

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรึงเอนไซม์หลายชั้นบนผิวคาร์บอนนาโนทิวส์ เพื่อใช้ตรวจวัดเชิงไปโอเซนเซอร์

Multilayered Immobilization of Enzyme on Carbon Nanotubes for Biosensors

คณะผู้วิจัย

นางพรทิพย์ คุ้มฉิมมิตร

นายวีระศักดิ์ สุระเรืองชัย

รายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ(ภาษาไทย)

การเกาะติดแบบอิเล็กโตรสแตติกที่เกิดขึ้นเองของเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (GOx) บน มัลติวอลล์ คาร์บอนนาโนทิวป์หนึ่งเส้น (MWNT) แล้วโม่ดีไฟด์บนกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดได้ ถูกศึกษาในการทดลองนี้ MWNT ได้ถูกฟังก์ชันนอลด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้เกิดประจุลบบน ผิว MWNT จากนั้นประจุบวกของโพลีเอซิลเอมีน ไฮโดรคลอไรด์ (PAA^+) ก็เคลือบเป็นชั้นขึ้นมา และต่อดัวยับของ GOx แล้วนำไปโม่ดีไฟด์บนกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด ซึ่งนำไปใช้ศึกษา การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงของฟลูออรีนออกไซด์ FAD/FADH_2 โดยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมตรี นอกจากนี้ยังนำไปศึกษาการปกคลุมที่ผิวหน้า (surface coverage) และแอกติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งถูกวิเคราะห์โดยยูวีวิส สเปกโตรโฟโตเมทรี และแอมเพอโรเมทรี

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

The electrostatic self-assembling glucose oxidase (GOx) on a multi-walled carbon nanotube (MWNT) – modified glassy carbon electrode is described. The MWNT was functionalized by carboxylic acid group then the negatively charged of MWNT surface was alternately assembled with a cationic poly (allylamine hydrochloride), (PAA⁺) layer and GOx layer. Finally, the modified nanotubes were adsorbed onto a glassy carbon electrode and were used for studying the direct electron transfer of FAD/FADH₂ redox peak by cyclic voltammetry. The surface coverage and enzyme activity were characterized by UV-vis spectrophotometry and amperometry, respectively

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
Abstract	ข
สารบัญ	ค
รายการตาราง	จ
รายการรูปประกอบ	ฉ
รายการสัญลักษณ์	ช
ประมวลศัพท์และคำย่อ	ฌ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ทฤษฎีสมมุติฐาน	3

2	วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	6
2.1	เครื่องมือและวัสดุ	6
2.2	สารเคมี	6
2.3	วิธีดำเนินการวิจัย	6
3	ผลการทดลองและข้อวิจารณ์	8
3.1	ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอมไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ติดอยู่บน ขั้วอิเล็กโทรด	8
3.2	ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเอมไซม์มัดติเลเยอร์ฟิล์มบน คาร์บอนนาโนทิวป์	13
3.3	ศึกษาแอกติวิตี้ของเอมไซม์มัดติเลเยอร์ฟิล์มบนคาร์บอนนาโนทิวป์	14
3.4	ศึกษา molar mass ของเอมไซม์มัดติเลเยอร์ฟิล์มบนคาร์บอนนาโน ทิวป์	15
3.5	ศึกษาอิเล็กโตรเคมีสทรีของกลูโคสออกซิเดสในแต่ละชั้นฟิล์ม	18
4	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	26
	เอกสารอ้างอิง	28
	ผลงานตีพิมพ์จากโครงการ	30

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	แสดงสมบัติเชิงจลศาสตร์ และ %FAD บน MWNTs/(PAA/GOx) _n	25

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1	ค่าความไวในการวัดกลูโคสที่ MWNTs/(PAA/GOx) _n โมดิไฟด์บนกระจกซี 9 คาร์บอนอิเล็กโทรด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.8 โวลท์
2	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของฟิล์ม MWNTs/(PAA/GOx) ₄ ที่อัตราการป้อน 10 ศักย์ไฟฟ้า 5 mV/s ใน (a) สารละลายกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 ที่มี 0.1 โมลาร์ (b) ไม่เติมสารละลายกลูโคส
3	อัตราส่วนของกระแสตอบสนองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ขึ้นต่างๆ ใน 11 สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 และโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ที่มีเฟอร์ไรซีน 0.1 มิลลิโมลาร์โดยเติมกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ ใช้ อัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า 5 mV/s

4	TEM ของ MWNTs (A) และ (B) MWNTs/(PAAGOx) ₄	13
5	แอมพลิจูดของเอมไซน์มัลติโกลโคสออกซิเดสที่วัดด้วยเทคนิค spectroscopy โดยวัดจาก supernatant ของเอมไซน์มัลติโกลโคสออกซิเดสบน MWNTs	UV-visible 14
6	Molar mass ของกลูโคสออกซิเดสบน MWNTs	16
7	แสดงจำนวนโมเลกุลของกลูโคสออกซิเดสในแต่ละชั้นที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์หนึ่งเส้น	18
8	โวลแทจโมแแกรมของ (MWNTs/(PAA/GOx) ₄ ที่อัตราป้อนศักย์ไฟฟ้าต่างๆ	19
9	ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสตอบสนองอะโนดิก (I _{pa}) และคาโทดิก (I _{pc}) กับ อัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า	20
10	ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าของพีคอะโนดิก(E _{pa}) และพีคคาโทดิก (E _{pc}) กับลิกกาติฟิมของอัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า	21
11	ความสัมพันธ์ระหว่างเดลต้าของศักย์ไฟฟ้ากับลิกกาติฟิมของอัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า	23

รายการสัญลักษณ์

Ag/AgCl	=	silver/silver chloride reference electrode
E_{pa}	=	Anodic peak potential
E_{pc}	=	Cathodic peak potential
ΔE_p	=	Delta of different potential
k	=	Rate constant
H_2O_2	=	hydrogen peroxide
H^+	=	Proton
I_p	=	Isoelectric point
I_{pa}	=	Anodic peak current
I_{pc}	=	Cathodic peak current
N_A	=	Avogadro's number
q	=	Charge passed in electrolysis
α_a	=	Anodic transfer coefficient
α_c	=	Cathodic transfer coefficient
ε	=	Extinction coefficient
ν	=	Scan rate
Γ	=	Surface coverage

ประมวลศัพท์และคำย่อ

LBL	=	Layer by Layer
MWNTs-COOH	=	Carboxylic functionalized on multiwalled carbon nanotubes
MWNTs-GOx	=	Glucose oxidase immobilized on the surface of multiwalled carbon nanotubes
MWNTs-CTAB	=	Cetyltrimethylammonium bromide functionalized on multiwalled carbon nanotubes
PAA	=	Polyallylamine
SWNTs	=	Single walled carbon nanotubes

