



## บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์  
ในตัวอย่างผลไม้และเครื่องดื่ม

Development of new amperometric method for determination of  
sulfite in fruit and beverage

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2556-2557 จำนวนเงิน 665,200 บาท  
ระยะเวลาการดำเนินงาน 2 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2557  
รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

1) ผศ. ดร. มะลิวรรณ อมตรงไชย 2) ผศ. ดร. เสนอ ชัยรัมย์ 3) น.ส. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์

ในงานวิจัยนี้จะพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูงจำนวน 2 ขั้วไฟฟ้า โดย i) การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลิอะนิลีน (ANi) ในเมทริกซ์ของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (MWCNT) และอิเล็กโทรเดโพสิทฟิล์มของอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน และ ii) ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยนาโนคอมโพสิตของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์-โพลี(อัลลิลไดเมธิลแอมโมเนียม คลอไรด์)-อนุภาคทองคำนาโน หรือ (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) และพัฒนาขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยการตรึงเอนไซม์การตรึงเอนไซม์ฮอร์ซแรดิซเปอร์ออกซิเดส (HRP) ลงบนโพลิเมอร์ชนิด poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) หรือ p(Ani-co-o-Aba) แล้วเคลือบผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยไคโตซาน (CS) ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้เป็นเซนเซอร์และไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แบบแอมเพอร์โรเมทรีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## บทคัดย่อ

ซัลไฟต์ถูกนำมาเติมลงในอาหารและเครื่องดื่มเพื่อใช้เป็นสารกันบูดและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารชนิดนี้มีผลกระทบต่อสุขภาพและอาจมีผลให้เกิดอาการแพ้หากมีปริมาณเจือปนในอาหารมาก ปริมาณซัลไฟต์ที่จึงมีความสำคัญและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จำเป็นต้องมีการระบุปริมาณซัลไฟต์ตามกฎหมาย ในงานวิจัยนี้จะพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูงจำนวน 2 ขั้วไฟฟ้าโดย i) การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลิอะนิลีน (ANi) ในเมทริกซ์ของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (MWCNT) และอิเล็กโทรเดโพสิทฟิล์มของอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน และ ii) ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยนาโนคอมโพสิตของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์-โพลี(อัลลิลไดเมทิลแอมโมเนียม คลอไรด์)-อนุภาคทองคำนาโน หรือ (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) และพัฒนาขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยการตรึงเอนไซม์การตรึงเอนไซม์ฮอร์เรดิซเปอร์ออกซิเดส (HRP) ลงบนโพลิเมอร์ชนิด poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) หรือ p(Ani-co-o-Aba) แล้วเคลือบผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยไคโตซาน (CS)

ซัลไฟต์เซนเซอร์พัฒนาโดยการทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์โพลิอะนิลีน (ANi) ในเมทริกซ์ของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (MWCNT) และการทำอิเล็กโทรเดโพสิทฟิล์มอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน ผลการทดลองพบว่ามัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (MWCNT-COOH) เป็นเมทริกซ์ที่เหมาะสมสำหรับการทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์โพลิอะนิลีนและขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC เมื่อนำซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เป็นตัวตรวจวัดในเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.067 M (pH เท่ากับ 7.0) เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบหนุ่ในการตรวจวัดซัลไฟต์ที่ศักย์ไฟฟ้า +0.6 โวลต์ (เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และมีขั้วแพลตตินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย) ในการศึกษาคุณลักษณะของเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีช่วงการตอบสนองของค่ากระแสแบบเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของซัลไฟต์ ตั้งแต่ 1 ถึง 16 mM ( $r^2 = 0.9964$ ) มีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ที่ 0.0927 mM มีความเที่ยงของสัญญาณสูงโดยให้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.12 (n = 5)

เมื่อนำเทคนิคโพลีอิเล็กชันอะนาไลซิสมาร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วซัลไฟต์เซนเซอร์จะทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์ที่ใหม่ สภาพไวสูง และมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดซัลไฟต์ ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ในตัวอย่างเครื่องดื่ม งานวิจัยในส่วนนี้จะพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์โดยการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนด้วยวัสดุขนาดนาโนลูกผสมของคาร์บอนนาโนทิวป์-โพลิเมอร์นำไฟฟ้า-อนุภาคทองคำนาโนลงบนผิวหน้าของ (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี พบว่าขั้วไฟฟ้า CNTs-PDDA-AuNPs/GC สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยสามารถวัดปริมาณซัลไฟต์ที่ศักย์ไฟฟ้า +0.4 โวลต์ (เทียบกับขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์) มีช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง  $0.1\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$  ( $r^2 = 0.9997$ ) ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เท่ากับ 0.03 ppm มีความเที่ยงของสัญญาณเท่ากับ 1.5% ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ซัลไฟต์ในตัวอย่างน้ำผลไม้ และไวน์ เทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วถึง 23 ตัวอย่าง/ชั่วโมง

การพัฒนาแอมเพอร์โรเมทริกไบโอเซนเซอร์แบบใหม่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการตรึงเอนไซม์ฮอร์ชเรดิซเปอร์ออกซิเดส (HRP) ลงบนโพลีเมอร์ ชนิด poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) หรือ p(Ani-co-o-Aba) แล้วเคลือบผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยโคโตซาน (CS) การตรึงเอนไซม์ HRP บนโครงสร้างของโคพอลิเมอร์และเคลือบชั้นนอกสุดของขั้วไฟฟ้าด้วยชั้นฟิล์มของ CS ทำให้ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี ทำให้การวิเคราะห์มีสภาพไวและมีความจำเพาะเจาะจงสูง ได้ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อการตรวจวัด เช่น อัตราส่วนโมลของโคพอลิเมอร์ p(Ani-co-o-Aba), ปริมาณของเอนไซม์ HRP และ CS, pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนืดและศักย์ไฟฟ้าที่ขั้วไฟฟ้าใช้งานเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง พบว่าไบโอเซนเซอร์แบบใหม่ที่พัฒนาขึ้นให้การตอบสนองที่เร็วและให้สัญญาณที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มมากขึ้นในช่วงตั้งแต่ 10  $\mu\text{M}$  ถึง 1,000  $\mu\text{M}$  ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ เท่ากับ 1.8  $\mu\text{M}$  (S/N =3) ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่า tolerance ต่อโดปามีน (dopamine: DA) กรดแอสคอบิก (ascorbic acid: AA) กลูโคส (glucose: Glu) และ กรดยูริก (uric acid: UA) เป็นที่น่าพอใจ ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความความเสถียรดีมากถึงสองสัปดาห์

**Key words:** ซัลไฟต์เซนเซอร์, คาร์บอนนาโนทิวป์, พีดีดีเอ, ฮอร์ชเรดิซเปอร์ออกซิเดส, ระบบโพลีอินเจคชัน-อะนาไลซิส, ไวน์

## Abstract

Sulfites are commonly used as preservatives in food and beverages to inhibit microbiological growth. Despite these advantages, sulfite should be applied in strictly limited amounts due to its potential toxicity. The level of sulfite in food has been subjected to legislation since it was discovered that at certain concentration level sulfite causes allergic reactions in some individuals. This work presents development of two sensitive and selective sulfites sensors based on i) electropolymerization of aniline (ANi) in matrix of multiwall carbon nanotube (MWCNT) and electro-deposit of gold nanoparticles (AuNPs) film on the surface of the glassy carbon (GC) electrode and ii) a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes-poly (diallyldimethylammonium chloride)-gold nanoparticles composites (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) and a novel hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase (HRP) on poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) or p(Ani-co-o-Aba) and then covered with chitosan (CS) film.

Electropolymerization of aniline (ANi) in matrix of multiwall carbon nanotube (MWCNT) and electro-deposit of gold nanoparticles (AuNPs) film on the surface of the glassy carbon (GC) electrode was proposed to develop a sulfite sensor. Carboxylic functionalized multiwall carbon nanotube (MWCNT-COOH) was the optimum matrix for polyaniline electropolymerization and the optimum composites for modified the electrode was AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC. The developed amperometric sensor was performed using 0.067 M phosphate buffer pH 7.0 as the supporting electrolyte at the potential of 0.6 V (Ag/AgCl and Pt wire as reference and counter electrodes). The figure of merit of this developed sensor (AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC) was demonstrated. The linear dynamic range of sulfite was found 1 to 16 mM ( $r^2 = 0.996$ ). The detection limit was 0.0927 mM sulfite. The developed method provided high precision signal with RSD of 4.12 (n=5).

A new approach is presented for sensitive and selective measurement of sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) in beverages based on a simple flow injection system with amperometric detection. In this work, the sulfite sensor was a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes-poly(diallyldimethylammonium chloride)-gold nanoparticles composites (CNTs-PDDA-AuNPs/GC). Electrochemical oxidation of sulfite with this electrode was first studied in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) using cyclic voltammetry. The results indicated that the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode possesses electrocatalytic activity for the oxidation of sulfite with high sensitivity and selectivity. Sulfite was quantified using amperometric measurement with the new sensor at +0.4 V vs Ag/AgCl in conjunction with flow injection. The linear working range for the quantitation of sulfite was 2 to 200  $\text{mg L}^{-1}$  ( $r^2 = 0.998$ ) with detection limit of 0.03  $\text{mg L}^{-1}$  ( $3\sigma$  of blank) and an estimated precision of 1.5%. The proposed method was successfully applied to

the determination of sulfite in fruit juices and wines with a sample throughput of 23 samples h<sup>-1</sup>.

A novel amperometric biosensor for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) determination was proposed by immobilizing horseradish peroxidase (HRP) on poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) or p(Ani-co-o-Aba) and then covered with chitosan (CS) film. The immobilized HRP displayed an excellent electrocatalytic activity to the reduction of hydrogen peroxide. The effects of experimental variables such as the o-Aba mol ratios in p(Ani-co-o-Aba) synthesis, HRP and CS concentrations, pHs of supporting electrolyte solution and applied potentials for the working electrode were investigated for the optimized conditions. This novel biosensor exhibits a fast response toward H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with a linear range from 10 to 1,000 μM and a detection limit of 1.8 μM based on the signal-to-noise ratio (S/N = 3). The developed biosensor shows satisfactory tolerance with other potential interferences such as dopamine (DA), ascorbic acid (AA), glucose (Glu) and uric acid (UA), and also shows a good stability for about 2 weeks.

**Key words:** sulfite sensor, CNTs, PDDA, polyaniline, Horseradish peroxidase, flow injection analysis, wine

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ซัลไฟต์ (sulfite) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) เป็นสารอีกกลุ่มที่มีความสำคัญและมักพบในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหาร ซัลไฟต์ถูกนำมาเติมลงอาหารเป็นสารกันบูด (preservative) เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารชนิดนี้มีผลกระทบต่อสุขภาพและอาจมีผลให้เกิดอาการแพ้ (pseudoallergic) การบริโภคอาหารที่มีสารซัลไฟต์เจือปนในปริมาณมากจะเกิดอาการปวดท้อง อาเจียน ความดันต่ำ และสำหรับผู้ที่แพ้สารซัลไฟต์อย่างรุนแรง หรือผู้ป่วยโรคหอบหืด อาการอาจรุนแรงถึงขั้นหมดสติ และเสียชีวิต [1] หลายประเทศทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในยุโรปและอเมริกาจึงมีกฎหมายควบคุมปริมาณของซัลไฟต์ที่เติมลงไปในการอาหาร เช่น องค์การ United States Food and Drug Administration (FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ออกกฎหมายในปี ค.ศ. 1986 ให้มีการระบุในฉลากสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีปริมาณของซัลไฟต์ เกิน 10 ppm (154  $\mu\text{M}$ ) [2] ในปี ค.ศ. 2002 องค์การ Australian Food Standards Code (AFSC) ของประเทศออสเตรเลียได้กำหนดให้ไวน์ที่มีปริมาณของซัลไฟต์ตั้งแต่ 10 ppm ต้องระบุไว้ในฉลากของผลิตภัณฑ์ [3]

ประเทศไทยมีการนำสารในกลุ่มซัลไฟต์มาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหลายรูปแบบ เช่น การใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) ในการฟอกสี เส้นก๋วยเตี๋ยว ผักผลไม้สด เช่น ถั่วงอก ชিং ฯลฯ และเติมลงในผลิตภัณฑ์แปรรูปเพื่อเป็นสารกันบูด เช่น ผลไม้แห้ง ทูเรียนกวน ชิงตอง ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการนำซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ( $\text{SO}_2$ ) มาใช้ในการรมผลลำไยสดหลังเก็บเกี่ยว ก่อนบรรจุเพื่อการส่งออก เพื่อให้ลำไยมีคุณภาพดี ไม่เน่าเสีย ผิวไม่มีตำหนิ สำหรับมาตรฐานในการผลิตลำไยของไทยอนุญาตให้มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเนื้อลำไยได้ไม่เกิน 10 mg/kg (ppm) [4] ค่ากำหนดปริมาณสูงสุด (ML) ของวัตถุเจือปนอาหารในมาตรฐานวัตถุเจือปนอาหารจากการประชุม (Codex General Standard for Food Additives; GSFA) ตามที่สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) [5] มีดังนี้ “ค่ากำหนดปริมาณสูงสุดของ Sulfite ในกลุ่มอาหาร 04.1.1.2 (surface-treated fresh fruit) ซึ่งที่ประชุมรับรองการกำหนดค่า ML ที่ 30 mg/kg และ (for use at 50 mg/kg in longan and lichee only)” แต่ในปัจจุบันการรมผลลำไยสดด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คือมักพบปัญหาเกี่ยวกับการมีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ตกค้างในผลลำไยสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ทำให้ประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนซึ่งเป็นผู้นำเข้าผลลำไยสดรายใหญ่ที่สุดของประเทศไทย มีความเข้มงวดในการนำเข้าผลลำไยสดจากประเทศไทยมากขึ้น [4]

นอกจากนี้ยังมีการการใช้สารซัลเฟอร์ไดออกไซด์หรือโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ในการผลิตไวน์ โดยในขั้นตอนการเตรียมน้ำผลไม้จะมีการเติมสารดังกล่าวเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการก่อนนำน้ำผลไม้ไปหมัก เมื่อการหมักเสร็จสิ้นแล้วในกระบวนการบรรจุขวดจะมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลงไปไวน์อีกครั้งเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการหมัก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในไวน์เกือบตลอดขั้นตอนการผลิต ปริมาณสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อนุญาตให้มีในผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตรแตกต่างกันไป เช่น ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของไทยเรื่องไวน์ (มอก. 2089-2544) กำหนดให้ไวน์ที่ผลิตในประเทศ และไวน์นำเข้าใช้สารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ได้ไม่เกิน 300 mg/dm<sup>3</sup> [6] ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543 กำหนดให้มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทได้ไม่เกิน 70 mg/kg

ส่วนปริมาณที่ได้รับต่อวัน (Acceptable Daily Intake; ADI) ที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้กำหนดค่าความปลอดภัยไว้คือไม่เกิน 0.7 mg/คน/วัน [7] ดังนั้นการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ที่มีความสะดวก รวดเร็วขึ้นมาใช้ในการประเมินหาปริมาณของสารซัลไฟต์ในตัวอย่างผลไม้สด น้ำผลไม้ และ ไวน์ เพื่อใช้เป็นเทคนิคในการตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่า ความเชื่อมั่นและการยอมรับในระดับสากลจากประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านสินค้าเกษตรและอาหาร จึงมีความจำเป็นและน่าสนใจในการทำวิจัยเป็นอย่างมาก การวิจัยและพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ขึ้นมาใช้เป็นเทคนิคเกี่ยวกับการพัฒนาคุณภาพและมาตรฐานสินค้าและผลิตภัณฑ์ ความปลอดภัยของอาหาร (food safety) และความมั่นคงด้านอาหาร (food security) จะทำให้สินค้าของไทยเป็นที่เชื่อถือเพื่อก่อให้เกิดการขยายตัวของส่งออกได้มากยิ่งขึ้น

การวิจัยเพื่อพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างให้มีความยุ่งยาก ซับซ้อนน้อยลง ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และลดการใช้สารเคมีปริมาณมาก ลดความจำเป็นในการใช้เครื่องมือขั้นสูงในการวิเคราะห์และแปรผล พัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ภาคสนาม และรู้ผลเร็วได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ โดยการพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ชนิดใหม่ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูง โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

### 1) การพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์ และขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์

1.1 ดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนเพื่อหาค่าประกอบของวัสดุเชิงประกอบระดับนาโน (nano composites) ที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ สัญญาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1.2 ศึกษาถึงผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อสภาพไวของขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เช่น องค์ประกอบที่เหมาะสมของวัสดุเชิงประกอบ วิธีในการดัดแปรวัสดุเชิงประกอบลงบนขั้วไฟฟ้าและ pH ของสารละลาย

1.3 ออกแบบและพัฒนาระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์

1.4 ประเมินคุณลักษณะของเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ที่พัฒนาขึ้น เช่น ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง (linearity range), ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (limit of detection), ผลของตัวรบกวน (interference study) และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่าง ในตัวอย่างผัก-ผลไม้ สด และแปรรูป

### 2) การพัฒนาซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์

2.1 ศึกษาและพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อหาค่าประกอบของวัสดุเชิงประกอบระดับนาโน (nano composites) ที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ออกซิเดสลงบนขั้วไฟฟ้า เพื่อใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์

2.2 ศึกษาถึงผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อสภาพไวของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ เช่น pH ของสารละลาย, เทคนิคในการตรึง (immobilize) เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสลงบน nano composites, ปริมาณของ CNT ที่ใช้ในการโม่ติฟายด์, ปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยา โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น และมีความจำเพาะเจาะจง สามารถนำไปใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดซัลไฟต์แบบแอมเพอร์โรเมทรีได้

2.3 ออกแบบและพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดซัลไฟต์ เพื่อให้เป็นวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติอย่างรวดเร็วในการประเมินหาปริมาณซัลไฟต์ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะเป็นเทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติในระบบที่มีการไหลที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ ซึ่งมีการตอบสนองที่รวดเร็ว (high response) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity)

2.4 ประเมินคุณลักษณะของเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ที่พัฒนาขึ้น เช่น ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง, ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์, ผลของตัวรบกวน และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่าง ในตัวอย่างผัก-ผลไม้ สดและแปรรูปที่มีจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อใช้เป็นเทคนิคในการตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่า ความเชื่อมั่น และการยอมรับในระดับสากลจากประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านสินค้าเกษตรและอาหาร

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ซัลไฟต์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ ที่มีสภาพไวในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ ซึ่งเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนั้นนอกจากจะสามารถนำมาวัดปริมาณซัลไฟต์ได้แล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้อีกมากมายเนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสาร Reactive Oxygen Species (ROS) ที่พบในสิ่งแวดล้อมและ สิ่งมีชีวิต เช่น ใช้เป็นสารซักฟอก (bleaching agent) ในโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ และยัง เป็นสารอินทรีย์มีเตียต ที่เกิดจากปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ฯลฯ ดังนั้นสามารถนำเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปประยุกต์ใช้ในการวัดปริมาณสารต่าง ๆ มากมาย ทั้งในทางอุตสาหกรรม, สิ่งแวดล้อม และทางการแพทย์ เช่น เป็น ออกซิแดนซ์เซนเซอร์ หรือ กลูโคสเซนเซอร์ ได้ด้วย

2) ได้ระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลโดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นด้วยวัสดุเชิงประกอบระดับนาโน ระหว่างคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube; CNT) โกลด์นาโนพาร์ทิเคิล (Gold nanoparticles; AuNPS) และโพลิเมอร์นำไฟฟ้า (conducting polymer)

3) ได้ไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่มีสภาพไว และความจำเพาะเจาะจงสูง ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ ที่พัฒนาขึ้นจากการ immobilize เอนไซม์ลงบน nano composites ให้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของซัลไฟต์ ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมขึ้นมานี้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง

4) ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพไบโอเซนเซอร์ เพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหาร ผัก-ผลไม้ สดและแปรรูป ที่จำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น เช่น ถั่วถั่วลิสง ถั่วลิสง ถั่วลิสง ถั่วลิสง และไวน์ ฯลฯ เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับผู้สนใจที่ต้องการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไปพัฒนาไบโอเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพ และ/หรือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อขนาดให้ระบบวิเคราะห์มีขนาดเล็กลงได้ (miniaturize) และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคในการตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์ เพื่อก่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่า ความเชื่อมั่น และการยอมรับในระดับสากลจากประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านสินค้าเกษตรและอาหารของไทย

5) ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นจะถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ หรือนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

6) ฐานข้อมูลสำหรับเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ ปริมาณซัลไฟต์ที่มีในผลิตภัณฑ์อาหารเช่น ผัก-ผลไม้ สดและแปรรูปที่มีจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย หน่วยงานที่คาดว่าจะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ คณะวิทยาศาสตร์ และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP)

7) เพิ่มขีดความสามารถและความเข้มแข็งของทีมนักวิจัยไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทีมนักวิจัยในระดับภูมิภาคให้ทัดเทียมกับระดับนานาชาติ

#### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณซัลไฟต์ เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างเครื่องดื่ม เช่น น้ำผัก-น้ำผลไม้ และ ไวน์ เพื่อใช้เป็นเทคนิคในการตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้า โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรกจะศึกษาและพัฒนาเคมีคัลเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ ควบคู่กับการพัฒนาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์เพื่อตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหล โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นด้วยวัสดุเชิงประกอบระดับนาโนระหว่างคาร์บอนนาโนทิวบ์ โกลด์นาโนพาร์ทิเคิล และโพลีเมอร์นำไฟฟ้า คาดว่าการใช้วัสดุเชิงประกอบระดับนาโนมาดัดแปรขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน จะทำให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่มีสภาพไวสูง มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากในการวัดจะใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำ วิธีวิเคราะห์ซัลไฟต์โดยใช้เอนไซม์รีแอกเตอร์ควบคู่กับขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นนี้จะมีข้อดี คือไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบของสารตัวอย่างเนื่องจากเอนไซม์รีแอกเตอร์มีจำเพาะเจาะจงต่อซัลไฟต์สูง สามารถนำไปใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์แบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยในส่วนที่สอง จะพัฒนาไปโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ โดยไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจะเป็นวัสดุเชิงประกอบระดับนาโน ระหว่างคาร์บอนนาโนทิวบ์, อนุภาคทอง และเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์, ความคงตัวของเอนไซม์ และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีสภาพไวสูง มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น และมีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถนำไปใช้เป็นไปโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดซัลไฟต์แบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลทั้งสองแบบที่พัฒนาขึ้นจะถูกนำมาประเมินคุณลักษณะของเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ ในตัวอย่างผัก-ผลไม้ สดและแปรรูปที่มีจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ถั่วถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วเขียว ฯลฯ เพื่อใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคในการตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์ เพื่อก่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่า ความเชื่อมั่น และการยอมรับในระดับสากลจากประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านสินค้าเกษตรและอาหารของไทย

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรม

การวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์มีความสำคัญมากทั้งในด้านสิ่งแวดล้อม, อุตสาหกรรมอาหาร และผลิตภัณฑ์จากการเกษตร เนื่องจากซัลไฟด์เป็นสารอีกกลุ่มที่มักพบในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวัตถุประสงค์ของการเติมลงในอาหารทั้งในรูปอาหารสดและแปรรูปคือเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เพื่อให้มีสีและสภาพที่เป็นที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารชนิดนี้มีผลกระทบต่อสุขภาพและอาจมีผลให้เกิดอาการแพ้ การบริโภคอาหารที่มีสารซัลไฟด์เจือปนในปริมาณมากจะเกิดอาการปวดท้อง อาเจียน ความดันต่ำ และสำหรับผู้ที่มีสารซัลไฟด์อย่างรุนแรง หรือผู้ป่วยโรคหอบหืด อาการอาจรุนแรงถึงขั้นหมดสติ และเสียชีวิต หลายประเทศทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในยุโรปและอเมริกาจึงมีกฎหมายควบคุมปริมาณของซัลไฟด์ที่เติมลงไปในการอาหาร เช่น องค์การ United States Food and Drug Administration (FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ออกกฎหมายในปี ค.ศ. 1986 กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีปริมาณของซัลไฟด์เกิน 10 mg/kg และเครื่องดื่มที่มีปริมาณของซัลไฟด์เกิน 10 mg/L ต้องมีการระบุไว้ในฉลาก [2] การวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารจึงมีความสำคัญและมีผู้สนใจวิจัยเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ปริมาณซัลไฟด์ (sulfide) ในอากาศและการเกิดปรากฏการณ์ “ฝนกรด (acid rain)” ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญเช่นกัน

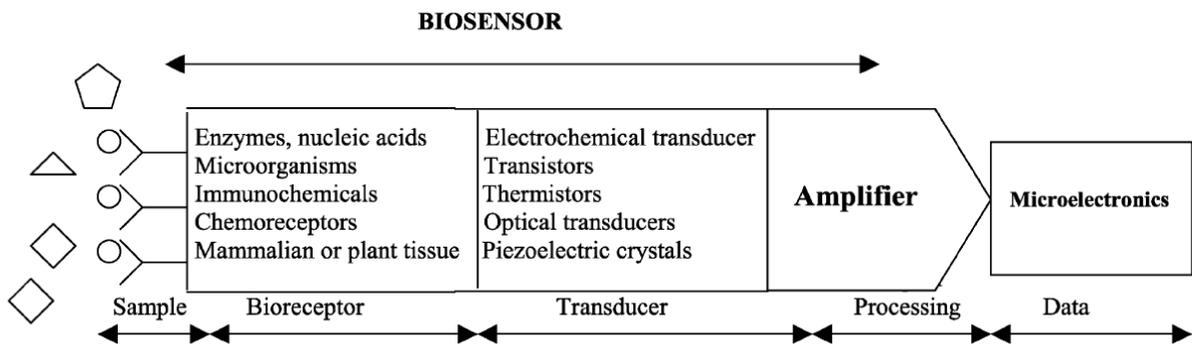
การวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์ในอาหารด้วยวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ มีข้อจำกัดคือใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สภาพไวในการวิเคราะห์ซัลไฟด์ต่ำ และไม่เหมาะที่จะใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ในกรณีที่เป็นงานประจำและมีปริมาณตัวอย่างเยอะ ดังนั้นจึงมีผู้วิจัยจำนวนมากสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดซัลไฟด์ที่มีสภาพไว และมีความเฉพาะเจาะจงสูง

#### 2.1 ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor)

ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของสารใดๆ โดยใช้สัญญาณที่ได้จากการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า คุณลักษณะเด่นของไบโอสเซนเซอร์คือ มีความเฉพาะเจาะจง (selectivity) และความไว (sensitivity) สูงเมื่อเทียบกับเทคนิคการตรวจวัดชนิดอื่น ๆ เช่น ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (UV-Vis spectrophotometry) ไบโอสเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน [8-10] คือ

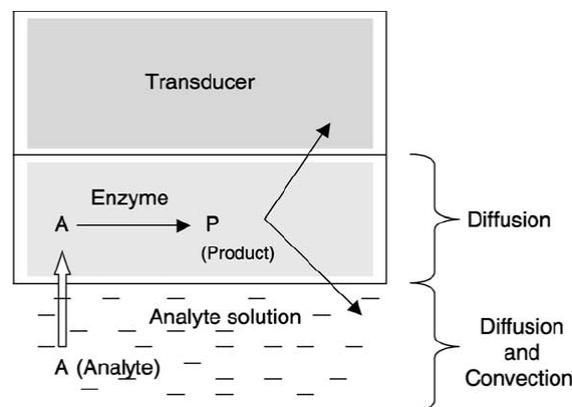
1) ส่วนของสารทางชีวภาพ (biomaterials) ที่ทำหน้าที่จดจำ (recognition) หรือเลือกเฉพาะ (selection) สารตัวอย่างที่จะทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอย่างจำเพาะ ส่วนที่ 1 นี้จะถูกตรึง (immobilization) อยู่บนผิวหน้าของส่วนที่ 2

2) ทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งทรานสดิวเซอร์นี้จะทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณดังกล่าวไปยังส่วนประมวลผล (processor) เพื่อวัดหรือแสดงสัญญาณให้เราได้ทราบ (signal elaboration) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการวัดสัญญาณและแปรค่าออกมาเป็นหน่วยต่างๆ ที่ต้องการ ไดอะแกรมส่วนประกอบของไบโอสเซนเซอร์แสดงได้ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ไดอะแกรมของไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบไปด้วย (1) ส่วนของรีเซพเตอร์ที่เป็นสารชีวโมเลกุล (Bioreceptor) และ (2) ทรานสดิวเซอร์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล [8]

กระบวนการเกิดกระแสทางไฟฟ้าเคมีนั้นสามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 1.2 เริ่มจากสารที่สนใจ (analyte; A) เคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าไปที่ชั้นของเอนไซม์ (enzyme layer) ผ่านกระบวนการแพร่ เกิดปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ (enzymatic reaction) กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Product; P) ซึ่งตรวจวัดได้ที่ทรานสดิวเซอร์ ปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องมือวัดทางไฟฟ้าเคมีหรือเรียกว่าเครื่องโพเทนชิโอสแตท (potentiostat) และสามารถนำไปแปรผลได้ต่อไป



รูปที่ 2.2 ไดอะแกรมของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ซึ่งเกิดจากสารที่สนใจ (analyte; A) เคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าผ่านกระบวนการแพร่ไปที่ชั้นของเอนไซม์ (enzyme layer) เกิดปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ (enzymatic reaction) กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Product; P) ซึ่งตรวจวัดได้ที่ทรานสดิวเซอร์ [8]

## 2.2 การวัดปริมาณซัลไฟต์ (Sulfite measurement)

วิธีมาตรฐานในการวัดปริมาณซัลไฟต์ตาม The Association of Analytical Chemists (AOAC) พัฒนาจากวิธีการของ Monier และ Williams [11] ซึ่งเป็นวิธีการใช้การกลั่นและการไทเทรต โดยเริ่มจากนำสารตัวอย่างมารีฟลักซ์ใน 0.5 M HCl ภายใต้การใช้แก๊สไนโตรเจนพ่น เพื่อเปลี่ยนซัลไฟต์ให้อยู่ในรูปซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ดังสมการที่ 2.1 ไนโตรเจนจะเป็น carrier gas พาแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นออกมาเก็บในขวดที่บรรจุ

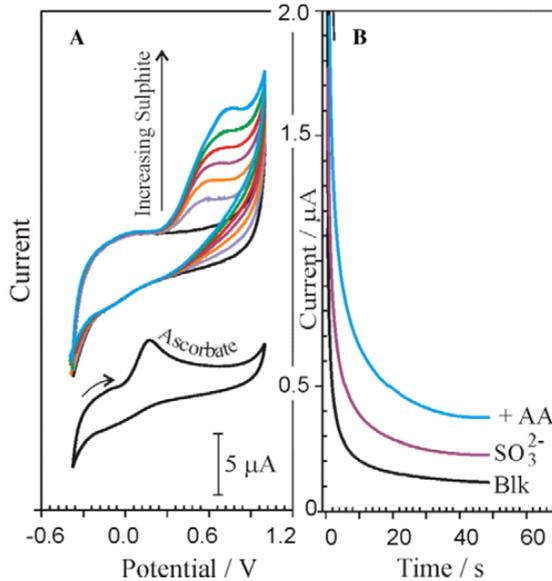


สารละลาย 3% peroxide แก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นซัลเฟตและเกิดกรด ดังสมการที่ 2.2

ดังนั้นปริมาณของซัลไฟต์ในสารตัวอย่างจึงสามารถวิเคราะห์ได้โดยการไทเทรตหาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น วิธีมาตรฐานของ AOAC นี้มีข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่ง่าย ใช้สารเคมีที่หาง่าย และราคาในการวิเคราะห์ไม่สูงนัก แต่มีข้อเสียคือ ขั้นตอนการรีฟลักซ์ใช้เวลานาน ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณของซัลไฟต์ต่ำ ๆ ได้ และไม่เหมาะที่จะใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ในกรณีที่เป็นงานประจำและมีปริมาณตัวอย่างเยอะ ดังนั้นจึงมีผู้วิจัยจำนวนมากสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์

### 2.3 การวัดด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรี/แอมเพอร์โรเมทรี (direct voltammetric/ amperometric measurement)

การตรวจวัดปริมาณของซัลไฟต์โดยอาศัยการวัดปริมาณจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์นอกจากจะใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC แล้ว ยังสามารถวัดได้ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีโดยตรง โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดของแข็ง เช่น Pt [12] , Au [13] , คาร์บอน [14, 15] และ metal oxide [16] ตัวอย่างไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 (A) ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของซัลไฟต์และ แอสคอร์เบทที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 อัตราเร็วในการสแกน 50mV/s และ (B) อิทธิพลของแอสคอร์เบทที่มีต่อสัญญาณของซัลไฟต์เมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี [14]

ซัลไฟต์สามารถเกิดสัญญาณที่ขั้วไฟฟ้าของแข็งเหล่านี้ได้ และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ที่อยู่ในระดับไมโครโมลาร์ แต่การใช้ขั้วไฟฟ้าของแข็งเหล่านี้ในการวิเคราะห์ซัลไฟต์มักพบปัญหาการ fouling ของขั้วไฟฟ้า ทำให้

สูญเสียสภาพไว (sensitivity) และความเที่ยง (reproducibility) ในการวิเคราะห์ นอกจากนี้การวัดการเกิดออกซิเดชันของซัลไฟต์โดยตรงมักใช้ศักย์ไฟฟ้าสูง ทำให้เกิดปัญหาเรื่องการรบกวนจากสารอื่นที่สามารถเกิดออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้าง่ายกว่า การนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจึงมีข้อจำกัด เช่น การนำไปใช้กับตัวอย่างไวน์ซึ่งมีเมทริกซ์ค่อนข้างซับซ้อน มักพบปัญหาของความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ที่ต่ำ เนื่องจากเกิดการรบกวนจากสารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง เช่น แอสคอร์เบท หรือ โพลีฟีนอล

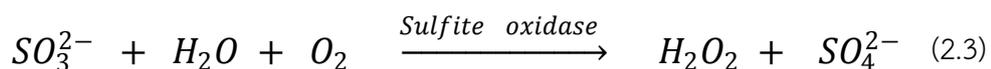
## 2.4 การพัฒนาไบโอรีแอคเตอร์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรี/แอมเพอร์โรเมทรี ให้มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) มากขึ้น นิยมทำโดยการนำเอนไซม์ เช่น ซัลไฟต์ออกซิเดส หรือ ซัลไฟต์ดีไฮโดรจิเนสมาใช้ควบคู่กับการวัดด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรี/แอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าของแข็ง โดยการนำเอนไซม์มาตรึง (immobilize) ลงบนวัสดุต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นเอนไซม์รีแอคเตอร์ (enzymatic reactor) หรือนำมาตรึงลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเพื่อนำมาตัดแปรขั้วไฟฟ้าให้เป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ซัลไฟต์ การตรึงเอนไซม์สามารถทำได้โดยการผสมส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำไปตรึงด้วยเทคนิคที่เฉพาะ เช่น

- 1) การตรึงโดยการยึดเกาะ (adsorption)
- 2) การตรึงโดยวิธีทำให้เกิดพันธะทางเคมี (chemical bonding)
- 3) การตรึงโดยวิธีโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerization)
- 4) การตรึงโดยวิธีเคลือบ (entrapment)

ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดี-ข้อเสียที่แตกต่างกัน การตรึงเอนไซม์ส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคการตรึงแบบการยึดเกาะ เพราะจะทำให้เอนไซม์ยังคงมีสภาพการทำงานที่ดี สามารถเติมองค์ประกอบต่างๆ ที่สำคัญได้ง่าย ทำการตรึงได้รวดเร็ว และสามารถทำได้ในปริมาณมาก

ในงานวิจัยนี้ ส่วนแรกจะศึกษาและพัฒนาเคมีคัลเซนเซอร์ (chemical sensor) ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ โดยจะอาศัยเอนไซม์รีแอคเตอร์ (enzymatic reactor) ทำให้ซัลไฟต์ ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ถูกออกซิไดส์ไปเป็นซัลเฟต ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) และเกิดสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ขึ้นดังสมการที่ 2.3 [17]



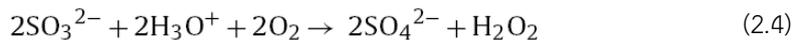
ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น โดยจะศึกษาและพัฒนาวิธีในการตรึงเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสลงบนวัสดุของแข็งเช่น เม็ด beads หรือ resin และนำไปบรรจุใน cartridge เพื่อนำมาใช้เป็นเอนไซม์รีแอคเตอร์ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงและสามารถเปลี่ยนซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟต และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างมีประสิทธิภาพ ควบคู่กับการพัฒนาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์เพื่อตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหล โดยขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นจะใช้วัสดุเชิงประกอบระดับนาโน ระหว่างคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube; CNT) โกลด์นาโนพาร์ทิเคิล (Gold nanoparticles; AuNPS) และโพลีเมอร์นำไฟฟ้า โดยคาดว่าวิธีวิเคราะห์ซัลไฟต์โดยใช้เอนไซม์รีแอคเตอร์ควบคู่กับขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นนี้จะมีข้อดี คือไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบของสารตัวอย่างเนื่องจากเอนไซม์รีแอคเตอร์มีจำเพาะเจาะจงต่อซัลไฟต์สูง และการใช้วัสดุเชิงประกอบระดับนาโนมาตัดแปรขั้วไฟฟ้าจะทำให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่มีสภาพไวสูง (high sensitivity) มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็วขึ้น (rapid response) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) เนื่องจากในการวัด

จะใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำ สามารถนำไปใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์แบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

