน้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐานแสดงว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมามีความเที่ยงสูงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริงได้

**ตารางที่ 4.7** ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธี

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )
1	26.9
2	26.7
3	27.6
4	28.3
5	27.6
%RSD = 2.3	

#### 4.6.3 ผลศึกษาความแม่นยำของวิธี

จากการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของกลูโคสในตัวอย่างซีรัมอยู่ในช่วง 96-108 % ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับที่อยู่ในช่วง 80-110% [86] แสดงดังตาราง 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการศึกษาการเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

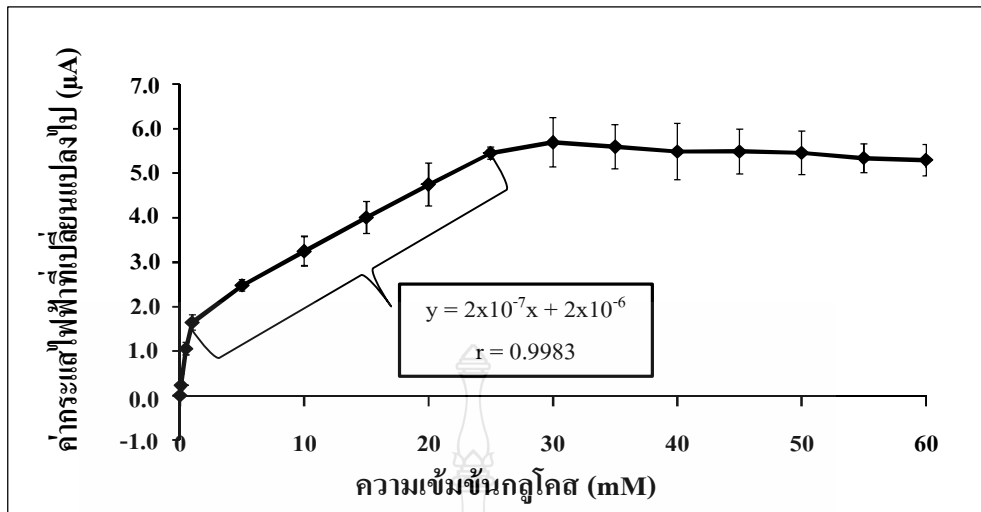
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (mM)			% การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
1	3.79	5.00	8.58	96
2	3.82	5.00	8.76	99
3	5.06	5.00	10.47	108

#### 4.6.4 ผลศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายกลูโคส จากตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1.00 ถึง 25.00 mM ซึ่งระดับกลูโคสในเลือดโดยปกติ 100-125 mg/dl (5.5-6.9 mM) มีค่าอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงนี้ มีความไววิเคราะห์หมีค่า 0.200  $\mu\text{A}/\text{mM}$  และค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9983

ตารางที่ 4.9 ผลศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

ความเข้มข้นของกลูโคส (mM)	ค่ากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไป ( $\mu$ A)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
Blank	0	0	0	0	0
0.10	0.1	0.1	0.4	0.2	0.3
0.50	1.0	1.0	1.2	1.1	0.1
1.00	1.7	1.4	1.8	1.7	0.2
5.00	2.6	2.3	2.5	2.5	0.1
10.00	3.6	3.1	3.0	3.3	0.3
15.00	4.4	4.0	3.6	4.0	0.4
20.00	4.8	5.2	4.2	4.7	0.5
25.00	5.6	5.3	5.4	5.5	0.1
30.00	6.3	5.2	5.6	5.7	0.6
35.00	5.6	6.1	5.1	5.6	0.5
40.00	6.2	5.0	5.2	5.5	0.6
45.00	6.0	5.0	5.4	5.5	0.5
50.00	5.9	4.9	5.6	5.5	0.5
55.00	5.6	4.9	5.4	5.3	0.3
60.00	5.4	4.9	5.6	5.3	0.4



รูปที่ 4.10 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายกลูโคส

#### 4.6.5 จี๊ดจำกัดในการตรวจพบ

จากการวัดแบบล่งค์สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ของสารจำนวน 7 ครั้ง นำค่ากระแสที่วัดได้มาคำนวณพบว่าจี๊ดจำกัดในการตรวจพบมีค่าเท่ากับ 0.46 mM

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}_{\text{blank}}$$

$$\text{LOD} = 0 + (3 \times 0.15)$$

$$\text{LOD} = 0.46$$

#### 4.6.6 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

จากการวัดแบบลงค์สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ของสารจำนวน 7 ครั้ง นำค่ากระแสที่วัดได้มาคำนวณพบว่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 4.60 mM โดยมีความเที่ยง (%RSD) เท่ากับ 1.36 และมีความแม่นยำ (% Recovery) เท่ากับ 96% แสดงว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 4.60 mM

$$\text{LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}_{\text{blank}}$$

$$\text{LOQ} = 0 + (10 \times 0.46)$$

$$\text{LOQ} = 4.6$$

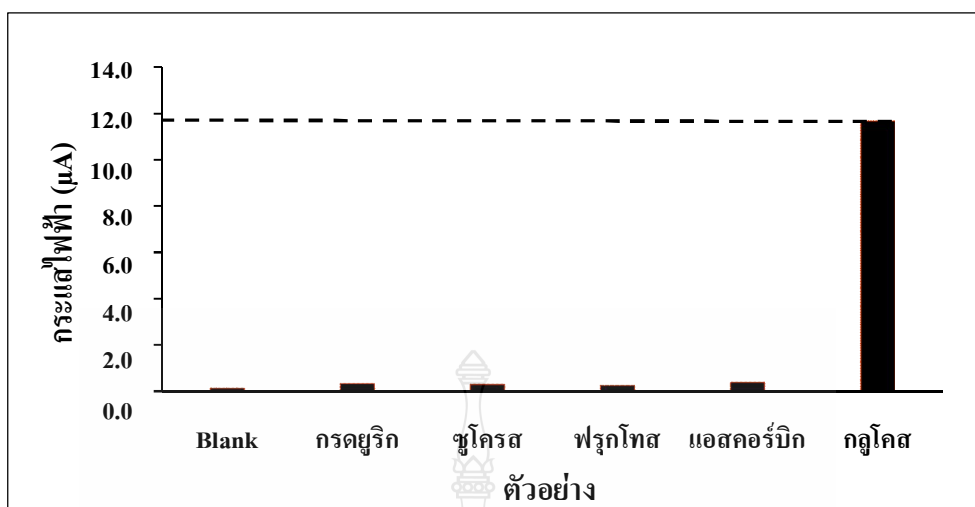
#### 4.6.7 ผลของตัวรบกวน

ศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีโอกาสพบในตัวอย่างซีรัมคือ กรดยูริก ซูโครส ฟรุกโทส และแอสคอร์บิก ซึ่งกรดยูริกและแอสคอร์บิก เป็นสารที่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า [87] ส่วนซูโครส และฟรุกโทส เป็นน้ำตาลที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นในการทดลองจึงได้เลือกสารดังกล่าวนำมาศึกษาเพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสต่อกลูโคส โดยนำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้มาเปรียบเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าของกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.6 M ดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นค่ากระแสการตอบสนองของกลูโคสมีค่าสูงกว่าตัวรบกวน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า กรดยูริก ซูโครส ฟรุกโทส และแอสคอร์บิก ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 4.10 ผลการศึกษาของตัวรบกวน