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

การพัฒนาอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ปี ได้มีการนำเอาวัสดุนาโนขนาด 1-100 นาโนเมตร มาช่วยในการทรานส์ดิวซ์สัญญาณวัด อาทิเช่น อนุภาคขนาดนาโนทองและเงิน เซมิ-คอนดักเตอร์ชนิดควอนตัมดอท (quantum dot, QD) ลวดนาโน (nanowire, NW) และคาร์บอนนาโนทิวส์ (carbon nanotube, CNT) ที่มีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงมาก โดยวัสดุเหล่านี้ทำงานร่วมกับสารชีวภาพ อาทิเช่น เอ็มไซม์ ดีเอ็นเอและแอนติบอดี เป็นต้น ซึ่งจะประยุกต์ใช้เป็นวัสดุพาหะสำหรับตรึงสารชีวภาพ จากสมบัติที่ดีของคาร์บอนนาโนทิวส์ อาทิเช่นให้ background current ต่ำ มีช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ใช้งานกว้าง และไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และสามารถสังเคราะห์หมู่ฟังก์ชันต่างๆบนผิวของคาร์บอนนาโนทิวส์ได้ เช่นหมู่คาร์บอกซิลิก และแอมมีน เป็นต้น ทำให้สามารถจับกับหมู่ฟังก์ชันของไบโอโมเลกุลได้หลากหลายชนิด จึงมีผู้ศึกษาและประยุกต์ใช้คาร์บอนนาโนทิวส์กับงานด้านอิมโมโนเซนเซอร์ ดีเอ็นเอเซนเซอร์ เคมีคัลและไบโอเซนเซอร์ โดยการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีความแม่นยำ และจำเพาะเจาะจง อย่างเช่น การสร้างกลูโคสเซนเซอร์ ที่ใช้ตรวจวัดผู้ป่วยโรคเบาหวาน ตรวจวัดน้ำตาลใช้เครื่องดื่มและอาหาร ส่วนใหญ่จะตรึงเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (GOx) ไว้ที่ผิวหน้าอิเล็กโทรดโดยวิธีอิเล็กโตรโพลีเมอไรส์ เซชัน [1] การตรึงแบบ cross-linking [2] casting [3] หรือใช้เทคนิค self-

assembly [4] ปัจจุบันสามารถตรึงเอนไซม์หลายชั้น โดยกระบวนการใช้เทคนิค layer-by-layer, LBL ซึ่งอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) การเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ผิวหน้าอิเล็กโทรด อย่างเช่น การเพิ่มไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้เกิดการรีดิวซ์ที่ผิวหน้าอิเล็กโทรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าความไวสูง จากองค์ความรู้นี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างตัวขยายสัญญาณในงานดีเอ็นเอ และอิมมูโนเซนเซอร์ได้อีกทางหนึ่งด้วย ข้อดีของการใช้เทคนิค LBL คือสามารถลดการดีเนเจอร์ (denaturation) ของเอนไซม์ เนื่องจากใช้กระบวนการดูดซับ (adsorption process) ในสารละลายสถานะที่เป็นกลาง [5]

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสหลายชั้น บนผิววัสดุคาร์บอนนาโนทิวป์ เพื่อประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ โดยจะใช้อิเล็กโทรดที่โมดิไฟด์ควบคุมการใช้เมดิเอเตอร์ และหาค่า kinetic ของเอนไซม์ที่โมดิไฟด์บนอิเล็กโทรด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการตรึงเอนไซม์หลายชั้น บนผิวคาร์บอนนาโนทิวป์แบบ self assembly และเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ในแต่ละชั้น โดยเทคนิค

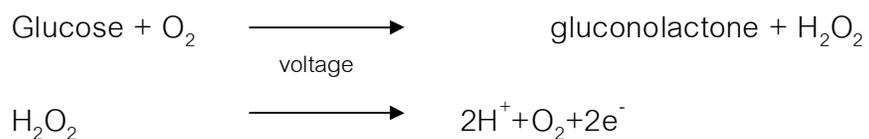
amperometry และ UV spectroscopy ทดสอบสมบัติเชิง bioelectrocatalytic โดยใช้รีดอกซ์เมดิเอเตอร์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารไทยหรือต่างประเทศได้ โดยมี
กลุ่มเป้าหมายในการนำไปใช้งานด้านนาโนไบโอเซนเซอร์ อิมโมโนเซนเซอร์ และ
ดีเอ็นเอเซนเซอร์

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน

การสร้างกลูโคสเซนเซอร์ สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้หลายวิธี โดย
การวัดในรูปของกระแสไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลมาจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสาร
ตัวอย่างเข้าสู่อิเล็กโทรด การถ่ายเทอิเล็กตรอนเกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ โดย
การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ อย่างเช่นการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ที่แปรผันโดยตรงกับปริมาณกลูโคส ซึ่งกลูโคสจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเอน
ไซม์กลูโคสออกซิเดส และได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดปฏิกิริยาออกซิชันที่
ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.6 โวลต์ดังสมการข้างล่าง [6]



นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาใช้สารตัวกลาง (mediator) เพื่อลด
ศักย์ไฟฟ้าให้ต่ำลง ทำให้ลดการรบกวนของสารปนเปื้อนอื่นได้ ขั้นตอนการ

ถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารตัวกลางกับเอมไซม์เริ่มจาก เมื่อสารตัวอย่างเข้าสู่
ศูนย์กลางของเอมไซม์ เกิดปฏิกิริยาโดยการเร่งของเอมไซม์ที่อยู่ในสภาพออกซิไดซ์
เมื่อเอมไซม์ก่อกายสภาพไปอยู่รูปรีดิวซ์ จึงต้องมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนต่อไป
อีก เพื่อให้เอมไซม์กลับสภาพไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ตามเดิม ซึ่งโดยทั่วไปทำได้
สองรูปแบบคือ การออกซิไดซ์โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าโดยตรงในขนาดที่เหมาะสม
ผ่านอิเล็กโทรด หรือการออกซิไดซ์สารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก
เอมไซม์ในสภาพรีดิวซ์ และเมื่อป้อนศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมผ่านอิเล็กโทรด
ทำงาน เทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิง สารตัวกลางในสภาพรีดิวซ์ถูกออกซิไดซ์
เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนเข้าสู่อิเล็กโทรด ทำให้เกิดการตอบสนองของ
กระแสไฟฟ้าซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของสารตัวอย่าง สารตัวกลางส่วนใหญ่ที่
ใช้วัดปริมาณกลูโคส อาทิเช่นการใช้เฟอร์โรซีนทำปฏิกิริยาส่งถ่ายอิเล็กตรอน
ระหว่างเอมไซม์กับผิวหน้าอิเล็กโทรด สามารถลดศักย์ไฟฟ้าได้ประมาณ 0.3
โวลท์

ปัจจุบันได้นำเอาเทคนิค LBL มาใช้สำหรับเพิ่มปริมาณเอมไซม์ได้สอง
แบบคือ การตรึงบนผิวอิเล็กโทรดโดยตรงและการตรึงบนผิววัสดุคาร์บอน
แรกสร้างชั้นฟิล์มของเอมไซม์บนผิวอิเล็กโทรด โดยงานวิจัยของ Liu และ Lin
[7] ใช้คาร์บอนนาโนทิวส์ที่มีประจุลบของคาร์บอกซีเลทแอนไอออน โมดิไฟด์
บน glassy carbon electrode (GCE) และเคลือบด้วยโพลีไอออนที่มีประจุ