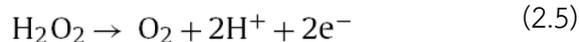
## 2.5 การพัฒนาซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์โดยใช้ไบโอเซนเซอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) มากขึ้น โดยการใช้เอนไซม์ดัดแปรขั้วไฟฟ้า (enzyme-modified electrode) ทำได้โดยการตรึงเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสลงบนพื้นผิวของวัสดุเชิงประกอบระดับนาโน ของคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube; CNT) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีลักษณะที่เด่นเป็นพิเศษคือ มีพื้นที่ผิวมาก, สามารถบรรจุอะตอม หรือโมเลกุลชนิดอื่นไว้ภายในท่อได้และมีสภาพนำไฟฟ้าที่สูง [18] และโกลด์นาโนพาร์ทิเคิล (gold nanoparticle; AuNPs) ซึ่งมีสภาพนำไฟฟ้าสูง (high conductivity) และมีความสามารถในการ catalyze ปฏิกิริยาได้ดี จึงคาดว่า biocatalyst ที่เตรียมขึ้นได้จะมีสมบัติที่พิเศษคือมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) สูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ biocatalyst ที่เป็นการต้องการอย่างยิ่งในไบโอเซนเซอร์ เพื่อนำมาดัดแปรขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนให้เป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ซัลไฟต์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นควบคุมกระบวนการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหล

กลไกในการวัดปริมาณซัลไฟต์ที่ขั้วไบโอเซนเซอร์ เริ่มจากเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของซัลไฟต์ ทำให้เกิดเป็น ซัลเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังสมการที่ 2.4 [19]



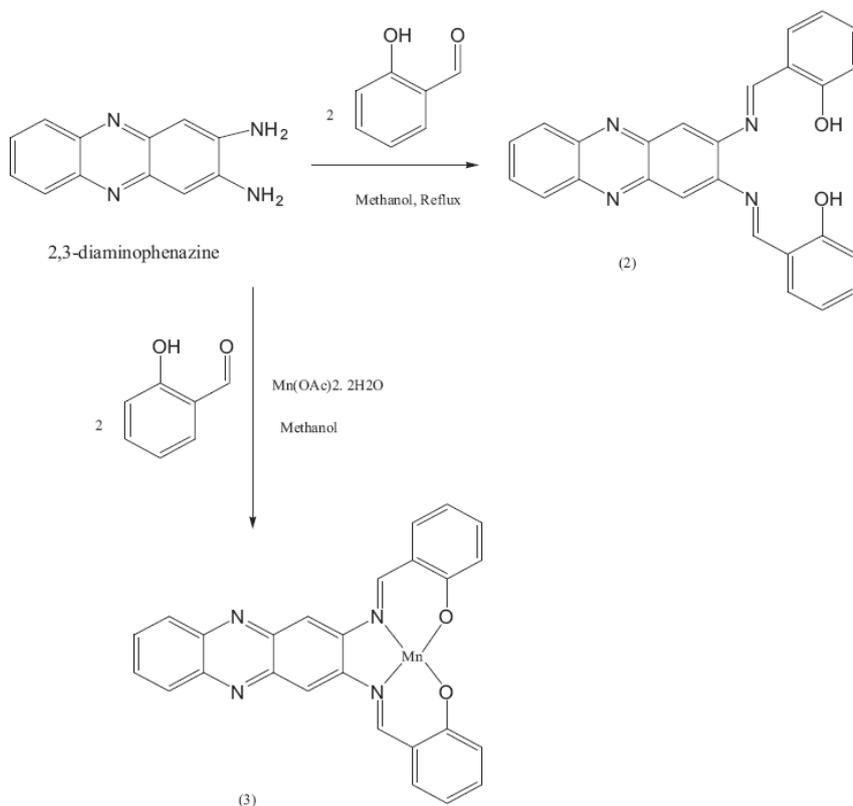
การตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยการตรวจวัดกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดัง สมการที่ 2.5



โดยคาดว่าวิธีวิเคราะห์ซัลไฟต์โดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้จะมีข้อดี คือไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบของสารตัวอย่างเนื่องจาก เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสมีจำเพาะเจาะจงต่อซัลไฟต์สูง และการใช้วัสดุเชิงประกอบระดับนาโนมาดัดแปรขั้วไฟฟ้าจะทำให้ได้ขั้วไฟฟ้าที่มีสภาพไวสูง มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถนำไปใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์แบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 2.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ (Hydrogen peroxide sensor)

Salimi และคณะ [20] เสนอวิธีการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนโดยใช้วัสดุเชิงประกอบของ single walled carbon nanotubes (SWCNTs) และ สารประกอบของ Mn (2-((4-((2-hydroxybenzylidene)amino)phenazine-1-yl)methylene)amino phenalto) หรือ สารประกอบเชิงซ้อน Mn-phenazine ซึ่งสังเคราะห์ได้โดยใช้กระบวนการดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการในการสังเคราะห์ Mn-phenazine complex [20]

เมื่อนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วย SWCNTs และสารประกอบเชิงซ้อน Mn-phenazine หรือ GC/SWCNTs/Mn-complex มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เริ่มเกิดรีดักชันที่ศักย์ไฟฟ้า -0.2 V และสังเกตเห็น catalytic reduction peak ที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.35 V เมื่อนำขั้วไฟฟ้างกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีพบว่า ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง (linearity range) ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อยู่ในช่วง 1.0  $\mu$ M- 1.5 mM และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (limit of detection) มีค่าเท่ากับ 0.2  $\mu$ M

ในปี ค.ศ. 2011 You และคณะ [21] ดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนโดยใช้โดยใช้วัสดุเชิงประกอบของ multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) และ Pd nanoparticles หลังจากนั้นใช้ Nafion เคลือบทับ การเตรียม MWCNT-Pd nanoparticles เตรียมจากการนำ MWCNT มาออกซิไดส์โดยใช้กรดผสม ระหว่าง  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$  (อัตราส่วน 1:3) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อกำจัดสารเจือปนและทำให้พื้นผิวของ MWCNT เป็นกรด จากนั้นนำ MWCNT ไปเตรียมเป็นสารละลายใน THF จากนั้นเติม NaSH ลงในสารละลายเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา thiolation สาร MWCNT ที่ได้จากการเตรียมในขั้นตอนนี้เรียก thiolated MWCNT นำไป disperse ในน้ำกลั่น (223.8 mg/100 mL) จากนั้นเตรียม Pd colloid โดยซิง sodium tetrachloropalladate (II) น้ำหนัก 249.83 mg ละลายในน้ำปริมาตร 30 mL จากนั้นเติม 4-dimethylaminopyridine 10 mL เติมสารละลาย thiolated MWCNT (223.8 mg/ 100 mL) ลงไป จากนั้นค่อย ๆ หยดสารละลาย  $\text{NaBH}_4$  ลงไป และกวนสารละลายประมาณ 30 นาที จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นดำ นำสารละลายที่ได้ไปกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้งใน vacuum oven จะได้ MWCNT-Pd nanoparticles. นำสารละลาย MWCNT-Pd nanoparticles ปริมาตร 5.0  $\mu$ L หยดบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้ากลาสซี

คาร์บอน ที่ให้พื้นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดสารละลาย 1% Nafion ปริมาตร 5.0  $\mu\text{L}$  จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-Pd/Nafion ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดรีดักชันที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.28 V เมื่อนำขั้วไฟฟ้างดกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีพบว่า ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง (linearity range) ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อยู่ในช่วง 1.0  $\mu\text{M}$ - 10 mM และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (limit of detection) มีค่าเท่ากับ 0.3  $\mu\text{M}$  (S/N=3)

ในปี ค.ศ. 2007 Qiu และคณะ [22] รายงานวิธีวิธีการดัดแปรขั้วไฟฟ้าโดยใช้กระจกชนิด tin-doped indium oxide หรือ (ITO) ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบของโกลด์นาโนพาร์ทิเคิล (AuNPs) ที่ดัดแปรด้วย Prussian blue (PB @Au nanoparticle) จากโกลด์นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมโดยการเตรียมสารละลาย A โดยใช้ 2% hydrogen tetrachloroaurate ปริมาตร 1 mL มาเจือจางให้มีปริมาตร 80 mL เตรียมสารละลาย B โดยผสม 1% trisodium citrate ปริมาตร 8 mL กับ 1% tannic acid ปริมาตร 0.2 mL จากนั้นนำมาเจือจางให้มีปริมาตร 20 mL นำสารละลาย A มาให้ความร้อนมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60  $^{\circ}\text{C}$  จากนั้นเติมสารละลาย B และกวนให้เข้ากันเป็นเวลา 35 นาที จะได้สารละลายโกลด์นาโนพาร์ทิเคิล นำสารละลายผสมของ 1.0 mM  $\text{FeCl}_3$ , 1.0 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0.1 M KCl และ 0.025 M HCl ปริมาตร 10 mL เติมนลงในสารละลายโกลด์นาโนพาร์ทิเคิลมาปริมาตร 10 mL กวนสารละลายเป็นเวลา 30 นาทีจะได้สารละลาย PB @Au nanoparticle นำสารละลาย colloid ที่เตรียมได้ไป centrifuge และล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง นำ particle ที่ได้มา disperse ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL จากนั้นเตรียมขั้วไฟฟ้า ITO ด้วยเทคนิค layer-by-layer self assembly จะได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์

Ping และคณะ [23] ดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนโดยใช้ขั้วไฟฟ้าวัสดุเชิงประกอบของ Prussian blue (PB) และ poly(o-phenylenediamine) (POPD) มาใช้ในการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การดัดแปรขั้วไฟฟ้าเริ่มจากการ deposit फिल्मของ Prussian blue (PB film) ด้วยกระบวนการ electro-deposit โดยนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนมาจุ่มในสารละลายผสมของ 2.5 mM  $\text{FeCl}_3$ , 2.5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0.1 M KCl และ 0.1 M HCl ให้ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V (เทียบกับ Ag/Ag/Cl) ที่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าไปจุ่มในสารละลาย 0.1 M KCl และ 0.1 M HCl และให้ศักย์ไฟฟ้าค่าระหว่าง 0.35 ถึง -0.05 V โดยใช้อัตราเร็วในการสแกน 0.05 V/s จำนวน 20 รอบ จากนั้นนำขั้วไฟฟ้ามาล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปทำให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 100 $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำขั้วไฟฟ้ามาทำ electro-polymerization ชั้นของ POPD โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าค่าระหว่าง ถึง -0.05 ถึง 0.8 V โดยใช้อัตราเร็วในการสแกน 0.01 V/s จำนวน 15 รอบ ในสารละลาย 0.01 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่มี 5.0 mM ของ OPD โมโนเมอร์ ขั้วไฟฟ้า GC/PB/POPD ที่เตรียมได้สามารถนำมาใช้วัดการเกิดรีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยให้ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงที่ช่วง 0.1  $\mu\text{M}$  – 0.12 mM และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 0.05  $\mu\text{M}$  เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างเครื่องดื่ม เช่น ชากลั่นมะนาว, ชาเขียว และน้ำผลไม้เช่น น้ำสับปะรด, น้ำแอปเปิ้ลและ น้ำองุ่น

## 2.7 เทคนิคในการตรึงเอนไซม์ในเอนไซม์รีแอกเตอร์

การนำเอนไซม์มาตรึง (immobilize) ลงบนวัสดุต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นเอนไซม์รีแอกเตอร์ (enzymatic reactor) หรือนำมาตรึงลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเพื่อนำมาดัดแปรขั้วไฟฟ้าให้เป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร การตรึงเอนไซม์ไม่ได้หมายถึงเอนไซม์ทั้งหมดถูกตรึง เพราะจะทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยาเคมีหมดไป ดังนั้นการตรึงเอนไซม์ จึงหมายถึงการจำกัดตำแหน่งเอนไซม์ ด้วยวิธีการทางกายภาพ หรือ

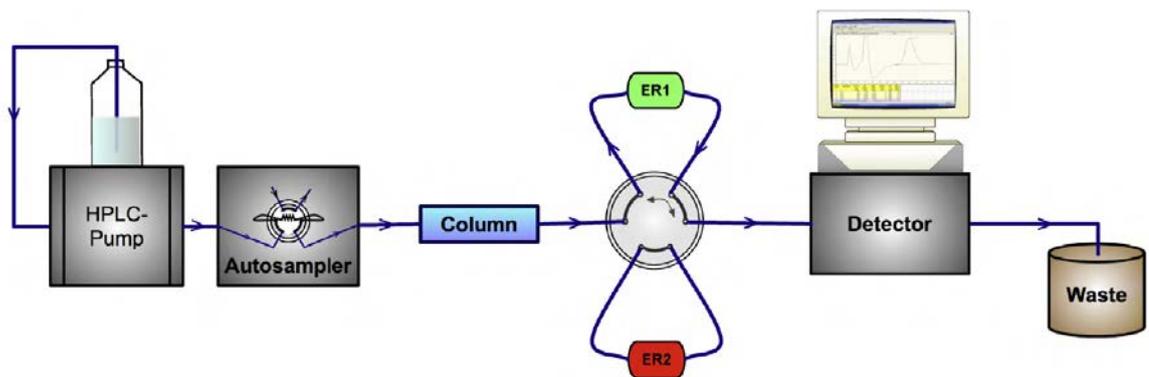
จำกัดตำแหน่งเอนไซม์ ให้อยู่ในช่องว่างที่กำหนด โดยการตรึงเอนไซม์กับตัวยึดเกาะที่ไม่ละลาย ที่มีหลากหลายชนิด ซึ่งเอนไซม์ยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา สิ่งสำคัญของการตรึงเอนไซม์ที่ต้องคำนึงถึงคือ

(1) เอนไซม์ยังคงแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเคมีภายหลังการตรึงเอนไซม์

(2) สารตั้งต้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ถูกตรึง โดยปราศจากการกีดขวาง ของตัวยึดเกาะหรือเมมเบรน และผลิตภัณฑ์แพร่ออกได้ง่าย

(3) เพื่อสร้างระบบเอนไซม์ตรึงรูปที่มีความคงตัว ภายใต้สภาวะการใช้งานของเอนไซม์ ทั้งนี้การตรึงเอนไซม์จะไม่เกิดประโยชน์ถ้า activity ของเอนไซม์ถูกทำลาย โดยกระบวนการตรึง หรือสารตั้งต้นไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้

Theisen และคณะ [17] ได้พัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในอาหารโดยใช้เทคนิค HPLC ควบคู่กับ immobilized enzyme reactor (IMER) โดยการนำเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสมาตรึงใน copolymer ของ methacrylamide (Eupergit®) โดยใช้อัตราส่วน 50 units/40mg ของ Eupergit® จากนั้นนำไปบรรจุใน carbonate cartridge และใช้เป็น IMER ในระบบวิเคราะห์แบบ HPLC ดังรูปที่ 2.5

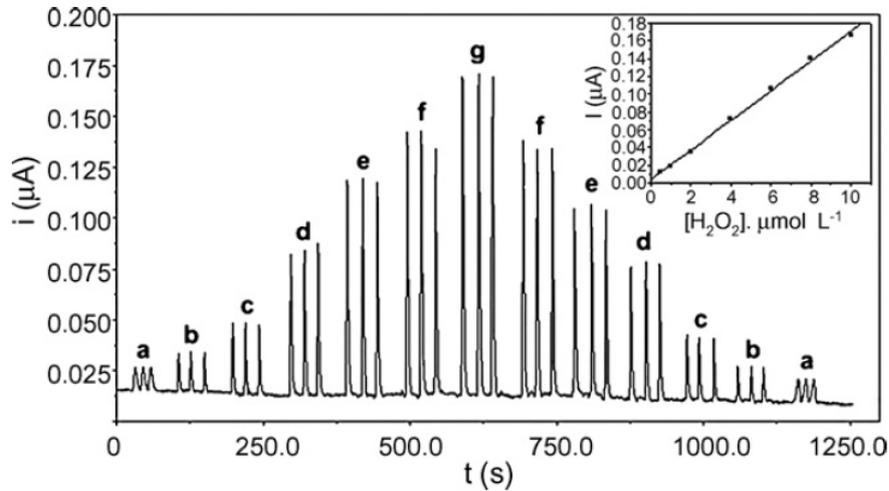


**รูปที่ 2.5** ระบบวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในอาหารด้วยเทคนิค HPLC ควบคู่กับ immobilized enzyme reactor (HPLC-IMER) ER 1 ใช้ซัลไฟต์ออกซิเดสจากพืช (pSO) ER2 ใช้ซัลไฟต์ออกซิเดสจากสัตว์ (cSO) และตัวตรวจวัด (detector) ใช้ขั้วไฟฟ้าแพลทตินัม (Pt electrode) ในการตรวจวัด โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 200 mV [17]

ระบบ HPLC-IMER ที่พัฒนาขึ้นเมื่อใช้ซัลไฟต์ออกซิเดสจากพืช (pSO) ให้ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงในช่วง 0.04– 2 mg/L ( $r^2 = 0.9996$ ) แต่ถ้าความเข้มข้นของซัลไฟต์เกิน 2 mg/L จะเกินขีดความสามารถในการตรวจวัดทำให้สัญญาณจากตัวตรวจวัดไม่ขึ้นกับปริมาณ ขณะที่เมื่อใช้ซัลไฟต์ออกซิเดสจากสัตว์ (cSO) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.04– 2 mg/L การตอบสนองไม่เป็นเส้นตรง ( $r^2 = 0.8809$ ) เมื่อนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างไม่เช่น องุ่น, พืช และมะนาว พบว่าให้ผลดี

ในปี ค.ศ. 2008 Franchini และคณะ [24] ได้พัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำผึ้งโดยใช้เทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลควบคู่กับ enzymatic reactor โดยการนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมาตรึงในเรซินชนิด Amberlite (IRA-173) โดยซังเรซินมา 250 mg เติม 0.1% กลูตารัลดีไฮด์ปริมาณ 100  $\mu$ L ลงไปผสมให้เข้ากันโดยการกวนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 200 units กวนของผสมเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเรซินไปบรรจุในท่อ (tygon tubing) ปิดปลายด้วยเยื่อแก้วและ

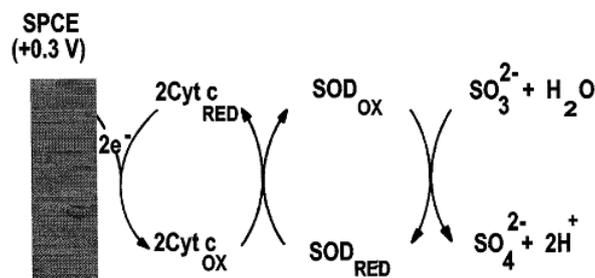
นำไปใช้เป็น enzymatic reactor ในระบบวิเคราะห์แบบ Flow Injection Analysis (FIA) ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าทองที่มีการดัดแปรด้วยแพลทตินัม (Platinum-modified gold electrode) โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 0.60 V ในการวัด สัญญาณที่ได้จากการวัดแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 สัญญาณที่ได้จากเทคนิคในการวัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ใช้ enzymatic reactor ในระบบวิเคราะห์แบบ FIA ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าทองที่มีการดัดแปรด้วยแพลทตินัม (Platinum-modified gold electrode) ความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> จาก (a) 1µM –(e) 10 µM รูปแทรกแสดงกราฟมาตรฐานที่ได้ [24]

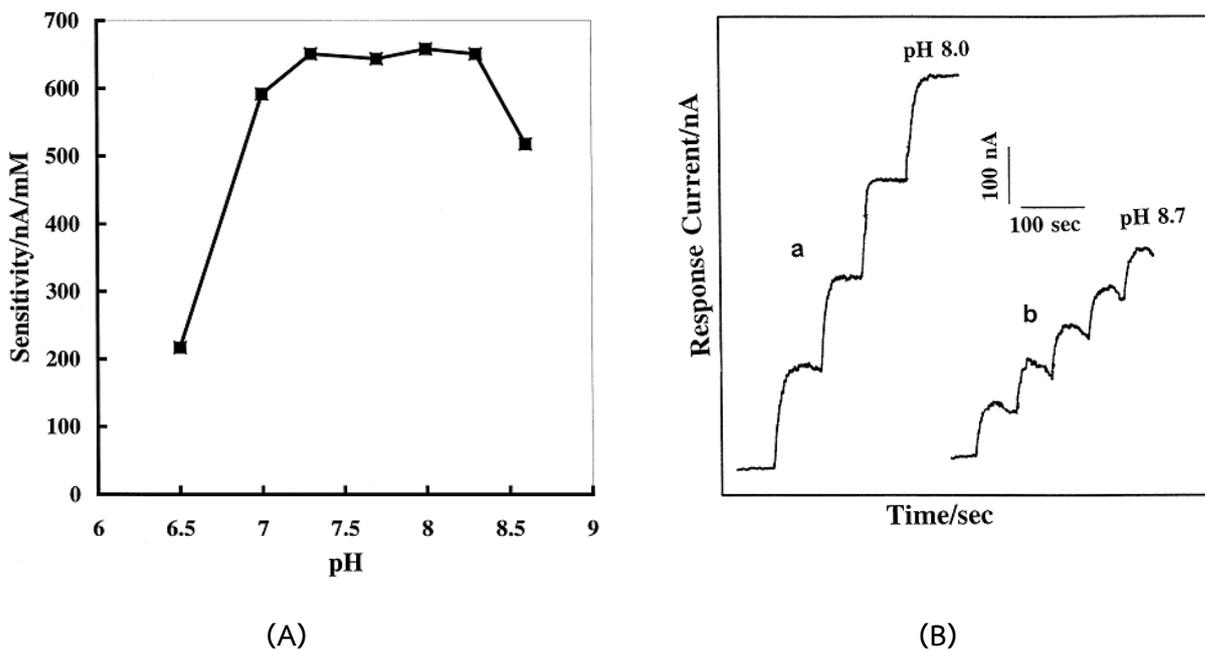
## 2.8 ซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์

Abass และคณะ [25] พัฒนาแอมเพอร์โรเมทริกไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ โดยใช้สารผสมระหว่างเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส และ cytochrome c ซึ่งใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนผสมลงในหมึกคาร์บอน และนำไปพิมพ์เป็น screen printed electrode เพื่อเตรียมเป็นไบโอเซนเซอร์ กลไกในการเกิดปฏิกิริยาที่ screen printed carbon electrode (SPCE) แสดงดังรูปที่ 2.7 ซัลไฟต์เกิด oxidation โดยการ catalyze ด้วยซัลไฟต์ออกซิเดส (SOD) และ cytochrome c (Cyt c) ซึ่งในโมเลกุลจะมี heme ซึ่งมีเหล็กเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>)



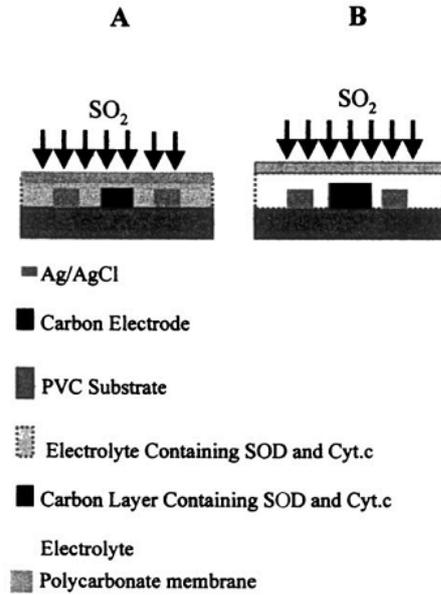
รูปที่ 2.7 ไดอะแกรมแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าของซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เมื่อ SOD คือซัลไฟต์ออกซิเดส และ Cyt c คือ cytochrom c [25]

เมื่อศึกษาผลของ pH ของสารละลายที่ใช้ในการวัดในช่วง 6.5 - 8.7 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1.7(A) ซึ่งพบว่าเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 6.5 ถึง 7.5 ค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมาก และเริ่มคงที่เมื่อ pH อยู่ในช่วง 7.5 -8.0 ค่ากระแสเริ่มลดลงเมื่อ pH ของสารละลายมีค่าเกิน 8.0 จากผลการทดลองในรูป 2.8 (B) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ คือ 8.0 เนื่องจากที่ pH 8.7 สัญญาณที่ได้จะไม่คงที่ และค่ากระแสที่ได้มีค่าลดลง ซึ่ง Abass และคณะอภิปรายไว้ว่าอาจเกิดเนื่องมาที่ pH เกิน 8.0 ซัลไฟต์ออกซิเดส และ cytochrom c เปลี่ยนโครงสร้างเนื่องจากเกิดการขดตัว (folding) ทำให้ specific activity ลดลง



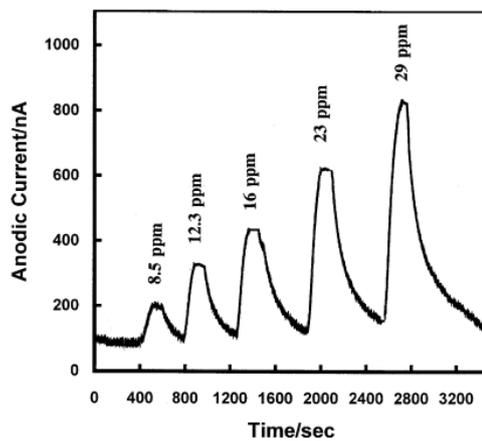
รูปที่ 2.8 (A) แสดงผลของ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวัดสัญญาณและ (B) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีโดยใช้ซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เมื่อเติม 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> ทีละ 20  $\mu$ L ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (a) pH = 8.0 และ (b) pH = 8.7 [25]

ในปี ค.ศ. 2002 คณะผู้วิจัย [26] ได้นำแนวความคิดในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์โดยใช้ เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส (SOD) และ cytochrom c ตรึงบน screen printed electrode (SPE) มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแก๊ส SO<sub>2</sub> การเตรียมไบโอเซนเซอร์ทำได้โดยการนำ 1.2 mg cytochrom c และ เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ และนำไป deposit บน polycarbonate membrane โดยออกแบบ SPE 2 ชนิดคือ s-type และ b-type biosensor รูปแบบดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ไดอะแกรมแสดงด้านข้าง (side view) ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (A) s-type biosensor และ (B) b-type biosensor [26]

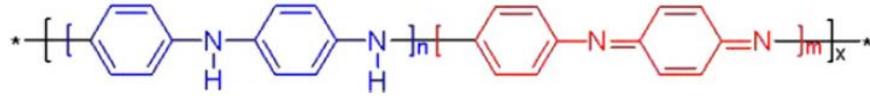
จากผลการทดลองพบว่า ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นชนิด s-type มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูงและการตอบสนอง (response time) ที่เร็วกว่าชนิด b-type เนื่องจาก cytochrom c และ เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสอยู่บนผิวหน้าของทรานสดิวเซอร์ (อิเล็กโทรด) เมื่อนำไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 สัญญาณที่ได้จากการวัด  $\text{SO}_2$  ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (s-type) [26]

ในปี ค.ศ. 2010 Bahmani และคณะ [19] เสนอวิธีในการพัฒนาซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์โดยตรงเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสในฟิล์มของ polyaniline บนขั้วไฟฟ้าอะลูมิเนียม ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเตรียมได้โดยการทำ electropolymerization ของ สารละลาย 0.1 M aniline ที่มี 2.5 mg/mL เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสใน ตัวทำละลาย  $\text{HCl-NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.5) ให้ศักย์ไฟฟ้าโดยสแกนค่าระหว่าง 1.2 ถึง -0.5 V (เทียบ

กับขั้วไฟฟ้า SCE) เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสจะถูกตรึงไว้ในฟิล์มของ polyaniline ระหว่างกระบวนการ electropolymerization รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้างของ polyaniline



รูปที่ 2.11 แสดงสูตรโครงสร้างของ polyaniline [19].

Dinckaya และคณะ [27] รายงานการเตรียมซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์ โดยการตรึงเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส บนขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ถูกเคลือบด้วยฟิล์มบางของปรอท ขั้นตอนในการเตรียมไบโอเซนเซอร์เริ่มจากการนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ทำความสะอาดมาแล้วมาจุ่มในสารละลาย mercury plating solution (200 mg/L  $Hg_2Cl_2$  ใน 2M HCl) ฟันไนโตรเจนแก๊สในสารละลาย 5 นาที จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้าแกว่งกลาสซีคาร์บอนที่ศักย์ -0.1 ถึง 1.2 V สองถึงสามครั้งเพื่อเตรียมผิวหน้าขั้วไฟฟ้า จากนั้นให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.8 V พร้อมกววนสารละลายด้วยอัตราการกววนสาร 1,800 รอบต่อนาที เพื่อให้ mercury ไป deposit ที่ขั้วไฟฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที นำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่มีฟิล์มบางของปรอทมาตรึงเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดส (0.5 U) ที่เตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาผสมกับ gelatin (1mg/50  $\mu$ L) จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ 50  $\mu$ L มาหยดลงบนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่มีฟิล์มบางของปรอทที่แห้งให้แห้งในที่เย็น (4  $^{\circ}$ C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าไปจุ่มในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ที่เตรียมใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จะได้ซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์โดยหลักการในการวัดคือ ออกซิเจนที่ละลายในสารละลายจะถูกรีดิวซ์ที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ถูกเคลือบด้วยฟิล์มบางของปรอท ไบโอเซนเซอร์จะวัดการลดลงของออกซิเจนที่เอนไซม์ซัลไฟต์ออกซิเดสนำไปใช้ในการเกิดปฏิกิริยาซัลไฟต์ออกซิเดชัน ดังนั้นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ใช้ไปในการทำปฏิกิริยาจึงนำไปสู่ปริมาณของซัลไฟต์ ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้ใช้วัดที่ศักย์ไฟฟ้า -0.24 V และสามารถใช้กับตัวอย่างอาหาร เช่น ขนมปัง, ชูป และ น้ำส้ม

## บทที่ 3 การทดลอง

### 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

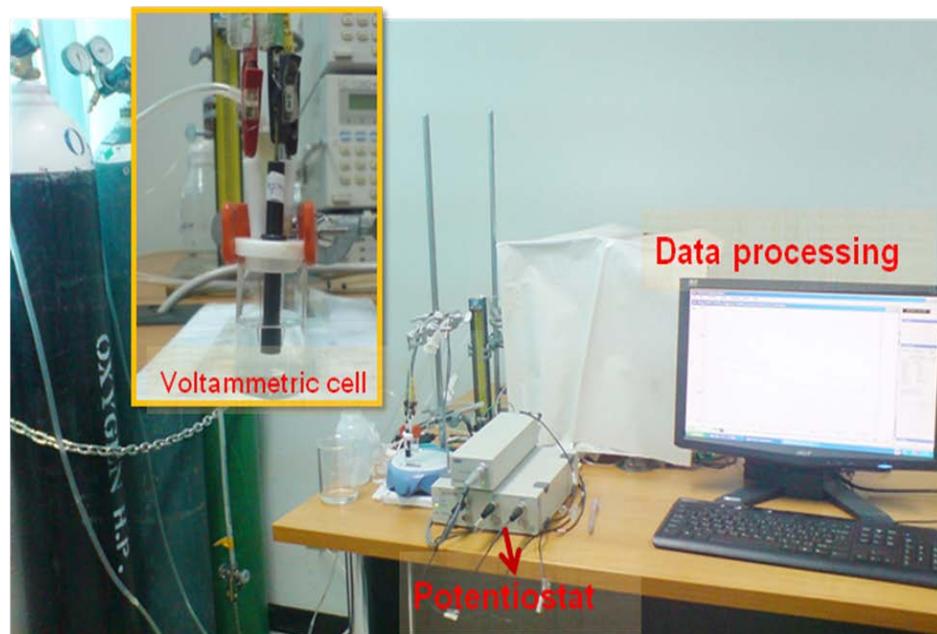
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

#### ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท (รุ่น)
Potentiostat	eDAQ (EA 161) eDAQ (e-corder 210)
Ultrasonicator	Scientific promotion (CT360D)
Glassy carbon electrode (3 mm diameter)	CH Instrument
Reference electrode : Ag/AgCl	CH Instrument
Counter electrode : (Pt wire)	CH Instrument
Vertex	LMS (VTX-3000L)
Magnetic stirrer	IKA (color squid ikamag)

#### 3.1.1 ไชคลิกโวลแทมเมทรี

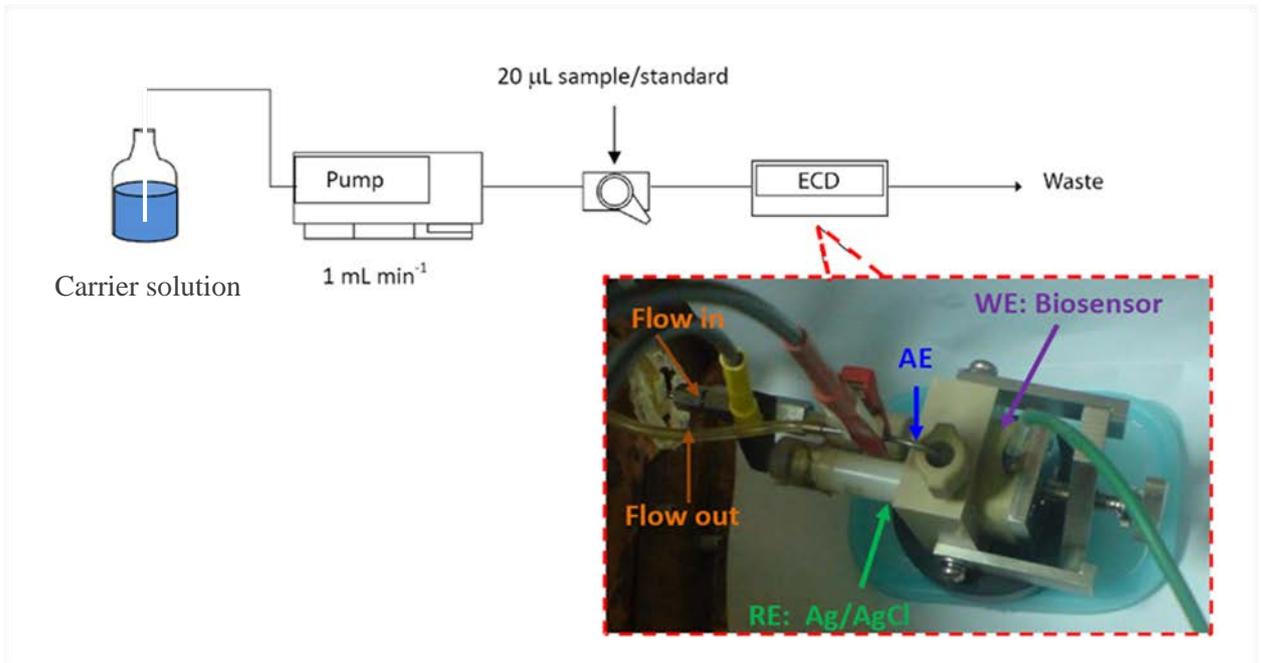
การทดลองไชคลิกโวลแทมแสดงดังรูปที่ 3.1 เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท eDAQ) และ โวลแทมเมทริกเซลล์ ขนาด 25 mL (รูปแทรก, รูปที่ 1) ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา (3 mm diameter) หรือ ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยคอมโพสิตของคาร์บอนนาโนทิวป์โพลีอะนิลีนและอนุภาคทองนาโนเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC), ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ลวด Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย



รูปที่ 3.1 การทดลองไซคลิกโวลแทมโมแกรมเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง รูปแทรกแสดงโวลแทมเมทริกเซลล์

### 3.1.2 ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหล (Flow injection analysis with amperometric detection)

ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น แสดงดังรูปที่ 3.2 HPLC ปัมป์ รุ่น LC-10AD (บริษัท Shimadzu), Injector ปริมาตร loop 20  $\mu\text{L}$  (บริษัท Rheodyne), เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท eDAQ) และ thin layer flow cell (รูปแทรก, รูปที่ 3.2) ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนคอมโพสิตเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน, ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ท่อ stainless steel เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย active area สำหรับขั้วไฟฟ้าใช้งานเท่ากับ  $0.06 \text{ cm}^2$  ใช้สารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 M เป็นสารละลายตัวพา (carrier solution)



รูปที่ 3.2 แมนิโฟลด์ของระบบโพลินเจกชันอะนาลิซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ชั่วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น รูปแทรกแสดงภาพของ thin layer flow cell

สารเคมีที่ใช้ เกรดของสารเคมีและบริษัทผู้ผลิตสารเคมีแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	เกรด	บริษัท
aniline (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> )	AR	Sigma-Aldrich
o-Aminobenzoic acid (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	AR	Sigma-Aldrich
Ammonium persulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	AR	Fluka
Chitosan, CS (C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> N) <sub>n</sub>	AR	Sigma-Aldrich
di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	AR	Carlo Erba
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	AR	Merck
Potassium di-hydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AR	Sigma-Aldrich
Horseradish peroxidase (HRP) EC 1.11.1.7 M <sub>r</sub> - 40,000 (Lit.) Unit 969.65 U/mg	AR	Fluka
Ascorbic acid (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	AR	Sigma-Aldrich
Dopamine (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> )	AR	Sigma-Aldrich
Uric acid (C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> )	AR	Acros
D(+)-glucose	AR	Sigma-Aldrich
Multiwall carbon nanotubes, MWCNT (95%)	-	NanoLab
Carboxylic functionalized MWCNT	-	NanoLab

### ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

สารเคมี	เกรด	บริษัท
Amino functionalized MWCNT	-	NanoLab
Hydrogen tetrachloro aurate (HAuCl <sub>4</sub> )	AR	Sigma-Aldrich
Sodium sulfite (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	AR	Acros
Glutaraldehyde	AR	Sigma-Aldrich

### 3.2 การเตรียมสารเคมี

สารละลายอะนิลีน ความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยปิเปตอะนิลีนบริสุทธิ์มา ปริมาตร 46  $\mu$ L ละลายด้วยสารละลาย H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตรเล็กน้อย ปรับปริมาตรให้ครบ 5 mL ในขวดวัดปริมาตร

สารละลาย MWCNT ความเข้มข้น 10 mg/mL เตรียมโดยชั่ง MWCNT (หรือ MWCNT-COOH หรือ MWCNT-NH<sub>2</sub>) มา 0.01  $\pm$  0.0005 g ละลายในสารละลายกรดผสมระหว่าง H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub> (3:1) ปริมาตร 1.00 mL นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สารละลายผสม MWCNT-COOH/aniline เตรียมโดยปิเปตสารละลายอะนิลีน ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 1.00 mL เติมลงในสารละลาย MWCNT-COOH ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 1.50 mL ผสมให้เข้ากันโดยนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicate เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> ความเข้มข้น 38.8 mM เตรียมโดยชั่ง Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O มา 0.5  $\pm$  0.005 g ละลายด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตรให้ครบ 50 mL