สารตัวอย่าง	ค่ากระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )
Blank	0.1
ยูริก	0.3
ซูโครส	0.3
ฟรุกโทส	0.2
แอสคอร์บิก	0.4
กลูโคส	11.6





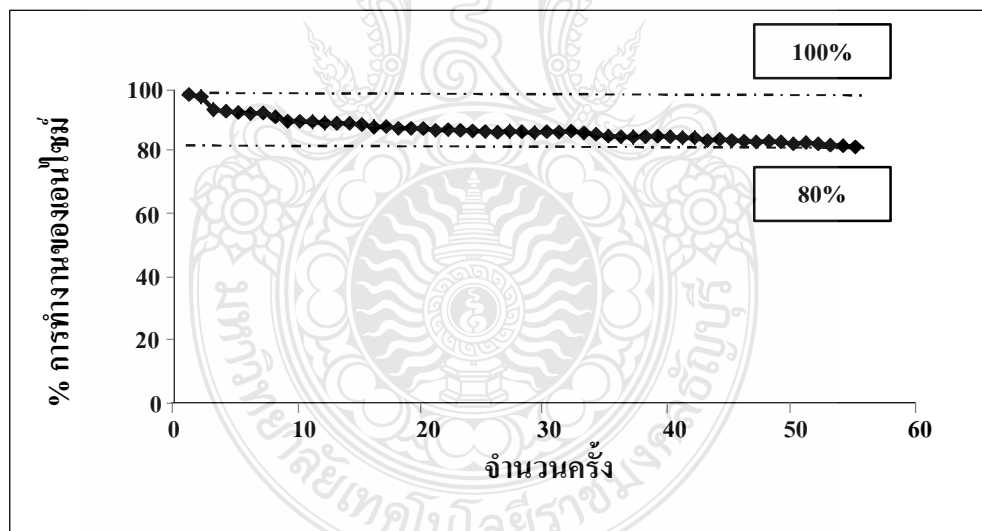
รูปที่ 4.11 แสดงผลของตัวรบกวนเปรียบเทียบกับกลูโคส

#### 4.6.8 ผลการหาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า

ผลการหาความเสถียรของขั้วไฟฟ้าในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.6 M โดยนำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ในแต่ละครั้งเปรียบเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้ในครั้งแรก ผลการทดลองที่ได้พบว่าขั้วไฟฟ้าทำงานสามารถวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสได้มากถึง 55 ครั้ง ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ลดลงเพียง 20% แสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรสูงสำหรับการตรวจวัดกลูโคสดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.11 ผลการหาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า

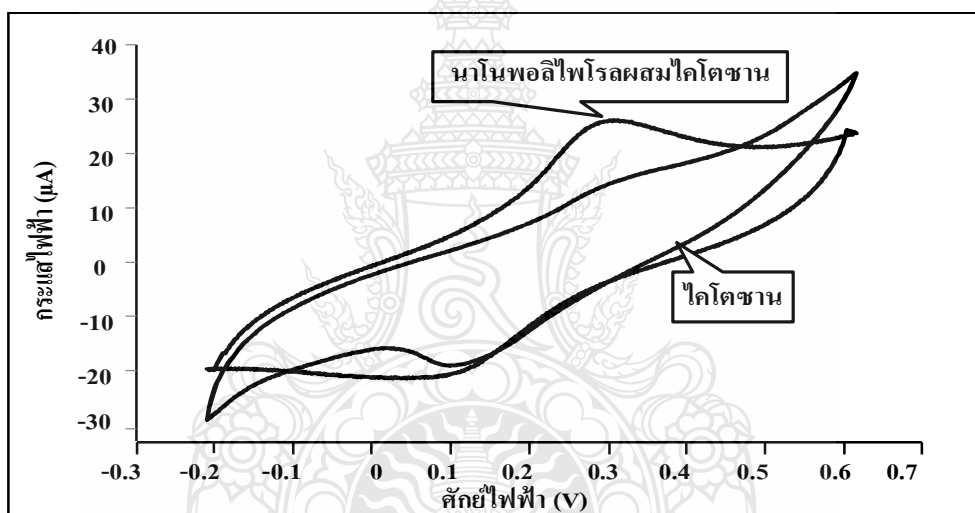
จำนวนครั้ง	ค่ากระแสไฟฟ้า ( $\mu\text{A}$ )
1-5	18.7-17.6
6-10	17.5 -17.0
11-15	17.0 -16.8
16-20	17.6 -16.6
21-25	16.5 -16.4
26-30	16.4 -16.4
31-35	16.4 -16.1
36-40	16.1 -16.1
41-45	16.0 -15.9
46-50	15.8 -15.7
51-55	15.7 -15.5



รูปที่ 4.12 ผลการหาความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงาน

#### 4.6.9 ผลการเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุนาโนพอลิไพโรล

ผลการเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยการเกาะติดของวัสดุนาโนพอลิไพโรลที่ผสมกับไคโตซานบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ เปรียบเทียบกับการใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียวเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.6 M ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ทำการเปรียบเทียบค่ากระแสที่ได้ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มนาโนพอลิไพโรลบนขั้วไฟฟ้าทำงานให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงกว่าขั้วไฟฟ้าที่มีเพียงแต่ไคโตซาน ทั้งนี้เพราะนาโนพอลิไพโรลสามารถช่วยในการเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้สามารถตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสได้มากขึ้นทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับกลูโคสได้มากขึ้น และนอกจากนี้นาโนพอลิไพโรลยังสามารถช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ได้จากปฏิกิริยาไปยังผิวหน้าขั้วไฟฟ้าอีกด้วยจึงทำให้นาโนพอลิไพโรลสามารถเพิ่มความไววิเคราะห์ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส

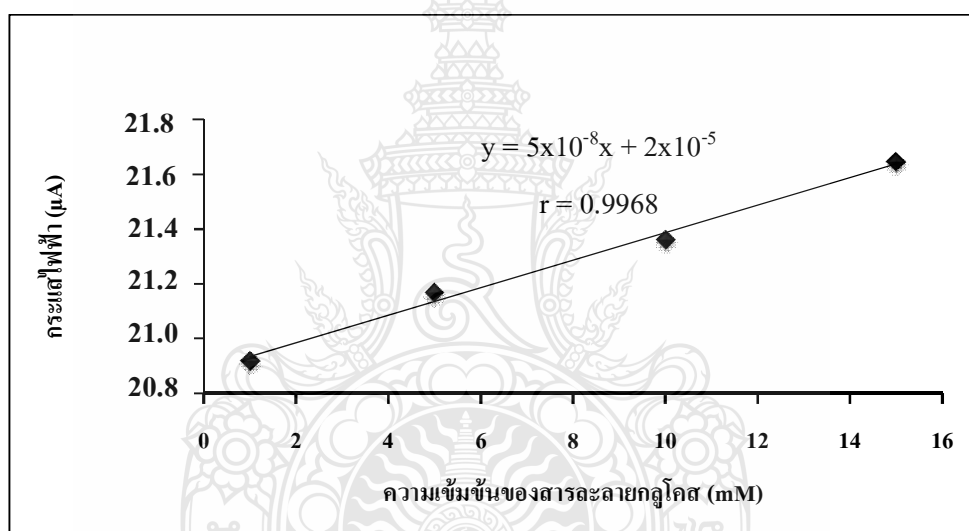


รูปที่ 4.13 ผลการเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุนาโนพอลิไพโรลผสมกับไคโตซานเปรียบเทียบค่ากระแสไฟฟ้ากับไคโตซานที่เกาะติดบนขั้วไฟฟ้าทำงานแกรไฟต์