บวก และจับกับประจุลบของ GOx ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 8 ซึ่งมากกว่า
/p ของ GOx (Isoelectric point (I/p) = 4.5) แบบที่สองคือ การสร้างชั้นฟิล์ม
เอมไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวส์ก่อนนำไปเคลือบบนผิวหน้าอิเล็กโทรด โดยใช้
หลักการ electrostatic interaction เหมือนวิธีแรก ซึ่งจะทำสลับกันไป
ระหว่างชั้นของเอมไซม์กับชั้นของโพลีอิเล็กโตรไลต์ ดังนั้นปริมาณเอมไซม์จะ
เพิ่มขึ้นตามจำนวนชั้นที่เกาะติด ทำให้เกิดปฏิกิริยากับซับสเตรตได้มากขึ้น
เมื่อใช้วัดในระบบที่มีสารละลายเมดิเอเตอร์ที่ช่วยการส่งถ่ายอิเล็กตรอนจึง
เพิ่ม sensitivity ได้

บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือและวัสดุ

การวัดเชิงเคมีไฟฟ้าใช้เครื่อง potentiostat ยี่ห้อ Autolab รุ่น PGSTAT 12 ของบริษัท Eco-Chimie ประเทศเนเธอร์แลนด์ เซลล์เคมีไฟฟ้าประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้าทำงาน กลาสซี คาร์บอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร (BAS Technocol) ขั้วไฟฟ้าช่วย เป็นแพททินัมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (สร้างในห้องปฏิบัติการ) และ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเป็น Ag/AgCl (BAS Technocol) ที่จุ่มอยู่ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์

2.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ มีผง MWNTs-COOH (>95wt% purity) ซื้อมาจาก Cheap Tubes Inc. (USA) เอมไซม์กลูโคสออกซิเดสมี isoelectric point 4.2 สกัดจาก *Aspergillus niger* และกลูโคสซื้อมาจากบริษัท Aldrich-Sigma สารเคมีอื่นเป็น reagent grade สารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองเตรียมในน้ำกลั่น

2.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

ในการวิจัยนี้จะใช้เทคนิคการตรึงเอนไซม์แบบ LBL บน MWNTs โดยประจุลบ บนผิว MWNTs จะจับกับประจุบวกของโพลีอิลเลคโตรไลต์ (poly (allylamine hydrochloride), PAA) และขั้นต่อไปจะจับกับเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH

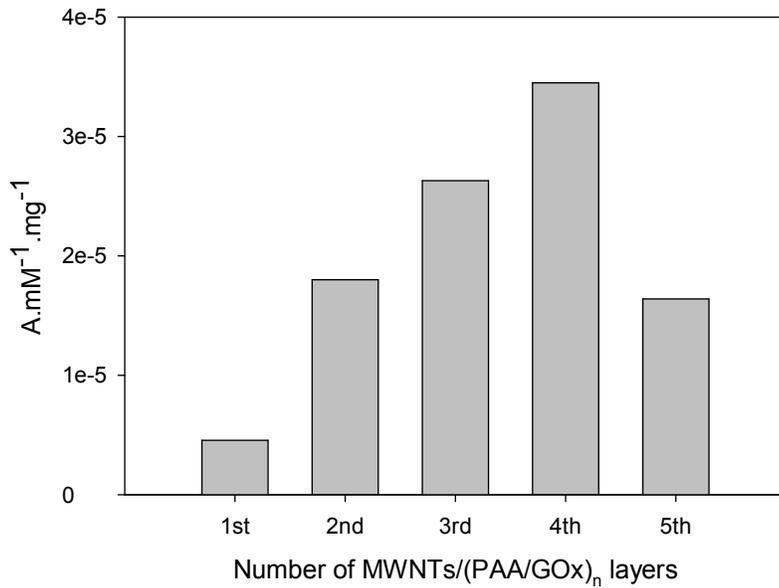
มากกว่าค่า p (Isoelectric point, GOx มีค่าเท่ากับ 4.5) จากนั้นเตรียมเอมไซม์ในชั้น
ต่อไป โดยมีโพลีอิเล็กโตรไลต์เป็นตัวเชื่อมในแต่ละชั้น จากนั้นนำ MWNTs-GOx ไป
โมดิไฟด์บนอิเล็กโทรด เพื่อศึกษาแอกติวิตีของเอมไซม์และสมบัติเชิงอิเล็กโตรเคมีคัล
เซนเซอร์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีและ UV-vis สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รวมทั้งศึกษา
สมบัติเชิงไบโออิเล็กโตรคะตะไลติก ด้วยการใช้สารตัวกลางรีดอกซ์ร่วมกับเทคนิค-
โวลแทมเมตรี เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกระแสตอบสนองเชิงอิเล็กโตรคะ-
ตะไลติกต่อน้ำหนักฟิล์ม MWNT-GOx ที่โมดิไฟด์บนหัวอิเล็กโทรด

บทที่ 3 ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

3.1 ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ติดอยู่บนขั้วอิเล็กโทรด

นำคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก (MWNTs-COOH) มา 0.5 mg/ml กระจายตัวในสารละลายโพลีอิลเลคโตรไลต์ หรือ โพลีเอิลลิคเอมีน (polyallylamine, PAA) ที่มี 0.5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แล้วเขย่าค่อยๆ 20 นาที ซึ่งจะทำให้คาร์บอกซิลเลตแอนไอออนบนผิวผนังทิวอลล์นาโนทิวป์จับกับประจุบวกบน PAA จากนั้น MWNTs/PAA ที่ได้จะนำไปปั่นแยก Supernatant ที่ 14000g เป็นเวลา 30 นาที นำ MWNTs/PAA ไปบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 ที่มี 1mg/ml กลูโคสออกซิเดส (GOx) โดยเขย่าเบาๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยก supernatant ที่ 14000g เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำ supernatant ที่ได้ไปวัด UV spectrophotometer เพื่อหา แอคติวิตีของเอนไซม์ และ molar mass ต่อไป ส่วนตะกอนที่ได้จะเป็น MWNTs(PAA/GOx)_n นำไปกระจายตัวในน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร แล้วหยดสารละลายนี้ลงในบีกเกอร์คาร์บอนอิเล็กโทรด 40 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำกระบวนการตรึงเอนไซม์

กับ PAA ซ้ำ บนผิว MWNTs เพื่อให้ได้จำนวนชั้นของเอมไซม์ตามต้องการ นำอิเล็ก
โทรดที่โมดิไฟด์ MWNTs/(PAA/GOx)_n ไปวัดการเร่งปฏิกิริยาของเอมไซม์บน
คาร์บอนนาโนทิวส์ที่ติดอยู่บนขั้วอิเล็กโทรด โดยวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
(H₂O₂) ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ซึ่ง H₂O₂ ผลิตจากการเร่งปฏิกิริยาของกลู
โคสออกซิเดสในสารละลายที่มีออกซิเจน รูปที่ 1 แสดงผลความไวของกลูโคสใน
สารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มี 0.1 โมลาร์ ไปแตสเซียมคลอไรด์
พบว่าผลของความไวเพิ่มขึ้น เมื่อจำนวนของชั้นฟิล์ม PAA/GOx เพิ่มขึ้นบน
MWNTs จนกระทั่งถึงเอมไซม์ถึง 4 ชั้น เนื่องจากจำนวนกลูโคสเพิ่มขึ้นตามจำนวน
ชั้นฟิล์ม แต่เมื่อถึงชั้นที่ 5 ค่าความไวลดลงเนื่องจาก ชั้น PAA ซึ่งเป็นฉนวนเพิ่มขึ้น
ด้วย ทำให้การตอบสนองของกระแสที่ได้จากปฏิกิริยาการเร่งของเอมไซม์บน
คาร์บอนนาโนทิวส์ ลดลง

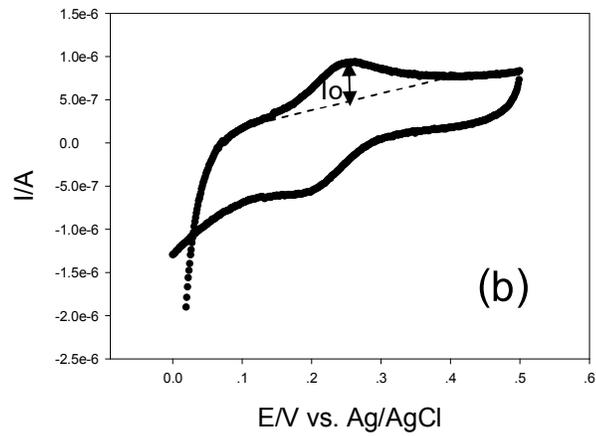
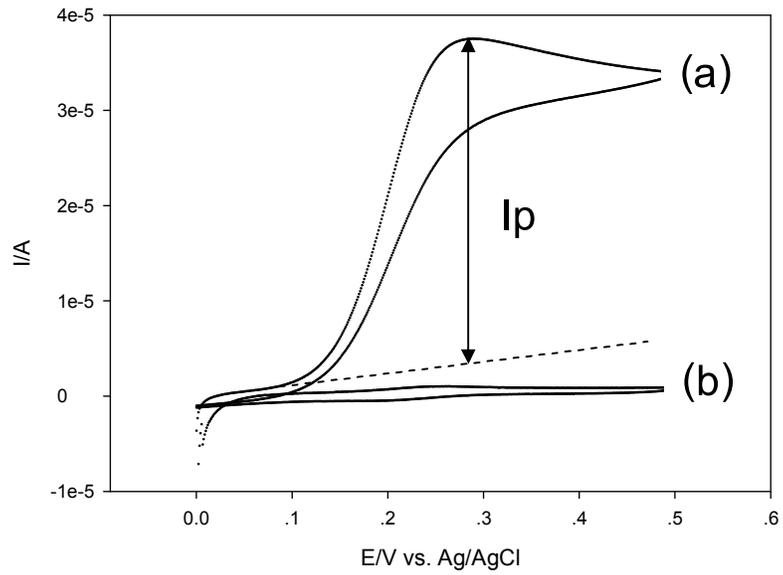


รูปที่ 1 ค่าความไวของการวัดกลูโคสที่ MWNTs/(PAA/GOx)_n โมดิไฟด์บนกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.8 โวลท์

เราสามารถยืนยันว่าจำนวนชั้นที่สี่ให้ความไวสูงที่สุด โดยการทดลองด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีของเอมไซม์โมดิไฟด์บนคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ใช้ควบคู่กับกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด ในสารละลายกลูโคสที่มีเฟอร์โรซีนเมทานอลเป็นเมดิเอเตอร์ ซึ่งแสดงในรูปที่ 2 โดย (a) แสดงพีคกระแสตอบสนอง (I_p) ของการเติม

กลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ สำหรับรูป (b) เป็นพีคกระแสตอบสนองที่ไม่ได้เต็มกลูโคส

(lo) ในสารละลายเฟอร์โรซีน 0.1 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 2 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของฟิล์ม MWNTs/(PAA/GOx)₄ ที่อัตราการป้อน

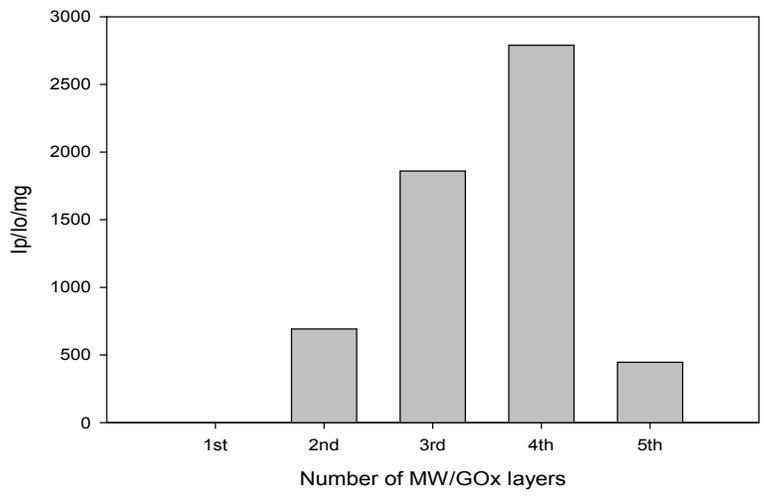
ศักย์ไฟฟ้า 5 mV/s ใน (a) สารละลายกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์

pH 7 ที่มี 0.1 โมลาร์ (b) ไม่เติมสารละลายกลูโคส

อัตราส่วนของ Ip/Io ในแต่ละชั้นของ PAA/GOx บน MWNTs ได้แสดงผลการ

ทดลองในรูปที่ 3 ซึ่งยืนยันว่าชั้นที่ 4 ของ PAA/GOx บน MWNTs ได้ค่าอัตรา

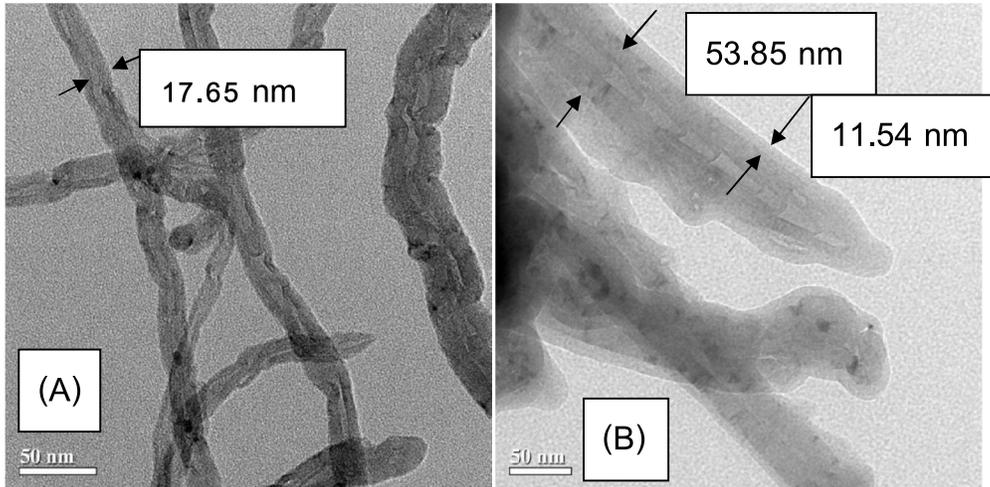
ส่วนสูงที่สุด ซึ่งให้เหตุผลเดียวกันกับการหาค่าความไวด้วยวิธีแอมเพอโรเมตริก