สารละลายอนุภาคทองคำนาโน ความเข้มข้น 0.02 % เตรียมจากสารละลาย HAuCl<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1.0 mM โดยชั่ง HAuCl<sub>4</sub> มา 0.01  $\pm$  0.0005 g ละลายด้วยน้ำ DI-ปรับปริมาตรให้ครบ 50 mL จากนั้นปิเปตสารละลาย HAuCl<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1.0 mM ปริมาตร 20 mL เติมลงในขวดแก้ว ใส่แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร กวนสารละลายที่ 1,000 รอบต่อนาที (rpm) พร้อมกับให้ความร้อนที่ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที จะสังเกตเห็นไอน้ำเกาะที่ผิวด้านข้างของขวดแก้ว ค่อยๆ เติมสารละลาย Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> ความเข้มข้น 38.8 mM ปริมาตร 2.00 mL เมื่อเติมครบแล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 125 °C พร้อมกับกวนสารละลายต่อไป 20 นาที จะได้ สารละลายอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) ที่มีสีแดง ทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายอนุภาคทองคำนาโน AuNPs ที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

สารละลายอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ค่อยๆ เติมสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้น 1.0 mM ปริมาตร 10 mL อย่างช้าๆลงในสารละลาย sodiumborohydride ความเข้มข้น 2.0 mM ปริมาตร 30 mL ภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา สารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองสว่าง ทำการกวนต่อไปอีก 3 นาที เก็บสารละลายอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 4 °C

สารละลายซัลไฟต์ ความเข้มข้น 1 M ชั่ง Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> มา 12.604  $\pm$  0.005 g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตรเล็กน้อย เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำ DI เก็บสารละลายที่ได้ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มา  $14.196 \pm 0.05$  g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อย เติลงในขวดปริมาตรขนาด 1,000 mL ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ เก็บไว้ในขวดแก้วเก็บสาร

สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  มา  $13.607 \pm 0.005$  g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อย เติลงในขวดปริมาตรขนาด 1,000 mL ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ เก็บไว้ในขวดแก้วเก็บสาร

สารละลายเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) เตรียมโดยชั่งเอนไซม์ HRP จำนวน 4 mg ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 1 mL จะได้สารละลายเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้น 4 mg/mL

สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 2 % เตรียมโดยตวงสารละลาย 99.9 % กรดอะซิติก ปริมาตร 0.2 mL เติลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ DI

สารละลาย 0.4% chitosan (CS) เตรียมโดยชั่ง CS จำนวน 0.2 g ละลายใน 5 mL 1.0 M HCl ตั้งกวนทิ้งไว้จนกระทั่ง CS ละลายเป็นเจลหมด จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL จะได้สารละลายความเข้มข้น 0.4% CS

สารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1 M เตรียมโดยตวงสารละลายมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30% ปริมาตร 9.99 mL เติลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เก็บไว้ในขวดแก้วเก็บสาร

### 3.3 การพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์ และขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์

#### 3.3.1 การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลีอะนิลีน

##### 3.3.1.1 การทำความสะอาดขั้วไฟฟ้ากาสซีคาร์บอน

ทำความสะอาดขั้วไฟฟ้ากาสซีคาร์บอน โดยขัดผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด ขัดขั้วไฟฟ้าโดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0 , 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate กับน้ำ DI เป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้งหยดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวป์-โคโตะซานคอมโพสิตบนขั้วไฟฟ้ากาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้อง

##### 3.3.1.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้า MWCNT-COOH\_GC

จุ่มขั้วไฟฟ้ากาสซีคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วลงในสารละลายผสมระหว่าง MWCNT-COOH ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 1.00 mL และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M (pH 7) ปริมาตร 11.50 mL ให้ศักย์ไฟฟ้าแบบไซคลิกระหว่าง 0.0 – 1.0 V. (RE: Ag/AgCl, AE: Pt) 30 รอบ ในอัตราการแสกน 50 mV/s พร้อมทั้งกวนสารละลาย 650 รอบต่อนาที ตลอดเวลา ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำ DI จะได้ขั้วไฟฟ้า MWCNT-COOH\_GC ทิ้งให้ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแห้งที่อุณหภูมิห้อง

### 3.3.1.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้า AuNPs\_GC

ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วลงในสารละลายผสมระหว่าง AuNPs ความเข้มข้น 0.02 % ปริมาตร 1.50 mL และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M pH 7 ปริมาตร 11.00 mL ให้ศักย์ไฟฟ้าแบบไซคลิกระหว่าง -0.3 ถึง + 0.9 V. (RE: Ag/AgCl, AE: Pt) 10 รอบ ด้วยอัตราการสแกน 50 mV/s พร้อมทั้งกวนสารละลาย 650 รอบต่อนาที ตลอดเวลา จะได้ขั้วไฟฟ้า AuNPs\_GC ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำ DI แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

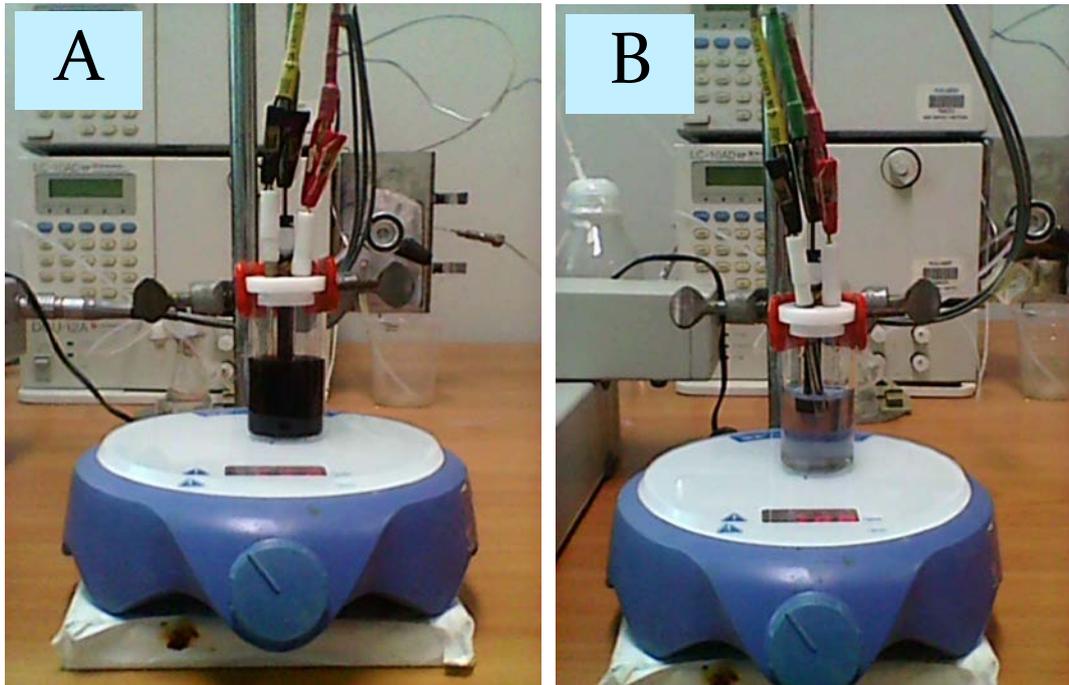
### 3.3.1.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้า MWCNT-COOH\_PANi\_GC

ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ทำความสะอาดแล้วลงในสารละลายผสมระหว่าง MWCNT-COOH/aniline (1.5:1) ปริมาตร 1.00 mL และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M (pH 7) ปริมาตร 11.50 mL ให้ศักย์ไฟฟ้าแบบไซคลิกระหว่าง 0.0 – 1.0 V. (RE: Ag/AgCl, AE: Pt) 30 รอบ ในอัตราการสแกน 50 mV/s พร้อมทั้งกวนสารละลาย 650 รอบต่อนาที ตลอดเวลา จะเกิดการพอลิเมอไรเซชันของอะนิลีน เกิดเป็นพอลิอะนิลีน (PANi) ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำ DI จะได้ขั้วไฟฟ้า MWCNT-COOH\_PANi\_GC ทิ้งให้ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าแห้งที่อุณหภูมิห้อง

### 3.3.1.5 การเตรียมขั้วไฟฟ้า AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC

ขั้วไฟฟ้า MWCNT-COOH\_PANi\_GC ที่เตรียมดังหัวข้อที่ 2.4.4 ลงในสารละลายผสมระหว่าง 0.02 % AuNPs ปริมาตร 1.50 mL และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M pH 7 ปริมาตร 11.00 mL ให้ศักย์ไฟฟ้าแบบไซคลิกระหว่าง -0.3 ถึง + 0.9 V. (RE: Ag/AgCl, AE: Pt) 10 รอบ ในอัตราการสแกน 50 mV/s พร้อมทั้งกวนสารละลาย 650 รอบต่อนาที ตลอดเวลา จะได้ขั้วไฟฟ้า AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC ล้างขั้วไฟฟ้าด้วยน้ำ DI แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมขั้วไฟฟ้าชนิด AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANi\_GC ในขั้นตอนการโม่ติฟายด์ขั้วไฟฟ้าด้วยกระบวนการ electropolymerization อะนิลีน (PANi) และ electro-deposit อนุภาคทองนาโนบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน แสดงดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการโม่ติฟายด์ซัลไฟต์ด้วยกระบวนการ (A) electropolymerization อะนิลีน (PANi) และ (b) electro-deposit อนุภาคทองนาโนบนผิวหน้าของซัลไฟต์ฟากลาสซีคาร์บอน

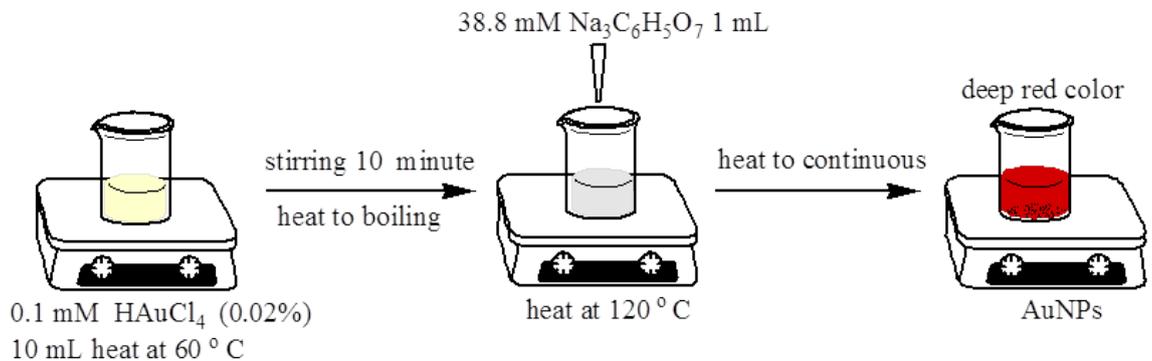
### 3.3.2 การเตรียมซัลไฟต์ฟากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์-พีดิดีเอ-อนุภาคทองนาโน (CNTs-PDDA-AuNPs/GC)

#### 3.3.2.1 สารละลายอนุภาคทองนาโน ความเข้มข้น 0.02% (0.02% AuNPs)

สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 1.0 mM โดยชั่ง  $\text{HAuCl}_4$  มา  $0.01 \pm 0.0005$  g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อย เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำ DI

สารละลาย  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ความเข้มข้น 38.8 mM โดยชั่ง  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  มา  $0.5 \pm 0.005$  g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อย เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำ DI

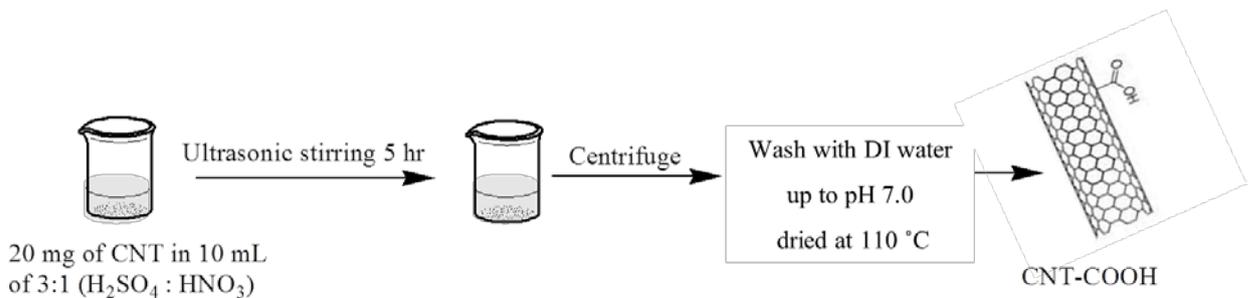
เปิดสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 1.0 mM ปริมาตร 20 mL เติมลงในขวดแก้วเก็บสาร ใส่แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร กวนสารละลายที่ 1,000 รอบต่อนาที (rpm) พร้อมกับให้ความร้อนที่  $75^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ความเข้มข้น 38.8 mM ปริมาตร 2.00 mL เมื่อเติมครบแล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น  $125^\circ\text{C}$  พร้อมกับกวนสารละลายต่อไป 20 นาที จะได้สารละลายอนุภาคทองนาโน (AuNPs) ที่มีสีแดง ทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายอนุภาคทองนาโนที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  แผนภาพขั้นตอนการเตรียมสารละลายอนุภาคทองนาโนแสดงดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารละลายอนุภาคทองคำนาโน

### 3.3.2.2 สารละลาย MWCNT-COOH

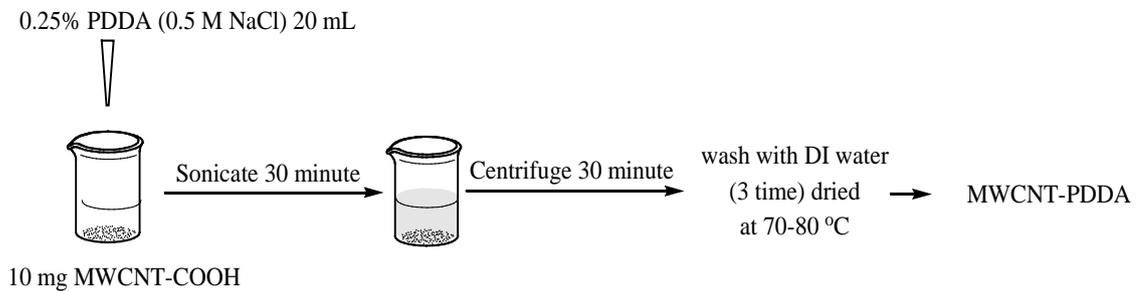
ซังคาร์บอนนาโนทิวป์มา 20 mg แล้วละลายในสารละลายกรดผสมระหว่าง  $H_2SO_4/HNO_3$  (3:1) ปริมาตร 10 mL นำไปนำไปผ่านการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ด้วยเครื่อง ultrasonicator เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แล้วล้างด้วยน้ำ DI จนมี pH 7.0 ตรวจสอบโดยใช้กระดาษลิตมัสแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 110 °C แผนภาพขั้นตอนการเตรียมสารละลายมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารละลายมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก

### 3.3.2.3 สารละลาย MWCNT-PDDA และ MWCNT-PDDA-AuNPs

ซังมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก ที่สังเคราะห์ได้ดังหัวข้อ 3.3.2.2 มา 10 mg แล้วเติมสารละลาย 0.25% PDDA (0.5 M NaCl) ปริมาตร 20 mL นำไปผ่านการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำ DI 3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยอบอุณหภูมิ 70-80 °C จะได้ MWCNT-PDDA แล้วซัง MWCNT-PDDA มา 4 mg/mL แล้วเติมน้ำ DI 1 mL นำไปผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) 3 ชั่วโมง จะได้ MWCNT-PDDA แผนภาพการเตรียมสารละลาย MWCNT-PDDA แสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย MWCNT-PDDA

สารละลาย CNT-PDDA-AuNPs เตรียมโดย ชั่ง CNT-PDDA มา 4 mg/mL แล้วเติมสารละลาย AuNPs ความเข้มข้น 0.02% 1 mL แล้ว sonicate 3 ชั่วโมงจะได้ MWCNT-PDDA-AuNPs

### 3.3.2.4 การตัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน

#### การเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-PDDA

นำขั้วไฟฟ้าที่ทำความสะอาดแล้วมาหยดสารละลาย MWCNT-PDDA ความเข้มข้น 4 mg/mL ปริมาตร 40  $\mu$ L ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-PDDA

#### การเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-PDDA-AuNPs

นำขั้วไฟฟ้าที่ทำความสะอาดแล้วมาหยดสารละลาย MWCNT-PDDA-AuNPs ปริมาตร 40  $\mu$ L ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-PDDA-AuNPs

#### การเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-PDDA/AuNPs

นำขั้วไฟฟ้าที่ทำความสะอาดแล้วมาหยดสารละลาย MWCNT-PDDA ความเข้มข้น 4 mg/mL ปริมาตร 40  $\mu$ L ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลาย AuNPs ความเข้มข้น 0.02% ปริมาตร 40  $\mu$ L แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องอีกครั้ง จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/MWCNT-PDDA/AuNPs

#### การเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/ AuNPs/MWCNT-PDDA

นำขั้วไฟฟ้าที่ทำความสะอาดแล้วมาหยดสารละลาย AuNPs ความเข้มข้น 0.02% ปริมาตร 40  $\mu$ L ลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลาย MWCNT-PDDA ความเข้มข้น 4 mg/mL ปริมาตร 40  $\mu$ L แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องอีกครั้ง จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/AuNPs /MWCNT-PDDA

### 3.3.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

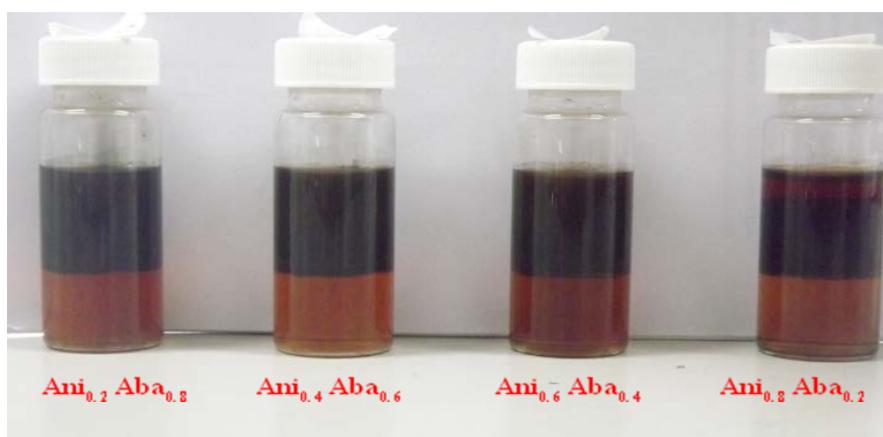
#### 3.3.3.1 การสังเคราะห์ Polyaniline-co-aminobenzoic acid หรือ p(Ani-co-o-Aba)

โคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ด้วยวิธี Interfacial copolymerization ได้สังเคราะห์ตามขั้นตอนซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ เตรียมสารละลายของ aniline (Ani) และ o-aminobenzoic acid (o-Aba) ใน 5 mL คลอโรฟอร์ม ( $\text{CHCl}_3$ ) โดยใช้อัตราส่วนโมล 0.8:0.2, 0.6:0.4, 0.4:0.6 และ 0.2:0.8 ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณของ  $\text{Ani}_x : \text{Aba}_y$  ในอัตราส่วนต่างๆ

$\text{Ani}_x\text{Aba}_y$	Aniline (ml)	o-Aminobenzoic acid (g)
$\text{Ani}_{0.2}\text{Aba}_{0.8}$	0.036	0.2192
$\text{Ani}_{0.4}\text{Aba}_{0.6}$	0.073	0.1645
$\text{Ani}_{0.6}\text{Aba}_{0.4}$	0.109	0.1097
$\text{Ani}_{0.8}\text{Aba}_{0.2}$	0.140	0.0584

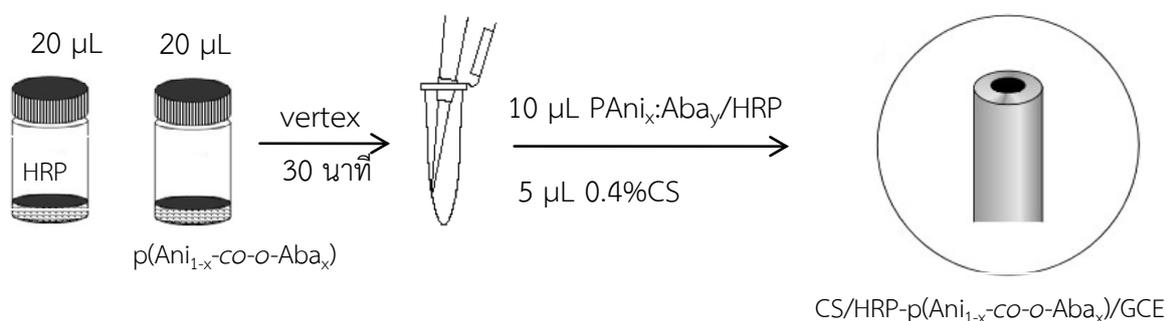
จากนั้นเตรียมสารละลาย  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  ใน 5 mL 1.0 M HCl เสร็จแล้วเทสารละลาย  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  ลงบนสารละลายของ Ani และ o-Aba ที่สารละลายของผสมไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดตะกอนของโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) จากนั้นล้างตะกอนของ p(Ani-co-o-Aba) ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลาย 1.0 M HCl น้ำปราศจากไอออน (DI  $\text{H}_2\text{O}$ ) และเอทานอล ตามลำดับ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จะได้โคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ตามสัดส่วนที่ต้องการ (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3.7 แสดงสารละลาย  $\text{Ani}_x : \text{Aba}_y$  ที่เตรียมได้โดยใช้การผสมในอัตราส่วนต่างๆ

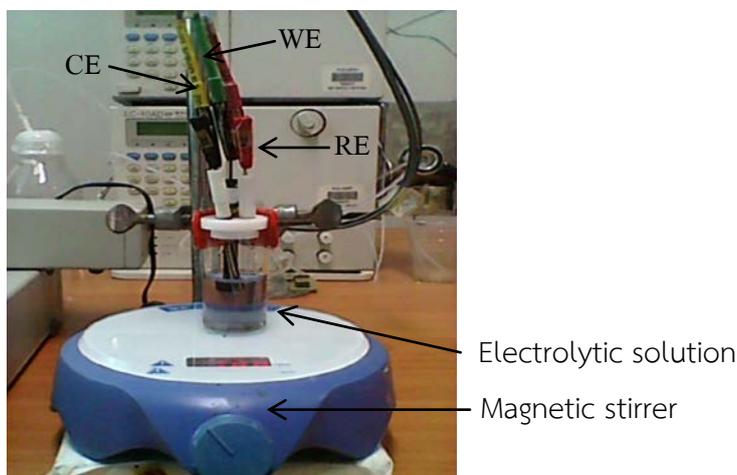
### 3.3.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

นำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GCE) ที่แห้งแล้วนี้มาเตรียมขั้ว CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ ผสม 20  $\mu\text{L}$  ของ p(Ani-co-o-Aba) ความเข้มข้น 10 mg/mL และ 20  $\mu\text{L}$  ของ HRP ความเข้มข้น 4 mg /mL นำไปผ่านกระบวนการผสม (vertex) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำ 10  $\mu\text{L}$  ของสารละลายผสมระหว่าง HRP-p(Ani-co-o-Aba) หยดลงบนขั้ว GCE หลังจากที่ทำละลายระเหยออกไปแล้ว เคลือบขั้วไฟฟ้าด้วย 5  $\mu\text{L}$  ของ CS ความเข้มข้น 0.4% เมื่อทิ้งไว้จนขั้วไฟฟ้าแห้ง ให้ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M การเตรียมขั้วไฟฟ้าอื่นๆ ทำในลักษณะเช่นเดียวกัน เพียงแค่เปลี่ยนชนิดของ p(Ani-co-o-Aba) จากนั้น เก็บขั้วไฟฟ้าที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4  $^{\circ}\text{C}$  เมื่อไม่ได้ใช้งาน ขั้นตอนการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนเตรียมขั้ว CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

ทำการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าด้วยระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า ได้แก่ CS/HRP-p(Ani<sub>1-x</sub>-co-o-Aba<sub>x</sub>)/GCE เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (WE) Ag/AgCl (sat. 3.0 M KCl) เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE) และ Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (CE) ศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้า โดยการสแกนค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.6 V and +0.4 V (vs. Ag/AgCl) ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ที่อิ่มตัวด้วย N<sub>2</sub> ในสถานะที่ไม่เติมและเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลิอะนิลีน

จากการศึกษาหาค่าประกอบที่เหมาะสมในการโม่ดีฟายด์ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนให้เป็นซัลไฟต์เซนเซอร์ ได้ทำการทดลองโดยเปรียบเทียบขั้วไฟฟ้าจำนวน 5 ชนิด (A-E) ได้แก่ A) GC, B) AuNPs\_GC ,C) MWCNT-COOH\_GC, D) MWCNT-COOH\_PANI\_GC และ E) AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANI\_GC โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีในการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM

ผลการทดลองศึกษาหาค่าประกอบที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์แสดงดัง รูปที่ 4.1 และ ศักย์ไฟฟ้าที่ยอดฟีกแสดงดังตารางที่ 4.1

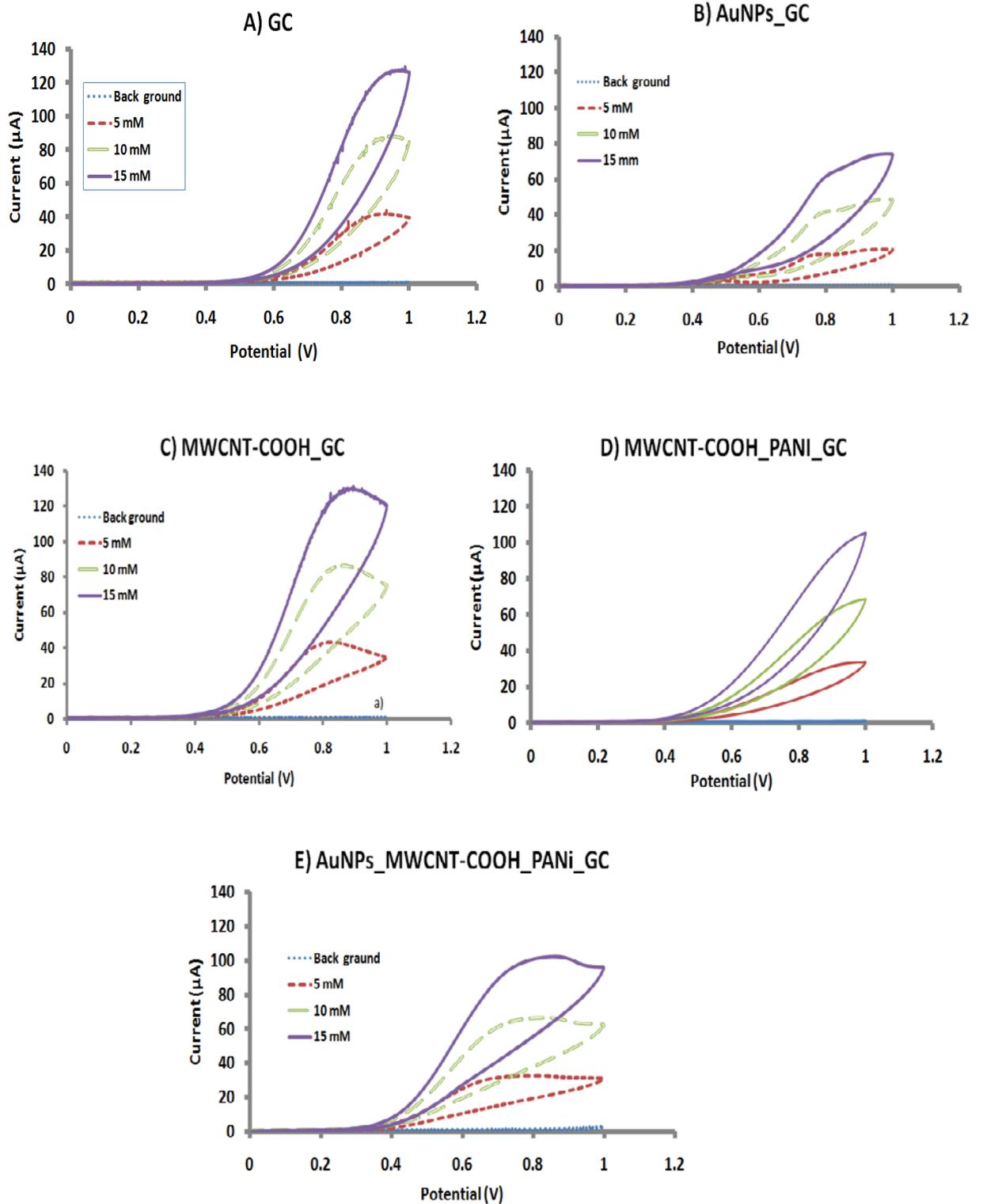
**ตารางที่ 4.1** แสดงค่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดฟีกแอโนดิก ( $E_{p,a}$ ) และค่ากระแสแอโนดิก ( $i_{0.6V}$ ) ของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 15 mM

Electrode code	Modified electrode	$E_{p,a}$ (V)	$i_{0.6V}$ ( $\mu A$ )
A	GC	0.93	10.17
B	AuNPs_GC	0.80	18.66
C	MWCNT-COOH_GC	0.85	26.97
D	MWCNT-COOH_PANI_GC	-	22.07
E	AuNPs_MWCNT-COOH_PANI_GC	0.75	60.49

\*  $i_{0.6V}$  คือ ค่ากระแสไฟฟ้าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 15 mM

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรม (รูปที่ 4.1) และศักย์ไฟฟ้าที่ยอดฟีกจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าขั้วไฟฟ้า (A) , (C) และ (D) ซัลไฟต์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าสูงกว่า 0.80 V ในขณะที่ขั้วไฟฟ้า (B) และ (E) เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 0.80 และ 0.75 V ตามลำดับ ซึ่งในการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์นั้นถ้าใช้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะทำให้องค์ประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างและสามารถเกิดออกซิเดชันได้รบกวนการวิเคราะห์

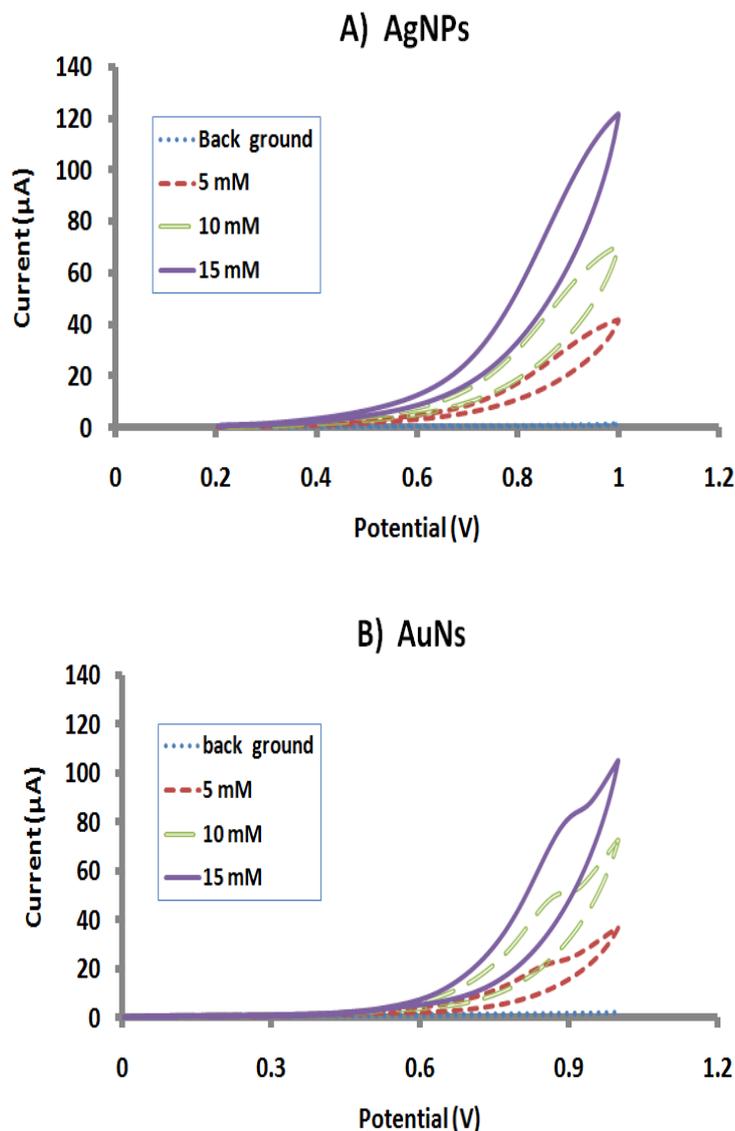
เมื่อพิจารณากระแสไฟฟ้าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ( $i_{0.6V}$ ) ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 15 mM พบว่าขั้วไฟฟ้า (E) หรือ AuNPs\_MWCNT-COOH\_PANI\_GC ซึ่งมีการ electropolymerization polyaniline โดยใช้สารละลายอะนิลีนในเมทริกของ MWCNT และมีการ electro-deposit อะนุภาคทองนาโนลงบนขั้วไฟฟ้า ให้ค่ากระแสที่สูงที่สุด คือ 60.49  $\mu A$  องค์ประกอบของขั้วไฟฟ้าชนิดนี้จึงเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นเซนเซอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ต่อไป



รูปที่ 4.1 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M ให้ศักย์ไฟฟ้าแบบไซคลิก แสกนจาก 0.0 – 1.0 V ด้วยอัตราเร็วในการแสกน 20 mV/s (RE : Ag/AgCl , AE : Pt) ของขั้วไฟฟ้าแต่ละชนิดที่พัฒนาขึ้น

-การศึกษาหาชนิดของอนุภาคโลหะนาโน (metal nanoparticles) ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์

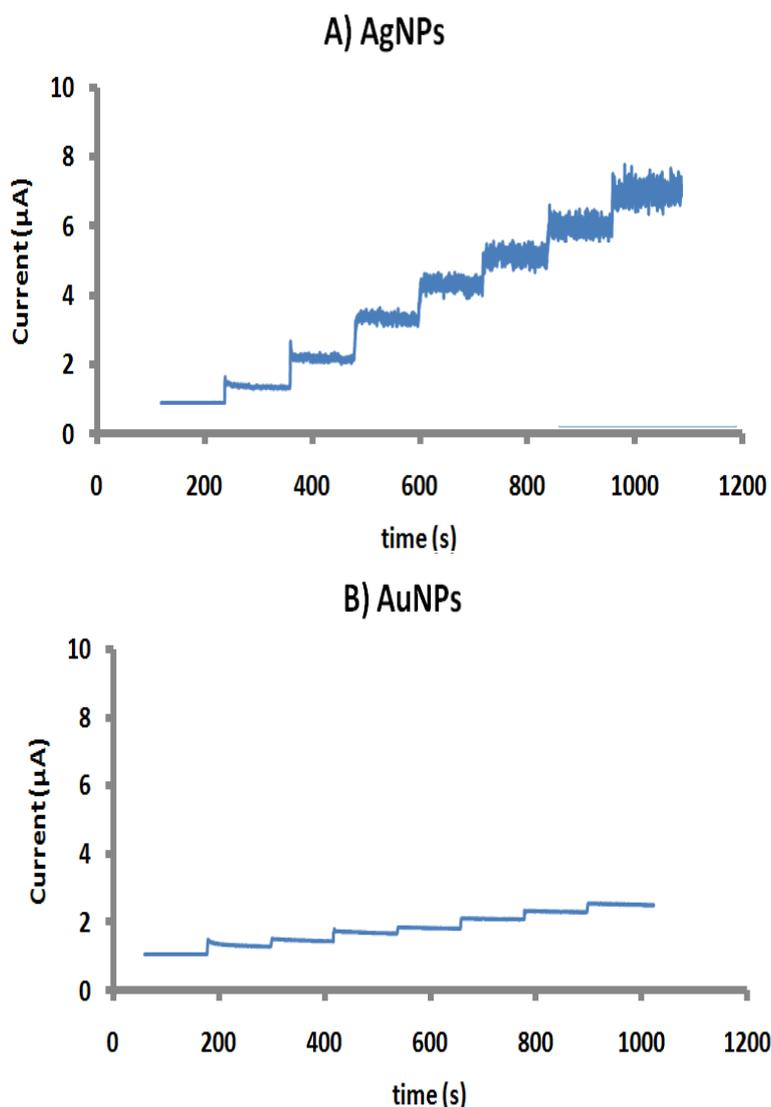
ในการศึกษาชนิดของโลหะนาโนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี และแอมเพอร์โรเมทรี จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีในการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM โดยใช้สารละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M เป็นสารอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนูน โดยเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วยอนุภาคโลหะเงินและทองคำนาโน (ขั้วไฟฟ้า AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GC และขั้วไฟฟ้า AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC) ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM ที่ขั้วไฟฟ้า A) AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GC และ B) AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M ด้วยอัตราเร็วในการสแกน 20 mV/s, RE : Ag/AgCl และ AE : Pt)

เมื่อพิจารณาไซคลิกโวลแทมโมแกรม จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการให้ศักย์ไฟฟ้าสแกนจาก 0.0 – 1.0 V ชั่วไฟฟ้า A) AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GC ซัลไฟต์สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าสูงกว่า 1.0 V แต่เมื่อใช้ชั่วไฟฟ้า B) AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC ซัลไฟต์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.85 V ในการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์นั้น

จากการศึกษาสัญญาณค่ากระแสที่ได้จากการเกิดออกซิเดชันโดยของซัลไฟต์ใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี (ที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V) โดยเติมสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ครั้งละ 1 mM ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M ภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา (อัตราเร็ว 500 rpm) ที่ชั่วไฟฟ้า AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GC และชั่วไฟฟ้า AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3



**รูปที่ 4.3** แอมเพอร์โรแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1-7 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M ให้ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ด้วยอัตราเร็วในการสแกน 20 mV/s (RE : Ag/AgCl , AE : Pt) ภายใต้สภาวะที่มีการกวน 500 รอบต่อนาที รูป A) -ชั่วไฟฟ้า AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GC และ รูป B) AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC

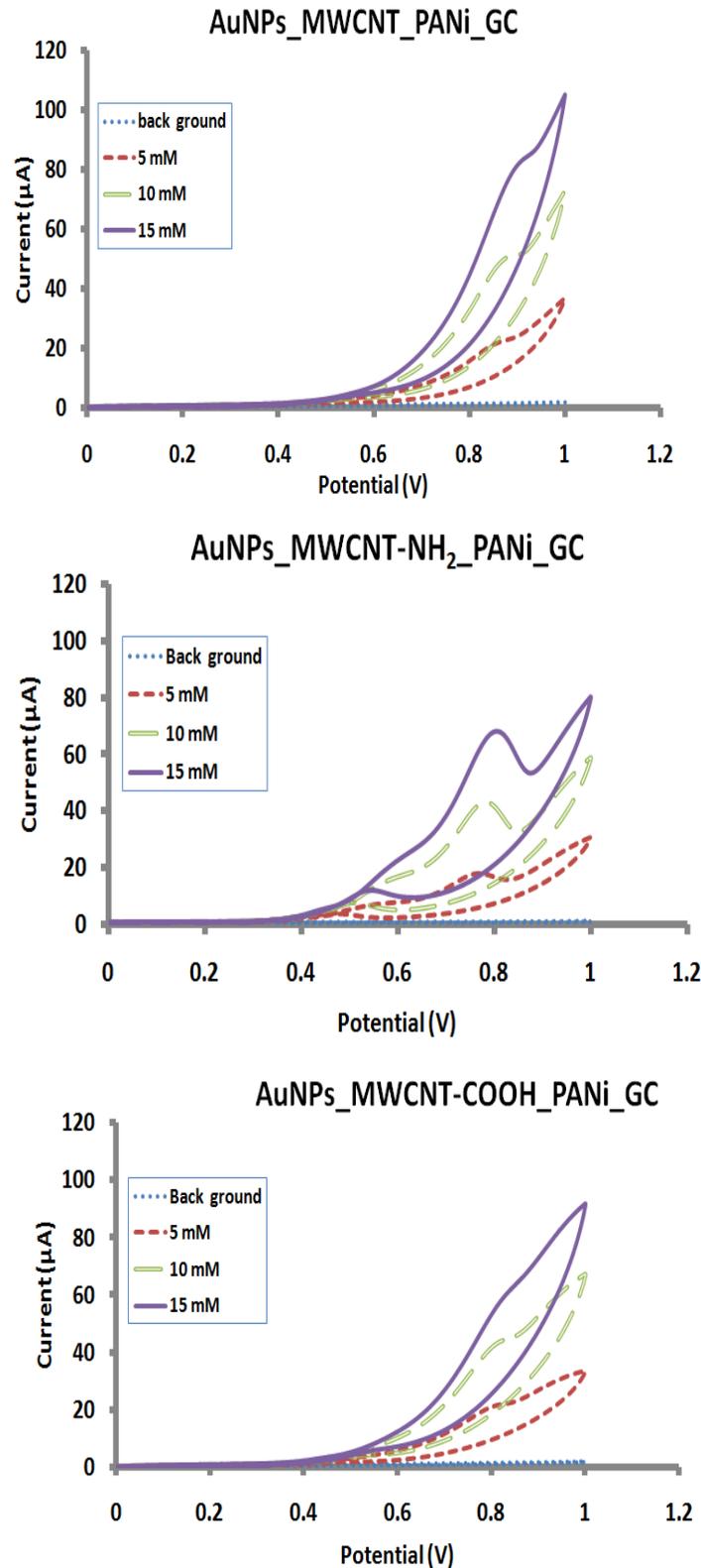
เมื่อพิจารณาผลจากแอมเพอร์โรแกรมจากรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าสัญญาณค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้า AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC มีสภาพไวที่ต่ำกว่าขั้วไฟฟ้า AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GC แต่มีความเสถียรมากกว่าสัญญาณที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้า AgNPs\_MWCNT\_PANi\_GCE ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.6 V และมีการกวาดตลอดเวลาด้วยอัตราเร็ว สัญญาณค่ากระแสที่วัดได้ในขั้นที่ 6 -7 (ประมาณ 800-1,000s) พบว่าสัญญาณค่ากระแสที่ได้จากขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วยอนุภาคทองนาโน (AuNPs) ให้สัญญาณที่เรียกว่าสัญญาณค่ากระแสที่ตรวจวัดได้ด้วยขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วยอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ขั้วไฟฟ้า AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC เหมาะสมในการพัฒนาเป็นซัลไฟต์เซนเซอร์มากกว่า

#### -การศึกษาหาชนิดของของมัลติวอลคาร์บอนนาโนทิวป์ (MWCNT) ที่เหมาะสม

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาหาองค์ประกอบและชนิดของอนุภาคโลหะนาโนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ พบว่าขั้วไฟฟ้าชนิด AuNPs\_MWCNT\_PANi\_GC เหมาะสมที่สุดการพัฒนาเป็นเซนเซอร์ ในการทดลองนี้จะศึกษาชนิดของมัลติวอลคาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาขั้วไฟฟ้าคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ศึกษา ได้แก่ MWCNT, MWCNT-NH<sub>2</sub> และ MWCNT-COOH

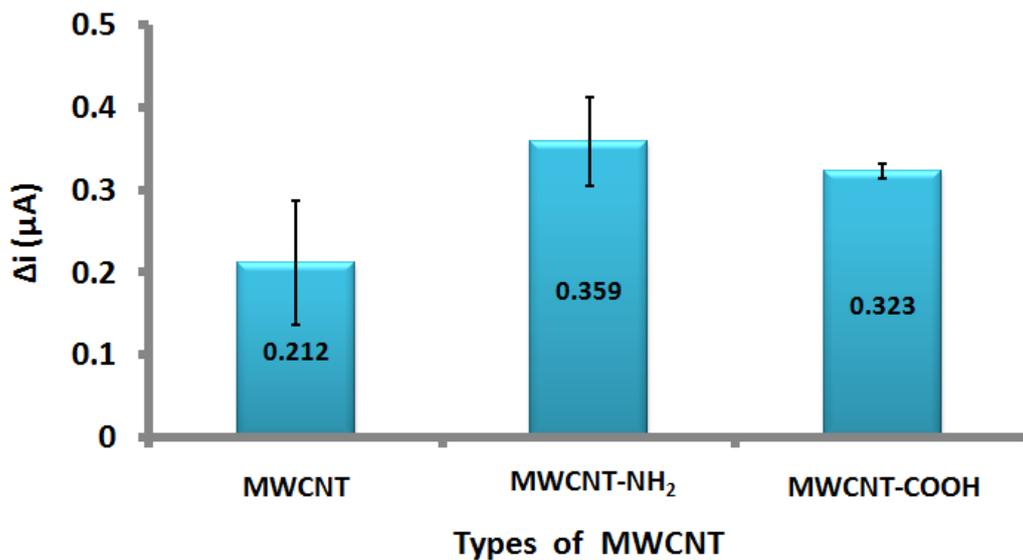
ผลการทดลองศึกษาหาชนิดของมัลติวอลคาร์บอนนาโนทิวป์ ที่เหมาะสมต่อการวัดปริมาณซัลไฟต์เซนเซอร์ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี แสดงได้ดังรูปที่ 4.4

เมื่อนำผลการทดลองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรม (รูปที่ 4.4) ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดฟีกแอโนดิก ( $E_{p,a}$ ) และค่ากระแสที่ศักย์ 0.6 V ( $i_{0.6V}$ ) จากผลการทดลองจะเห็นว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT ธรรมดา ซัลไฟต์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.85 V ในขณะที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT-NH<sub>2</sub> และ MWCNT-COOH ซัลไฟต์สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า คือ 0.80 V เมื่อพิจารณากระแสไฟฟ้าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ( $i_{0.6V}$ ) ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 15 mM ของขั้วไฟฟ้าทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่ากระแสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ที่ตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT-NH<sub>2</sub> ให้ค่ากระแสที่สูงที่สุด รองลงมาคือ MWCNT-COOH และ MWCNT โดยให้ค่ากระแสเท่ากับ 22.56, 12.33 และ 7.31  $\mu$ A ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 ไชคลิกโวลแทมโมแกรม ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5,10 และ 15 mM ที่ขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์โดยใช้วัสดวอลคาร์บอนนาโนทิวป์ชนิดต่าง ๆ (MWCNT, MWCNT-NH<sub>2</sub> และ MWCNT-COOH) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M อัตราเร็วในการสแกน 20 mV/s (RE : Ag/AgCl , AE : Pt)

จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในการตรวจวัดสัญญาณค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ เมื่อนำค่ากระแสเฉลี่ยที่ได้จากการตรวจวัดซัลไฟต์ 3 ซ้ำ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) มาเปรียบเทียบค่ากระแสที่ได้ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่โม่ติฟายด์จากมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงได้ดังกราฟแท่งรูปที่ 4.5

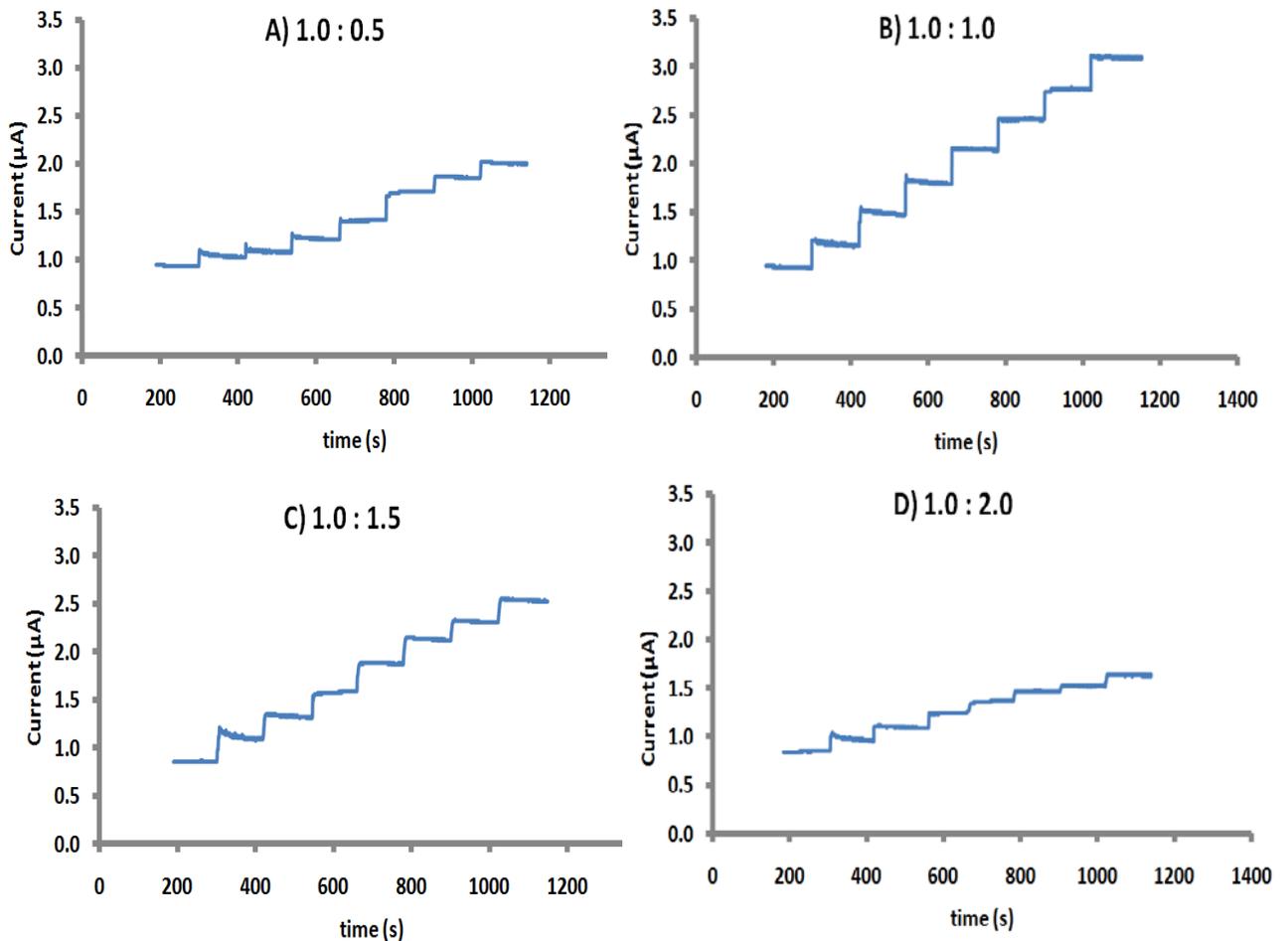


**รูปที่ 4.5** กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT ชนิดต่างๆ

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากแอมเพอร์โรแกรมและค่ากระแสเฉลี่ยที่แสดงดังกราฟแท่งในรูปที่ 4.5 พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT-NH<sub>2</sub> และ MWCNT-COOH ให้ค่ากระแสเฉลี่ยที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันคือ 0.350 และ 0.323 μA ตามลำดับ แต่ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ยในการตรวจวัดของขั้วไฟฟ้าที่โม่ติฟายด์ด้วย MWCNT-NH<sub>2</sub> มีค่าสูงกว่าขั้วไฟฟ้าที่โม่ติฟายด์ด้วย MWCNT-COOH ดังนั้นมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์คือ คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (MWCNT-COOH) ซึ่งช่วยให้สัญญาณค่ากระแสที่วัดได้มีความเสถียร เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์มากกว่าคาร์บอนนาโนทิวป์ชนิดอื่น

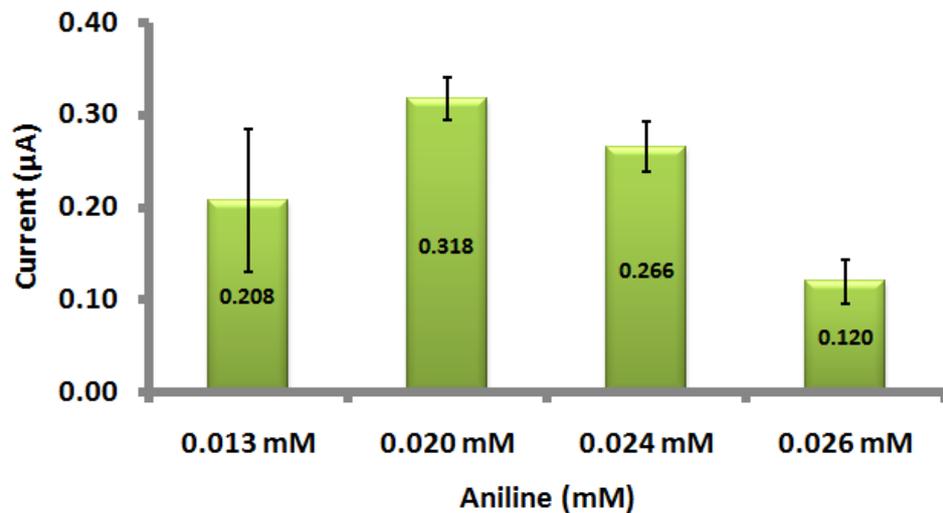
#### -การศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

ในการศึกษาหาปริมาณอะนิลีนที่เหมาะสมในการโม่ติฟายด์ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน จะใช้สารละลายผสมของ MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันแตกต่างกันดังนี้ 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 และ 1.0:2.0 ผลการทดลองศึกษาหาปริมาณของอะนิลีนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี แสดงได้ดังรูปที่ 4.6



**รูปที่ 4.6** แอมเพอร์โรแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1-7 mM ที่วัดได้จาก ขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วยสารละลาย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (A) 1.0:0.5, (B) 1.0:1.0, (C) 1.0:1.5 และ (D) 1.0:2.0 (ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M pH 7.0, RE : Ag/AgCl, AE : Pt)

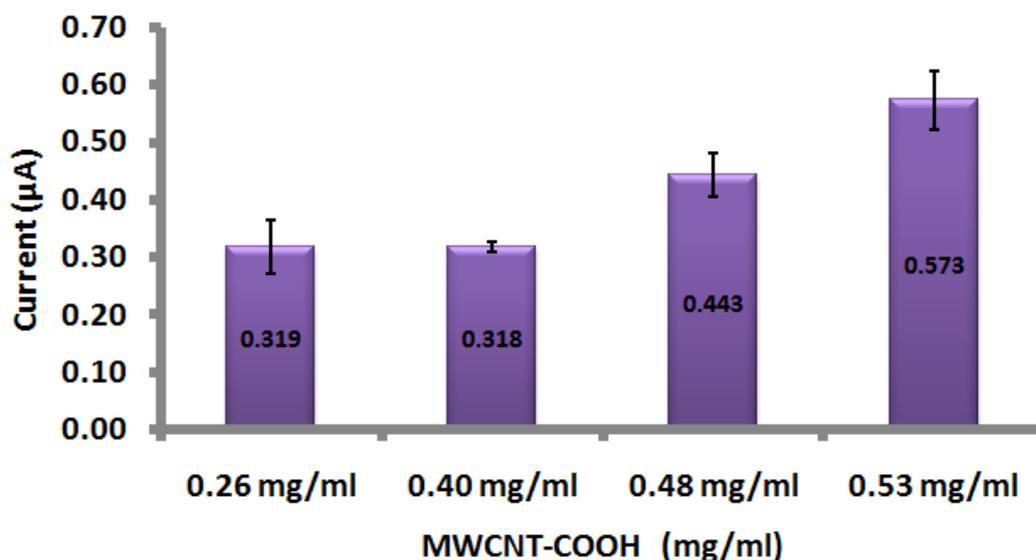
จากผลการทดลองในรูปที่ 4.6 เมื่อนำค่ากระแสที่ได้จากการที่ตรวจวัดโดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วย สารละลาย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันทั้ง 4 สภาวะ มาเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) มาเปรียบเทียบกับค่ากระแสที่ตรวจวัดซัลไฟต์ได้ ผลที่ได้แสดงดังกราฟแห่งรูปที่ 4.7



**รูปที่ 4.7** กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนต่างๆ โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของอะนิลีน

จากแอมเพอร์โรแกรม (รูปที่ 4.6) และค่ากระแสเฉลี่ยที่แสดงดังกราฟแท่งในรูปที่ 4.7 พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ขั้วไฟฟ้า (B) ที่มีอัตราส่วนระหว่าง MWCNT-COOH:aniline (1.0:1.0) ซึ่งมีปริมาณของอะนิลีน (aniline) อยู่ 0.02 mM ให้ค่ากระแสเฉลี่ย 0.318  $\mu\text{A}$  ซึ่งมีค่าสูงกว่าขั้วไฟฟ้า (A), (C) และ (D) แสดงให้เห็นว่าปริมาณของอะนิลีนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนคือ ในอัตราส่วนระหว่าง MWCNT-COOH:aniline (1.0:1.0) ซึ่งมีปริมาณของอะนิลีนอยู่ 0.02 mM ช่วยให้อัตราส่วนค่ากระแสที่วัดได้มีค่าสูง และมีความเสถียรดี

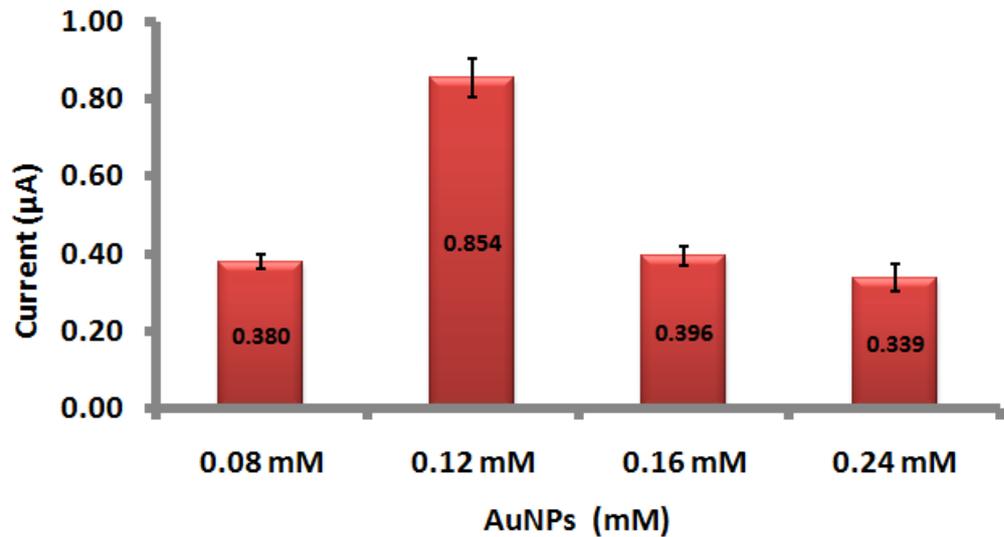
ในการศึกษาปริมาณของ MWCNT-COOH ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน โดยจะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วยสารละลายผสมระหว่าง MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันดังนี้ 0.5:1.0, 1.0:1.0, 1.5:1.0 และ 2.0:1.0 จากผลการทดลองศึกษาหาปริมาณของ MWCNT-COOH ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี เมื่อนำค่ากระแสที่ได้จากการที่ตรวจวัดโดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วยสารละลาย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันทั้ง 4 สภาวะ มาเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) มาเปรียบเทียบค่ากระแสที่ตรวจวัดซัลไฟต์ได้ ผลที่ได้แสดงดังกราฟแท่งรูปที่ 4.8



**รูปที่ 4.8** กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของ MWCNT-COOH

เมื่อพิจารณาค่ากระแสเฉลี่ยที่แสดงดังกราฟแท่งในรูปที่ 4.8 พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ขั้วไฟฟ้า (D) ให้ค่ากระแสเฉลี่ยสูงที่สุด แต่มีค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ยที่สูงกว่าค่ากระแสที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้า (C) ซึ่งให้ค่ากระแสเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน ขั้วไฟฟ้า (C) ที่มีอัตราส่วนระหว่าง MWCNT-COOH:aniline (1.5:1.0) ซึ่งมีปริมาณของ MWCNT-COOH อยู่ 0.48 mg/mL ช่วยให้อัตราส่วนค่ากระแสที่ที่ตรวจวัดได้มีความเสถียร เป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ได้ดีที่สุด

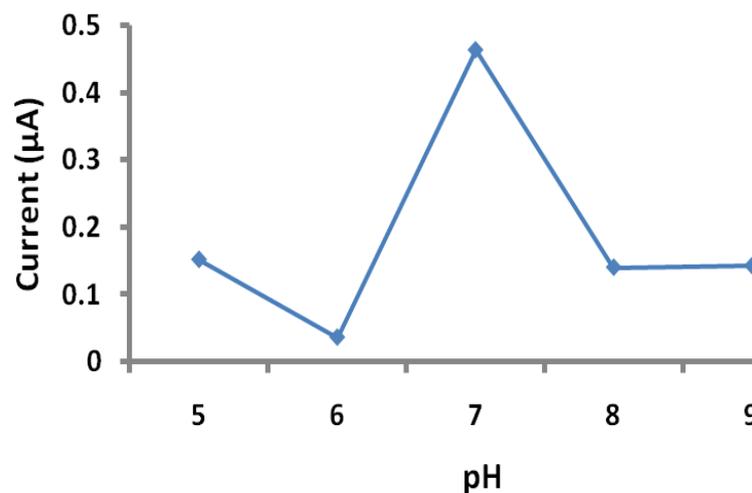
ในการศึกษาปริมาณของอนุภาคทองนาโนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน โดยศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วยสารละลายที่มีปริมาณของอนุภาคทองนาโนแตกต่างกันดังนี้ 0.08, 0.12, 0.16, และ 0.24 mM ผลการทดลองศึกษาหาปริมาณของอนุภาคทองนาโน (AuNPs) ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี เมื่อนำค่ากระแสที่ได้จากการที่ตรวจวัดโดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่โมดิฟายด์ด้วยสารละลายอนุภาคทองนาโน (AuNPs) ความเข้มข้นที่แตกต่างกันทั้ง 4 สถานะ มาเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) มาเปรียบเทียบค่ากระแสที่ตรวจวัดซัลไฟต์ได้ ผลที่ได้แสดงดังกราฟแท่งรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่โม่ติพายด์ด้วยอนุภาคทองคำนาโนในปริมาณต่างกัน

เมื่อพิจารณาค่ากระแสเฉลี่ยที่แสดงดังกราฟแท่งในรูปที่ 4.9 พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V ขั้วไฟฟ้า (B) ซึ่งมีปริมาณ AuNPs อยู่ 0.12 mM ให้ค่ากระแสเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.854  $\mu\text{A}$  ดังนั้นปริมาณของอนุภาคนาโนทองคำ (AuNPs) 0.12 mM เหมาะสมต่อการพัฒนาขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนสำหรับวิเคราะห์ซัลไฟต์มากที่สุด

ในการศึกษาช่วง pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนืดในการตรวจวัดซัลไฟต์ที่ใช้ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเป็นตัวตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มี pH 5.0 , 6.0 , 7.0 , 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนืด ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10



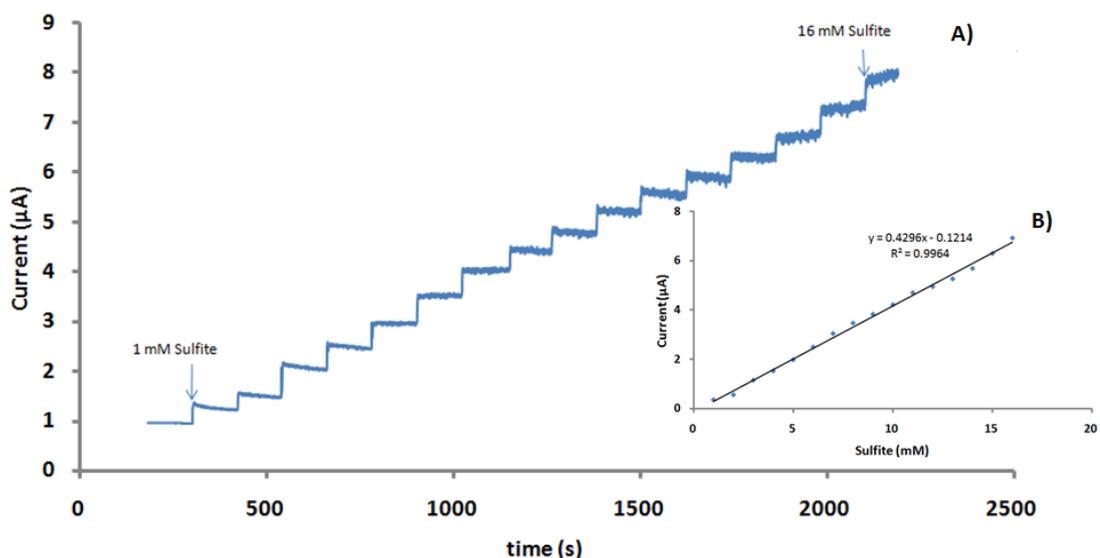
รูปที่ 4.10 แสดงค่ากระแสเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 1 mM ที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M ที่มีค่า pH ต่างกันเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนืด

จากผลการทดลองดังรูปที่ 3.10 จะเห็นได้ว่าสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M ที่ pH 7.0 สามารถตรวจวัดค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 1 mM ได้สูงที่สุดคือ 0.463  $\mu\text{A}$  ดังนั้น ค่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนืดในการตรวจวัดซัลไฟต์ที่ใช้ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเป็นตัวตรวจวัด คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M

#### -การศึกษาคุณลักษณะของซัลไฟต์เซนเซอร์

จากการทดลองและคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ โดยในการทดลองได้ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ จำนวน 5 ขั้ว ค่าความหนาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.0927 mM มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.12 ( $n = 5$ ) แสดงให้เห็นว่าซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาได้มีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงระดับมิลลิโมลาร์ และมีความเที่ยงตรง

จากการศึกษาการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11



**รูปที่ 4.11** แอมเพอร์โรแกรม แสดงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของซัลไฟต์ ที่ได้จากการเติมสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1 – 16 mM รูป A) รูปสัญญาณแอมเพอร์โรแกรม รูป B) แสดงกราฟมาตรฐานและสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของซัลไฟต์

จากรูปที่ 4.11 แสดงสัญญาณที่ได้จากการใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในการหาช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1 – 16 mM เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์กับค่ากระแส (ดังรูป B) ได้สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.4296x - 0.1214$  ( $r^2 = 0.9964$ )

ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีผลต่อระบบการวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ได้พัฒนาขึ้น โดยสารละลายมาตรฐานของตัวรบกวนที่ทำการศึกษาได้แก่ ascorbic acid, sodium sulfate, sodium nitrate และ potassium iodide ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองแอมเพอร์โรแกรม นำสัญญาณค่ากระแสที่ได้จากการทดลองตรวจวัดสารละลายผสมที่เติมตัวรบกวนที่ความเข้มข้นต่างๆมาเปรียบเทียบกับสัญญาณกระแสที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ไม่มีตัวรบกวน ถ้าสัญญาณกระแสที่ตรวจวัดได้มีความแตกต่างกัน  $\pm 5\%$  แสดงว่ามีการรบกวนของสารตัวรบกวนที่เติมลงไปต่อระบบการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

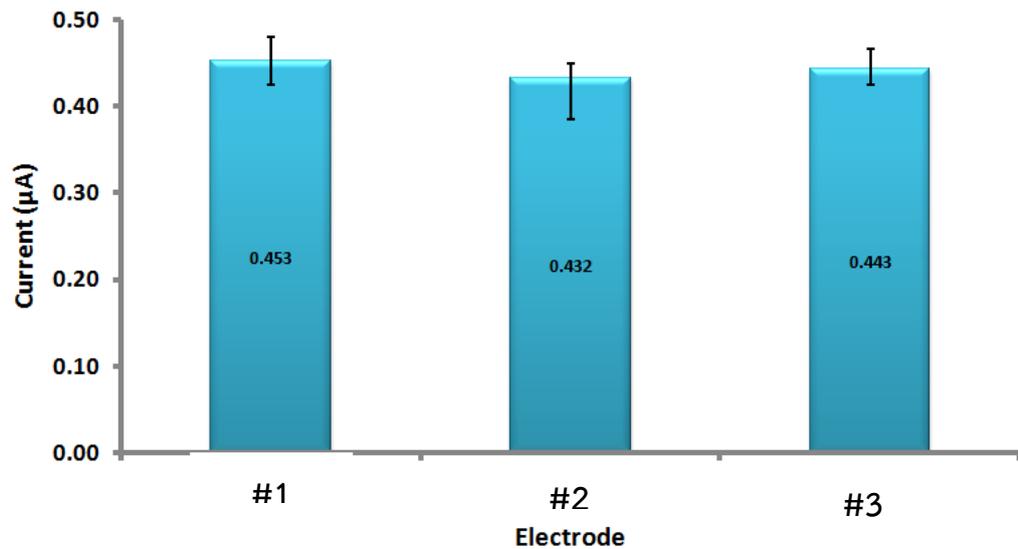
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาผลของตัวรบกวน

ตัวรบกวน	ช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (mM)	Tolerance limit <sup>a</sup> (mM)
ascorbic acid	0.01 – 0.15	0.05 <sup>a</sup>
sodium sulfate	1.00 – 50.00	10.00 <sup>a</sup>
sodium nitrate	0.10 – 50.00	20.00 <sup>a</sup>
potassium iodide	0.01 – 0.30	0.20 <sup>a</sup>

Tolerance limit<sup>a</sup> พิจารณา จากสัญญาณการเปลี่ยนแปลงค่ากระแส  $\pm 5\%$

จากตารางที่ 4.2 พบว่าตัวรบกวนที่ทำการศึกษา ได้แก่ ascorbic acid , sodium sulfate , sodium nitrate และ potassium iodide มีการรบกวนต่อระบบการวิเคราะห์ โดยมี Tolerance limit คือ 0.05 , 10.00 , 20.00 และ 0.20 mM ตามลำดับ สำหรับ ascorbic acid ที่มี Tolerance limit ต่ำ มีค่าเพียง 0.05 mM อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารนี้เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ใกล้เคียงกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ จึงทำให้เกิดการรบกวนการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ สำหรับ potassium iodide ซึ่งเป็นสารอิเล็กโทรไลต์ การรบกวนต่อระบบการวิเคราะห์อาจเกิดเนื่องจาก เมื่อละลายในตัวทำละลายจะแตกตัวเป็นไอออนบวก ( $K^+$ ) และไอออนลบ ( $I^-$ ) ทำให้สามารถนำไฟฟ้าได้ ซึ่งอาจมีผลต่อสัญญาณค่ากระแสที่ตรวจวัดได้

ในการศึกษาความเที่ยงของการทำซ้ำ (reproducibility) ของซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาจากผลการทดลองตรวจวัดซัลไฟต์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี ที่วัดสัญญาณค่ากระแสของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1 mM จำนวน 3 ซ้ำ จากแอมเพอร์โรแกรมที่ได้สามารถหาค่ากระแสเฉลี่ยและนำมาสร้างเป็นกราฟแท่งเพื่อเปรียบเทียบค่ากระแสที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้าทั้ง 3 ขั้ว แสดงดัง รูปที่ 4.12



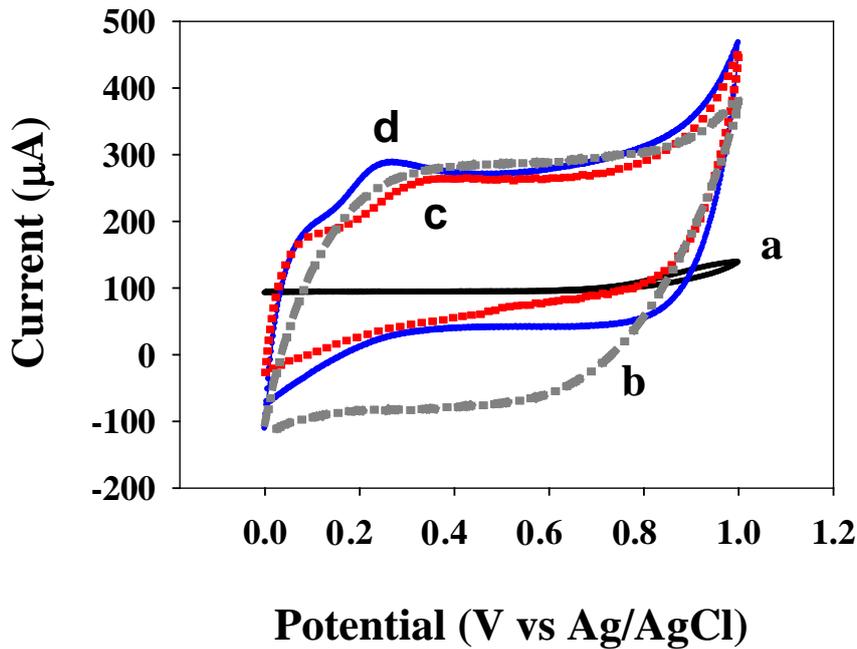
**รูปที่ 4.12** แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบค่ากระแสของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้า ที่ใช้สำหรับศึกษาช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง และศึกษาตัวรบกวน

จากรูปที่ 4.12 แสดงค่ากระแสเฉลี่ยที่ได้จากการตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าทั้ง 3 ขั้ว ที่เตรียมขึ้นโดยใช้วิธีการเดียวกัน ให้ค่ากระแสที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.453, 0.432 และ 0.443  $\mu\text{A}$  ตามลำดับ เมื่อนำค่ากระแสเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการศึกษาความเที่ยงของการทำซ้ำของซัลไฟต์เซนเซอร์ (reproducibility) ที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ 2.37

4.2 ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์-พีดีดีเอ-อนุภาคทองนาโน

#### -การศึกษาหองค์ประกอบที่เหมาะสม

การศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ โดยดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนด้วยวิธีการ drop casting จากการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 4 mM โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วยองค์ประกอบที่ต่างกันทั้ง 4 ชนิด (a-d) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13

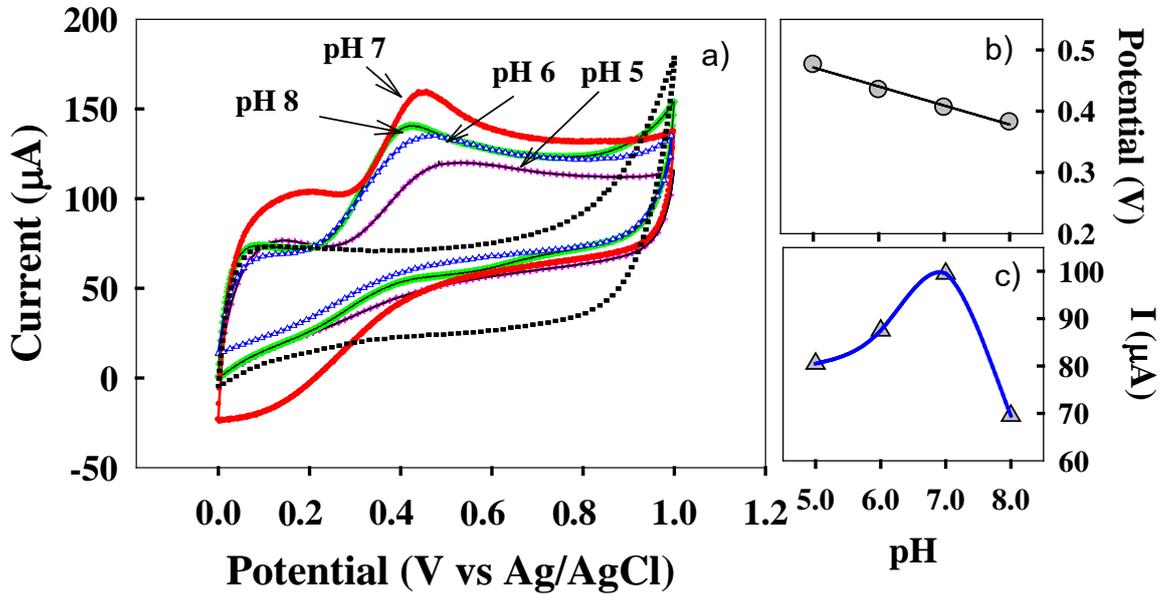


รูปที่ 4.13 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 4 mM ที่ขั้วไฟฟ้าแต่ละชนิด (a) กลาสซีคาร์บอน (GC), (b) CNTs/GC, (c) CNTs-PDDA/GC และ (d) CNTs-PDDA-AuNPs/GC โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M (pH 7.0) เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน, อัตราเร็วในการสแกน  $50 \text{ mVs}^{-1}$