#### 4.6.10 ผลการหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างซีรัม

รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้ากับกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (3.2.6.9) นำสมการเส้นตรงมาคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.12 ความเข้มข้นของกลูโคสที่วัดได้ด้วยวิธีที่พัฒนากับค่าที่วัดโดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งตรวจวัดด้วยเครื่อง Shappire 400 เมื่อนำผลการวิเคราะห์ทั้งสองมาเปรียบเทียบกัน โดยใช้สถิติ t-test [88] พบว่าวิธีทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% สรุปว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตรวจหาผลึกในตัวอย่างซีรัมได้ดีเทียบเท่ากับวิธีที่โรงพยาบาล

ใช้แต่มีข้อดีกว่าคือ ใช้สารในปริมาณน้อย สามารถนำขั้วไฟฟ้ากลับมาใช้ใหม่ได้ และประหยัดเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดโดยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ดังตารางที่ 4.13 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมามีข้อเด่นคือ มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย และให้ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ 0.46 mM แสดงว่าสามารถตรวจวัดคลูโคสในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำๆได้ แต่เมื่อพิจารณาความไววิเคราะห์ เปรียบเทียบกับการใช้ท่อนาโนคาร์บอนและลวดนาโนพอลิอะนิลีน พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมามีความไววิเคราะห์ที่ต่ำกว่า ทั้งนี้เพราะท่อนาโนคาร์บอนและลวดนาโนพอลิอะนิลีนสามารถนำไฟฟ้าได้ดีกว่าไฟโรล ซึ่งเป็นพอลิเมอร์มาก แต่การใช้ท่อนาโนคาร์บอนและลวดนาโนพอลิอะนิลีนมีข้อจำกัดหลายด้านเช่น ราคาสูง สังกะสีได้ยาก และให้ค่ากระแสไฟฟ้าพื้น (Background current) สูง ทำให้วิธีมีขีดจำกัดในการตรวจวัดสูง



รูปที่ 4.14 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์กับวิธีมาตรฐาน (Enzymatic Colorimetric method) และผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ (t-test)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลูโคส (mM)		D	D <sup>2</sup>
	ไบโอเซนเซอร์	วิธีมาตรฐาน		
1	11.3	9.4	1.9	3.6
2	16.9	15.2	1.7	3.0
3	14.6	15.3	-0.7	0.5
4	19.6	16.0	3.6	13.0
5	17.2	17.3	-0.03	0.0009
			$\Sigma D = 6.44$	$\Sigma D^2 = 19.9938$
t-test (Calculate) = 1.3452				
t-test (Table.) = 2.776				

ตารางที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอื่นๆ

ประสิทธิภาพ ของวิธี วิเคราะห์	เทคนิค ไบโอเซนเซอร์ที่ พัฒนาขึ้น	ท่อนาโนคาร์บอน ผสมกับนาโนทิน ฟิล์ม <sup>35</sup>	วัสดุผสมระหว่าง ท่อนาโนคาร์บอน กับเจลาติน <sup>90</sup>	สวดนาโนพอลิ อะนิลีน <sup>89</sup>
Sensitivity	0.2 $\mu$ A/mM	5.1 $\pm$ 0.9 $\mu$ A/mM	2.47 $\mu$ A/mM	2.5 $\mu$ A/mM
Linearity	1-25 mM	4.9–19 mM,	6.3-20 mM	0.25-8 mM
Detection limit	0.46 mM	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	50 $\mu$ M



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสร้างไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี โดยใช้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคส และเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุนาโนพอลิไพโรล ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ในระบบไบโอเซนเซอร์มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

เตรียมอนุภาคนาโนพอลิไพโรลโดยสังเคราะห์ด้วยกระบวนการอิมัลชันพอลิเมอไรเซชันโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิดคือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุลบ และ ไอโซออกทิลฟีนิล เอสเทอร์ เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิไพโรลจะทำการผสมสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดในอัตราส่วน 2:1 โดยละลายด้วยน้ำกลั่น ภายใต้สภาวะการคนตลอดเวลา ทำการเติมมอนอเมอร์ไพโรล และเติมตัวยั่วยิ่ง ทำให้ได้อนุภาคนาโนพอลิไพโรลสำหรับการวิเคราะห์ ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและขนาดของอนุภาคนาโนพอลิไพโรล ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าอนุภาคมีทรงกลมและขนาดเฉลี่ย 100 นาโนเมตร

อนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่สังเคราะห์จะถูกนำมาตรึงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์โดยขั้นแรกจะทำการศึกษาผลการตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์โดยใช้สารเชื่อมโยงขั้วเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่ผสมกับไคโตซานกับเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการตรึงอนุภาคนาโนพอลิไพโรลผสมกับไคโตซาน ตรึงสารเชื่อมโยงขั้วกูดารอลดีไฮด์ และตรึงเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ ค่ากระแสไฟฟ้าที่แคโทดิกและแอนอดิกลดลง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในแต่ละขั้นของการตรึงสามารถเกาะติดบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ได้ นำขั้วไฟฟ้าทำงานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยจุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายเฟอร์โรซีนทำหน้าที่เป็นสารส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง +0.6 V อัตราการสแกน 50 mV/s ใช้เป็นสภาวะที่คงที่ พบว่าเมื่อเติมสารละลายกลูโคสเกิดค่ากระแสไฟฟ้าแคโทดิกได้ 15.0  $\mu\text{A}$  ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.31 V

หาสภาวะที่เหมาะสมของระบบไบโอเซนเซอร์โดยศึกษาปริมาณของอนุภาคนาโนพอลิไพโรลที่เหมาะสมในการตรึง พบว่าอนุภาคนาโนพอลิไพโรลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรที่ผสมกับไคโตซานปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ให้ค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองสูงสุด เมื่อได้ขั้วไฟฟ้าที่ถูกต้อง

ด้วยอนุภาคนาโนพอลิไพโรลต่อไปจะทำการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสที่เหมาะสมในการตรึงบนขั้วไฟฟ้า ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 2.50 mg/ml มีความเหมาะสมในการตรึงเพราะมีค่ากระแสการตอบสนองที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นอื่นๆ หลังจากนั้นนำขั้วไฟฟ้าทำงานมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรีสำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส พบว่าความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นที่ 0.05 M และพีเอช 6.5 ตามลำดับ

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีไบโอเซนเซอร์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยง ( $\% \text{RSD} \leq 3$ ) และความแม่นยำสูง (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน) อยู่ในช่วง 96-108% สามารถตรวจหาปริมาณของกลูโคสได้ในช่วง 1 ถึง 25 mM ความไววิเคราะห์มีค่า 0.200  $\mu\text{A}/\text{mM}$  ค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9983 จิตจำกัดการตรวจพบของวิธีเท่ากับ 0.46 mM และจิตจำกัดในการตรวจพบเชิงปริมาณคือ 4.6 mM ศึกษาผลของสารรบกวนที่สามารถพบได้ในซีรัมโดยสารรบกวนที่เลือกศึกษาคือ กรดยูริก ซูโครส ฟรุกโทส และแอสคอร์บิก พบว่าไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส ความเสถียรของขั้วไฟฟ้าทำงานที่ตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสสามารถวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสได้ถึง 55 ครั้ง โดยมีค่าการตอบสนองเหลือที่ 80%