รูปที่ 3 อัตราส่วนของกระแสตอบสนองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ชั้นต่างๆ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 และโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ที่มีเฟอร์โรซีน 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยเติม 25 มิลลิโมลาร์กลูโคส ซึ่งใช้อัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า 5 mV/s

3.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเอมไซม์มัดติเลเยอร์ฟิล์มบนคาร์บอนนาโนทิวส์

การสร้างชั้นของ GOx ตรึงบนผิว MWNTs อาศัยการเชื่อมต่อกับชั้น PAA จะได้เป็นชั้นต่อชั้นของ MWNTs/(PAA/GOx)_n ซึ่งอาศัยหลักการของการเชื่อมต่อกับแบบอิลคโตรสแตติก ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.3 ลักษณะทางกายภาพของ MWNTs ที่ยังไม่ได้โมดิไฟด์แสดงในรูป TEM รูปที่ 4a จะมีลักษณะเป็นทรงกระบอกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15-60 นาโนเมตร และมีความยาวหลายไมโครเมตร เปรียบเทียบกับผิวของ MWNTs ในรูปที่ 4b แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า มีชั้นของ PAA/GOx เคลือบไว้ ซึ่งถูกเคลือบด้วย PAA/GOx จำนวน 4 ชั้นได้ความหนาประมาณ 11.5 นาโนเมตร



รูปที่ 4 TEM ของ MWNTs (A) และ (B) MWNTs/(PAA/GOx)₄

3.3 ศึกษาแอกติวิตี้ของเอนไซม์มัลดีเลเยอร์ฟิล์มบนคาร์บอนนาโนทิวป์

แอกติวิตี้ของเอนไซม์ที่ตรึงบน MWNTs คำนวณได้จากการดูดกลืนแสงยูวีที่

จำนวนชั้นต่างๆของเอนไซม์บน MWNTs ด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy โดย

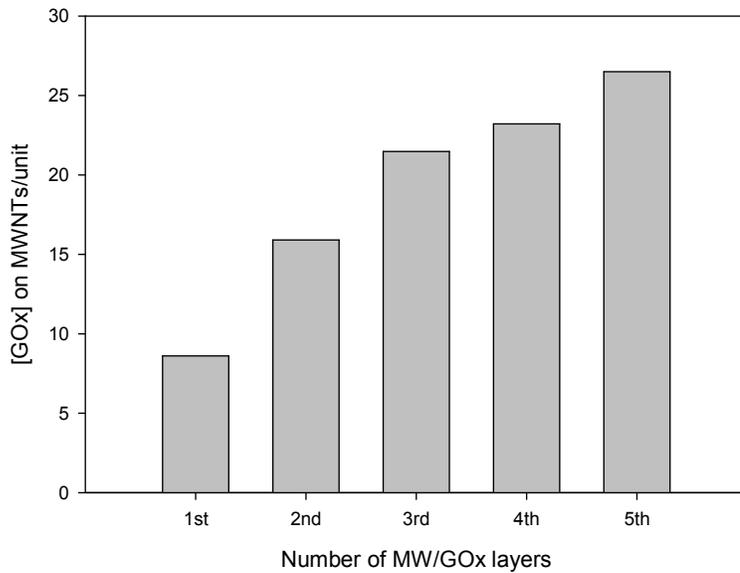
supernatant ของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้ไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซด์ แล้วไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับไดแอนิซติน จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิ-

เดสอีกครั้ง ซึ่งจะเปลี่ยนจากสารละลายสีเหลืองเป็นสีส้ม แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่

สเปคตรัม 500 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลูโคส

ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนชั้นที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์ ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่วัดด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy โดยวัดจาก supernatant ของเอนไซม์

3.4 ศึกษา molar mass ของเอนไซม์มัลติเลเยอร์ฟิล์มบนคาร์บอนนาโนทิวป์

การหา molar mass จาก supernatant ของกลูโคสออกซิเดสที่เหลือจากการ

ตรึงเอนไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวป์ สามารถคำนวณได้จากการสังเกตสเปกตรัมหรือการ

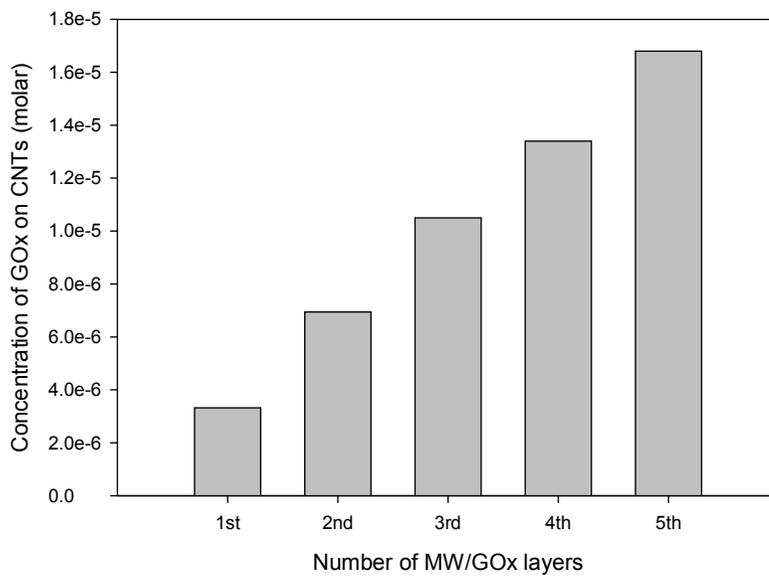
ดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยมีค่า extinction coefficient (ϵ) เท่ากับ 1.4×10^4

$M^{-1}cm^{-1}$ [8] จากสมการของเบียร์ คือ $A = \epsilon bc$ ซึ่ง A คือค่าการดูดกลืนแสง b คือความ

กว้างของเซลล์ (1 cm) และ c คือ molar mass ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง molar mass