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากไชคคลิกโวลแทมโมแกรมในรูป 4.13 จะเห็นว่าที่ขั้วไฟฟ้า (a) กลาสซีคาร์บอน ปฏิกริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์เกิดที่ศักย์ไฟฟ้าสูง (ประมาณ 0.85 V) ในขณะที่ ขั้วไฟฟ้า (b) CNTs/GC (c) CNTs-PDDA/GC และ (d) CNTs-PDDA-AuNPs/GC ให้ค่ายอดฟิสิกส์แอโนดิกศักย์ไฟฟ้า 0.40, 0.33 และ 0.25 V ตามลำดับ ขั้วไฟฟ้า CNTs-PDDA/GC และ CNTs-PDDA-AuNPs/GC ทำให้ปฏิกริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์เกิดที่ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำลง 0.45 และ 0.52 V ตามลำดับเมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้างลาสซีคาร์บอนธรรมดา นอกจากนี้สัญญาณของค่ากระแสแอโนดิกที่ได้จาก ขั้วไฟฟ้า CNTs/GC, CNTs-PDDA/GC และ CNTs-PDDA-AuNPs/GC มีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับขั้วไฟฟ้างลาสซีคาร์บอนธรรมดา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CNTs ส่งเสริมให้การถ่ายเทอิเล็กตรอนเกิดได้ดีขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติการนำไฟฟ้าที่ดี มีพื้นที่ผิวสูง และมีความทนทานต่อปฏิกริยาเคมี ส่วน CNTs-PDDA มีบทบาทในการเร่งปฏิกริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ให้ได้ดีที่ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำลง และ CNTs-PDDA-AuNPs มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกริยามากกว่า CNTs-PDDA เนื่องจาก AuNPs ซึ่งมีคุณสมบัติคือมีสภาพนำไฟฟ้าที่สูง มีพื้นที่ผิวมากทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ดียิ่งขึ้น จากผลการทดลอง ขั้วไฟฟ้า CNTs-PDDA-AuNPs/GC จึงเป็นขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปวัดปริมาณซัลไฟต์

ในการศึกษา pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนในการตรวจวัดซัลไฟต์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรีวัดค่ากระแสของซัลไฟต์ความ

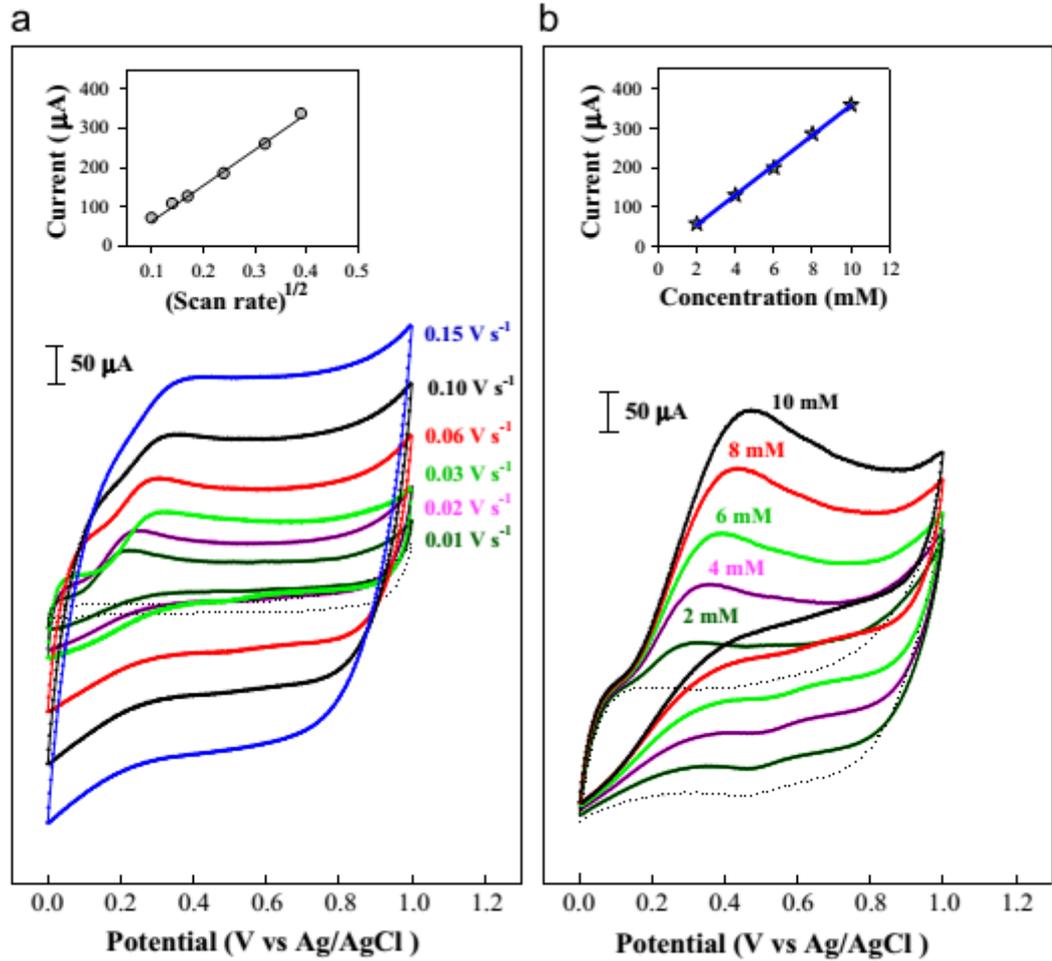
เข้มข้น 4 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 (a) โวลแทมโกรมไซคลิกที่ได้จากการวัดค่ากระแสไฟฟ้าสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 2 mM ที่มีค่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ที่ต่างกัน (b) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณศักย์ไฟฟ้ากับค่า pH และ (c) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณค่ากระแสกับค่า pH

ผลการทดลองจากรูปที่ 4.14 พบว่าเมื่อพีเอชของสารละลายสูงขึ้นพบว่าเมื่อพีเอชของสารละลายสูงขึ้นซัลไฟต์สามารถเกิดออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำลง ส่วนค่ากระแสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อพีเอชสารละลายสูงขึ้นจนถึงพีเอช 7.0 และค่ากระแสจะลดลงเมื่อพีเอชของสารละลายมากกว่า 7.0 จากการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าพีเอชของสารละลายมีผลต่อการทำงานของนาโนคอมโพสิตบนซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น และค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ให้ค่ากระแสสูงสุดคือพีเอช 7.0 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกค่าพีเอช 7.0 เป็นพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสม

ในการศึกษาผลของอัตราเร็วในการสแกนต่อโวลแทมโกรมไซคลิกเพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่ผิวของขั้วไฟฟ้าใช้งาน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.15a พบว่าเมื่อใช้อัตราเร็วในการสแกนที่สูงขึ้น ค่ากระแสที่ได้มีค่าสูงขึ้น โดยเมื่อนำค่ากระแสที่ยอดแอโนดิกมาพลอตกับค่าสแควร์รุตของอัตราเร็วในการสแกน (ดังภาพแทรกในรูป 4.15a) จะได้กราฟที่มีความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรง ( $r^2 = 0.996$ ) แสดงว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นถูกควบคุมจากกระบวนการแพร่ (diffusion control process) และไม่เกิดการดูดซับที่ผิวขั้วไฟฟ้าใช้งาน CNTs-PDDA-AuNPs/GC ที่พัฒนาขึ้น



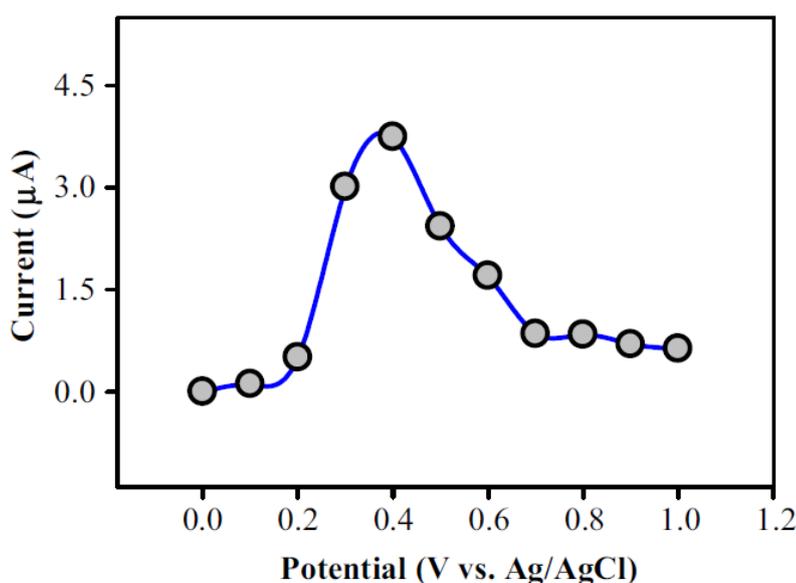
รูปที่ 4.15 a) โวลแทมโมแกรมของซัลไฟต์ ความเข้มข้น 2mM ที่อัตราเร็วในการสแกนค่าต่างๆ (0.01- 0.15 Vs<sup>-1</sup>) และ b) ที่อัตราเร็วในการสแกน 0.05 Vs<sup>-1</sup> เมื่อมีของซัลไฟต์ความเข้มข้น 2-10 mM

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.15b จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซัลไฟต์จะได้ค่ากระแสที่สูงขึ้น เมื่อนำค่ากระแสที่ได้มาพล็อตกับค่าความเข้มข้นของซัลไฟต์ (ดังรูปแทรก 3.15b) พบว่าค่ากระแสแปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของซัลไฟต์ ( $r^2=0.999$ ) แสดงว่าขั้วไฟฟ้าใช้งาน CNTs-PDDA-AuNPs/GC ที่พัฒนาขึ้นเหมาะสมสำหรับ นำมาตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์

-แอมเพอร์โรเมทรีที่ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) ในระบบที่มีการไหล

#### การศึกษาหาคักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมใน

การนำเทคนิคโพลินเจกชันมาใช้ร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) จะทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดซัลไฟต์ ในการศึกษาหาคักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัดซัลไฟต์ที่ซัลไฟต์เซนเซอร์ผลการทดลองดังรูปที่ 4.16

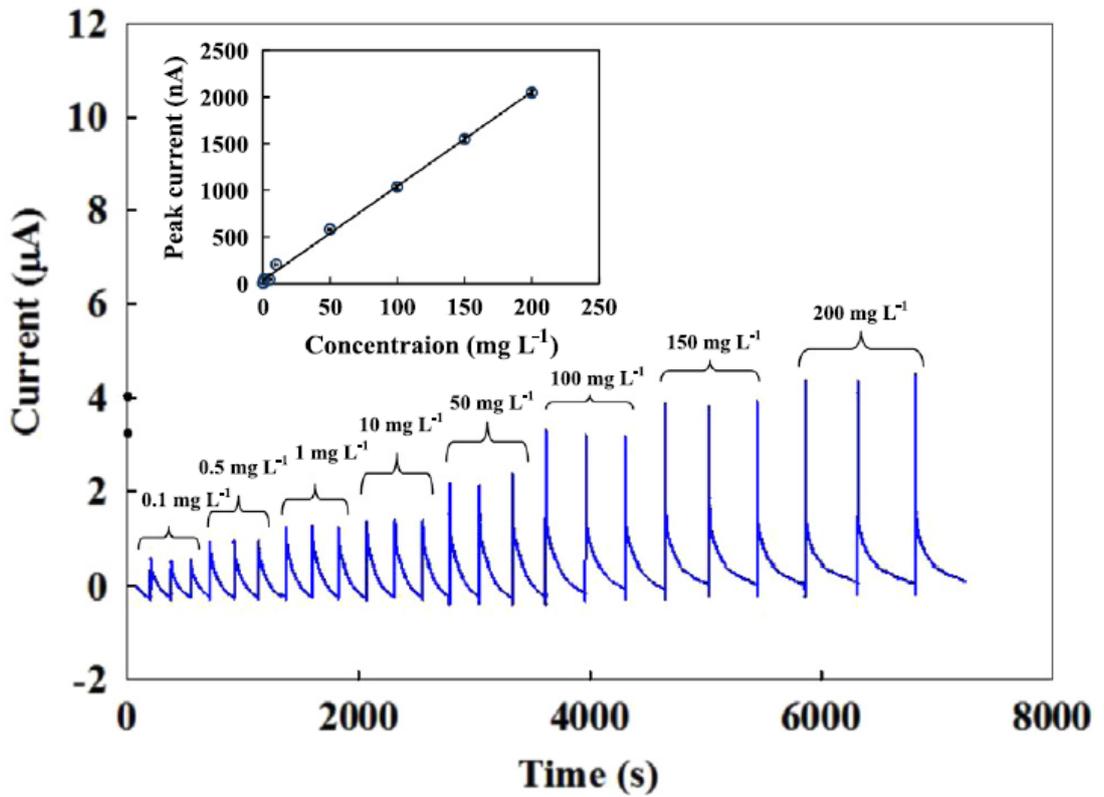


**รูปที่ 4.16** ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์กับศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) ในระบบโพลินเจกชัน

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.16 พบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.0 ถึง +0.4 โวลต์ ค่ากระแสที่ได้จะเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองที่ดีขึ้นของซัลไฟต์เซนเซอร์ที่ถูกควบคุมโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ที่เกิดขึ้น ทำให้ค่ากระแสที่ได้เพิ่มมากขึ้น และเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้ามากกว่า +0.4 โวลต์ ค่ากระแสจะลดลง โดยที่ศักย์ไฟฟ้าที่ +0.4 โวลต์ จะให้ค่ากระแสสูงสุด จึงเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัดการตอบสนองของซัลไฟต์เซนเซอร์

#### คุณลักษณะของซัลไฟต์เซนเซอร์

ได้ทดลองเพื่อหาคุณลักษณะของระบบโพลินเจกชันอะนาไลซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17



**รูปที่ 4.17** ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโพลีเมอร์อินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PPDA-AuNPs/GC) ได้พัฒนาขึ้น ศักย์ไฟฟ้าในการวัด: +0.4 V (เทียบกับ Ag/AgCl), สารละลายตัวพา: ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0, อัตราการไหล: 1.0 mL.min<sup>-1</sup>

ในการศึกษาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น พบว่ากราฟมาตรฐานของซัลไฟต์มีการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 200 mg.mL<sup>-1</sup> ค่าความชันเท่ากับ 10.054 นาโนแอมแปร์ต่อ mg/mL ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r^2$ ) เท่ากับ 0.998

ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (detection limit) มีค่าเท่ากับ 0.03 mg.mL<sup>-1</sup> ( $3\sigma$ ) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดมีความเที่ยง (precision) ต่ำมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.5 (วัดจากสัญญาณของซัลไฟต์ความเข้มข้น mg/mL,  $n = 10$ ) และสามารถวิเคราะห์ได้ 23 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงที่เหมาะสมและอาจเป็นประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ในเครื่องดื่มเช่น ไวน์ น้ำผลไม้ เป็นต้น

**การศึกษาผลของตัวรบกวนและการประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริง**

ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีผลต่อระบบการวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่พัฒนาขึ้น ตัวรบกวนที่ทำการศึกษาได้แก่ fructose, glucose, sucrose, ethanol, sodium nitrate, sodium sulfate, potassium chloride และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำผลการทดลองของเอฟไอแอมแกรมที่ได้

จากการทดลองตรวจวัดสารละลายผสมที่เติมตัวรบกวนที่ความเข้มข้นต่างๆมาเปรียบเทียบกับสัญญาณกระแสที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ไม่มีตัวรบกวน ถ้าสัญญาณกระแสที่ตรวจวัดได้มีความแตกต่างกัน  $\pm 5\%$  แสดงว่ามีการรบกวนของสารตัวรบกวนที่เติมลงไปต่อระบบการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

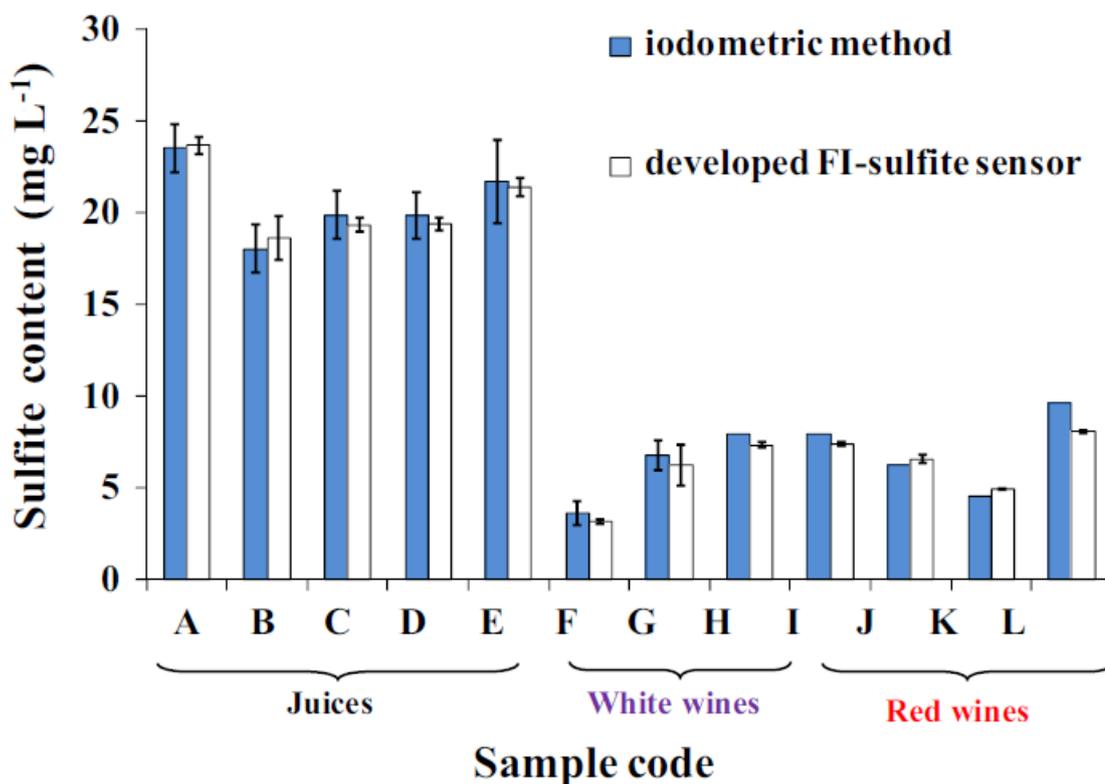
**ตารางที่ 4.3** แสดงผลการศึกษาผลของตัวรบกวน เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 10 mg/mL (n=3)

Foreign species/added as	Results <sup>a</sup>
Fructose	Does not interfere (Studied up to 1,000 mg L <sup>-1</sup> )
Glucose	
Sucrose	
Ethanol/C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NaNO <sub>3</sub>	
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Cl <sup>-</sup> /NaCl	
Ascorbic acid/C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Interfere (at 50 mg L <sup>-1</sup> )

<sup>a</sup> พิจารณาจากสัญญาณการเปลี่ยนแปลงสัญญาณค่ากระแส  $\pm 5\%$

จากตารางที่ 4.4 พบว่าตัวรบกวนที่ทำการศึกษาทั้ง 8 ชนิด มีตัวรบกวน 5 ชนิดได้แก่ fructose, glucose, sucrose, ethanol, sodium nitrate, sodium sulfate และ potassium chloride ที่ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบการวิเคราะห์ (แม้จะมีความเข้มข้นที่สูงถึง 1,000 mg/mL) ส่วน ascorbic acid รบกวนการวิเคราะห์โดยให้ค่า Tolerance limit เท่ากับ 50 mg/L

ประเมินประสิทธิภาพของระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วซัลไฟต์เซนต์เซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) โดยการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่งน้ำผลไม้ (A-E) ตัวอย่างไวน์ขาว (F-H) และไวน์แดง (I-L) นำผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากระบบโพลีอินเจกชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วซัลไฟต์เซนต์เซอร์ที่พัฒนาขึ้น มาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานได้แก่ วิธีวัดแบบไอโอดิเมทรี (Iodometry) พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ของปริมาณซัลไฟต์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำผลไม้ (A-E) ตัวอย่างไวน์ขาว (F-H) และไวน์แดง (I-L) จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโพลีเมอร์เจกซ์อะนาไลซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชีวไฟฟ้า CNTs-PDDA-AuNPs/GC และวิธีวิธีมาตรฐานแบบไอโอดิเมทรี (ตัวอย่างละ 3 replicate)

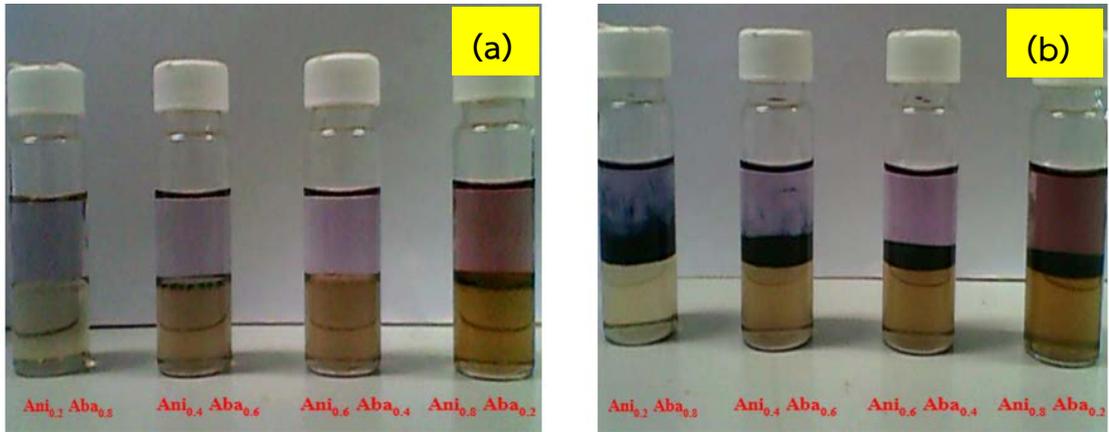
จากการทดลองพบว่าปริมาณซัลไฟต์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำผลไม้ (A-E) ตัวอย่างไวน์ขาว (F-H) และไวน์แดง (I-L) จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโพลีเมอร์เจกซ์อะนาไลซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ชีวไฟฟ้า CNTs-PDDA-AuNPs/GC ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคมาตรฐาน (Iodometric method) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $t_{\text{observed}} = 1.7276$ , เมื่อ  $t_{\text{critical}} = 2.2009$ )

### 4.3 การเตรียมชีวไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

#### 4.1.3.1 การสังเคราะห์ p(Ani-co-o-Aba)

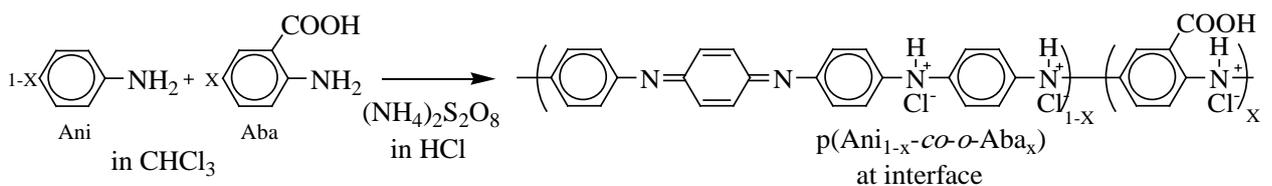
การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ด้วยวิธี Interfacial copolymerization จากสารละลายผสมของ aniline (Ani) และ o-aminobenzoic acid (o-Aba) ในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยคลอโรฟอร์ม (CHCl<sub>3</sub>) โดยใช้อัตราส่วนโมลของมอนอเมอร์ 0.8:0.2, 0.6:0.4, 0.4:0.6 และ 0.2:0.8 ตามลำดับ และใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ซึ่งละลายในตัวทำละลายน้ำเป็นตัวริเริ่ม (initiator) เพื่อให้

เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบอนุมูลอิสระ (radical polymerization) เมื่อได้ตะกอนของโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) แล้ว ให้ล้างตะกอนของ p(Ani-co-o-Aba) ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลาย HCl น้ำปราศจากไอออน (DI H<sub>2</sub>O) และเอทานอล ตามลำดับ เพื่อกำจัดมอนอเมอร์และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ออกไป แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จะได้โคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ตามที่ต้องการ โดยยิ่งเพิ่มปริมาณ aminobenzoic acid (o-Aba) ในโคพอลิเมอร์ ยิ่งทำให้โคพอลิเมอร์ที่ได้มีสีน้ำตาลเหลืองมากเท่านั้น



รูปที่ 4.19 สารละลายผสม p(Ani-co-o-Aba) ในอัตราส่วนต่างๆ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินผ่านไป (a) 1 นาที และ (b) 10 นาที

จากกระบวนการที่เกิดขึ้น คณะผู้วิจัยจึงขอนำเสนอสมการปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของ aniline (Ani) และ o-aminobenzoic acid (o-Aba) ที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

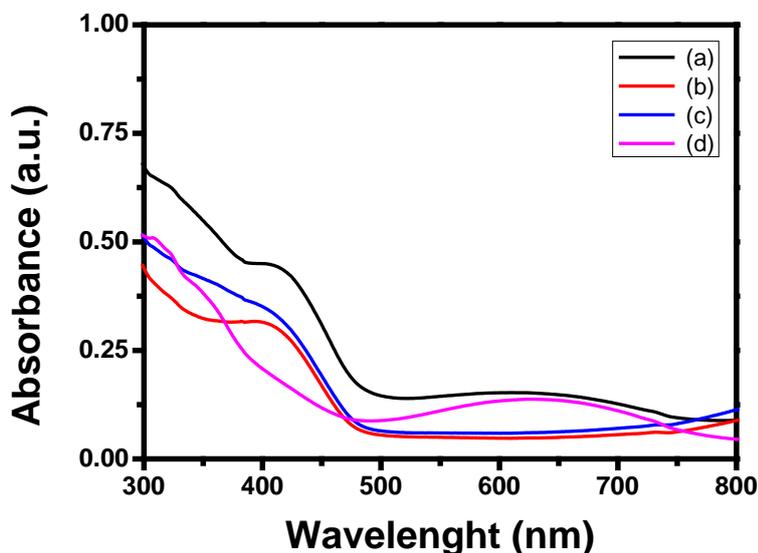


รูปที่ 4.20 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของ aniline (Ani) และ o-aminobenzoic acid (o-Aba) ด้วยวิธี Interfacial copolymerization เมื่อ x (0 ≤ x ≤ 1) เป็นอัตราส่วนโมลของ o-Aba ในโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba)

**การวิเคราะห์เอกลักษณ์**

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic acid group) เป็นองค์ประกอบ คณะผู้วิจัยสามารถศึกษาคุณสมบัติของการดูดกลืนแสงโดยละลายในตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวได้ เช่น ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamid: DMF) หรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์

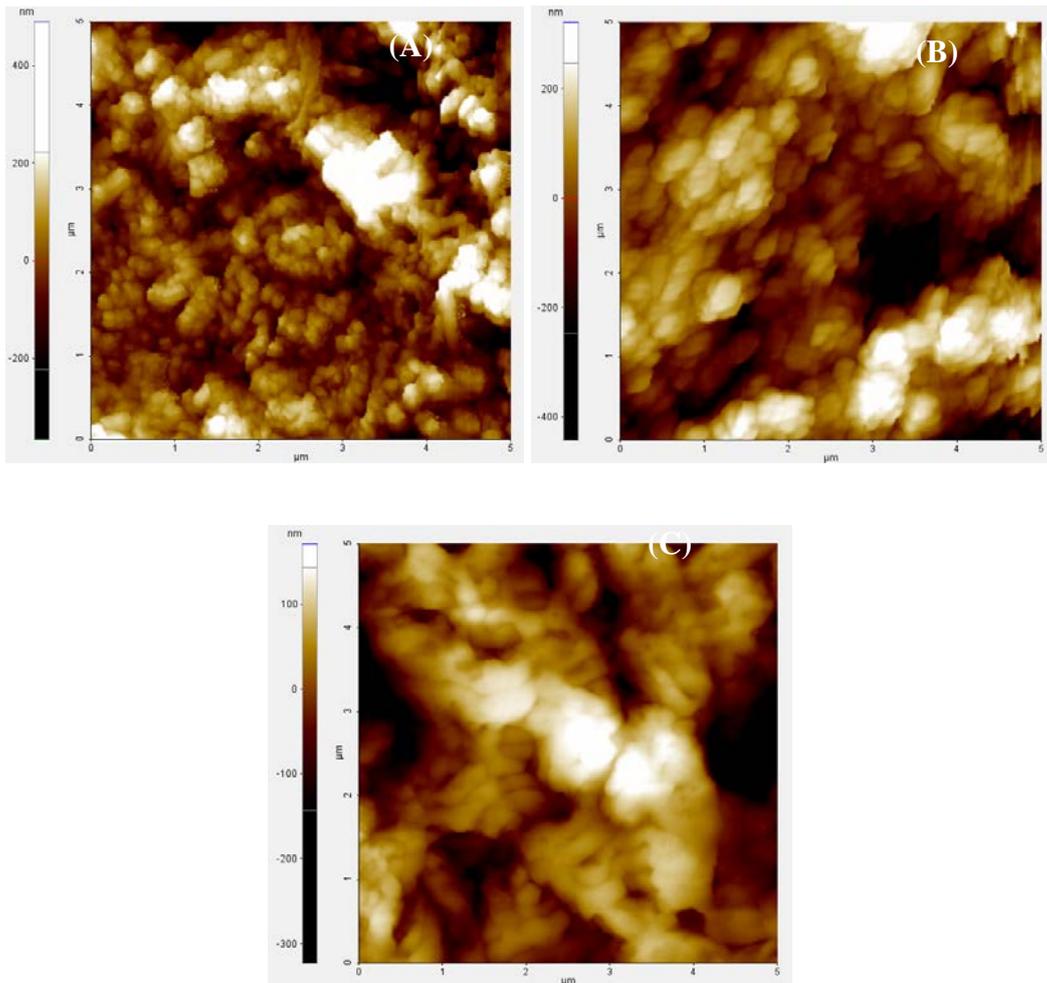
(dimethyl sulfoxide: DMSO) ในการทดลองนี้ คณะผู้วิจัยได้นำโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ในแต่ละอัตราส่วนที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วย DMSO (dimethyl sulfoxide) จากนั้น นำไปศึกษาการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Perkin Elmer Lambda25 UV-Visible spectrophotometer ด้วย quartz cuvette (10 x 10 mm, Hellma Analytics) จากนั้นสแกนในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 300 ถึง 800 nm



รูปที่ 4.21 UV-visible spectra ของ p(Ani-co-o-Aba) ในแต่ละอัตราส่วนที่สังเคราะห์ได้ (a) 0.2, (b) 0.4, (c) 0.6 and (d) 0.8 mol ของ o-Aba ต่อ Ani

เมื่อพิจารณา UV-visible spectra ที่ได้จาก p(Ani-co-o-Aba) ในแต่ละอัตราส่วน พบช่วงการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ซึ่งเป็นลักษณะการดูดกลืนแสงของพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิอินนิน และสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมา เมื่อเพิ่มปริมาณ aminobenzoic acid (o-Aba) ในโคพอลิเมอร์ คณะผู้วิจัยพบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 390 nm ซึ่งเป็นกระบวนการ  $\pi-\pi^*$  ของระบบวงเบนซีน (benzenoid ring) นอกจากนี้ยังพบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 620 nm ของกระบวนการ  $n-\pi^*$  ของอิเล็กตรอนคูโดดเดี่ยวบนอะตอมไนโตรเจนซึ่งเป็นระดับออร์บิทัลสูงสุดที่มีอิเล็กตรอนครอบครองอยู่ (HOMO) ไปยัง  $\pi^*$  ซึ่งเป็นระดับออร์บิทัลต่ำสุดที่ไม่มีอิเล็กตรอนครอบครองอยู่ (LOMO) [28]

เมื่อนำขั้วไฟฟ้า p(Ani-co-o-Aba)/GCE, HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE และ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE ไปศึกษาลักษณะของพื้นผิวด้วยเครื่อง Atomic force microscope (AFM, Park Systems Corp., Korea) ที่ควบคุมการสแกนด้วย XEI software จากนั้นทำการสแกนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยการสุมในพื้นที่สแกน 5x5  $\mu\text{m}$  จากนั้น นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ลักษณะของพื้นผิวโดยพิจารณาจากแถบบอกระดับความสูง



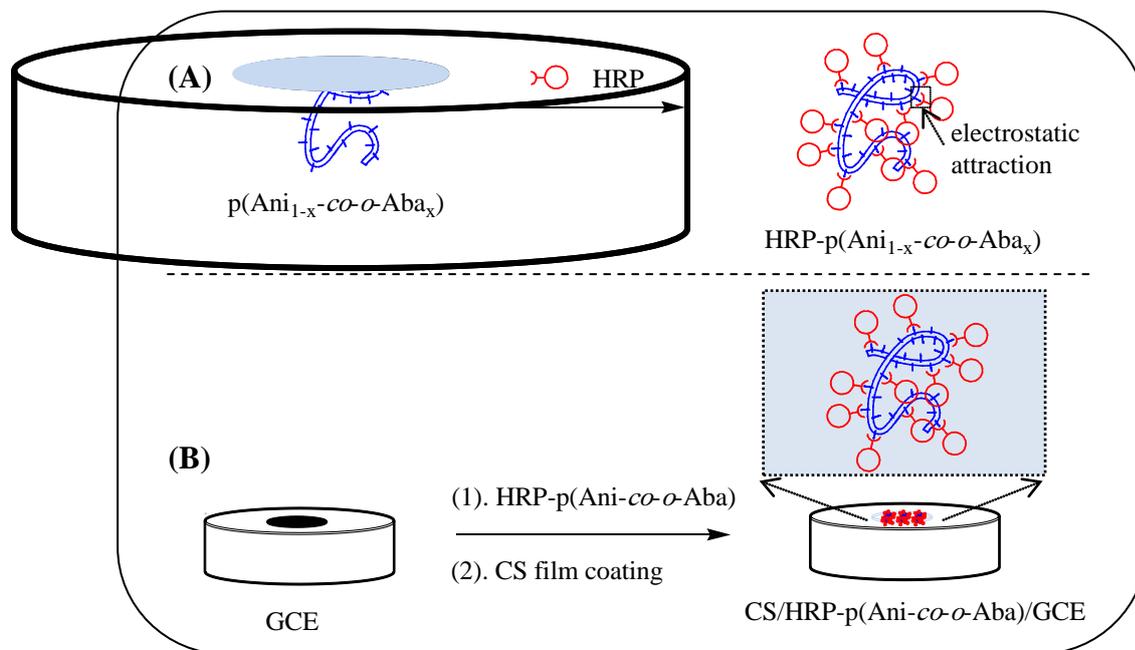
รูปที่ 4.22 ภาพ AFM ของ (A) p(Ani-co-o-Aba)/GCE, (B) HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE และ (C) CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

จากภาพ AFM จะเห็นว่า ขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วย p(Ani-co-o-Aba), HRP-p(Ani-co-o-Aba) และ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba) จะมีลักษณะความพื้นที่ผิวแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง ขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วย p(Ani-co-o-Aba) ประกอบไปด้วยอนุภาคกลุ่มก้อน (cluster) ของอนุภาคระดับนาโนที่มีขนาดไม่เกิน 100 nm ซึ่งมีประโยชน์ต่อการตรึงเอนไซม์ลงบนขั้วไฟฟ้า เมื่อพิจารณาขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วย HRP-p(Ani-co-o-Aba) และ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba) ลักษณะของพื้นที่ผิวยิ่งมีความเรียบมากขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เพราะเกิดจากการลักษณะทางกายภาพของสารชีวโมเลกุล (CS และ HRP) นั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาหลายฉบับ<sup>28</sup> ที่ได้รายงานไว้เกี่ยวกับการใช้ CS และ HRP มาดัดแปรขั้วไฟฟ้า

#### การเตรียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์

วิธีในการเตรียมขั้ว CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE จากการดัดแปรด้วยของผสมระหว่าง p(Ani-co-o-Aba) และ HRP หลังจากนั้น นำสารละลายผสมระหว่าง HRP-p(Ani-co-o-Aba) หยดลงบนขั้ว GCE หลังจากที่ทำละลายระเหยออกไปแล้ว ให้เคลือบขั้วไฟฟ้าด้วยสารละลาย CS เมื่อทิ้งไว้จนขั้วไฟฟ้าแห้ง ให้ล้างด้วย

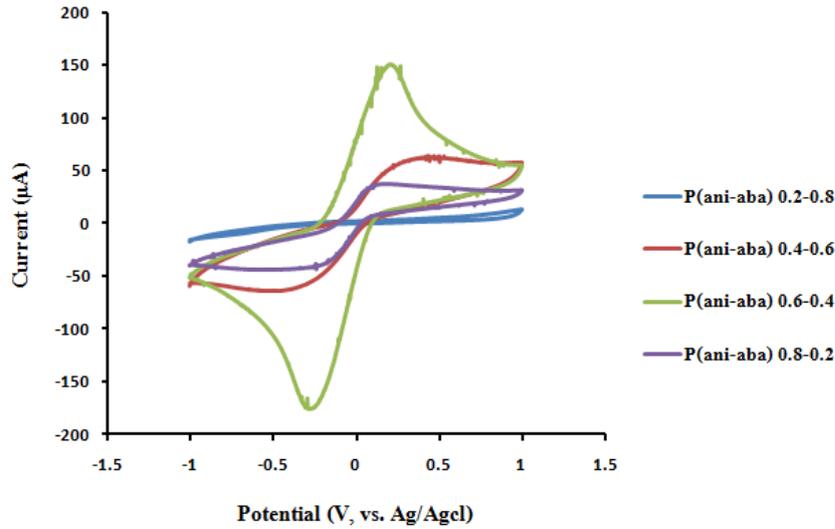
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, pH 6.5) จะได้ขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE ตามที่ต้องการ ในการตรึงเอนไซม์ HRP ลงบน HRP-p(Ani-co-o-Aba) คณะผู้วิจัยอาศัยกลไกการตรึงด้วยวิธีแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) ระหว่างหมู่  $-COO^-$  บนโครงโคพอลิเมอร์กับ  $-NH_2^+$  บนโครงสร้างของ HRP แล้วเคลือบด้วยชั้นฟิล์มของ CS ซึ่งสรุปเป็นขั้นตอนดังรูป 4.23