เมื่อได้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมจึงนำวิธีไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีไบโอเซนเซอร์เทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้สถิติ (วิธี t-test) แสดงวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างซีรัมได้จริง มีข้อดีคือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย ไม่มีขั้นตอนการเตรียมสารที่ยุ่งยาก ประหยัดเวลาการวิเคราะห์ สามารถนำขั้วไฟฟ้ากลับมาใช้วิเคราะห์ซ้ำใหม่ได้ และมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่ถูกกว่าวิธีมาตรฐาน



## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ที่ประดิษฐ์ขึ้นง่าย ดั่งนั้นจึงต้องศึกษาวิธีการตั้งหลายวิธี เพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับขั้วไฟฟ้า

5.2.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิไพโรลต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดเวลาการสังเคราะห์ในการทดลองควรรีใช้อ่างสำหรับควบคุมอุณหภูมิในการสังเคราะห์



## บรรณานุกรม

- [1] S. Wild, G. Roglic, "Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030," *Diabetes Care*, vol. 27, pp. 1047-1053, 2004.
- [2] T. J. Michael, et al., "Design of a biosensor for continual, transdermal glucose monitoring," *Clinical Chemistry*, vol. 45, pp. 1681-1683, 1999.
- [3] B. Linke, et al., "Amperometric biosensor for in vivo glucose sensing based on glucose oxidase immobilized in a redox hydrogel," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 9, pp. 151-158, 1994.
- [4] K. Wolfgang, et al., "The function of a hydrogen peroxide-detecting electroenzymatic glucose electrode is markedly impaired in human sub-cutaneous tissue and plasma," *Biosensor and Bioelectronics*, vol. 8, pp. 473-482, 1993.
- [5] N. Engl, J. Med, "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus," *DCCT Research Group*, vol. 329, pp. 977-986, 1993.
- [6] H. L. Lindholm, et al., "Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol," *Lancet*, vol. 359, pp. 1004-1010, 2002.
- [7] A. G. C. Rita, M. D. Richard, "Standards of medical care in diabetes," *Diabetes care*, vol. 29, pp. 476-477, 2006.
- [8] P. E.Poul, "World Health Organization global policy for improvement of oral health-World Health Assembly 2007," *International Dental Journal*, vol. 58, pp. 115-121, 2008.
- [9] K. Grace M.V., K. Guy, "The performance of the Finnish Diabetes Risk Score, a modified Finnish Diabetes Risk Score and a simplified Finnish Diabetes Risk Score in community-based cross-sectional screening of undiagnosed type 2 diabetes in the Philippines," *Primary care diabetes*, vol. 7, pp. 249-259, 2013.
- [10] D. Stanley, "Colour production and stability in the folin and wu method of blood glucose estimation," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 8, pp. 253-261, 1955.
- [11] P. J. Cammidge, "Benedict's test for sugar in the urine," *The Lancet*, vol. 190, pp. 24, 1917.

- [12] W. A. Telfer Brunton, I. W. Percy-Robb, "Methods for measuring plasma or blood glucose in the clinic: A short review," *American Heart Journal*, vol 94, pp. 533–536, 1977.
- [13] K. Yu, et al., "Hexokinase and glucose-6-phosphatase activity in woodchuck model of hepatitis virus-induced hepatocellular carcinoma," *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 143, pp. 225–231, 2006.
- [14] S. Saniye, et al., "Development of a novel biosensor based on a conducting polymer," *Talanta*, vol. 118, pp. 84–89, 2014.
- [15] L. Bo, et al, "Microbial surface display of glucose dehydrogenase for amperometric glucose biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 45, pp. 19–24, 2013.
- [16] L. Bo, et al., "Simultaneously improving stability and specificity of cell surface displayed glucose dehydrogenase mutants to construct whole-cell biocatalyst for glucose biosensor application," *Bioresource Technology*, vol. 147, pp. 492–498, 2013.
- [17] M. Piano, et al., "A flow injection system, comprising a biosensor based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue–Reinecke salt coated with glucose dehydrogenase, for the measurement of glucose," *Analytical Biochemistry*, vol. 396, pp. 269–274, 2010.
- [18] W. Zhijie, et al., "Durable cofactor immobilization in sol–gel bio-composite thin films for reagentless biosensors and bioreactors using dehydrogenases," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 32, pp. 111–117, 2012.
- [19] M. C. Jesus, et al., "Fiber optic glucose sensor based on bionano films," *Sensors and Actuators*, vol. 131, pp. 633–639, 2008.
- [20] A. Riccarda, et al., "A comparison between the use of a redox mediator in solution and of surface modified electrodes in the electrocatalytic oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide," *Bioelectrochemistry*, vol. 64, pp. 157– 163, 2004.
- [21] M. Estrella, et al., "A multianalyte flow electrochemical cell: application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 774–781, 2005.

- [22] S. S. Farhana, M. Lanqun, and O. Takeo, "Development of a dehydrogenase-based glucose anode using a molecular assembly composed of Nile blue and functionalized SWCNTs and its applications to a glucose sensor and glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell," *Sensors and Actuators B*, vol. 152, pp. 130–135, 2011.
- [23] M. Rastislav, et al., "Amperometric glucose biosensor utilizing FAD-dependent glucose - dehydrogenase immobilized on nanocomposite electrode," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 50, pp. 227-232, 2012.
- [24] T. Seiya, et al., "Novel FAD-dependent glucose dehydrogenase for a dioxygen-insensitive glucose biosensor," *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, vol. 70, pp. 654-659, 2006.
- [25] N. Z. Muhammad, et al., "Characterization of different FAD-dependent glucose dehydrogenases for possible use in glucose-based biosensors and biofuel cells," *Anal Bioanal Chem*, vol. 402, pp. 2069-2077, 2012.
- [26] Z. Chuan, W. Gunther, "Scanning electrochemical microscopy for detection of biosensor and biochip surfaces with immobilized pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase as enzyme label," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1277-1284, 2005.
- [27] V. Laurinavicius, et al., "Reagentless biosensor based on PQQ-dependent glucose dehydrogenase and partially hydrolyzed polyarbutin," *Talanta*, vol. 52, pp. 485–493, 2000.
- [28] K. Bogumila, et al., "Application of oxygen-independent biosensor for testing yeast fermentation capacity," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 766–771, 2010.
- [29] A. Curulli, et al., "Assembling and evaluation of new dehydrogenase enzyme electrode probes obtained by electropolymerization of aminobenzene isomers and PQQ on gold, platinum and carbon Electrodes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 12, pp. 1043-1055, 1997.
- [30] A. Malinauskas, "Bioelectrochemical sensor based on PQQ-dependent glucose dehydrogenase," *Sensors and Actuators B*, vol. 100, pp. 387-394, 2004.
- [31] Z. M. Dong, et al., "Electrochemical polymerization of toluidine blue and its application for the amperometric determination of  $\beta$ -D-glucose," *Electrochimica Acta*, vol. 43, pp. 1803-1809, 1998.