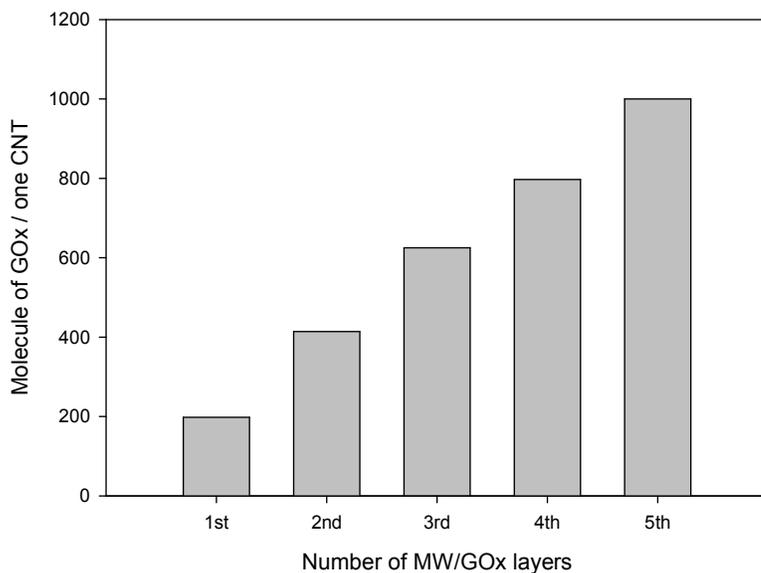
และจำนวนชั้นของเอมไซม์ที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวส์ถูกแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็น

เห็นว่า มีจำนวนเอมไซม์เพิ่มขึ้นตามจำนวนชั้นที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวส์



รูปที่ 6 molar mass ของกลูโคสออกซิเดสบน MWNTs

นอกจากนี้เรายังสามารถคำนวณจำนวนโมเลกุลของเอมไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวป์ได้ เมื่อเราทราบค่า N_A ของหนึ่งสารประกอบเท่ากับ 6.022×10^{23} โมเลกุล/โมล แล้วทราบค่ามวล (m) ของคาร์บอนนาโนทิวป์หนึ่งเส้นได้จาก $d = m/V$ ซึ่ง d คือความหนาแน่นของคาร์บอนนาโนทิวป์หนึ่งเส้น (0.28 g cm^{-3} , เป็นค่าคุณสมบัติเฉพาะจากบริษัท Cheaptubesinc จำกัดผู้ผลิต MWNTs) ส่วน V คือ ปริมาตรของคาร์บอนนาโนทิวป์หนึ่งเส้นซึ่งหาได้จาก $V = \pi r^2 h$ ที่มีรัศมี (r) และความยาว (h) เท่ากับ 15 นาโนเมตร และ 20 ไมโครเมตร (เป็นค่าคุณสมบัติเฉพาะจากบริษัท Cheaptubesinc จำกัดผู้ผลิต MWNTs) ตามลำดับ ดังนั้นทำให้ทราบค่า m ประมาณ 3.96×10^{-12} ไมโครกรัมต่อหนึ่งเส้นคาร์บอนนาโนทิวป์ สุดท้ายนี้เราสามารถคำนวณโมเลกุลของกลูโคสออกซิเดสต่อหนึ่งเส้นคาร์บอนนาโนทิวป์ได้ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 7 พบว่า จำนวนโมเลกุลเอมไซม์เพิ่มขึ้นตามจำนวนชั้นของเอมไซม์ที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์หนึ่งเส้น



รูปที่ 7 แสดงจำนวนโมเลกุลของกลูโคสออกซิเดสในแต่ละชั้นที่ตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์

หนึ่งเส้น

3.5 ศึกษาอิเล็กโตรเคมีสทรีของกลูโคสออกซิเดสในแต่ละชั้นฟิล์ม

ความสำเร็จในการสร้าง MWNTs/(PAA/GOx)₄ ได้ตรวจสอบโดยเทคนิคแอมเพอโร

เมตทรีและไซคลิกโวลแทมเมตทรี การวัดเชิงอิเล็กโตรมีสทรีแบบโดยตรง (direct

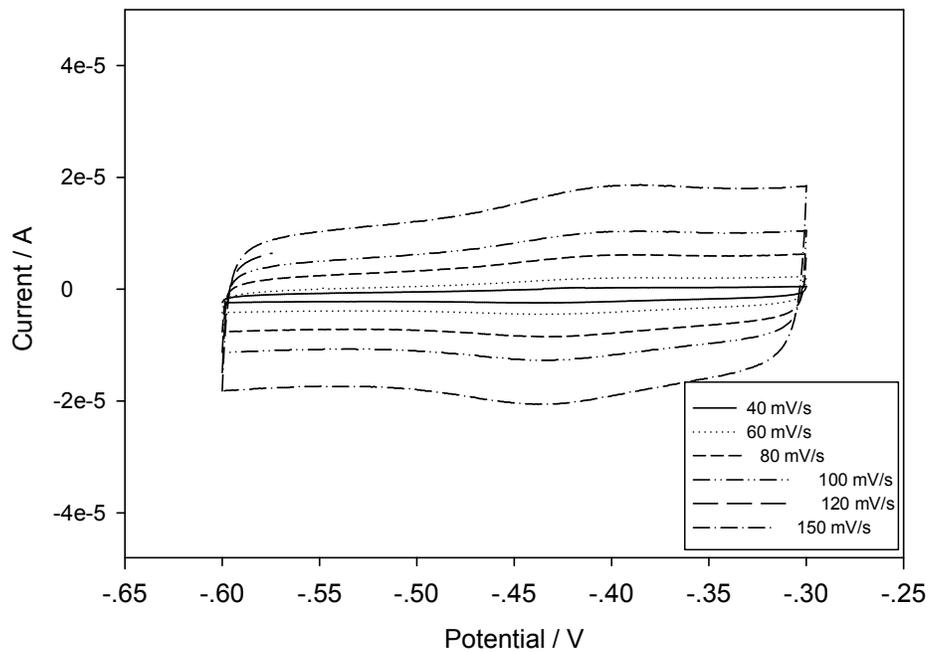
electrochemistry) ของการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสชั้นที่สี่บน MWNTs โมดิไฟด์

บนกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด ได้ถูกศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น

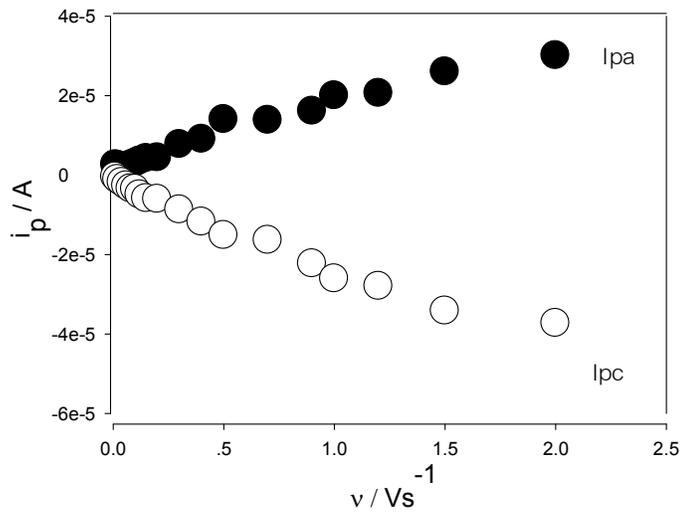
0.1 โมลาร์ ภายใต้บรรยากาศที่อิ่มตัวด้วยไนโตรเจน จากผลการทดลองพบว่าไซคลิก

โวลแทมโมแกรมของ MWNTs/(PAA/GOx)₄ ที่โมดิไฟด์บนกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด

ณ อัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้าที่แตกต่างกันมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 โวลแทมโมแกรมของ (MWNTs/(PAA/GOx)₄) ที่อัตราป้อนศักย์ไฟฟ้าต่างๆ



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสตอบสนองอะโนดิก (Ipa) และคาโทดิก (Ipc) กับ

อัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า

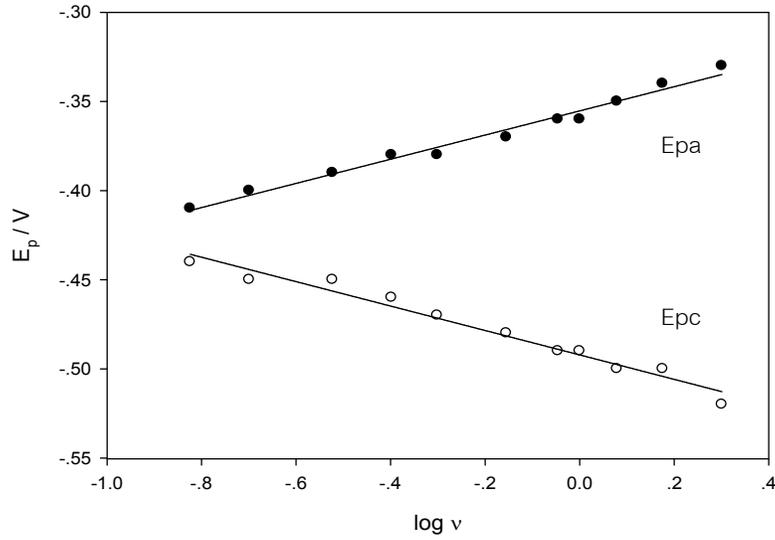
ความสัมพันธ์เส้นตรงของพีคคาร์โทดิก (Ipc) และอะโนดิก (Ipa) ที่ขึ้นกับอัตราการป้อน

ศักย์ไฟฟ้าดังแสดงผลในรูปที่ 9 ผลที่เกิดขึ้นคาดว่าจะป็นปฏิกิริยาแบบ surface-

confined ที่เกิดบนผิวหน้าอิเล็กโทรด แสดงว่าเอมไซม์กลูโคสออกซิเดสถูกตรึงอย่าง

แข็งแรงบนผิวหน้าอิเล็กโทรด ดังนั้นการถ่ายเทอิเล็กตรอนจะเกิดขึ้นโดยตรงบนผิวหน้า

อิเล็กโทรดซึ่งไม่มีการแพร่ของเอมไซม์กลูโคสออกซิเดส



รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าของพีคอะโนดิก(E_{pa}) และพีค

คาโทดิก (E_{pc}) กับลอการิทึมของอัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า

จากความชันของกราฟที่ 10 แทนค่าในสมการที่ 1 และ 2 ข้างล่างนี้

$$\alpha_a = 1 - \left(\frac{2.3RT}{nF \text{slope}_a} \right) \dots\dots\dots 1$$

$$\alpha_c = -2.3 \left(\frac{RT}{nF \text{slope}_c} \right) \dots\dots\dots 2$$

ที่ slope_a = ค่าความชันของอะโนดิกพีค (0.0678)

slope_c = ค่าความชันของคาโทดิกพีค (-0.0685)

R = The gas constant (8.314 J/Kmol)

T = Temperature (298 K)

F = Faraday constant (96485.3 C/mol)

n = Number of electron (2)

ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทอิเล็กตรอนของฟีกอะโนติก (α_a) และคาร์โติดิก

(α_c) จะได้ $\alpha_a = 0.56$ และ $\alpha_c = 0.43$ ตามลำดับ พบว่าการถ่ายเท

อิเล็กตรอนแบบโดยตรงของเอมไซม์กลูโคสออกซิเดสชั้นที่ 4 บนมัลติวอลล์คาร์บอน

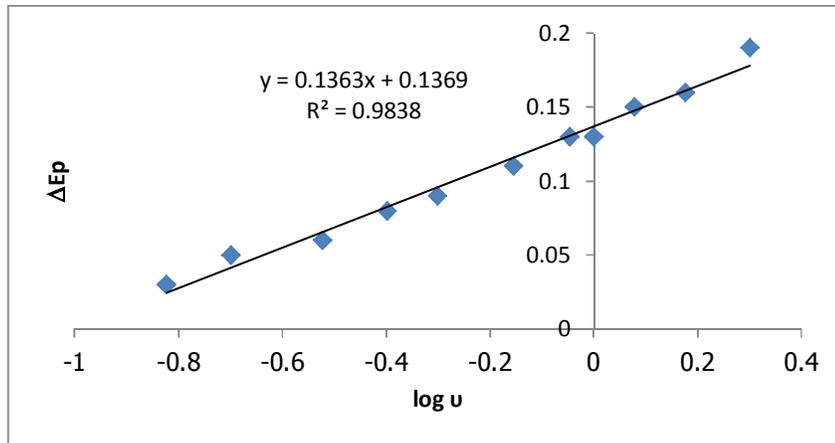
นาโนทิวป์ เกิดปฏิกิริยาแบบ quasi-reversible

อัตราการคงที่ (rate constant, k (s^{-1})) ของ MWNTs/(PAA/GO)₄ โมดิไฟด์บน

กลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดสามารถคำนวณได้จากทฤษฎีของ Laviron [9] ซึ่งมี

สมการหาอัตราการคงที่ของการถ่ายเทอิเล็กตรอนแบบ heterogeneous (k) ดังนี้

$$\log k = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \left(\frac{RT}{nFv} \right) - \alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p / 2.3RT \dots\dots\dots 3$$



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเดลต้าของศักย์ไฟฟ้ากับลอการิทึมของอัตราการ

ป้อนศักย์ไฟฟ้า

จากสมการที่ 3 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเดลต้าความต่างศักย์ไฟฟ้า

(ΔE_p) และค่าลอการิทึมของอัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า ($\log u$) เมื่อแทนค่าความ

ชัน (0.136) ค่าจุดตัดแกน y (0.136) และค่า α (0.56) จะได้ค่า k เท่ากับ 2.8 s^{-1} ค่า

k ของเอมไซม์กลูโคสออกซิเดสที่สูงกว่าที่เคยมีผู้รายงานมาอย่างเช่นการตรึงเอมไซม์

นี้บน MWNTs และ chitosan ได้ค่า k เท่ากับ 1.08 s^{-1} [10] การตรึงเอมไซม์นี้บน

toray carbon paper/ MWNTs ได้ค่า k เท่ากับ 1.44 s^{-1} [11] การตรึงเอมไซม์บน

MWNTs-CTAB ได้ค่า k เท่ากับ 1.53 s^{-1} [12] การตรึงเอมไซม์บนโบรอนโดป

MWNTs ได้ค่า k เท่ากับ 1.56 s^{-1} [13] การตรึงเอมไซม์บน CNT ไมโครอิเล็กโทรด ได้

ค่า k เท่ากับ 1.61 s^{-1} [14] การตรึงเอนไซม์บน SWNTs paper ได้ค่า k เท่ากับ 1.7 s^{-1} [15] เอนไซม์ที่ตรึงบน SWNTs-chitosan โมดิไฟด์บนอิเล็กโทรดได้ค่า k เท่ากับ 3.0 s^{-1} [16] และเอนไซม์ที่ตรึงบน CNTs-poly (diallyldimethylammonium Chloride) (PDDA) โมดิไฟด์บนอิเล็กโทรด ได้ค่า k เท่ากับ 2.76 s^{-1} [17] จากการเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับหลายงานวิจัยพบว่า MWNTs/(PAA/GOx)₄ ให้การถ่ายเทอิเล็กตรอนเร็วระหว่างศูนย์กลางรีดอกซ์ของเอนไซม์และอิเล็กโทรด