รูปที่ 4.23 การดัดแปรขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE โดยอาศัย (A) การตรึง HRP ลงบน p(Ani-co-o-Aba) โดยอาศัยกลไกการตรึงด้วยวิธีแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) (B) เคลือบด้วยชั้นฟิล์มของ CS

### การวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า

เมื่อทำการทดลองเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของโคพอลิเมอร์ของพอลิอะนิลีนและอะมิโนเบนโซอิก แอซิด ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (cyclic voltammetry: CV) ซึ่งควบคุมศักย์ไฟฟ้าด้วยเครื่องโพเทนชิโอสเตท โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วย p(Ani-co-o-Aba) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (A-D) ใช้ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ใช้ลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ตามลำดับ สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนที่ใช้เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.1 M โดยทำการทดลองในสภาวะภายใต้บรรยากาศก๊าซ  $N_2$  จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าทั้ง 4 ชนิด (A-D) มาศึกษาคุณสมบัติโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +1.0 ถึง -1.0 V ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ที่อิ่มตัวด้วย  $N_2$  ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.24 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของ  $p(\text{Ani}_{1-x}\text{-co-o-Aba}_x)$  เมื่อ  $x$  ( $0 \leq x \leq 1$ ) เป็นอัตราส่วนโมลของ *o*-Aba ในโคพอลิเมอร์ของ  $p(\text{Ani-co-o-Aba})$

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจาก cyclic voltammogram พบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,c}$ ) ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและค่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,a}$ ) จากการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน สรุปลงได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ศักย์ไฟฟ้าที่ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,c}$ ) และค่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,a}$ ) จากการเกิดปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วยโพลิเมอร์

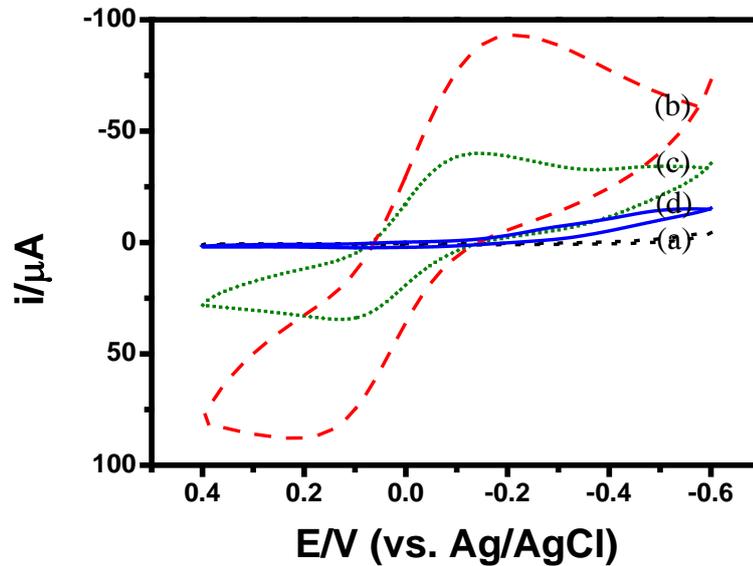
Electrode code	$E_{p,c}$ (V)	$E_{p,a}$ (V)	$i_{-0.30V}^*$ ( $\mu\text{A}$ )
A ( $\text{Ani}_{0.2}\text{Aba}_{0.8}$ )	> 1.0	> -1.0	-1.51
B ( $\text{Ani}_{0.4}\text{Aba}_{0.6}$ )	0.53	-0.51	-58.30
C ( $\text{Ani}_{0.6}\text{Aba}_{0.4}$ )	0.21	-0.28	-174.00
D ( $\text{Ani}_{0.8}\text{Aba}_{0.2}$ )	0.19	-0.56	-42.40

$i_{-0.30V}^*$  \* คือ ค่ากระแสที่ศักย์ไฟฟ้า -0.30 V

เมื่อพิจารณาค่ากระแส พบว่า ขั้วไฟฟ้า A ( $\text{Ani}_{0.2}\text{Aba}_{0.8}$ ) ให้ค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ -1.51  $\mu\text{A}$  ขั้วไฟฟ้า B ( $\text{Ani}_{0.4}\text{Aba}_{0.6}$ ) ให้ค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ -58.30  $\mu\text{A}$  ขั้วไฟฟ้า C ( $\text{Ani}_{0.6}\text{Aba}_{0.4}$ ) ให้ค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ -174.00  $\mu\text{A}$  ขั้วไฟฟ้า D ( $\text{Ani}_{0.8}\text{Aba}_{0.2}$ ) ให้ค่ากระแสเท่ากับ -42.40  $\mu\text{A}$  ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ขั้วไฟฟ้า C ( $\text{Ani}_{0.6}\text{Aba}_{0.4}$ ) เป็นขั้วไฟฟ้าที่ให้ค่าการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกขั้วไฟฟ้า C ซึ่งมี  $\text{Ani}_{0.6}\text{Aba}_{0.4}$  เป็นพอลิเมอร์สำหรับการตรึงเอนไซม์ HRP บนขั้วไฟฟ้าสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

เมื่อนำ  $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})$  มาเป็นพอลิเมอร์เพื่อตรึงเอนไซม์ HRP แล้วเคลือบด้วยชั้นฟิล์มของ CS ได้ขั้วไฟฟ้า CS/HRP- $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})$ /GCE เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน แล้วเปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าอื่นๆ อีก 3 ขั้ว ได้แก่ GCE,  $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})$ /GCE และ HRP- $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})$ /GCE ใช้ Ag/AgCl

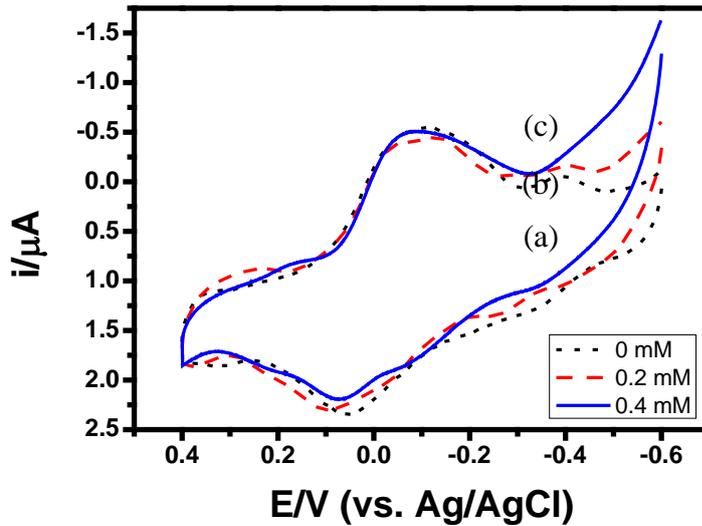
เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ใช้ลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ตามลำดับ สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนืดที่ใช้เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.1 M โดยทำการทดลองในสภาวะภายใต้บรรยากาศก๊าซ  $N_2$  จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าทั้ง 4 ชนิด มาศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.40 ถึง -0.60 V ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ที่อิ่มตัวด้วย  $N_2$  ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของ (a) GCE (black dot line), (b)  $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})/\text{GCE}$  (red dash line), (c)  $\text{HPR-p}(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})/\text{GCE}$  (green short dash line) และ (d)  $\text{CS/HPR-p}(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})/\text{GCE}$  (blue solid line)

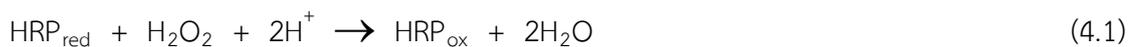
ผลการทดลองที่ได้พบว่า ขั้วไฟฟ้า GCE (black dot line) ไม่แสดงลักษณะของพีคใดๆ ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนืด ขั้วไฟฟ้า  $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})/\text{GCE}$  (red dash line) ให้ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,c}$ ) ที่ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,a}$ ) ที่ชัดเจน (ดังที่กล่าวมาข้างต้น) และเป็นขั้วที่ให้ค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองที่สูงที่สุด ทั้งนี้เป็นผลมาจากสมบัติรีดอกซ์ของพอลิเมอร์กลุ่มพอลิอะนิลีน [29-31] หลังจากที่ตั้งริงเอนไซม์ HRP ลงบน  $p(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})$  ขั้วไฟฟ้า  $\text{HPR-p}(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})/\text{GCE}$  (green short dash line) ยังให้ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,c}$ ) ที่ยอดพีคคาโนดิก ( $E_{p,a}$ ) แต่ค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองมีค่าลดลง และหลังจากเคลือบขั้วไฟฟ้าชั้นนอกสุดด้วย CS ค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองมีค่าต่ำที่สุด สาเหตุที่ค่ากระแสไฟฟ้าตอบสนองมีค่าต่ำลงเป็นผลมาจากสมบัติไม่นำไฟฟ้าของสารชีวโมเลกุล (CS และ HRP) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Gao et al [32] ที่ได้รายงานไว้ว่า สมบัติการนำไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าจะลดลงเมื่อดัดแปรด้วย CS และ HRP

หลังจากที่นำขั้ว  $\text{CS/HPR-p}(\text{Ani}_{0.6}\text{-co-o-Aba}_{0.4})/\text{GCE}$  ไปศึกษาการตอบสนองต่อ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 mM โดยการสแกนค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.6 V and +0.4 V (vs. Ag/AgCl) ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ที่อิ่มตัวด้วย  $N_2$  ในสภาวะที่ไม่เติมและเติม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลการทดลองแสดงในรูปต่อไปนี้



**รูปที่ 4.26** ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.6 V and +0.4 V (vs. Ag/AgCl) ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ที่อิ่มตัวด้วย N<sub>2</sub> ในสภาวะที่ไม่เติม (curve a, black dot line) และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.2 mM (curve b, red dash line) และ 0.4 mM (curve c, blue solid line) ใช้ scan rate 50 mV/s ที่อุณหภูมิห้อง

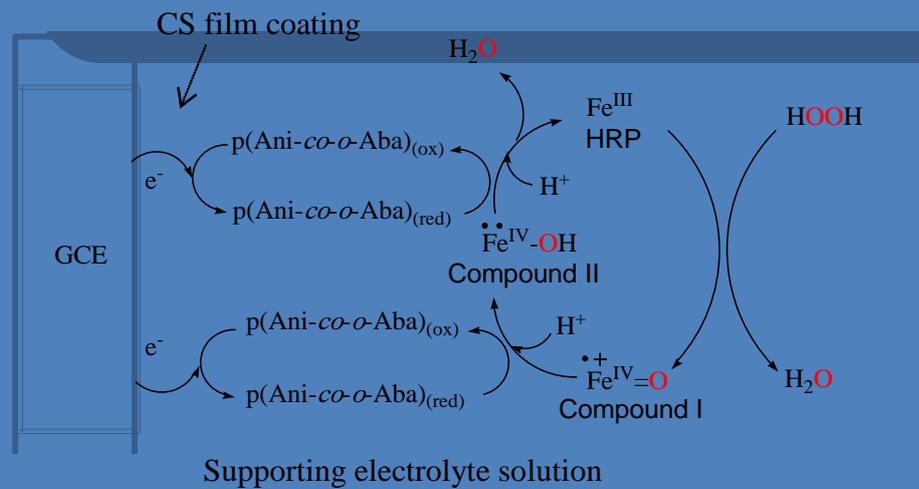
ผลการทดลองพบว่า กระแสออกซิเดชันมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่กระแสรีดักชันเพิ่มขึ้นที่ค่าศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.25 V ไปจนถึง -0.6 V ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวบ่งบอกว่า กระแสที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีด้วยขั้ว CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE จากกระบวนการที่เกิดขึ้น คณะผู้วิจัยจึงเสนอสมการที่เกิดขึ้นที่ได้ดังนี้



สมการรวม :



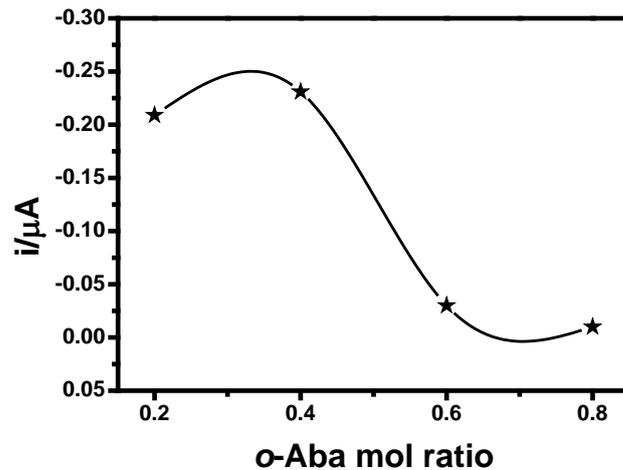
จากรายงานวิจัยของ Berglund et al. [33] คณะผู้วิจัยจึงขอนำเสนอแผนภาพแสดงกลไกของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.27 แผนภาพแสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทางไฟฟ้าเคมีด้วย ขี้ว CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE

#### ศึกษาหาสภาวะในการทดลองที่เหมาะสม

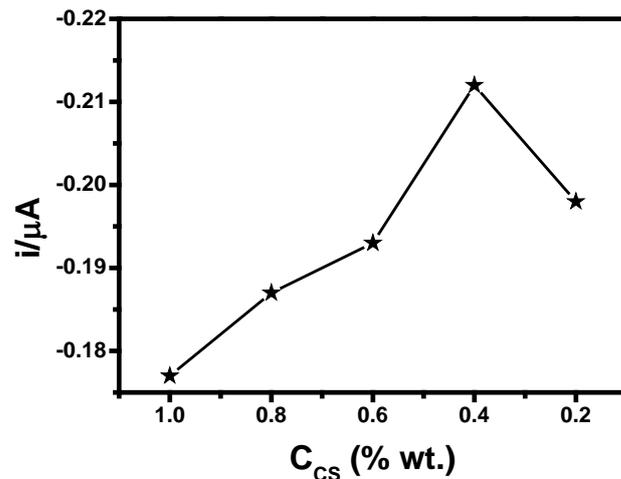
เพื่อยืนยันว่า p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) เป็นชนิดของโคพอลิเมอร์ที่ดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ HRP คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองวัดการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับโคพอลิเมอร์ p(Ani<sub>1-x</sub>-co-o-Aba<sub>x</sub>) ทั้งสี่ชนิด ได้แก่ p(Ani<sub>0.2</sub>-co-o-Aba<sub>0.8</sub>), p(Ani<sub>0.4</sub>-co-o-Aba<sub>0.6</sub>), p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) และ p(Ani<sub>0.8</sub>-co-o-Aba<sub>0.2</sub>) ที่ใช้ตรึงเอนไซม์ HRP แล้วเคลือบด้วยชั้นฟิล์ม CS และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV) ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.40 ถึง -0.60 V ในสภาวะที่เติม 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บนขี้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>1-x</sub>-co-o-Aba<sub>x</sub>)/GCE เมื่อ x (0 ≤ x ≤ 1) เป็นอัตราส่วนโมลของ o-Aba ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ใช้ scan rate 50 mV/s ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.28



**รูปที่ 4.28** ค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>1-x</sub>-co-o-Aba<sub>x</sub>)/GCE เมื่อ  $x$  ( $0 \leq x \leq 1$ ) เป็นอัตราส่วนโมลของ o-Aba ในสารละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ใช้ scan rate 50 mV/s

ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ p(Ani<sub>0.8</sub>-co-o-Aba<sub>0.2</sub>) เป็นตัวตรึงเอนไซม์ HRP ค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.2 mM มีค่าประมาณ -0.2 μA และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) และเป็นค่ากระแสที่สูงที่สุดที่อ่านได้ หลังจากนั้น ค่ากระแสที่ตอบสนองมีค่าลดลงเมื่อใช้ p(Ani<sub>0.4</sub>-co-o-Aba<sub>0.6</sub>) และ p(Ani<sub>0.2</sub>-co-o-Aba<sub>0.8</sub>) ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันว่า p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) เป็นชนิดของโคพอลิเมอร์ที่ดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ HRP เมื่อพิจารณาถึงกลไกที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ จะเห็นได้ว่า การตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) ต้องอาศัยหมู่ -COO<sup>-</sup> บนโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ คณะผู้วิจัยอธิบายได้ว่า ถ้าโคพอลิเมอร์มีหมู่ -COO<sup>-</sup> อยู่ในปริมาณที่มาก ปริมาณเอนไซม์ HRP ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้านั้นจะมีปริมาณมากเช่นกัน ลักษณะดังกล่าวมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการนำส่งกระแสไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้าของสารชีวโมเลกุลของเอนไซม์ ในทางตรงกันข้าม ถ้าโคพอลิเมอร์มีหมู่ -COO<sup>-</sup> อยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าปกติ ปริมาณเอนไซม์ HRP ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้านั้นจะมีปริมาณน้อยลงตามไปด้วย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) เป็นชนิดของโคพอลิเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ HRP ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้า

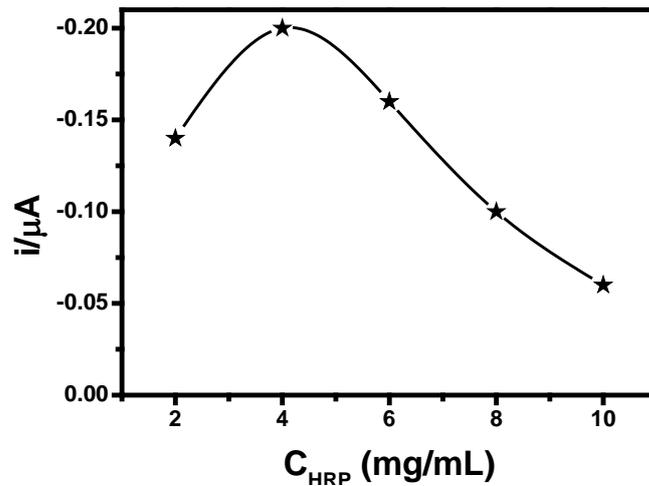
ในการศึกษาปริมาณ %CS ที่เหมาะสม โดยใช้ %CS ที่แตกต่างกันทั้งหมด 5 ชนิด คือ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0%CS ตามลำดับ ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV) ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.40 ถึง -0.60 V ในสภาวะที่เติม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.2 mM บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ใช้ scan rate 50 mV/s ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลการทดลองดังรูป 4.29



**รูปที่ 4.29** ค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ CS จาก 1.0-0.2 %wt. บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ใช้ scan rate 50 mV/s

การตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) โดยอาศัยหมู่  $-\text{COO}^-$  บนโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ อาจทำให้ขั้วไฟฟ้าที่ได้ไม่มีความเสถียรมากพอ เพราะเอนไซม์ HRP ที่ถูกตรึงนั้นซึ่งอยู่ในส่วนชั้นนอกสุด อาจเกิดการหลุดออกจากขั้วไฟฟ้าได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะเคลือบชั้นนอกสุดของขั้วไฟฟ้าด้วยชั้นฟิล์มของ CS เพราะนอกจากจะเป็นสารที่ช่วยตรึงเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าได้ดีแล้ว ยังเป็นสารที่มีความสามารถเข้ากันได้ (compatibility) เป็นอย่างดี ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CS จาก 0.2% เป็น 0.4% ค่ากระแสที่ตอบสนองมีค่าเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ อย่างเห็นได้ชัดเจนกระทั่งต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.0%CS ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Li et al [34] ซึ่งได้รายงานไว้ว่าความเข้มข้นของ CS ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์จะมีค่าเหมาะสมที่ค่าหนึ่งเท่านั้น ยิ่งมีการเพิ่มปริมาณ CS ลงไปมากเท่าไร ยิ่งทำให้ขั้วไฟฟ้าที่ได้ไม่เสถียรมากเท่านั้น ซึ่งมีสาเหตุเนื่องมาจากการหลุดลอกของชั้นฟิล์ม CS นั้นเอง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ ความเข้มข้นของ CS ที่ 0.4% ในการตรึงเอนไซม์ HRP ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE สำหรับการวิเคราะห์ตัวแปรอื่นต่อไป

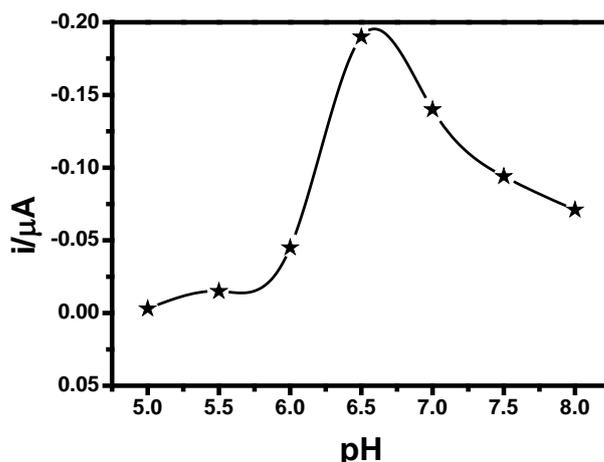
ในการศึกษาหาปริมาณ HRP ที่เหมาะสม โดยใช้ HRP ที่แตกต่างกันทั้งหมด 5 ชนิด คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL HRP โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV) ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.40 ถึง -0.60 V ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ในสภาวะที่เติม 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้ scan rate 50 mV/s ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองแสดงดังรูป 4.30



**รูปที่ 4.30** ค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ HRP จาก 2-10 mg/mL บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ในสารละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ใช้ scan rate 50 mV/s

เป็นที่ทราบกันดีว่าค่ากระแสที่ตอบสนองจะขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้า คณะผู้วิจัยจึงทำการทดลองกล่าวโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP จาก 2-10 mg/mL บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP จาก 2 mg/mL เป็น 4 mg/mL ค่ากระแสที่เพิ่มขึ้น หลังจากนั้น ยังเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP มากขึ้นเท่าไร ค่ากระแสที่ได้ยังมีค่าต่ำลงมากเท่านั้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากสมบัติที่เป็นสารไม่นำไฟฟ้าของเอนไซม์ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ HRP ที่ 4 mg/mL ในการสร้างขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE สำหรับการวิเคราะห์ตัวแปรอื่นต่อไป

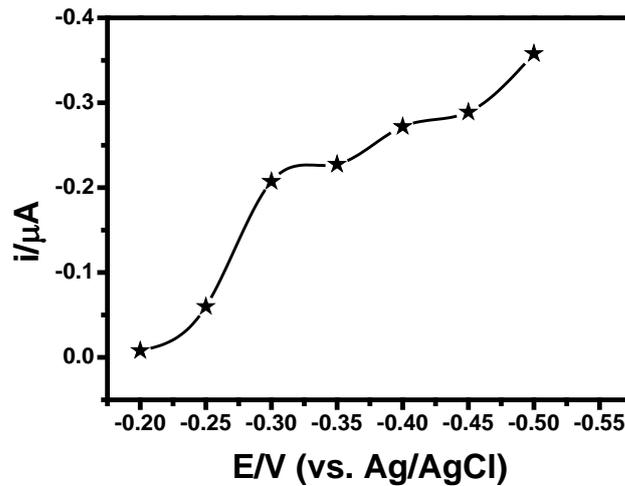
ในการศึกษาผลของ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลืออนิน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี pH ต่างกัน คือ pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 จากนั้น นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry (CV) ทำการให้ศักย์แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งานตั้งแต่ +0.40 ถึง -0.60 V ในสถานะที่เติม 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้ scan rate 50 mV/s ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองแสดงดังรูป 4.31



**รูปที่ 4.31** ค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE เมื่อเปลี่ยน pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ที่ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ใช้ scan rate 50 mV/s

pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างยิ่งต่อการทำงานของเอนไซม์ HRP เมื่อพิจารณาค่ากระแสที่ตอบสนองที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเพิ่มค่า pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนจาก 5.0 ถึง 6.0 ค่ากระแสที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และจะมีค่าสูงที่สุดที่ pH เท่ากับ 6.5 แต่หลังจากที่เพิ่มค่า pH สูงขึ้นจนถึง 8.0 ค่ากระแสที่ได้มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Tangkuaram et al. [35] ซึ่งได้รายงานไว้ว่า กระบวนการเร่งการสลายตัวของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็น H<sub>2</sub>O จะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย เพราะเอนไซม์ HRP จำเป็นต้องใช้ H<sup>+</sup> ในปฏิกิริยาการรีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูนที่ pH เท่ากับ 6.5 ในการเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE สำหรับการทดลองอื่นต่อไป

การทดลองนี้เป็นการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV) โดยเติมสารละลายมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้น นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry (CV) ทำการสแกนศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ +0.40 ถึง -0.60 V ในสภาวะที่เติม 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้ scan rate 50 mV/s ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองดังรูป 4.32

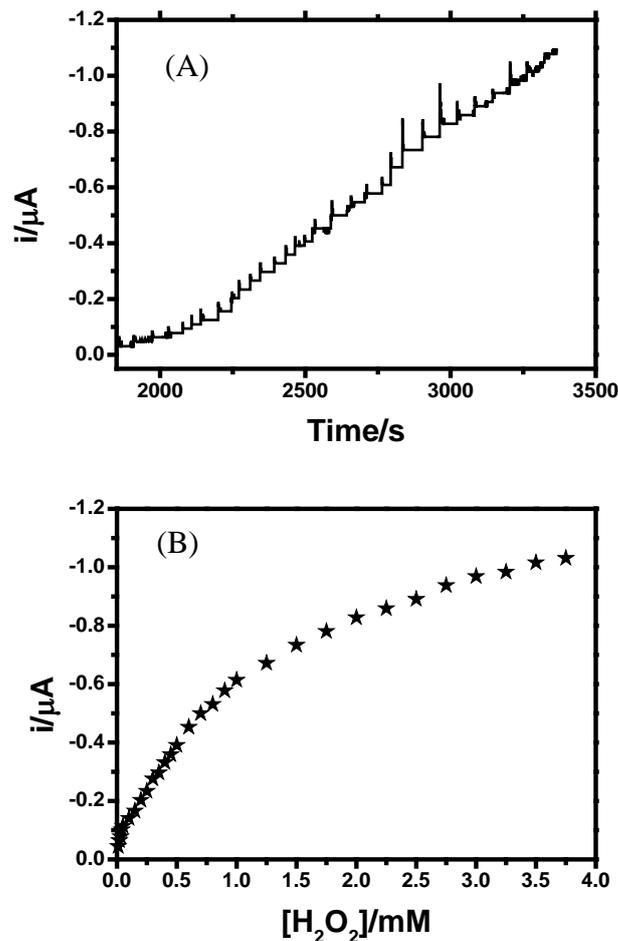


**รูปที่ 4.32** ค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ใช้ scan rate 50 mV/s

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คณะผู้วิจัยจึงพิจารณาค่ากระแสที่ตอบสนองต่อ 0.2 mM ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ผลการทดลองที่ได้พบว่า ยิ่งเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นบนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE มากเท่าไร ค่ากระแสที่ได้ยังมีค่าเพิ่มขึ้นมากเท่านั้น ถึงแม้ว่า ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นสูงจะทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ดี แต่ก็มีแนวโน้มจะเป็นที่สูงเช่นกันที่อาจจะถูกรบกวนด้วยตัวรบกวนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาการรีดักชันที่ค่าศักย์ไฟฟ้าใกล้เคียง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นที่ -0.3 V ในการเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

**-การวัดสัญญาณแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ (CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE)**

ในการทดลองนี้ ศึกษาการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V โดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีโดยใช้ขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>1-x</sub>-co-o-Aba<sub>x</sub>)/GCE เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (WE) ใช้ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE) ใช้ลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (CE) ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น 0.1 M ทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศก๊าซ N<sub>2</sub> ในสารละลายที่มีการกวน ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.33



รูปที่ 4.33 (A) กราฟแสดงความสัมพันธ์ กระแส-เวลา ( $i-t$ ) บนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ -0.3 V (vs. Ag/AgCl) ที่ตอบสนองต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ที่อิ่มตัวด้วย N<sub>2</sub> และกวนตลอดเวลา (B) กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับความเข้มข้นของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เติมลงไป

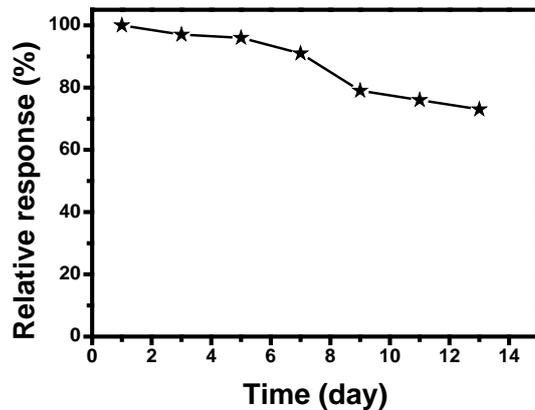
จากผลการทดลองในรูปที่ 4.33 พบว่าขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE มีสภาพไวสูงให้การตอบสนองที่เร็วต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยให้สัญญาณที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เติมลงไป ในสารละลาย ในช่วงตั้งแต่ 10  $\mu\text{M}$  ถึง 4 mM กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงดังรูปที่ 4.33B

ค่าคงที่ Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) ที่บ่งบอกถึงจลนศาสตร์ของเอนไซม์-ซับสเตรต คำนวณหาได้จากสมการของ Lineweaver-Burk ดังสมการ

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M^{app}}{I_{max} C} \quad (4.5)$$

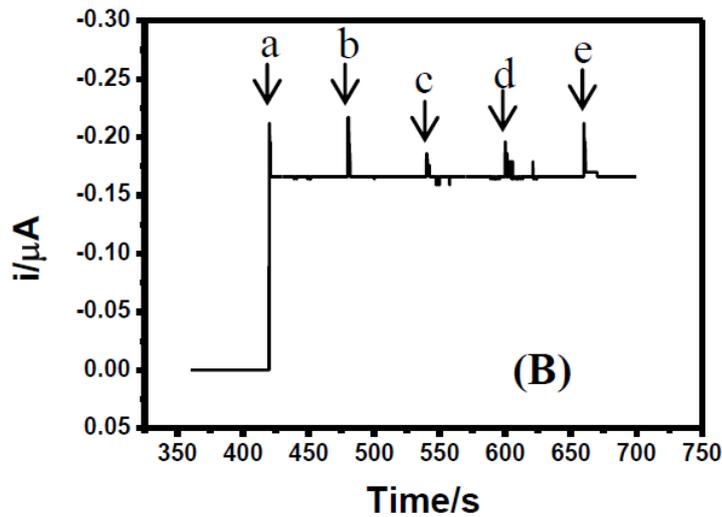
เมื่อ  $I_{ss}$  คือค่ากระแสที่สภาวะ steady-state เมื่อมีการเติมซับสเตรต,  $I_{max}$  คือค่ากระแสสูงสุดที่ได้เมื่อเติมซับสเตรตจนอิ่มตัว และ  $C$  คือความเข้มข้นของซับสเตรต จากการทดลองพบว่า  $K_M^{app}$  ของขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani0.6-co-o-Aba0.4)/GCE ที่ได้จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 5.14 แสดงให้เห็นว่า การจับของเอนไซม์ HRP-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความแข็งแรงพอทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี

ในการศึกษาความเสถียรของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปโอเซนเซอร์ที่ได้ โดยนำมาศึกษาการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V ทำการศึกษาทั้งหมดรวมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.34



**รูปที่ 4.34** การศึกษาความเสถียรของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปโอเซนเซอร์ จากค่ากระแสรีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.2 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V mM ในสารละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5).

ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 mM แล้วเติมสารละลายมาตรฐานตัวรบกวน ได้แก่ โดปามีน (dopamine: DA) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid: AA) กลูโคส (glucose: Glu) และ กรดยูริก (uric acid: UA) ที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 1.0 mM หลังจากนั้นเปรียบเทียบสัญญาณกระแสที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสัญญาณที่ได้จากการเติมตัวรบกวน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.35



**รูปที่ 4.35** การศึกษาผลของตัวรบกวนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปโอเซนเซอร์ จากค่ากระแสที่คงที่ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.2 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V mM ในสารละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) เมื่อมีการเติม (a) 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (b) 1 mM DA, (c) 1 mM AA, (d) 1 mM Glu and (e) 1 mM UA

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เมื่อมีการเติมตัวรบกวน DA, AA, Glu และ UA ความเข้มข้นสูงกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถึง 5 เท่า (1 mM) ค่ากระแสที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าตัวรบกวนที่ศึกษาดังกล่าวทั้ง 4 ชนิดไม่รบกวนการวิเคราะห์

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้การพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์และขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์แบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

#### 1) การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลิอะนิลีน

การพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์โดยการทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์โพลิอะนิลีนให้เกิดพอลิอะนิลีนในเมทริกซ์ของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (MWCNTs) และการทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์โลหะนาโน (metal nanoparticles) บนขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอน เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดในเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ใช้งานง่าย สะดวก มีความเที่ยงและมีสภาพไวสูงขึ้น โดยติดตามค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์ จากการศึกษาชนิดของอนุภาคโลหะนาโนและชนิดของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี และเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี พบว่าอนุภาคโลหะนาโนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์คือ อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) และชนิดของมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์คือ MWCNT-COOH จากนั้นทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของอะนิลีน (aniline), MWCNT-COOH และปริมาณของ AuNPs ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ พบว่าปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ ในสารละลายที่ใช้ในการตัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการวัดปริมาณซัลไฟต์ คือ อะนิลีนความเข้มข้น 0.02 mM, MWCNT-COOH ความเข้มข้น 0.48 mg/mL และ AuNPs ความเข้มข้น 0.12 mM ในการศึกษาหา pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.067 M ที่เหมาะสมต่อการทำงานของซัลไฟต์เซนเซอร์โดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี (ศักย์ไฟฟ้า +0.6 V) พบว่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบหนุในการตรวจวัดซัลไฟต์ pH เท่ากับ 7.0

ในการศึกษาคุณลักษณะของเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรี โดยใช้ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาได้เป็นตัวตรวจวัด ใช้ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.067 M เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบหนุ ให้ศักย์ไฟฟ้า 0.6 V แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน พบว่าค่ากระแสที่ได้จากการตรวจวัดแปรผันตรงกับความเข้มข้นของซัลไฟต์ โดยมีช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1–16 mM ( $r^2 = 0.9964$ ) ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดต่ำสุดในการวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.0927 mM มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.12 ( $n = 5$ ) แสดงให้เห็นว่าซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาได้มีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดถึงระดับมิลลิโมลาร์ และมีความเที่ยงสูง ในการศึกษาผลของตัวรบกวนด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่พัฒนาขึ้น พบว่าตัวรบกวนที่ศึกษา ascorbic acid, sodium sulfate, sodium nitrate และ potassium iodide มีค่า tolerance limit เท่ากับ 0.05, 10.00, 20.00 และ 0.20 mM ตามลำดับ งานวิจัยในส่วนนี้สามารถพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ที่มีสภาพไว ความจำเพาะเจาะจง และมีความเที่ยงตรงสูง สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี การที่จะนำซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ในตัวอย่างจริงด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีได้นั้น อาจจำเป็นต้องมีกระบวนการในการแยกเอาตัวรบกวนออกก่อนทำการวิเคราะห์ จากปัญหานี้จึงต้องมีการศึกษาและพัฒนากระบวนการเพื่อลดผลของตัวรบกวน

2) ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ตัดแปรด้วยมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์-พิตีดีเอ-อนุภาคทองนาโน การพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์โดยการวิธีการเคลือบ (drop casting) ด้วยวัสดุขนาดนาโนลูกผสมของคาร์บอนนาโนทิวป์-โพลีเมอร์นำไฟฟ้า-อนุภาคโลหะขนาดนาโนลงบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนจากการศึกษาองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์ โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีพบว่าวัสดุขนาดนาโนลูกผสมที่เหมาะสมคือ คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (CNTs-COOH)-โพลีไวดแอลลิลไดมเทิล (PDDA) และอนุภาคทองนาโน (AuNPs) จะได้ขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ CNTs-PDDA-AuNPs/GC จากนั้นทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกและปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคทองนาโนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาซัลไฟต์เซนเซอร์โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีและเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี พบว่าปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆในสารละลายที่ใช้ในการตัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการวัดปริมาณซัลไฟต์ คือ CNTs-PDDA ความเข้มข้น 4 mg/mL และ AuNPs ความเข้มข้น 0.02 % จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วยองค์ประกอบที่เหมาะสมเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ในการศึกษาหา pH ของสารละลายเฟสเพตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M ที่เหมาะสมต่อการทำงานของซัลไฟต์เซนเซอร์โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ผลการศึกษาพบว่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดซัลไฟต์คือ 7.0

เมื่อนำเทคนิคโพลีอินเจกชันอะนาไลซิสมาร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) จะทำให้ได้เทคนิควิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดซัลไฟต์ ในการศึกษาคุณลักษณะของเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรี โดยใช้ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นได้เป็นตัวตรวจวัด ใช้ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ใช้ลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 M (pH 7.0) เป็นสารละลายตัวพา ในการศึกษาหาค่ากระแสที่ได้จากการตรวจวัดแปรผันกับความเข้มข้นของซัลไฟต์ โดยมีช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-200 ppm ( $r^2 = 0.9997$ ) ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ เท่ากับ 0.03 ppm ซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ซัลไฟต์ในตัวอย่งน้ำผลไม้ และไวน์

### 3) การเตรียมขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

งานวิจัยในส่วนนี้ได้พัฒนาแอมเพอร์โรเมทริกไบโอเซนเซอร์แบบใหม่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการตรึงเอนไซม์ฮอร์ชเรดิซเปอร์ออกซิเดส (HRP) ลงบนโพลีเมอร์ ชนิด poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) หรือ p(Ani-co-o-Aba) โดยการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba) ด้วยวิธี Interfacial copolymerization จากสารละลายผสมของ aniline (Ani) และ o-aminobenzoic acid (o-Aba) ในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยคลอโรฟอร์ม ( $\text{CHCl}_3$ ) ผลการทดลองพบว่า p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) เป็นชนิดของโคพอลิเมอร์ที่ดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ HRP การตรึงเอนไซม์ HRP ด้วยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) โดยอาศัยหมู่  $-\text{COO}^-$  บนโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ อาจทำให้ขั้วไฟฟ้าที่ได้ไม่มีความเสถียรมากพอ เพราะเอนไซม์ HRP ที่ถูกตรึงนั้นซึ่งอยู่ในส่วนชั้นนอกสุด อาจเกิดการหลุดออกจากขั้วไฟฟ้าได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะเคลือบชั้นนอกสุดของขั้วไฟฟ้าด้วยชั้นฟิล์มของ CS เพราะนอกจากจะเป็นสารที่ช่วยตรึงเอนไซม์บนขั้วไฟฟ้าได้อย่างดีแล้ว ยังเป็นสารที่มีความสามารถเข้ากันได้ (compatibility) เป็นอย่างดี ผลการทดลองที่ได้พบว่าความเข้มข้นของ CS ที่ 0.4% เหมาะสมที่สุดในการตรึงเอนไซม์ HRP ที่ตรึงบนขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE

ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.3$  V โดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีโดยใช้ขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>1-x</sub>-co-o-Aba<sub>x</sub>)/GCE เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (WE) ใช้ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (RE) ใช้ลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (CE) ในสารละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ความเข้มข้น  $0.1$  M ผลการทดลองพบว่าขั้วไฟฟ้า CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE มีสภาพไวสูง ให้การตอบสนองที่เร็วต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยให้สัญญาณที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เติมลงไป ในสารละลาย ในช่วงตั้งแต่  $10$   $\mu$ M ถึง  $1,000$   $\mu$ M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ เท่ากับ  $1.8$   $\mu$ M ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่า tolerance ต่อโดปามีน (dopamine: DA) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid: AA) กลูโคส (glucose: Glu) และกรดยูริก (uric acid: UA) เป็นที่น่าพอใจ ขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดีมากถึงสองสัปดาห์

## เอกสารอ้างอิง

1. Vally, H.; Carr, A.; El-Saleh, J.; Thompson, P. Wine-induced asthma: a placebo-controlled assessment of its pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, 103, 41-46.
2. Situmorang, M.; Hibbert, D. B.; Gooding, J. J.; Barnett D. A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis. *Analyst* **1999**, 124, 1175-1779
3. Zhao, M.; Hibbert, D. B.; Gooding, J. Determination of sulfite in beer samples using an amperometric flow channel biosensor employing sulfite oxidase. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 556, 195-200.
4. <http://www.ndoae.doe.go.th/article2010/2011012.html> (access date: 20/07/2011)
5. <http://www.acfs.go.th/showNotiNewTBT.php?pageid=36> (access date: 20/07/2011)
6. [http://www.foodindustrythailand.com/v17/index.php?option=com\\_content&view=article&id=521&Itemid=132](http://www.foodindustrythailand.com/v17/index.php?option=com_content&view=article&id=521&Itemid=132) (access date: 20/07/2011)
7. <http://www.foodnetworksolution.com/vocab/wordcap/Sulfur%20dioxide> (access date: 20/07/2011)
8. Adhikari, B.; Majumdar, S. Polymer in sensor applications. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 699-766.
9. Terry, L. A.; White, S. F.; Tigwell, L. J. The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1309-1316.
10. Mello, L. D.; Kubota, T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* **2002**, 77, 237-256.
11. Iller, B. R.; Elkins, E. R.; Warner, D.; Daneil, T.; Fazio, T. *J AOAC Inst* **1989**, 72, 470.
12. Scott, K.; Taama, W. M. An investigation of anode materials in the anodic oxidation of sulphur dioxide in sulphuric acid solutions. *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 3421-3427.
13. Li, H.; Wang, Q. J.; Xu, J.M.; Zhang, W.; Jin, L. T. A novel nano-Au-assembled amperometric SO<sub>2</sub> gas sensor: preparation, characterization and sensing behavior. *Sens. Actuators B.* **2002**, 87, 18-24.
14. Isaac, A.; Livingstone, C.; Wain, A. J.; Compton, R.G.; Davis, J. Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. *Trends in Anal. Chem.* **2006**, 25, 589-598.
15. Balduf, T.; Valentin, G.; Lopicqve, F. Faradaic processes on activated carbon particles: Example of sulfite anodic oxidation. *J. Chem. Eng.* **1998**, 76, 790-798.
16. Kiattipoomchai, M.; Somasundrum, M.; Tanticharoen, M.; Kirtikara, K. Measurement of sulfite at oxide-coated copper electrodes. *Analyst*, **1998**, 123, 2017-2019.