- [32] S. W. Ivo, G. Gero, and L. Fred, "A pyrroloquinolinequinone-dependent glucose dehydrogenase (PQQ-GDH)-electrode with direct electron transfer based on polyaniline modified carbon nanotubes for biofuelcell application," *Electrochimica Acta*, vol. 82, pp. 224–232, 2012.
- [33] I. Kazunori, K. Yumiko, and S. Koji, "Amperometric DNA sensor using the pyrroquinoline quinone glucose dehydrogenase /avidin conjugate," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, pp. 1075-1080, 2002.
- [34] R. Julija, et al., "4-Ferrocenylphenol as an electron transfer mediator in PQQ-dependent alcohol and glucose dehydrogenase-catalyzed reactions," *Electrochemistry Communications*, vol. 2, pp. 307–311, 2000.
- [35] H. Tatsuya, S. I. Shin, and M. Hitoshi, "Amperometric biosensor based on multilayer containing carbon nanotube, plasma-polymerized film, electron transfer mediator phenothiazine, and glucose dehydrogenase," *Bioelectrochemistry*, vol. 84, pp. 1–5, 2012.
- [36] T. H. Chi, Y. Ruo, and Y. Mengsu, "Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of dehydrogenase-generated NADH and NADPH," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, pp. 211–219, 2001.
- [37] L. I. Boguslavsky, et al., "Amperometric thin film biosensors based on glucose dehydrogenase and Toluidine Blue O as catalyst for NADH electrooxidation," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, pp. 693-704, 1995.
- [38] T. Hazhir, S. Abdollah, and H. Rahman, "Electrocatalytic oxidation of NADH at electrogenerated NAD<sup>+</sup> oxidation product immobilized on to multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid nanocomposite: Application to ethanol biosensing," *Talanta*, vol. 90, pp. 91- 98, 2012.
- [39] M. Milena, et al., "Glucose sensing by electrogenerated chemiluminescence of glucose-dehydrogenase produced NADH on electrodeposited redox hydrogel," *Bioelectrochemistry* vol. 82, pp. 63–68, 2011.
- [40] T. Miyake, "Biofuel cell anode: NAD<sup>+</sup>/glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode," *Chemical Physics Letters*, vol. 480, pp. 123–126, 2009.

- [41] B. Lu, et al., "Carbon nanotubes-ionic liquid nanocomposites sensing platform for NADH oxidation and oxygen, glucose detection in blood," *Talanta*, vol. 91, pp. 110-115, 2012.
- [42] Z. Chuan, W. Gunther, "Scanning electrochemical microscopy for detection of biosensor and biochip surfaces with immobilized pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase as enzyme label," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1277-1284, 2005.
- [43] S. Saniye, et al., "Development of a novel biosensor based on a conducting polymer," *Talanta*, vol. 118, pp. 84-89, 2014.
- [44] O. M. Schuvailo, et al., "Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate," *Analytica Chimica Acta*, vol. 573-574, pp. 110-116, 2006.
- [45] L. A. Mark, C. Q. James, "Amperometric determination of glucose with a ferrocene-mediated glucose oxidase/polyacrylamide gel electrode," *Analytica Chimica Acta*, vol. 175, pp. 89-97, 1985.
- [46] M. Piano, S. Serban, "A flow injection system, comprising a biosensor based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt coated with glucose dehydrogenase, for the measurement of glucose," *Analytical Biochemistry*, vol. 396, pp. 269-274, 2010.
- [47] T. H. J. Luong, A. Mulchandani, "Developments and applications of biosensors," *Trends Biotechnology*, vol. 6, pp. 310, 1988.
- [48] C. Asha, B. D. Malhotra, "Mediated biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, pp. 441-456, 2002.
- [49] G. Manju, C. Asha, and B. D. Malhotra, "Application of conducting polymers to biosensors," *Biosensor and Bioelectron*, vol. 17, pp. 345-359, 2002.
- [50] N. Martine, L. C. Jean, and M. T. Canh, "Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 46, pp. 181-185, 2000.
- [51] C. M. Tran, G. Broun, "Construction and study of electrodes using cross-linked enzymes," *Analytical Chemistry*, vol. 47, pp. 1359-1364, 1975.

- [52] M. Isabelle, et al., "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking," *BioTechniques*, vol. 37, pp. 790-802, 2004.
- [53] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress in polymer science*, vol. 31, pp. 603-632, 2006.
- [54] H. Qitong, et al., "A sensitive and reliable dopamine biosensor was developed based on the Au@carbon dots-chitosan composite film," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 52, pp. 277-280, 2014.
- [55] Y. Lijun, et al., "A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film," *Bioelectrochemistry*, vol. 84, pp. 44-48, 2012.
- [56] O. Maria, "Polypyrrole and polyaniline prepared with cerium(IV) sulfate oxidant," *Synthetic Metals*, vol. 160, pp. 701-707, 2010.
- [57] A. Mohammadi, et al., "Conducting polymers prepared by template polymerization: polypyrrole," *Polymer*, vol. 31, Issue 3, pp. 395-399, 1990
- [58] L. H. Yeon, L. Y. Jun, and L. S. Doo, "A novel conducting soluble polypyrrole composite with a polymeric co-dopant," *Synthetic Metals*, vol. 114, pp. 347-353, 2000.
- [59] S. Minni, K. K. Pavan, and J. Nagaraju, "Polypyrrole based amperometric glucose biosensors," *Sensors and Actuators B*, vol. 143, 430-443, 2009.
- [60] J. Jyongsik, O. H. Joon, and S. D. Galen, "Fabrication of Ultrafine Conducting Polymer and Graphite Nanoparticles," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 41, pp. 4016-4019, 2002.
- [61] N. Gospodinova, et al., "A new route to polyaniline composites," *Polymer* Vol. 38, pp. 743-746, 1997.
- [62] L. Wei, et al., "The Role of Template in the Enzymatic Synthesis of Conducting Polyaniline," *American Chemical Society*, vol. 121, pp. 11345-11355, 1999.
- [63] A. Pich, et al., "Dispersion polymerization of pyrrole in the presence of poly (vinyl methyl ether) microgels," *Polymer*, vol. 43, pp. 5723-5729. 2002.
- [64] M. K. Tarun, M. M. Broja, "Ethylhydroxyethylcellulose stabilized polypyrrole dispersions," *Polymer*, vol. 36, pp. 1911-1913, 1995.