การหา surface coverage ของ MWNTs/(PAA/GOx)₄ ที่โมดิไฟด์บนอิเล็กโทรด หาได้จากเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตริกที่อัตราการป้อนศักย์ไฟฟ้า 1 Vs^{-1} พบว่าได้ $2.14 \times 10^{-10} \text{ molcm}^{-2}$ ค่านี้ได้จากการคำนวณประจุ (q) เฉลี่ยของพีคออกซิเดชันและรีดักชัน โดยใช้สมการที่ 4 [18]

$$\Gamma = \frac{q}{nFA} \dots \dots \dots (4)$$

ที่ $\Gamma = \text{surface coverage (molcm}^{-2}\text{)}$

$q = \text{ประจุเฉลี่ยของรีดอกซ์พีค (}2.92e^{-2}\text{C)}$

$A = \text{Electrochemical surface area (0.07 cm}^2\text{)}$ ซึ่งค่า

นี้ได้จากเทคนิค UV-visible spectroscopy

นอกจากนี้ยังหาค่าเปอร์เซ็นต์ FAD ของ MWNTs/(PAA/GOx)₁ ได้ 31.78 % ดัง

แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ FAD ของแต่ละชั้นฟิล์ม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสมบัติเชิงจลศาสตร์ และ %FAD บน MWNTs/(PAA/GOx)_n

No. of layers	Number of layer	K	Γ_{cv} (mol/cm ²)	Γ_{uv} (mol/cm ²)	%FAD* on MWNTs
1st	0.567	5.276	1.17e-9	3.68e-9	31.784
2nd	0.94	4.087	2.28e-10	1.41e-8	1.611
3rd	0.715	5.616	3.10e-10	2.83e-8	1.095
4th	0.431	2.809	2.14e-10	3.89e-8	0.550
5th	0.794	7.25	7.52e-11	1.41e-7	0.053

*%FAD = $(\Gamma_{cv}/\Gamma_{uv}) \times 100\%$

บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนผิวของ MWNTs โดยวิธีขั้นต่อขั้น โดยเส้น MWNTs มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15-60 นาโนเมตร ถูกเคลือบด้วยชั้นโพลีเอทิลีนออกไซด์ ชั้นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ทำสลับกันไปจนครบสี่ชั้น โดยจะได้ความหนาของฟิล์มทั้งหมดประมาณ 11.5 นาโนเมตร กลูโคสออกซิเดสที่อยู่บนคาร์บอนนาโนทิวส์สามารถเร่งปฏิกิริยากับกลูโคสได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การป้อนศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้ไฮโดรเจนถูกออกซิไดส์และให้กระแสตอบสนองได้ ซึ่งผลปรากฏว่าจำนวนชั้นที่ 4 ของการตรึงเอนไซม์บน MWNTs ให้ค่ากระแสสูงสุด สมบัติที่บ่งบอกว่าการตรึงเอนไซม์บนคาร์บอนนาโนทิวส์เพิ่มขึ้นตามจำนวนชั้นการตรึงและประสบความสำเร็จ ได้แก่ ค่าแอดคิตีวตี ค่า molar mass ค่าจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ ค่าเหล่านี้ได้เพิ่มขึ้นตามจำนวนเอนไซม์ต่อคาร์บอนนาโนทิวส์หนึ่งเส้น สามารถอธิบายได้ว่าเอนไซม์กลูโคสมีการยึดเกาะอย่างแข็งแรงบนคาร์บอนนาโนทิวส์ และพบว่าให้ความไวในการตอบสนองดีในเชิง bioelectrocatalytic activity สำหรับอิเล็กโทรดที่โมดิไฟด์ด้วย

MWNTs/(PAA/GOx)₄ การคำนวณสมบัติเชิงจลนศาสตร์ ทำให้เข้าใจพฤติกรรม

พื้นฐานของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของเอมไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงบน MWNTs

ในแต่ละชั้นฟิล์ม

เอกสารอ้างอิง

1. M.H. Xue, Q. Xu, M. Zhou, J.J. Zhu, *Electrochem. Commun.*, 8 (2006) 1468.
2. J.R. Retama, B.L. Ruizb, E.L. Cabarcos, *Biomaterials*, 24 (2003) 2965.
3. J. Wang, X.J. Zhang, P. Madhu, *Anal. Chim. Acta.*, 395 (1999) 11.
4. S.X. Zhang, N. Wang, Y.M. Niu, C.Q. Sun, *Sensor Actuat. B*, 109 (2005) 367.
5. H.B. Shi, Y. Yang, J.D. Huang, Z.X. Zhao, X.H. Xu, J.I. Anzai, T. Osa, Q. Chen, *Talanta*, 70 (2006) 852.
6. C. Qiang, K. Yuka, T. Hiroki, H. Tomonori, A. Jun-ichi, *Electroanalysis*, 10 (1998) 94.
7. G. Liu, Y. Lin, *Electrochem. Commun.*, 8 (2006) 251.
8. C. Phanthong, M. Somasundrum, *J. Electroanal. Chem.*, 558 (2003), 1.
9. E.Laviron, *J.Electroanal. Chem.*101 (1979) 19
10. X. Luo, A.J. Killard, M.R. Smyth, *Electroanalysis* 18 (2006) 1131.
11. H.Z. Zhao, J.J. Sun, J. Song, Q.Z. Yang, *Carbon* 48 (2010)1508.

12. C.X. Cai, J. Chen, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 75.
13. C. Dang, J.H. Chen, X.L. Chen, C.H. Xiao, L.H. Nie, S.Z. Yao, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1272.
14. Y.D. Zhao, W.D. Zhang, H. Chen, Q. M.Luo, *Anal.Sci.* 18 (2002) 939.
15. A. Guiseppi-Elie, C. Lei, R.H. Baughman, *Nanotechnology* 13 (2002) 559.
16. Y. Zhou, H. Yang, H.Y. Chen, *Talanta* 76 (2008) 419.
17. D. Wen, Y.Lin, G.C. Yang, S.J. Dong, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 5312.
18. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*, 2rd ed. John Wiley & Sons, New York, 2001.

ผลงานเผยแพร่จากโครงการ

Porntip K, 2010, "Electrochemistry of Multiple Enzyme Layers on Carbon nanotubes" Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2010), 21st -23rd January 2010, Ubon Ratchathani, Thailand.