17. Theisen, S.; Hansch, R.; Kothe, L.; Leist, U.; Galensa, R. A fast and sensitive HPLC method for sulfite analysis in food based on a plant sulfite oxidase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26*, 175-181.
18. Zheng, W.; Zho, H. M.; Zheng, Y. F.; Wang, N. A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell. *Chemical Physics Letters* **2008**, *457*, 381-385.
19. Bahmani, B.; Moztaaradeh, F.; Rabiee, M.; Tahriri, M. Development of an electrochemical sulfite biosensor by immobilization of sulfite oxidase on conducting polyaniline film. *Synthetic Material*. **2010**, *160*, 2653-2657.
20. Salimi, A.; Mahdioun, M.; Noorbakhsh, A.; Abdolmaleki, A.; Ghavami, R., A novel non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on single walled carbon nanotubes-manganese complex modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta* **2011**, *56*, 3387-3394.
21. You, J. M.; Jeong, Y. N.; Ahmed, M. S.; Kim, S. K.; Choi, H. C.; Jeon, S., Reductive determination of hydrogen peroxide with MWCNT-Pd nanoparticles on a modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2287-2291.
22. Qui, J. D.; Peng, H. Z.; Liang, R.P.; Li, J.; Xia, X.H. Synthesis, characterization, and immobilization of Prussian blue-modified Au nanoparticles: application to electrocatalytic reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Langmuir* **2007**, *23*, 2133-2137.
23. Ping, J.; Wu, J.; Fan, K., Ying, Y. An amperometric sensor based on prussian blue and poly(o-phenylenediamine) modified glassy carbon electrode for the determination of hydrogen peroxide in beverages. *Food Chemistry* **2010**, *126*, 2005-2009.
24. Franchini, R. A. A.; Matos, M. A. C.; Colombara, R.; Matos, R. C. Differential amperometric determination of hydrogen peroxide in honeys using flow-injection analysis with enzymatic reactor. *Talanta* **2008**, *75*, 301-306.
25. Abass, A.K.; Hart, J. P.; Cowell, D. Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer. *Sens. Actuators B*. **2000**, *62*, 148-153.
26. Hart, J. P.; Abass, A.K.; Cowell, D. Development of disposable amperometric sulfur dioxide biosensors based on screen printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, *17*, 389-394.
27. Dinckaya, E.; Sezginurk, M. K.; Akyilmaz, E.; Ertas, F. N. Sulfite determination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbon electrode coated with thin mercury film. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1540-1544.
28. Nguyen, M. T. and Diaz, A. F. Water-Soluble Poly(aniline-co-o-anthranilic acid) Copolymers *Macromolecules*, 1995, *28*, 3411-3415.

- 29 Ahuja, T., Mir, I. A. and Rajesh, D. K. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications, *Biomaterials*, **2007**, 28, 791-805.
- 30 Kong, Y.-T., Boopathi, M. and Shim, Y.-B. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase bonded on a conducting polymer modified glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 19, 227-232.
- 31 Chaubey A. and Malhotra, B. D. Mediated biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, 17, 441-456.
- 32 Gao, F., Yuan, R., Chai, Y., Chen, S., Cao, S. and Tang, M. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on nano-Au/Thi/poly (p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**. 70, 407-413.
33. Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T, Szoke, H., Henriksen A. and Hajdu, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature*, **2002**, 417, 463-468.
34. Li, F., Chen, W., Tang, C. and Zhang, S., Li, F., Chen, W., Tang, C. and Zhang, S. *Talanta*, **2009**, 1304-1308.
35. Tangkuaram, T., Ponchio, C., Kangkasomboon, T., Katikawong, P. and Veerasai, W. Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22, 2071-2078.

## Output จากโครงการวิจัย

### 1 ผลผลิตของโครงการในเรื่องของการตีพิมพ์สรุปได้ดังต่อไปนี้

#### 1.1 วารสารนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง

-S. Chairam, P. Buddhalee and M. Amatatongchai. "A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) Modified Glassy Carbon Electrode Coated with Chitosan Film" *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2013**, 8, 10250-10264.

-M. Amatatongchai, W. Sroysee, S. Chairam and D. Nacapricha "Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes-PDDA-gold nanoparticles" *Talanta*, **2015**, 133, 134-141.

#### 1.2 เอกสารสืบเนื่องการประชุม จำนวน 1 เรื่อง

-W. Sroysee and M. Amatatongchai, "Amperometric Biosensor for Sulfite Determination Using Glassy Carbon Modified with Hybrid Nano-materials Electrode in Simple Flow Injection System" *Proceeding from Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2014)*, pp. 90-93, Khon kaen, Khon kaen University.

#### 1.3 นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

-M. Amatatongchai, W. Sroysee and D. Nacapricha "Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection on sulfite sensor using glassy carbon electrode modified with AuNPs/carbon nanotubes-PDDA" 18<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2013) including related techniques 15-20 September 2013 as oral contribution (Porto, Portugal).

-W. Sroysee and M. Amatatongchai, "Amperometric Biosensor for Sulfite Determination in Beverages Using Glassy Carbon Modified with Hybrid Nano-materials Electrode in Simple Flow Injection System" *Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2014)* as poster contribution (Khon kaen, Thailand).

### 2 Output ของโครงการในเรื่องของผลการวิจัยสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. ได้ขั้วไฟฟ้าซัลไฟต์เซนเซอร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เซนเซอร์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

2. ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นได้ถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ และนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

3. ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น เหล้าสาโท ไวน์ผลไม้ น้ำผลไม้ รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับภาคอุตสาหกรรมที่ต้องการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และ/หรือสามารถนำไปใช้ในการย่อขนาดเครื่องมือวิเคราะห์ให้มีขนาดเล็กลงได้

4. โครงการวิจัยนี้สามารถเอื้อให้มีการผลิตมหาบัณฑิต ทางด้านเคมี จำนวน 2 คน องค์ความรู้จากงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดเป็นสารนิพนธ์สำหรับนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จำนวน 2 เรื่อง

## ภาคผนวก

# A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Poly(aniline-*co*-*o*-aminobenzoic acid) Modified Glassy Carbon Electrode Coated with Chitosan Film

Sanoe Chairam<sup>\*</sup>, Peerawich Buddhalee and Maliwan Amatongchai

Department of Chemistry and Centre of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand.

<sup>\*</sup>E-mail: [scsanoch@ubu.ac.th](mailto:scsanoch@ubu.ac.th)

Received: 2 June 2013 / Accepted: 5 July 2013 / Published: 1 August 2013

---

In this work, a novel amperometric biosensor for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) determination was successfully prepared by immobilizing horseradish peroxidase (HRP) on poly(aniline-*co*-*o*-aminobenzoic acid) or p(Ani-*co*-*o*-Aba) and then covered with chitosan (CS) film. The immobilized HRP displayed an excellent electrocatalytic activity to the reduction of hydrogen peroxide. The effects of experimental variables such as the *o*-Aba mol ratios in p(Ani-*co*-*o*-Aba) synthesis, HRP and CS concentrations, pHs of supporting electrolyte solution and applied potentials for the working electrode were investigated for the optimized conditions. This novel biosensor exhibits a fast response toward H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with a linear range from 10 to 1,000 μM and a detection limit of 1.8 μM based on the signal-to-noise ratio (S/N = 3). The developed biosensor shows satisfactory tolerance with other potential interferences such as dopamine (DA), ascorbic acid (AA), glucose (Glu) and uric acid (UA), and also shows a good stability for ~2 weeks.

---

**Keywords:** Hydrogen peroxide biosensor, Horseradish peroxidase, Poly(aniline-*co*-*o*-aminobenzoic acid), Glassy carbon electrode, Chitosan

## 1. INTRODUCTION

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is extremely reactive species which is an enzymatic intermediate substance obtained from many enzyme-substrate reactions [1]. The determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is very important in food, industrial, clinical and environmental assays [2-3]. Many scientific methodologies have been widely employed for determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, such as titrimetry, spectrophotometry,

fluorimetry, chemiluminescence and electroanalytical method [4-7]. Among these techniques, the electroanalytical method is advantageous over other methods because of their robustness, possible miniaturization, low-cost and ease of operation. Due to their high selectivity and sensitivity, the development of biosensors based on peroxidase-modified electrodes has been widely studied in the field of electroanalytical chemistry [8].

The horseradish peroxidase (HRP), a heme-containing oxidoreductase, is a commercially important enzyme, which catalyzes the reductive cleavage of  $H_2O_2$  by an electron donor [9]. However, the sensitivity of these biosensors based on the direct electron exchange between HRP and electrode surface is often relatively low. To increase the current response, HRP is widely fixed onto the electrode surface with the metal nanoparticles, carbon nanomaterials, and conducting polymers [10-12].

Polyaniline and its derivatives have been of the most attractive conducting polymers due to their easy synthesis, low cost and high environmental stability, and variable electrical conductivity, excellent redox recyclability and optical activity [13-16]. They easily facilitates not only the electron transfer between the enzyme and electrode surface, but also make a more convenient environment for localizing the enzyme onto micro-size electrode surfaces in the electrochemical biosensors.

Chitosan (CS) is obtained from the partial deacetylation of chitin as one of the most abundant polysaccharides in the world [17]. CS is a biocompatible biopolymer possessing diverse properties for numerous applications, such as film-forming ability, hydrophilicity, high mechanical strength, good adhesion and chemical inertness [18]. Because of this unique combination of properties, there have been several reports using CS as ionically immobilizing and physically coating materials for preparing enzyme biosensors [19-21].

The design of a novel enzyme biosensor based on conducting-functionalized polymers and polymer-coated supports remain a significant focus of the study to consider in the enzyme immobilization strategy. In this study, the poly(aniline-*co-o*-aminobenzoic acid) or p(Ani-*co-o*-Aba) having different carboxylic ( $-COOH$ ) groups were prepared by copolymerization of aniline (Ani) and *o*-aminobenzoic acid (*o*-Aba). Then, the HRP immobilized on p(Ani-*co-o*-Aba) was casted onto the glassy carbon electrode (GCE) by a simple drop-coating method. The outer layer CS film as a binder was further coated on the electrode surface. We found that the CS/HRP-p(Ani-*co-o*-Aba)/GCE shows an excellent activity for the electrocatalysis of  $H_2O_2$  reduction. To explore its analytical performances, the proposed biosensor was used for the determination of  $H_2O_2$  over other interfering substances.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Reagents

Horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7,  $M_r$  . 40,000 (Lit.), 969.65 U  $mg^{-1}$ ), ammonium persulphate ( $(NH_4)_2S_2O_8$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , 30%) were purchased from Fluka. Aniline (Ani), *o*-aminobenzoic acid (*o*-Aba) and chitosan (CS) were purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals used in this study were of analytical grade and used as received, except for the aniline which

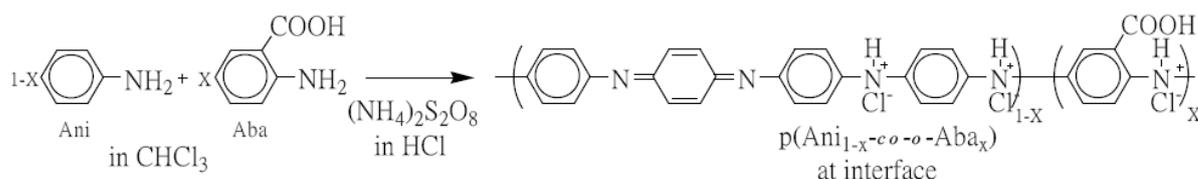
was purified by double distillation under reduced pressure prior to use and stored at 4 °C in the fridge when not in use. All aqueous solutions were freshly prepared using de-ionized (DI) water ( $R \geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) purified with a Nano-pore<sup>TM</sup> ultrapure water system. A stock standard solution was prepared freshly each day. The concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution was determined by titration with  $\text{KMnO}_4$  [4]. All measurements were carried out in 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) used as supporting-electrolyte solution. The PBS with various pH values was prepared by mixing stock standard solutions of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and then adjusted the pH with  $\text{NaOH}$  or  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

## 2.2 Instruments and apparatus

All electrochemical measurements were carried out with an eDAQ potentiostat (EA161) equipped with an e-corder (201) controlled by E-Chem software. A conventional three-electrode system was used with the modified electrode as working electrode, the  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  (sat. 3.0 M  $\text{KCl}$ ) as reference electrode, and a platinum (Pt) wire as counter electrode. A 713 pH meter (Metrohm, Switzerland) was used to monitor the pH of PBS. UV-Visible absorption spectra of solutions were recorded by using a Perkin Elmer Lambda25 UV-Visible spectrophotometer with the path length of a standard rectangular quartz cuvette (10 x 10 mm, Hellma Analytics) over the wavelength ranging from 300 to 800 nm. Atomic force microscope (AFM) images were obtained with scanning microscope probe (Park Systems Corp., Korea.) controlled by the XEI software.

## 2.3 Preparation of *p*(Ani-co-o-Aba)

A typical method of the copolymers synthesis described by Huang et al. [22-23] was adopted. Briefly, two monomers including Ani and *o*-Aba were dissolved in 5 mL of chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ).  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  used as the oxidant was dissolved in 5 mL of 1.0 M hydrochloric acid solution. After the reaction was left at room temperature for 24 h, the solid copolymer was collected from the reaction by filtration. To remove excess acid and unreacted monomers, the filtered solid product was then washed with several portions of diluted HCl, DI water and ethanol, respectively, and finally dried under vacuum. The structure of conducting *p*(Ani-co-o-Aba) from interfacial copolymerization is summarized in Figure 1. When a carboxyl group is deprotonated, its conjugate base forms a carboxylate anion ( $-\text{COO}^-$ ).

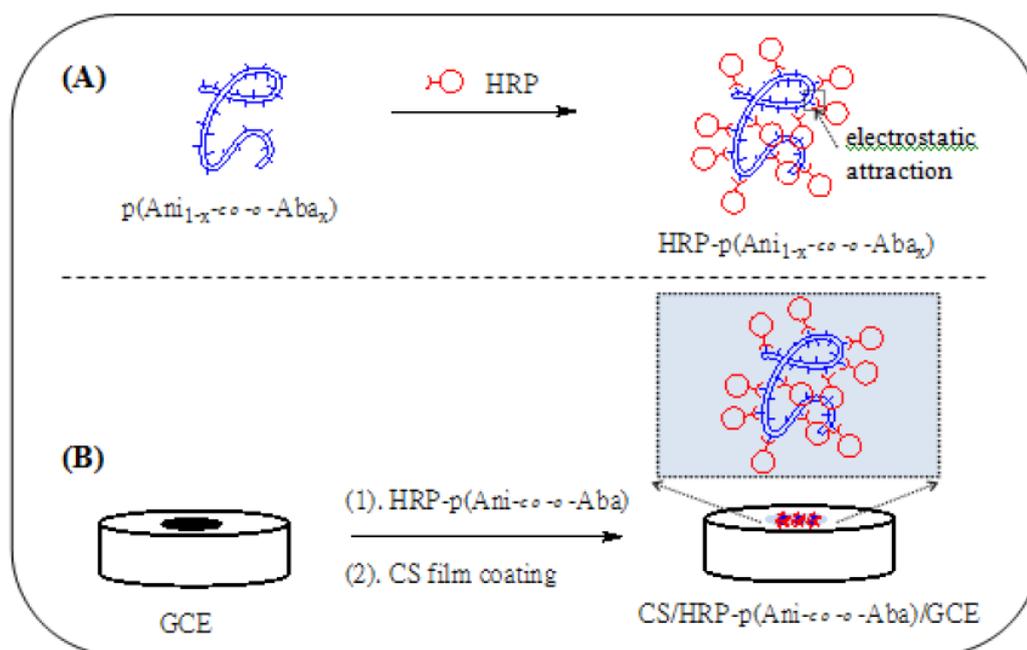


**Figure 1.** The structure of conducting *p*(Ani-co-o-Aba) prepared from Ani and *o*-Aba, where  $x$  ( $0 \leq x \leq 1$ ) relates to the substitution stoichiometry of *o*-Aba unit in *p*(Ani-co-o-Aba).

#### 2.4 Preparation of modified electrodes

The GCE (CH Instrument Co., USA) with a diameter of 3 mm was polished with 0.3-, 0.1-, and 0.05- $\mu\text{m}$  alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) slurry using a soft micro cloth polishing pad, and then thoroughly rinsed with DI water. After that, the GCE was ultrasonically treated sequentially in DI water for 10 min to remove residual polishing materials physically adsorbed on the electrode surface and then dried in air. The GCE was cleaned by potential cycling between  $-1.0$  V and  $+1.0$  V (vs. Ag/AgCl) at  $50$   $\text{mV s}^{-1}$  in  $0.1$  M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution until the stable cyclic voltammograms (CVs) were obtained.

The preparation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  biosensor based on the CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE can be schematically illustrated in Figure 2. For the preparation of CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE, the HRP enzyme was mixed to the mixture before casting. Briefly, a  $20$   $\mu\text{L}$  of  $10$   $\text{mg mL}^{-1}$  homogeneous p(Ani-co-o-Aba) solution was mixed with an equivalent volume of  $4$   $\text{mg mL}^{-1}$  HRP solution (Figure 2A). The positively charged HRP was immobilized on negatively charged p(Ani-co-o-Aba) by electrostatic attraction. After vortexing for  $15$  min, a  $10$   $\mu\text{L}$  of the resulting homogeneous solution was pipetted onto the well-polished GCE surface, which was kept at room temperature for  $3$  h. According to the previous reports by Chico et al. [24] and Chen et al. [25], stable biocatalysts could be efficiently immobilized electrostatically in polysaccharide-coated supports. Then in our work,  $5$   $\mu\text{L}$  of CS solution was dropped onto the surface of the HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE to fabricate the  $\text{H}_2\text{O}_2$  biosensor (Figure 2B). Finally, the CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE was air-dried for overnight at room temperature and kept at  $4$   $^\circ\text{C}$  in the fridge when not in use.



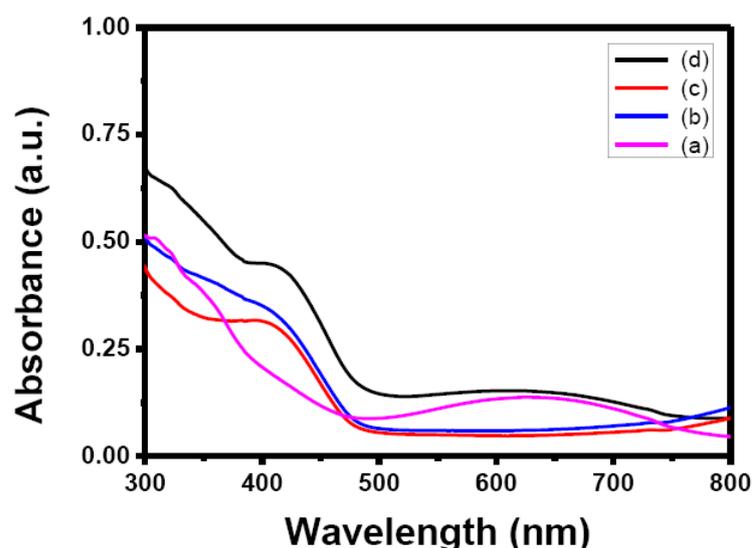
**Figure 2.** Preparation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  biosensor based on the CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE: (A) Immobilization of HRP using p(Ani-co-o-Aba). (B) Drop-coating method of HRP-p(Ani-co-o-Aba) onto GCE coated with an outer layer CS film.

### 2.5 Electrochemical measurements

All electrochemical measurements were carried out with eDAQ potentiostat (e-corder 401) controlled by EChem software. A conventional three-electrode system consisting of CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE working electrode, the Ag/AgCl (sat. 3.0 M KCl) reference electrode, and a platinum (Pt) wire counter electrode, was used throughout. The cyclic voltammetric and amperometric experiments were performed in a thermostatic electrochemical cell at 25 °C. The supporting electrolyte solutions were purged vigorously for at least 10 min to remove O<sub>2</sub> and kept under N<sub>2</sub> atmosphere during the measurements. The CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE was electrochemically performed by cycling the potential between -0.6 V and +0.4 V (vs. Ag/AgCl) in the absence or presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Amperometric experiments were carried out in a stirred batch system of 10 mL glass cell by applying a potential of -0.3 V to the working electrode and adding successively freshly prepared aliquot of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard solution to the electrolyte solution. Current-time data were recorded after the steady state current to be achieved. The CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE was kept at 4 °C in a dry condition in the fridge when not in use.

## 3. RESULTS AND DISCUSSIONS

### 3.1 UV-Vis absorption spectra of p(Ani-co-o-Aba)



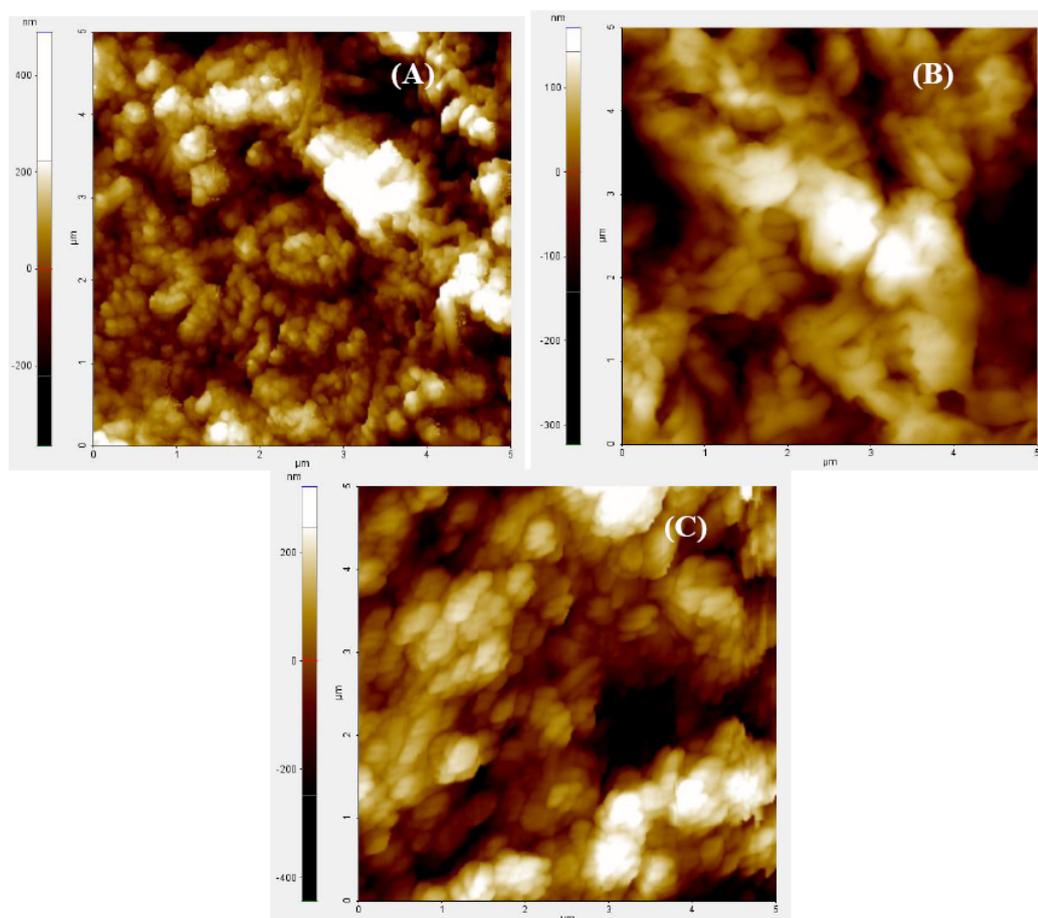
**Figure 3.** UV-Vis absorption spectra of p(Ani-co-o-Aba) for (a) 0.2, (b) 0.4, (c) 0.6 and (d) 0.8 mol ratio of o-Aba to Ani.

Considering the nature of carboxylic acid groups, the as-prepared p(Ani-co-o-Aba) could be soluble in an aqueous alkaline solution or in polar organic solvents such as DMF, DMSO, etc. In this study, a p(Ani-co-o-Aba) solution was prepared by dissolving each copolymer in DMSO. The

solubility increases with the increasing of *o*-Aba content in the copolymers. As shown in Figure 3, the UV-Vis absorption spectra showed two absorption bands over the wavelength of 400 - 700 nm, which is similar to the characteristics of polyaniline (see, [14,23,26]). With increasing the ratio of *o*-Aba in the copolymer composition, the spectra of the copolymers showed the strong absorption peak around 390 nm with varying intensities. The peak around 390 nm is ascribed to the  $\pi$ - $\pi^*$  transition of the benzenoid rings as reported for the absorption spectra of amino benzoic acid, while the other band around 620 nm is attributed to the  $n$ - $\pi^*$  transition from the nonbonding nitrogen lone pair of a localized benzenoid highest occupied molecular orbital (HOMO) to the  $\pi^*$  of a quinoid lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) [27].

### 3.2 AFM of *p*(Ani-co-*o*-Aba)/GCE, HRP-*p*(Ani-co-*o*-Aba)/GCE and CS/HRP-*p*(Ani-co-*o*-Aba)/GCE

The AFM technique was widely employed to investigate the surface topography of modified electrodes.

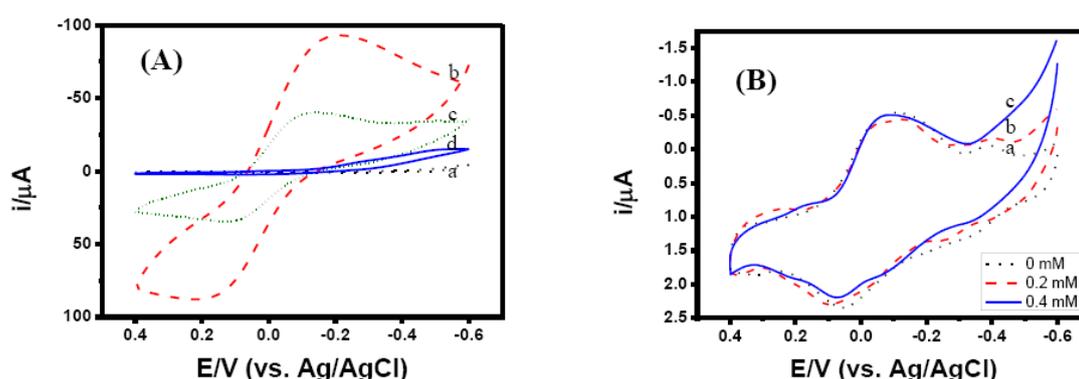


**Figure 4.** Representative AFM images of (A) *p*(Ani-co-*o*-Aba)/GCE, (B) HRP-*p*(Ani-co-*o*-Aba)/GCE and (C) CS/HRP-*p*(Ani-co-*o*-Aba)/GCE.

Figure 4A-C show the representative AFM image ( $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  scan size) of the p(Ani-co-o-Aba)/GCE, HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE and CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE, respectively. As shown in Figure 4A, the p(Ani-co-o-Aba) particles deposited on GCE were in a range of a few hundred nanometers, which give rise to higher surface and easier immobilization of HRP molecules than the bare electrodes [23]. As shown in Figure 4B and 4C, the topographical images of the HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE and CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE quite different from the p(Ani-co-o-Aba)/GCE were observed. This is attributed to the fact that immobilized HRP and CS film coating mainly changed the surface characteristic of the p(Ani-co-o-Aba)/GCE. These results obtained here were similar to several enzyme electrodes [28-29].

### 3.3 Electrochemical behavior of CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

All electrochemical measurements were performed in a PBS (pH 6.5) to investigate the changes of the electrochemical behavior after each modification step. Figure 5A shows the CVs of the bare GCE, p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE, HPR-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE and CS/HPR-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE, respectively. Concerning the bare GCE (curve a, black dot line), no peak was observed as a result from the lack of redox-active material. After modified with the p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>) (curve b, red dash line), the redox peaks were observed due to the electrochemical behavior of an electrically conducting polymer [30-32]. According to Gao et al. [33], the current peaks decreased gradually after immobilization of HRP, and CS coating on the electrode surface, respectively. These results were attributed to the insulating property of HRP (curve c, green short dash line) and CS (curve d, blue solid line) (see Figure 5A).

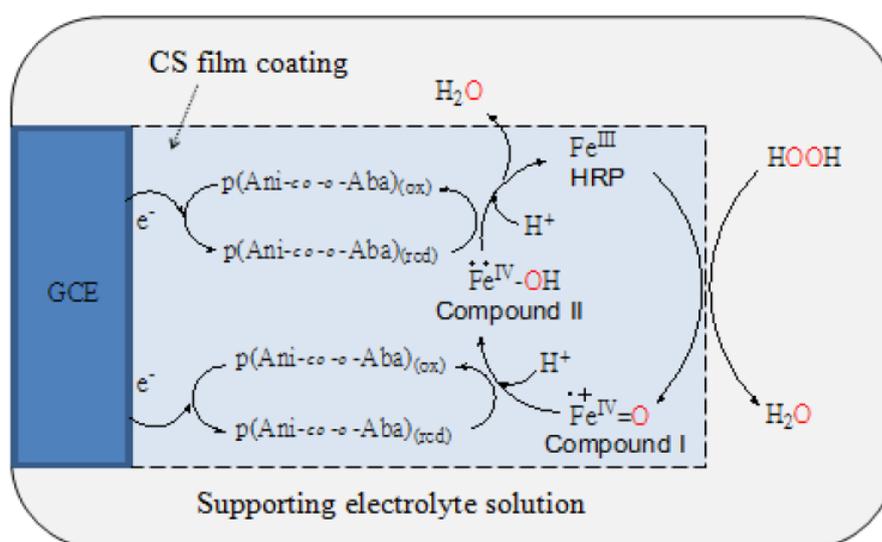


**Figure 5.** (A) CVs of (a) bare GCE (black dot line), (b) p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE (red dash line), (c) HPR-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE (green short dash line) and (d) CS/HPR-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE (blue solid line). (B) Typical CVs of the CS/HPR-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE in a N<sub>2</sub>-saturated PBS (pH 6.5) in the absence (curve a, black dot line) and presence of 0.2 mM (curve b, red dash line) and 0.4 mM (curve c, blue solid line) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using scan rate 50 mV/s at room temperature.

The typical cyclic voltammograms (CVs) of the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE were investigated to determine the working potential for the electrochemical measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The electrocatalysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction was studied by cycling the potential between +0.4 and -0.6 V (vs. Ag/AgCl) at the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE to a Pt electrode in a PBS (pH 6.5) using scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup> at room temperature. As shown in Figure 5B, when 0.2 mM (curve b, red dash line) and 0.4 mM (curve c, blue solid line) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were introduced into electrochemical system, the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE showed an obviously electrocatalytic response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (the reduction currents increased noticeably while the decrease of oxidation currents decreased). This feature implies that an enhanced enzymatic reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was generated from the bioactivity of the immobilized HRP.

### 3.4 Electrocatalytic reaction mechanisms of CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

The general features of the catalytic pathway for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction by HRP are currently well understood [16,34-36]. According to Berglund et al. [37], the electrocatalytic reaction mechanisms of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on the CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE could be schematically illustrated in Figure 6:



**Figure 6.** Electrocatalytic reaction mechanisms of the CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

There are two different intermediates of horseradish peroxidase compounds that form during the reactions. They were created with either a reaction with hydrogen peroxide or an addition of an electron. Initially, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS diffused to the enzyme electrode, where it was enzymatically reduced by HRP (Fe<sup>III</sup>) to give H<sub>2</sub>O and to form the first intermediate (compound I). This intermediate is a two-valent oxidized form that contains an oxyferryl centre with the iron in the ferryl state

( $^{+}\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) and a porphyrin II cation radical. Then, the compound I shows the catalytic activity while its porphyrin radical undergoes the reduction to form the second intermediate (compound II,  $^{+}\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{OH}$ ), which is subsequently regenerated to the native HRP by accepting one electron from the reduction state of copolymer,  $\text{p}(\text{Ani-co-o-Aba})_{(\text{red})}$ , on the electrode surface while copolymer itself changes into the oxidation state,  $\text{poly}(\text{Ani-co-o-Aba})_{(\text{ox})}$ . The  $\text{poly}(\text{Ani-co-o-Aba})_{(\text{ox})}$  could be recycled to  $\text{p}(\text{Ani-co-o-Aba})_{(\text{red})}$  at the electrode surface. When electrons were transferred from the electrode surface, the amperic currents were generated. Thus, the content of  $\text{H}_2\text{O}_2$  could be determined by the measurement of currents. This approach was widely researched since it could be used to detect  $\text{H}_2\text{O}_2$  with high sensitivity at a low quantitatively detectable concentration.

### 3.5 Optimization conditions for detection of $\text{H}_2\text{O}_2$ at CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE

The optimization conditions for the detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were examined by the CV method. In this work, the voltammetric currents of the novel biosensor could be controlled by changing the *o*-Aba mol ratio in  $\text{p}(\text{Ani-co-o-Aba})$  synthesis, HRP concentration, CS concentration, pH and applied potential. The CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE was investigated by evaluating the reduction current to 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a  $\text{N}_2$ -saturated PBS (pH 6.5).