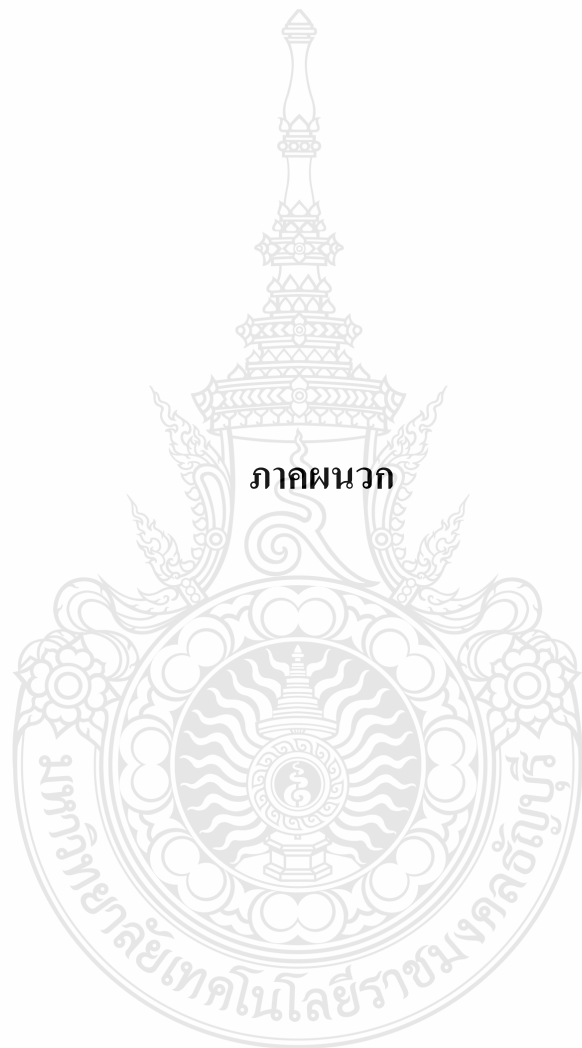
- [65] K. Ishizu, H. Tanaka, and R. Saito, "Microsphere Synthesis of Polypyrrole by Oxidation Polymerization," *Polymer*, vol. 37, pp. 863-867, 1996.
- [66] K. J. Woo, et al., "Preparation of polypyrrole nanoparticles in mixed surfactants system," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 110, pp. 1324-1329, 2008.
- [67] B. Otman, Y. Xiaohong, "Engine fault diagnosis based on multi-sensor information fusion using Dempster-Shafer evidence theory," *Information Fusion*, vol. 8, pp. 379-386, 2007.
- [68] Z. Xiongjun, et al., "Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 72, pp. 145-149, 2011.
- [69] A. Abbas, et al., "Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 73, pp. 315-324, 2009.
- [70] A. Tarushee, et al., "Potentiometric urea biosensor based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/silica composite material," *Materials Science and Engineering C*, vol. 31, pp 90-94, 2011.
- [71] C. L. Clark, C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [72] A. H. Emily, et al., "Amperometric microsensor for direct probing of ascorbic acid in human gastric juice," *Analytica Chimica Acta*, vol. 678, pp. 176-182, 2010.
- [73] E. A. Ali, A. M. Jafari, and B. Rezaei, "A novel enzyme-free amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Nafion/exfoliated graphene oxide-Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite," *Talanta*, vol. 103, pp. 322-329, 2013.
- [74] M. Daniela, et al., "Flavohemoglobin and nitric oxide detoxification in the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 399, pp. 654-658, 2010.
- [75] R. G. Young, P. I. Su, "Passivation kinetics of surface films formed on a graphite electrode in organic lithium salt solution as a function of salt anion type," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 433, pp. 97-105, 1997.
- [76] U. Koichi, et al., "Analysis of solid electrolyte interface formation reaction and surface deposit of natural graphite negative electrode employing polyacrylic acid as a binder," *Journal of Power Sources*, vol. 247, 981-990, 2014.



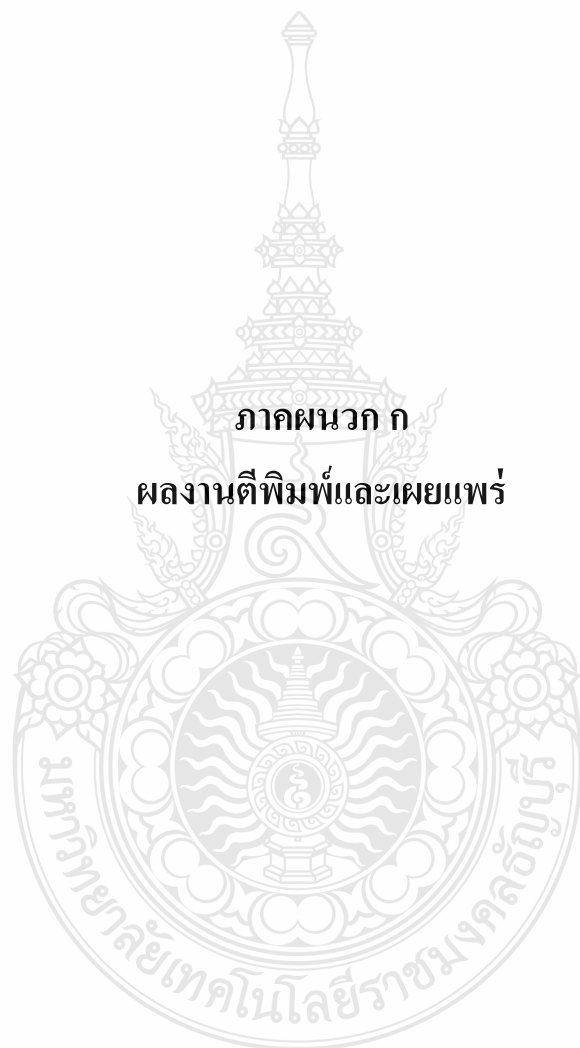
- [77] S. Jacques, et al., "Glassy carbon electrodes doped by surface graphite nano-flakes Multi-step redox transitions functionalization," *Electrochemistry Communications*, vol. 30, pp. 17–20, 2013.
- [78] K. T. Roohollah, B. E. Craig, G. C. Richard, "Graphite impurities cause the observed 'electrocatalysis' seen at C modified glassy carbon electrodes in respect of the oxidation of l-cysteine 60," *Analytica Chimica Acta*, vol. 566, pp 1–4, 2006.
- [79] M. Asadollahi-Baboli, A. Mani-Varnosfaderani, "Rapid and simultaneous determination of tetracycline and cefixime antibiotics by mean of gold nanoparticles-screen printed gold electrode and chemometrics tools," *Measurement*, vol. 47, pp. 145–149, 2014.
- [80] B. K. Tushar, J. Nagaraju, "Studies on thin film based flexible gold electrode arrays for resistivity imaging in electrical impedance tomography," *Measurement*, vol. 47, pp. 264–286, 2014.
- [81] N. Zahra, S. Esmail, "A glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized onto glassy carbon electrode modified with nitrophenyl diazonium salt," *Electrochimica Acta*, vol. 112, pp. 640–647, 2013.
- [82] B. Zahra, et al., "Development of a new biosensor based on functionalized SBA-15 modified screen-printed graphite electrode as a nano-reactor for Gquadruplex recognition," *Talanta*, vol. 119, pp. 24–33, 2014.
- [83] W. L. Yue, et al., "Glucose biosensor based on new carbon nanotube–gold–titania nanocomposites modified glassy carbon electrode," *Chinese Chemical Letters*, pp. 1-4, 2013.
- [84] D. Pan, W. Ping, and C. Chenxin, "A glucose biosensor based on electrocatalytic oxidation of NADH at single-walled carbon nanotube functionalized with poly(nile bule A)," *Journal of electroanalytical chemistry*, vol. 624, pp. 21-26, 2008.
- [85] J. N. Barisci, et al., "Characterisation and analytical use of a polypyrrole electrode containing anti-human serum albumin," *Analytica Chimica Acta*, vol. 371, pp. 39–48, 1998.
- [86] I. Taverniers, et al., "Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 535-552, 2004.

- [87] P. Rungtiva, "Biezymatic Amperometric Biosensor for Glucose Based on Methylene Blue-Carbon Nanotubes Nanohybrids Modified on Glassy Carbon Electrode," Science Journal Ubon Ratchathani University, vol 1, pp. 43-51, 2554.
- [88] J. C. Miller and J. N. Miller, Statistic for Analtical Chemistry, 3rd ed. Chichester : Ellis Horwood Limited, 1993.
- [89] Y.Y. Horng, et al., "Direct-growth of polyaniline nanowires for enzyme-immobilization and glucose detection," Electrochem Commun, vol. 11, pp. 850-853, 2009.
- [90] A.I. Gopalan, et al., "An electrochemical glucose biosensor exploiting a polyaniline grafted multiwalled carbon nanotube/perfluoro sulfonate ionomer-silica nanocomposite," Biomaterials, vol. 30, pp. 5999-6005, 2009.





**ภาคผนวก**



PURE AND APPLIED CHEMISTRY  
INTERNATIONAL CONFERENCE 2013



GLOBAL

Chemical Science for Green Community  
CHEMICAL SCIENCE FOR GREEN COMMUNITY

January 23-25, 2013

Bangsaen Beach

THAILAND



## POSTER PRESENTATIONS

Poster presentations will be held on at Room Pacific 4.

### Poster Board

You will be provided with a poster board to mount/display your poster. The Poster Size is 100 centimeter (Height) by 80 centimeter (Width). Your Poster number will be indicated in the board. You will be provided with the material to mount your poster onto the board.

### Setting Up and Removing Posters

There are three poster sessions, A, B and C, the presenters are kindly requested to mount up and take off the posters following the appointed schedule;

Poster Presentation session/Date	A (23-Jan-2013)	B (24-Jan-2013)	C (25-Jan-2013)
Analytical Chemistry	ANC-P-001-057	ANC-P-058-097	
Biological / Biophysical Chemistry and Chemical Biology		BBC-P-001-029	
Bioinformatics		BIF-P-001	
Chemical Education		CHE-P-001-005	
Cosmetics		COS-P-001-007	
Environmental Chemistry	ENC-P-001-035		
Free radicals/ Antioxidants			FRA-P-001-015
Food safety and Food Chemistry	FSC-P-001-020		
Industrial Chemistry and Innovation		IIN-P-001-021	
Inorganic Chemistry	INC-P-001-021		
Material Sciences and Nanotechnology	MSC-P-001-052		MSC-P-053-111
Organic Chemistry and Medicinal Chemistry		OCM-P-001-033	OCM-P-034-079
Physical and Computational Chemistry		PCC-P-001-030	PCC-P-031-053
Polymer Chemistry	PMC-P-001-025	PMC-P-026-055	
Petroleum Chemistry and Catalysis		PTC-P-001-014	
<b>Installation Date/Time</b>	22-Jan-2013	16.00-20.00	24-Jan-2013
	23-Jan-2013	8.00-9.00	25-Jan-2013
<b>Display</b>		14.00 - 18.30	8.00-10.00
<b>Discussion</b>		13.00 - 18.30	9.00 - 10.10
<b>Removable Date/Time</b>		17.10 - 18.30	9.00 - 10.10
		18.30-20.00	10.30-12.00



## POSTER PRESENTATION PROGRAM

Poster Presentation session/Date	A (23-Jan-2013)	B (24-Jan-2013)	C (25-Jan-2013)
Analytical Chemistry	ANC-P-001-057	ANC-P-058-097	
Biological / Biophysical Chemistry and Chemical Biology		BBC-P-001-029	
Bioinformatics		BIF-P-001	
Chemical Education		CHE-P-001-005	
Cosmetics		COS-P-001-007	
Environmental Chemistry	ENC-P-001-035		
Free radicals/ Antioxidants			FRA-P-001-015
Food safety and Food Chemistry	FSC-P-001-020		
Industrial Chemistry and Innovation		IIN-P-001-021	
Inorganic Chemistry	INC-P-001-021		
Material Sciences and Nanotechnology	MSC-P-001-052		MSC -P-053-111
Organic Chemistry and Medicinal Chemistry		OCM-P-001-033	OCM-P-034-079
Physical and Computational Chemistry		PCC-P-001-030	PCC-P-031-053
Polymer Chemistry	PMC-P-001-025	PMC-P-026-055	
Petroleum Chemistry and Catalysis		PTC-P-001-014	
<b>Installation Date/Time</b>	22-Jan-2013 16.00-20.00	24-Jan-2013 8.00-10.00	25-Jan-2013 8.00-9.00
<b>Display</b>	23-Jan-2013 8.00-9.00		
<b>Discussion</b>	14.00 - 18.30	13.00 - 18.30	9.00 - 10.10
<b>Removable Date/Time</b>	17.10 -18.30 18.30-20.00	17.10 - 18.30 18.30-20.00	9.00 - 10.10 10.30-12.00

MSC  
P  
034

## SYNTHESIS AND CHARACTERIZATIONS OF NANOPOLYPYRROLE BY EMULSION POLYMERIZATION

S. Jongjinakool, S. Moonmangmee , S. Teepoo

*Department of Chemistry, Rajamangala University of Technology, Thailand*



The SEM image of Polypyrrole nanoparticles  
were by emulsion polymerization

**Keywords**

Nanopolypyrrole; Emulsion polymerization; anionic and nonionic surfactants





# Synthesis and characterizations of nanopolypyrrole by emulsion polymerization

S. Jongjinakool<sup>1</sup>, S. Moonmangmee<sup>2</sup>, S. Teepoo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Klong6, Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand

<sup>2</sup>Thailand Institute of Scientific and Technological Research, KlongLuang, Pathumthani 12120 Thailand

\*E-mail: [sjirivan@mail.rmutt.ac.th](mailto:sjirivan@mail.rmutt.ac.th)

## Abstract

The nanopolypyrrole was used for enhancement in the sensitivity of biosensor for glucose detection. The synthesis of nanopolypyrrole was investigated using emulsion polymerization based on the interaction of surfactants. The sodium dodecyl sulfate (SDS) and isooctylphenyl ether (Triton X-100) were chosen as anionic and nonionic surfactants, respectively. The size and shape of nanopolymer were controlled by the surfactants ratio. The optimum ratio between anionic and cationic surfactants was 0.3 to 0.15M. Under optimum condition, the nanopolypyrrole size of 20-200 nm was obtained by using dynamic light scattering (DLS). The scanning electron microscopy (SEM) showed spherical shape of nanopolymer.

## Introduction

Nowadays, nanotechnology is rapidly evolving to open new materials useful in solving challenging bioanalytical problems, including specificity, stability and sensitivity. Here conducting polymers can be exploited as an excellent tool for the preparation of nanoparticles. In this work we have been focused on the synthesis and characterization of nanopolypyrrole. In addition, these nanoconducting polymers were applied in biosensor technique.

## Objective

To synthesize and characterize the nanopolypyrrole

## Method

SDS and Triton X-100 were dissolve in distilled water at 38 °C with mechanical stirring

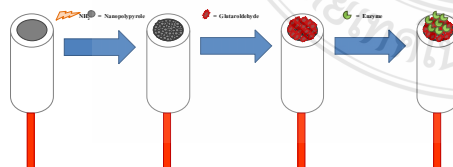
Monomer of pyrrole was added drop wise into the SDS/Triton X-100

Iron(III) chloride dissolved in distilled water was added to the mixture solution

The precipitated nanoparticles were washed with distilled water, acetone, and methanol

Dried in a vacuum oven at room temperature to obtain the nanopolypyrrole

## Application in biosensor system



Scheme. 1. Fabrication process of nanopolypyrrole modified electrode

## Results

### Characteristic of nanopolypyrrole

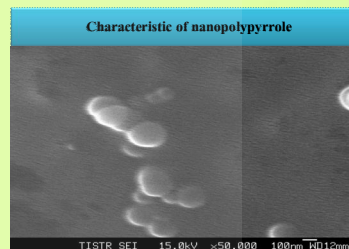


Fig. 1. The SEM image of polypyrrole nanoparticles

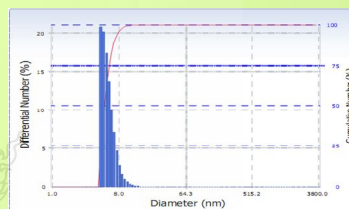


Fig. 2 Dynamic light scattering of polypyrrole nanoparticles

### Characteristics of electrochemistry on electrode surface

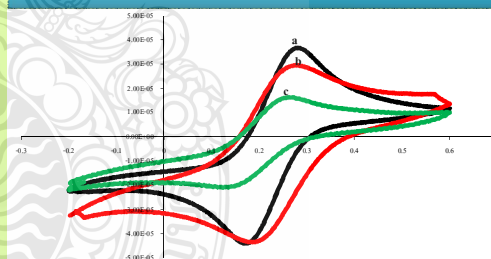


Fig. 3 Cyclic voltammograms of the electrode at different stages: (a) bare electrode, (b) nanopolypyrrole modified electrode, (c) enzyme/nanopolypyrrole modified electrode. Supporting electrolyte: 10 mM Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup> solution containing 0.1 M KCl; scan rate, 50 mV/s.

## Conclusion

In this work showed the synthesis of nanoconducting polymer by emulsion polymerization. Resulting the polypyrrole particles were obtained in the range of nanometer. The nanopolypyrrole has been used in biosensor system. The nanopolypyrrole based on biosensor was enhanced the current response because ability of nanopolypyrrole high conductivity, increasing the electroactive surface area for higher enzyme loading and non toxic to the environment.

## Reference

Kwon W.J, Suh D.H, Chin B.D., Yu J-W, (2008), Applied Polymer Science, Vol. 110, 1324–1329



**PACCON**  
PURE AND APPLIED CHEMISTRY  
INTERNATIONAL CONFERENCE 2013



**Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013)**

**"Global Chemical Sciences for Green Community"**

The Tide Resort, Bangsaen Beach, Chon Buri, Thailand, 23-25 January, 2013

In honor of your attendance, we are pleased to present

**CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION**

to

**SURIYAPHA JONGJINAKOOL**

on 25 January 2013

*T. Uswadee*

Assoc. Prof. Dr. Supawan Tantayanon  
President of Chemical Society of Thailand

Assoc. Prof. Dr. Usavadee Tuntiwatanuruk  
Dean of Faculty of Science, Burapha University



ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณ

# 1 การคำนวณหาประสิทธิภาพของวิธีไบโอเซนเซอร์

## 1.1 การทำซ้ำของวิธี (Repeatability)

สูตรการคำนวณ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

% RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$  = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธี

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า ( $\mu A$ )
1	29.2
2	28.3
3	28.3
4	28.9
5	27.2

$$\bar{X} = 28.40$$

$$SD = 0.74$$

$$\%RSD = \frac{0.77 \times 100}{28.38}$$

$$\%RSD = 2.6$$

## 1.2 การทวนซ้ำของวิธี (Repeatability)

สูตรการคำนวณ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$  = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธี

ครั้งที่	กระแสไฟฟ้า ( $\mu A$ )
1	26.9
2	26.7
3	27.6
4	28.3
5	27.6

$$\bar{x} = 27.42$$

$$SD = 0.64$$

$$\%RSD = \frac{0.64 \times 100}{27.42}$$

$$\%RSD = 2.3$$

### 1.3 ความแม่นยำของวิธี (Recovery)

$$\% \text{Recovery} = \frac{(\text{ค่าจากสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน}) - (\text{ค่าจากตัวอย่างที่ไม่เติม})}{\text{ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม}}$$

ตารางที่ 4.8 ผลการศึกษาการเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (mM)			% การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
1	3.79	5.00	8.58	96
2	3.82	5.00	8.76	99
3	5.06	5.00	10.47	108

แสดงการคำนวณตัวอย่างที่ 1.

$$\% \text{Recovery} = \frac{8.58 - 3.79}{5.00} \times 100$$

$$\% \text{Recovery} = 96\%$$

### 1.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}_{\text{blank}}$$

$$\text{LOD} = 0 + (3 \times 0.15)$$

$$\text{LOD} = 0.46$$

### 1.5 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

$$\text{LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}_{\text{blank}}$$

$$\text{LOQ} = 0 + (10 \times 0.46)$$

$$\text{LOQ} = 4.6$$

1.6 สถิติ t-test

$$t = \frac{\frac{\sum D}{n}}{\frac{\sqrt{\frac{\sum D^2 - \frac{(\sum D)^2}{n}}{n(n-1)}}}{n(n-1)}}$$

- D = ค่าความแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีไบโอเซนเซอร์
- D<sup>2</sup> = ค่าความแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีไบโอเซนเซอร์ยกกำลังสอง
- n = จำนวนครั้งของการตรวจวัด

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีไบโอเซนเซอร์กับวิธีมาตรฐาน (Enzymatic Colorimetric method) และผลการวิเคราะห์ด้วย สถิติ (t-test)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลูโคส		D	D <sup>2</sup>
	ไบโอเซนเซอร์	วิธีมาตรฐาน		
	mM : mg/dL	mM : mg/dL		
1	11.3 : 203.6	9.4 : 170	1.9	3.6
2	16.9 : 304.5	15.2 : 273.8	1.7	3.0
3	14.6 : 263	15.3 : 275.6	-0.7	0.5
4	19.6 : 353.1	16.0 : 288.3	3.6	13.0
5	17.2 : 309.9	17.3 : 312	-0.03	0.0009
			$\sum D = 6.44$	$\sum D^2 = 19.9938$

$$t = \frac{1.2888}{19.9938-1.6589}$$

$$t = \frac{5(5-1)}{1.288}$$

$$t = \frac{0.9575}{1.3452}$$

เปรียบเทียบค่า t ที่คำนวณได้กับค่า t ในตาราง  $t_{Table} = 2.776$

1.7 หน่วยของการวัดจาก มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรแปลงเป็นมิลลิโมลต่อลิตร  
ใน 1mg/dL ของกลูโคสเปลี่ยนเป็น mmol/L (MW=180.156)

$$\text{mmol/L} = \frac{1\text{mg}}{1\text{dl}} \times \frac{10\text{dl}}{1\text{L}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \times \frac{1\text{mol}}{180.156\text{g}} \times \frac{1000\text{mmol}}{1\text{mol}}$$

ดังนั้น กลูโคส 1 mg/dL เท่ากับ 0.0555 mmol/L

ตัวอย่างเช่น : ในตัวอย่างเลือดมีปริมาณกลูโคส 273 mg/dL จะมีค่ากี่ mmol/L

ใน 1mg/dL มีค่าเท่ากับ 0.0555 mmol/L

ใน 273 mg/dL มีค่าเท่ากับ  $\frac{273\text{mg/dL} \times 0.0555\text{mmol/L}}{1\text{mg/dL}}$

ดังนั้น กลูโคส 273 mg/dL มีค่าเท่ากับ 15 mmol/L



## ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน                   นางสาวสุรียภา จงจินากุล  
วัน เดือน ปีเกิด                30 เมษายน 2532  
ที่อยู่                                31/6 หมู่ 1 ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี 71180  
การศึกษา                         สำเร็จการศึกษาวិทยาสตรบัณฑิต  
  สาขาวิชาเคมี  
  มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปี พ.ศ. 2553  
อีเมล                                namtan\_2532@hotmail.com