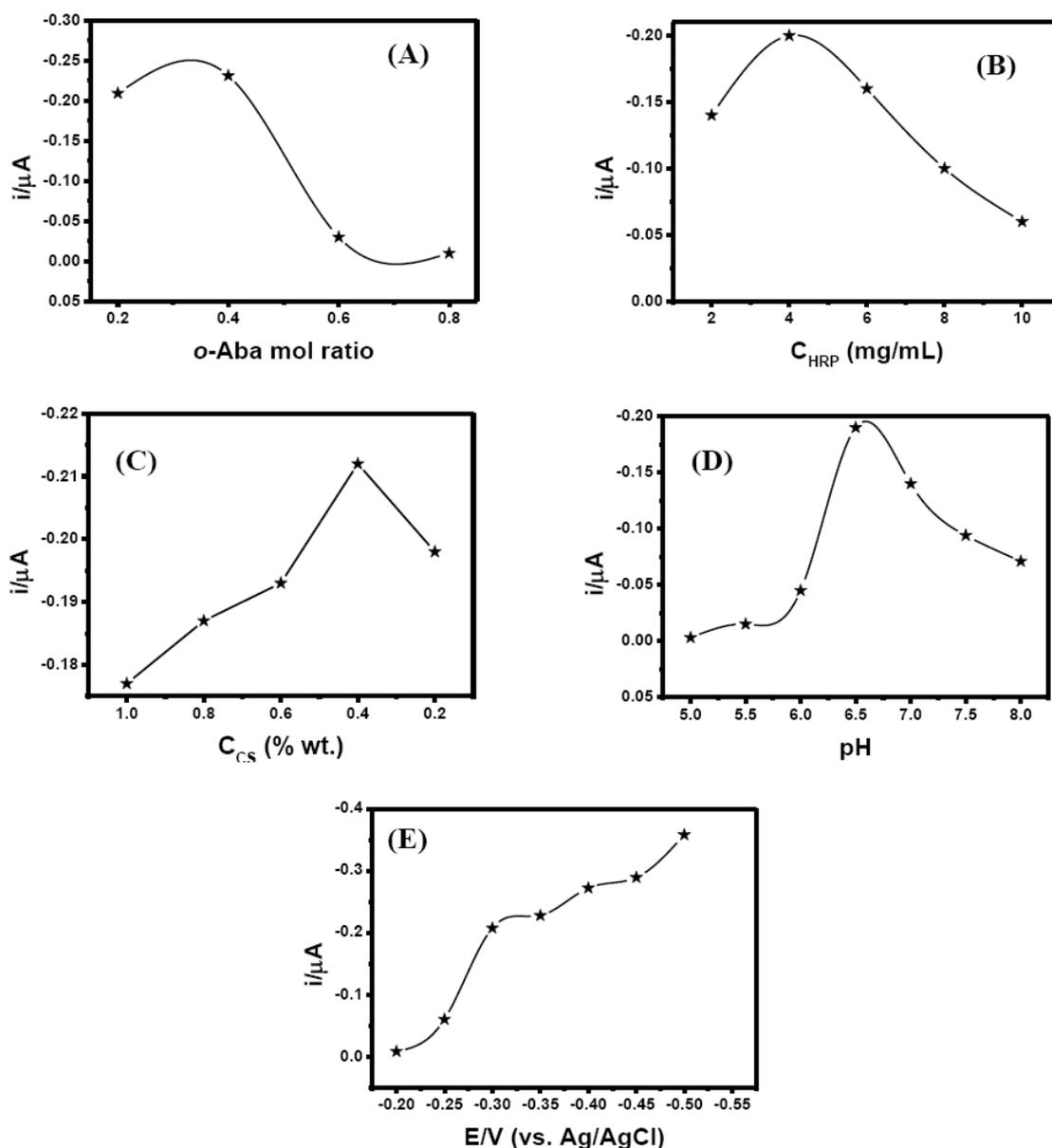
The effect of *o*-Aba mol ratio in  $\text{p}(\text{Ani-co-o-Aba})$  was varied from 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8, respectively. The CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE prepared with the different *o*-Aba mol ratios was investigated by evaluating the reduction current to  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the applied potential of -0.3 V. As shown in Figure 7A, the current responses increased with increasing *o*-Aba mol ratio from 0.2 to 0.4 in the  $\text{p}(\text{Ani-co-o-Aba})$ , but decreased from 0.4 to 0.8. Therefore, a 0.4 mol ratio of the  $\text{p}(\text{Ani-co-o-Aba})$  was selected for casting the modified electrode and for further experiments.

The effect of HRP concentration on the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE was studied in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the potential of -0.3 V. As shown in Figure 7B, the current responses increased with increasing the HRP concentration to maximum value at 4 mg mL<sup>-1</sup>, and then tended to decrease with further increase in the HRP concentration. This behavior is typical of the enzyme-based biosensors [35,38]. Thus, 4 mg mL<sup>-1</sup> HRP was chosen for subsequent experiments.

The effect of CS concentration on the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-o-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE was studied in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the potential of -0.3 V. The concentrations of CS solution were decreased from 1.0 to 0.2%wt. Li et al. [39] suggested that although high %CS solutions result in a high stability of modified electrode, high thickness of film coating also result in a large noise and slow response of biosensor. As seen in Figure 7C, the current responses increased with the decrease of %CS solution from 1.0 to 0.4%wt and then decreased from 0.4 to 0.2% wt. These results indicated that 0.2% wt of CS solution was not sufficient and would result in thin and unstable film on the modified electrode. Thus, to make a stable biosensor, a 0.4%wt of CS solution was selected for further investigations.

As known, the effect of pH on the  $\text{H}_2\text{O}_2$  electrocatalytic biosensor is mainly due to the catalytic activity of the enzyme. In this work, the effect of pHs of a PBS on the current responses of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the potential of -0.3 V was investigated from pH 5.0 to 8.0. According to Tangkuaram et al. [20], the acidic solution greatly enhanced the electrocatalysis of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by the HRP enzyme, because  $\text{H}^+$  is

needed for HRP enzyme in the reduction of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$ . As shown in Figure 7D, the current responses increased rapidly from pH 5.0 to 6.5, and then slightly decreased from pH 6.5 to 8.0. Thus, to obtain the maximum sensitivity and bioactivity, the pH 6.5 of PBS was selected as the suitable pH of the supporting electrolyte solution for amperometric determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



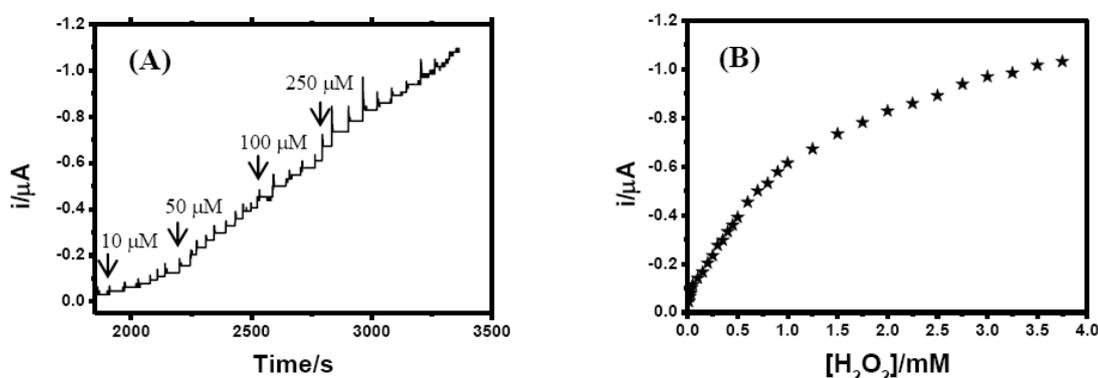
**Figure 7.** Dependence of current response to 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a PBS at CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE: (A) *o*-Aba mol ratio, (B) HRP concentration, (C) CS concentration, (D) pH of PBS and (E) Applied potential.

The effect of applied potential on the current responses of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a PBS (pH 6.5) using the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6</sub>-co-*o*-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE is investigated by evaluating the reduction current of  $\text{H}_2\text{O}_2$  from -0.2 to -0.5 V. As shown in Figure 7E, the current responses increased when increasing the potential

from -0.2 to -0.5 V. Low current signal was observed below the potential of -0.3 V, but highly increased from -0.3 to -0.5 V. Although the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE could have an excellent response at higher voltages, the high operating potential could result in interference from matrix species. Thus, a suitable applied potential of -0.3 V was selected for the determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.6 Amperometric measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signal from CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE

The amperometric measurement using the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE was investigated by successively adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a continuous stirring 10 mL PBS solution under the optimized condition. Figure 8 shows the amperometric signals corresponding to its calibration plot under the optimal conditions. As shown in Figure 8A, the current increases with increasing the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ranging from 10 μM to 4 mM. The response time was very fast, indicating that the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE had a higher sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The calibration plot was constructed by plotting between the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and the corresponding current. As shown in Figure 8B, the linear response range of the biosensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was from 10 to 1,000 μM with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.9905, and the detection limit of 1.8 μM was estimated based on the signal-to-noise ratio (S/N = 3).



**Figure 8.** (A) Typical amperometric response of the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE at the applied potential of -0.3 V (vs. Ag/AgCl) to the successive additions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a stirring PBS (pH 6.5). (B) The linear calibration plot of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations vs. the corresponding current.

The apparent Michaelis-Menten constant ( $K_M^{app}$ ), which gave an indication of enzyme-substrate kinetics, could be obtained from the electrochemical version of the Lineweaver-Burk equation:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M^{app}}{I_{max} C}$$

where  $I_{ss}$  is the steady-state current after the addition of substrate,  $I_{max}$  is the maximum current under the saturated substrate condition, and  $C$  is the bulk concentration of the substrate. It was found

that the  $K_M^{app}$  value for the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE was calculated to be 5.14 mM, indicating that the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE was a high affinity of the enzyme immobilization for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electroanalytical determination. The  $K_M^{app}$  found here was smaller than such  $K_M^{app}$  value of 8.01 mM for the system of HRP-ZrO<sub>2</sub>/Au electrode [40].

**Table 1.** Comparison of analytical performance of the proposed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection with previously reported modified electrodes.

Electrode	Applied potential (V)	Linear range (μM)	Detection limit (μM)	References
AuNPs-HRP/CS <sup>a</sup>	-0.3 <sup>d</sup>	12.2-2,430	6.3	[41]
HPR/AuNPs/Thi/P(ABSA) <sup>b</sup>	-0.45 <sup>d</sup>	2.6-8,800	0.64	[33]
HRP-ZrO <sub>2</sub> <sup>c</sup>	-0.3 <sup>d</sup>	20-9,450	2	[40]
HRP/PAni/CS <sup>b</sup>	-0.13 <sup>e</sup>	10-1,500	0.5	[35]
SA/HRP-AuNPs <sup>c</sup>	-0.4 <sup>e</sup>	20-13,700	3	[24]
HRP/PAni/MWCNTCOOH <sup>c</sup>	-0.35 <sup>e</sup>	86-10,000	86	[42]
HRP/AuNPs-Thi/CS <sup>b</sup>	-0.38 <sup>e</sup>	0.1-100	0.05	[43]
CS/HRP-p(Ani <sub>0.6-co-o</sub> -Aba <sub>0.4</sub> ) <sup>b</sup>	-0.3 <sup>e</sup>	10 – 1,000	1.8	This work

AuNPs = gold nanoparticles; Thi = Thiophene; P(ABSA) = *p*-aminobenzene sulfonic acid; PAni = Polyaniline; MWCNTCOOH = Carboxy-functionalized multiwalled carbon nanotube; SA = Sodium alginate

<sup>a</sup> Carbon paste electrode (CPE)

<sup>b</sup> Glassy carbon electrode (GCE)

<sup>c</sup> Gold (Au) electrode

<sup>d</sup> Saturated calomel electrode (SCE)

<sup>e</sup> Silver/silver chloride (Ag/AgCl)

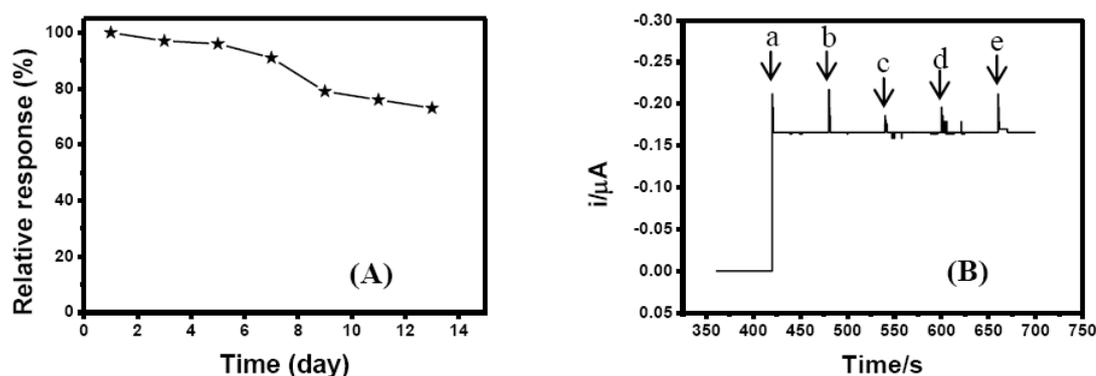
Table 1 shows the analytical performance of the proposed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection compared with various modified electrodes. This suggests that the linearity range, detection limit and response time of the proposed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor mentioned above appeared to be beneficial to improve upon those of other previously reported modified electrodes.

### 3.7 Stability and selectivity of CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE

Stability is important in practical use of the biosensors. In this study, the stability of the successive tests was investigated using the same biosensor and monitoring the current response of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the applied potential -0.3 V (vs. Ag/AgCl). As shown in Figure 9A, it was found that the current responses of the biosensors gave the relatively closed results for the first 7 days, and the

electrochemical activity loss about 27% was observed after 13 days. These results suggested that the novel biosensor was a good satisfactory stability.

One of the most important challenges in the amperometric detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is the problem from other potential interferences. In the experiment, five interfering substances such as dopamine (DA), ascorbic acid (AA), glucose (Glu) and uric acid (UA) were used to evaluate the selectivity of the biosensor. Figure 9B shows a typical amperometric responses of the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE at the applied potential -0.3 V (vs. Ag/AgCl) to the successive addition of the identical concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DA, AA, Glu and UA in a continuously stirring PBS (pH 6.5). It was seen obviously that there was no significant change of the current responses generated from DA, AA, Glu and UA compared to the response of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Thus, these results strongly demonstrate that this modified electrode could be applied as the novel biosensor for a practical determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of AA, Glu, DA and UA.



**Figure 9.** (A) Stability study of the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE. (B) Amperometric responses of the CS/HRP-p(Ani<sub>0.6-co-o</sub>-Aba<sub>0.4</sub>)/GCE at the applied potential of -0.3 V (vs. Ag/AgCl) to the successive addition of (a) 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (b) 1 mM DA, (c) 1 mM AA, (d) 1 mM Glu and (e) 1 mM UA in a stirring PBS (pH 6.5).

#### 4. CONCLUSION

In conclusion, a novel method for fabrication of amperometric hydrogen peroxide biosensor was achieved by immobilizing horseradish peroxidase (HRP) on poly(aniline-*co-o*-aminobenzoic acid) (p(Ani-*co-o*-Aba)) through electrostatic attraction and then covered by chitosan (CS) film. A series of the p(Ani-*co-o*-Aba) having different compositions were prepared by the copolymerization of aniline (Ani) and *o*-aminobenzoic acid (*o*-Aba). The enzyme electrode exhibited a fast response toward  $\text{H}_2\text{O}_2$ , good linear range of response, as well as low detection limit. Based on these results, immobilizing HRP on p(Ani-*co-o*-Aba) through electrostatic attraction and then covered by CS film is useful strategy for preparing the amperometric enzyme biosensors.

## ACKNOWLEDGMENTS

The financial support from the National Research Council of Thailand (NRCT, 2556A11702005), the Centre of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Office of the Higher Education Commission and Faculty of Science, Ubon Ratchathani University (UBU) are gratefully acknowledged.

## References

1. S. Neill, R. Desikan and J. Hancock, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5 (2002), 388.
2. P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta*, 334 (2003), 41.
3. R. Stolarek, P. Bialasiewicz, M. Krol and D. Nowak, *Clin. Chim. Acta*, 411 (2010), 1849.
4. C.E. Huckaba and F.G. Keyes, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948), 1640.
5. K.A. Fährnich, M. Pravda and G.G. Guilbault, *Talanta*, 54 (2001), 531-559.
6. R.M. Sellers, *Analyst*, 105 (1980), 950.
7. A.S. Keston and R. Brandt, *Anal. Biochem*, 11 (1965), 1.
8. T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton and G. Marko-Varga, *Anal. Chim. Acta*, 330 (1996), 123.
9. N.C. Veitch, *Phytochemistry*, 65 (2004), 249-259.
10. S.B. Adeloju and G.G. Wallace, *Analyst*, 121 (1996), 699.
11. P.N. Barlett and J.M. Cooper, *J. Electroanal. Chem.*, 362 (1993), 1.
12. M.V. Deshpande and D.P. Amalnerkar, *Prog. Polym. Sci.*, 18 (1993), 623-649.
13. S. Bhadra, D. Khastgir, N.K. Singha and J.H. Lee, *Prog. Polym. Sci.*, 34 (2009), 783.
14. N. Gospodinova and L. Terlemezyan, *Prog. Polym. Sci.*, 23 (1998), 1443.
15. E.T. Kang, K.G. Neoh and K.L. Tan, *Prog. Polym. Sci.*, 23 (1998), 277.
16. C. Dhand, M. Das, M. Datta and B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011), 2811.
17. C.K.S. Pillai, W. Paul and C.P. Sharma, *Prog. Polym. Sci.*, 34 (2009), 641.
18. M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, 31 (2006), 603.
19. Q. Zhang, L. Zhang and J. Li, *Electrochim. Acta*, 53 (2008), 3050.
20. T. Tangkuaram, C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong and W. Veerasai, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007), 2071.
21. G. Yang, Y. Chang, H. Yang, L. Tan, Z. Wu, X. Lu and Y. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 644 (2009), 72.
22. J. Huang and R.B. Kaner, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2003), 851.
23. J. Huang, S. Virji, B.H. Weiller and R.B. Kaner, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2002), 314.
24. B. Chico, C. Camacho, M. Pérez, M.A. Longo, M.A. Sanromán, J.M. Pingarrón and R. Villalonga, *J. Electroanal. Chem.*, 629 (2009), 126.
25. C. Chen, L. Wang, Y. Tan, C. Qin, F. Xie, Y. Fu, Q. Xie, J. Chen and S. Yao, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011), 2311.
26. D. Li, J. Huang and R.B. Kaner, *Acc. Chem. Res.*, 42 (2008), 135.
27. M.T. Nguyen and A.F. Diaz, *Macromolecules*, 28 (1995), 3411.
28. X. Yu, D. Chattopadhyay, I. Galeska, F. Papadimitrakopoulos and J.F. Rusling, *Electrochem. Commun.*, 5 (2003), 408.
29. X. Yu, S.N. Kim, F. Papadimitrakopoulos and J.F. Rusling, *Molec. Biosys.*, 1 (2005), 70.
30. T. Ahuja, I.A. Mir and D. K. Rajesh, *Biomaterials*, 28 (2007), 791.
31. Y.-T. Kong, M. Boopathi and Y.-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2003), 227.
32. A. Chaubey and B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002), 441.
33. F. Gao, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, S. Cao and M. Tang, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007), 407.

*Int. J. Electrochem. Sci., Vol. 8, 2013*

10264

34. E.I. Iwuoha, D. Saenz de Villaverde, N.P. Garcia, M.R. Smyth and J.M. Pingarron, *Biosens. Bioelectron.*, 12 (1997), 749.
35. Z. Du, C. Li, L. Li, M. Zhang, S. Xu and T. Wang, *Mater. Sci. Eng., C*, 29 (2009), 1794.
36. X. Chen, Z. Chen, J. Zhu, C. Xu, W. Yan and C. Yao, *Bioelectrochemistry*, 82 (2011), 87.
37. G.I. Berglund, G.H. Carlsson, A.T. Smith, H. Szoke, A. Henriksen and J. Hajdu, *Nature*, 417 (2002), 463.
38. R. Villalonga, P. Díez, P. Yáñez-Sedeño and J.M. Pingarrón, *Electrochim. Acta*, 56 (2011), 4672.
39. F. Li, W. Chen, C. Tang and S. Zhang, *Talanta*, 77 (2009), 1304.
40. Z. Tong, R. Yuan, Y. Chai, Y. Xie and S. Chen, *J. Biotechnol.*, 128 (2007), 567.
41. C.-X. Lei, S.-Q. Hu, G.-L. Shen and R.-Q. Yu, *Talanta*, 59 (2003), 981.
42. M.-Y. Hua, Y.-C. Lin, R.-Y. Tsai, H.-C. Chen and Y.-C. Liu, *Electrochim. Acta*, 56 (2011), 9488.
43. X.B. Kang, G.C. Pang, X.Y. Liang, M. Wang, J. Liu and W.M. Zhu, *Electrochim. Acta*, 62 (2012), 327.

© 2013 by ESG ([www.electrochemsci.org](http://www.electrochemsci.org))



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles<sup>☆</sup>



Maliwan Amatatongchai<sup>a,b,\*</sup>, Wongduan Sroysee<sup>a</sup>, Sanoo Chairam<sup>a</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry and Center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>b</sup> Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Bangkok 10400, Thailand

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 December 2013

Received in revised form

19 June 2014

Accepted 21 July 2014

Available online 31 July 2014

#### Keywords:

Sulfite

Amperometry

Flow injection analysis

AuNPs

PDDA

CNTs

### ABSTRACT

A new approach is presented for sensitive and selective measurement of sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) in beverages based on a simple flow injection system with amperometric detection. In this work, the sulfite sensor was a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes–poly(diallyldimethylammonium chloride)–gold nanoparticles composites (CNTs–PDDA–AuNPs/GC). Electrochemical oxidation of sulfite with this electrode was first studied in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) using cyclic voltammetry. The results indicated that the CNTs–PDDA–AuNPs/GC electrode possesses electrocatalytic activity for the oxidation of sulfite with high sensitivity and selectivity. Sulfite was quantified using amperometric measurement with the new sensor at +0.4 V vs Ag/AgCl in conjunction with flow injection. The linear working range for the quantitation of sulfite was 2–200  $\text{mg L}^{-1}$  ( $r^2=0.998$ ) with a detection limit of 0.03  $\text{mg L}^{-1}$  ( $3\sigma$  of blank) and an estimated precision of 15%. The proposed method was successfully applied to the determination of sulfite in fruit juices and wines with a sample throughput of 23 samples per hour.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Sulfites in various forms (sulfur dioxide, metabisulfite, bisulfite and sulfite) are commonly used as preservatives and antioxidants in food and beverages to inhibit microbiological growth, to control enzymatic and non-enzymatic browning reactions and to assist in preserving vitamin C [1–4]. Despite these advantages, sulfite should be applied in strictly limited amounts due to its potential toxicity. This level of sulfite in food has been subjected to legislation since it was discovered that at a certain concentration level sulfite causes allergic reactions in some individuals [5]. The United States Food and Drug Administration (FDA) has required labeling of products containing more than 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of sulfite [6–8]. Therefore, it is

essential to have accurate and precise methods available for determination of the sulfite content in these products.

The Association of Analytical Chemist (AOAC) recommended a standard reference method for sulfite measurement that involves a combination of distillation and titration. The method required an acid distillation to extract the sulfur dioxide gas from sample matrices prior to analysis and the conventional titrimetric method suffers from poor precision and long analysis time. Many analytical methods for the sulfite assays such as spectrophotometry [9,10], chemiluminescence [4,11], capillary electrophoresis [12] and electrochemical detections [13–18] have been reported. Among these methods, electrochemical detection is most attractive because of its high sensitivity, simplicity, rapid response and inexpensive equipment.

In previous reports, the determination of sulfite using amperometric detections has been proposed using conventional electrodes, such as platinum [19], glassy carbon [20] and gold electrode [21], as the working electrode. However, all these electrodes have certain drawbacks, such as problems associated with the electrode fouling and high positive potential for oxidation of sulfite (0.8–1.2 V vs Ag/AgCl). As a result, many substances can interfere with

<sup>☆</sup>This paper is dedicated to Prof. Kate Grudpan on the anniversary of his 60th birthday.

\* Corresponding author at: Department of Chemistry and Center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand. Tel.: +66 45 353 401x4576; fax: +66 45 288 379.

E-mail addresses: [scmaliam@ubu.ac.th](mailto:scmaliam@ubu.ac.th), [amalivan@gmail.com](mailto:amalivan@gmail.com) (M. Amatatongchai).

the measurement. Therefore, modification of electrode is required to achieve high sensitivity and selectivity.

The use of functional hybrid materials composed of carbon nanotubes (CNTs) and conducting polymers for the construction of chemical sensors and biosensors has attracted great attention [22–24]. CNTs are increasingly recognized as a promising material for surface functionalization in electrochemistry and are widely used in research. The lamellar planes of  $sp^2$  carbon in graphite sheets are organized in hexagons with tremendously high degree of delocalization of  $\pi$ -electrons. Thus, CNTs can display metallic, semiconducting and superconducting electron transport properties [25,26] that are able to promote proton or electron transfer reaction. They also have high thermal capacity and are environmental friendly [25]. Recent studies have demonstrated that CNTs can impart high electrocatalytic activity and decrease surface fouling of electrode [27,28]. Poly(diallyldimethylammonium chloride), PDDA, is a conducting polymer used widely in fabrication of chemical [29] or biological sensors [23,24,30] and in various industrial applications [31]. For sensor application, it has been extensively used to immobilize biomolecules and to disperse nanomaterials in the development of electrochemical transducers [23,24,30].

Gold nanoparticles (AuNPs) feature excellent conductivity, high surface area and catalytic properties that make them promising materials for the electrochemical detection of various analytes [32]. AuNPs can be prepared and conjugated with many functionalizing agents such as ligands, surfactants, polymers and CNTs. They have been found to play an important role in augmenting the quality of chemical and biosensors. The synergistic combination of electroactive AuNPs and conducting compounds such as CNTs provides electro-sensitive and selective system for detection of cholesterols [23], hydrogen peroxide [24] and glucose [33]. However, to our knowledge, the use of glassy carbon modified with hybrid nanocomposites of CNTs–PDDA–AuNPs nanocomposite for amperometric detection of sulfite has not yet been reported.

This work describes a simple and effective method for constructing a sulfite sensor using carboxylated functionalized multiwall carbon nanotubes–poly(diallyldimethylammonium chloride)–gold nanoparticles (CNTs–PDDA–AuNPs) composites. The formation of this composite is through electrostatic interaction. The CNTs–PDDA–AuNPs nanocomposite is formed by drop coating on the surface of the glassy carbon (GC) electrode. CNT–PDDA–AuNPs composite film exhibits high activity, sensitivity and selectivity in the detection of sulfite.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

All solutions were prepared in deionized-distilled water (Water Pro PS, USA). Sodium sulfite ( $Na_2SO_3$ ) and poly (diallyldimethylammonium chloride) (PDDA, MW: 100,000–200,000, 20% w/w) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Carboxylated functionalized multiwall carbon nanotubes (CNTs–COOH, diameter:  $15 \pm 5$  nm, length: 1–5  $\mu$ m, purity: > 95%) were purchased from Nanolab Inc. (MA, USA). Hydrogen tetrachloro aurate (III) trihydrate ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ , Au > 48%) was purchased from Acros Organic (Geel, Belgium)

### 2.2. Apparatus

#### 2.2.1. Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetric measurements were carried out using an eDAQ potentiostat (model EA161, Australia) equipped with an e-corder 210 and e-Chem v2.0.13 software. The active surface area of glassy carbon electrode, (diameter 3 mm, CH Instrument, USA)

was approximately  $0.07$  cm<sup>2</sup>. An in-house three-electrode cell, comprising a working electrode (CNTs–PDDA–AuNPs/GC electrode), a reference electrode (Ag/AgCl) and a counter electrode (platinum wire) was employed. Measurements were performed using a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) as supporting-electrolyte solution and pure nitrogen was used for deaeration of the solution.

#### 2.2.2. Simple flow injection system with sulfite sensor

The flow injection (FI) system for amperometric detection of sulfite with the new sulfite sensor consisted of a Shimadzu pump (model LC-10AD, Japan), a Rheodyne injector (model 7725, USA) fitted with 20  $\mu$ L sample loop and an electrochemical detector. An eDAQ potentiostat (EA161), equipped with an e-corder 210, Chart v5.5.11 software and a thin layer flow cell with three electrodes system (CH Instruments, USA), was used for amperometric measurements. The glassy carbon modified with CNTs–PDDA–AuNPs was used as the working electrode, Ag/AgCl as the reference electrode and a stainless steel tube as the counter electrode. Silicone rubber gasket (flow channel,  $0.1 \times 0.6$  cm) was used as a spacer in the thin layer flow cell between the base of the cell and the working electrode. The analyte solution was passed through an inlet passage in the base and along a channel in the gasket contacting the electrode, then to the outlet. The area of working electrode was ca.  $0.06$  cm<sup>2</sup>.

### 2.3. Preparation of sulfite sensor

#### 2.3.1. Preparation of AuNPs

Gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized according to the method previously described by McFarland et al. [34]. In brief, 20 mL of 1.0 mM  $HAuCl_4$  was heated to boiling on a stirring hot plate. Then 2.0 mL of 38.8 mM sodium citrate was added to the solution. The solution was further heated and stirred for about 10 min to obtain a wine-red solution. The solution was then cooled to room temperature while stirring continuously and stored in a dark bottle at 4 °C.

#### 2.3.2. Preparation of CNTs–PDDA

A general method for functionalization of multiwall carbon nanotube with PDDA (CNTs–PDDA) as described by Cui et al. [24] was adopted. Briefly, carboxylated carbon nanotubes (CNTs–COOH) were functionalized with PDDA by dispersing of 10 mg CNTs–COOH into 20 mL of a 0.25% PDDA aqueous solution containing 0.5 M NaCl and ultrasonicated, with stirring, for 30 min. The resulting dispersion was centrifuged and washed with water three times to remove residual PDDA. Finally, 2 mg of the collected product was dispersed in 1 mL water and the resulting solution sonicated for 5 min before use.

#### 2.3.3. Preparation of CNTs–PDDA–AuNPs

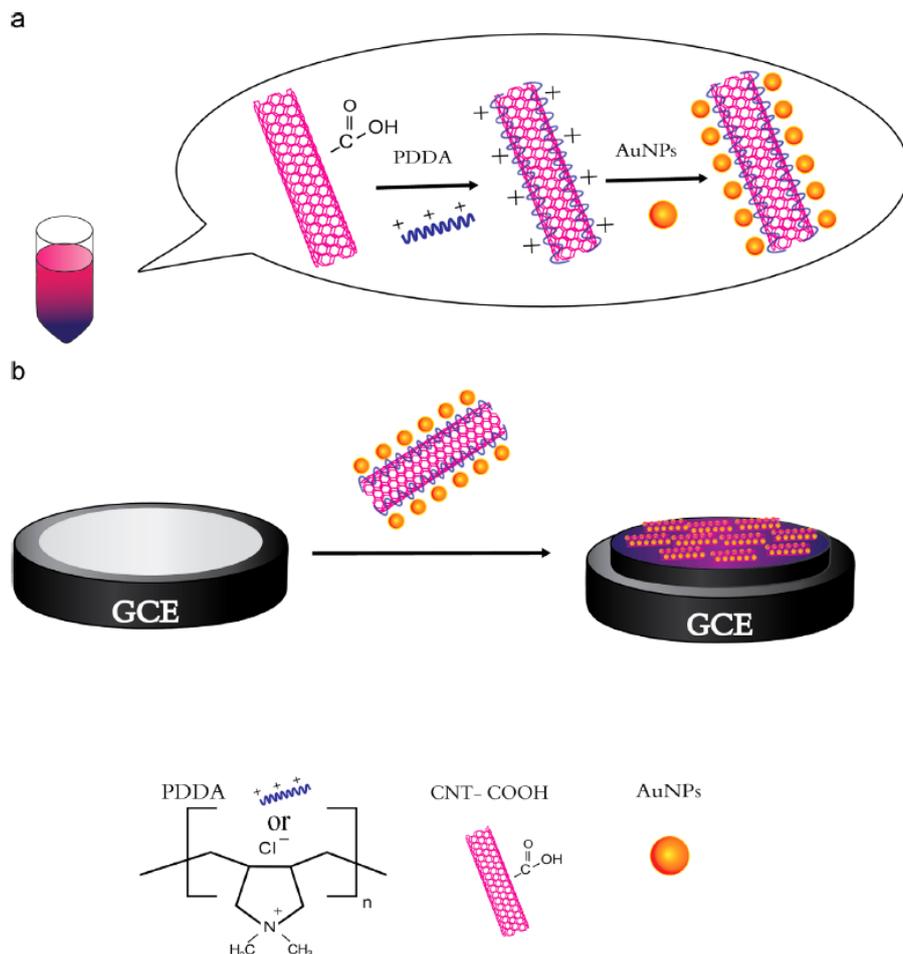
The preparation of CNTs–PDDA–AuNPs dispersion is schematically shown in Scheme 1a. The CNTs–PDDA was functionalized with AuNPs by the following procedure: 0.5 mL of CNTs–PDDA dispersion ( $4$  mg mL<sup>-1</sup>) was mixed with an equivalent volume of 0.25% AuNPs solution. The resulting solution was then sonicated for 15 min. The negatively charged AuNPs was adsorbed on the positively charged CNTs–PDDA by electrostatic attraction.

#### 2.3.4. CNTs–PDDA/GC electrode

Prior to the electrochemical experiments, glassy carbon (GC) electrode (diameter 3 mm) was polished using 1.0 and 0.05  $\mu$ m alumina slurry, successively. The electrode was rinsed with distilled water and then sonicated in de-ionized water for 5 min to remove residual abrasive particles. GC/CNTs–PDDA electrode was prepared by casting 40  $\mu$ L of the CNTs–PDDA dispersion ( $2$  mg mL<sup>-1</sup>), mentioned

136

M. Amatatongchai et al. / Talanta 133 (2015) 134–141



**Scheme 1.** Preparation of the sulfite sensor based on the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode: (a) preparation of CNTs-PDDA-AuNPs dispersion and (b) drop-coating method of CNTs-PDDA-AuNPs dispersion on to glassy carbon (GC) electrode.

above, on the surface of the polished glassy carbon (GC) electrode, and then left to dry at ambient temperature.

### 2.3.5. CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode

The preparation of sulfite sensor based on the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode is schematically shown in Scheme 1b. The electrode was prepared by casting 40  $\mu$ L of the CNTs-PDDA-AuNPs dispersion on the surface of the polished glassy carbon (GC) electrode, and dried at ambient temperature.

### 2.3.6. Characterization

The TEM image of AuNPs was collected under vacuum at an operating voltage of 200 kV (JEOL 2100 TEM, Japan). A drop of colloidal AuNPs solution was placed on a formvar-coated TEM grid. The hydrodynamic diameter of AuNPs was determined by using dynamic light scattering (DLS, MAL 500261 Particle Size Analyzer) equipped with 35 mW solid-state laser detector at an operating wavelength of 658 nm. Measurements were carried out at 25  $^{\circ}$ C

with 90 $^{\circ}$  detection angle in a PS cuvette. The sample was dispersed in 0.01 M KNO<sub>3</sub> solution.

The SEM images were collected with a field emission scanning electron microscope (FESEM, JEOL JSM 5410 LV, Japan) under vacuum at accelerating voltage of 20 kV. The sample was mounted on a double-sided carbon tape, and then gold sputter coated to minimize charging prior to SEM imaging. Atomic force microscopy (AFM) images were obtained using a scanning microscope probe (Park Systems Corp., Korea.) controlled by the XEI software.

### 2.4. Standard method for sulfite determination

The iodometric method [35] was employed in order to compare the results obtained using the proposed FI-sulfite sensor method. An accurate sample volume (5.00 mL) was transferred into a 125 mL conical flask and 5 mL of standard iodine solution added. The excess of iodine was titrated with standard sodium thiosulfate solution using starch as indicator. These titrations were carried out as quickly as possible with the end point indicated by the formation of a light blue color.

### 2.5. Method validation

Various brands of fruit juice and wine were purchased from supermarkets in Ubon Ratchathani Province, Thailand. Five fruit juice samples (A–E), three white wines (F–H) and four red wines (I–L) were analyzed using the developed amperometric sensor in flow injection system. Dilution of samples (5 or 10 fold) with phosphate buffer was carried out prior to analysis. The amperometric results were compared with those from the iodometric method [35].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of nanomaterials

The morphology and size of as-prepared gold nanoparticles were examined by TEM measurement. From the TEM image as shown in Fig. 1(a), the nanoparticles mainly consisted of spherical nanostructures having uniform size. In order to investigate the particle size distribution, the as-prepared nanoparticles were characterized by DLS measurement. As shown in Fig. 1(b), the as-prepared nanoparticles exhibit a broad particle size distribution with a mean particle diameter of about 13.23 nm.

Surface morphologies of glassy carbon electrode modified with CNTs-PDDA and CNTs-PDDA-AuNPs were investigated by SEM [Fig. 2(a, b)] and AFM [Fig. 2(c, d)]. As shown in Fig. 2(a), the surface of CNT-PDDA modified electrode displays the characteristic feature of a smooth film. However with the augmented AuNPs, Fig. 2(b) clearly shows that the electrode surface became

rougher after modification (CNTs-PDDA-AuNPs), while the feature of CNTs-PDDA is still evident. This indicated that AuNPs play an important role to a modified electrode surface, resulting in a larger surface area. The atomic force microscopy (AFM) is one of the most widely used techniques for topological study. As shown in Fig. 2(c), long and typical tube-like CNTs form a homogeneous hybrid material, with some coexisting from the wrapped structure. Here, PDDA plays the roles of dispersing agent, inhibiting the strong  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction between CNTs [23]. In contrast, the AFM image of CNTs-PDDA-AuNPs displays obviously different surface morphology from CNTs-PDDA. As shown in Fig. 2(d) the CNTs supports are decorated by nanosized AuNPs with some aggregations. These results might be attributed to the interaction between the negatively charged CNTs and the positively charged PDDA-capped AuNPs [33].

### 3.2. Cyclic voltammetry of sulfite

The electrochemical behavior of sulfite at the GC, CNTs/GC, CNTs-PDDA/GC and CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrodes were studied using cyclic voltammetry. Fig. 3 shows the comparison of the response of the bare GC, CNTs/GC, CNTs-PDDA/GC and CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrodes toward electro-oxidation of sulfite at pH 7.0. Sulfite oxidation is an electrochemically irreversible process. Bare GC electrode (curve a) results in a peak shape signal at about 0.85 V versus Ag/AgCl, whereas the CNTs/GC (curve b), CNTs-PDDA/GC (curve c) and CNTs-PDDA-AuNPs/GC (curve d) shows oxidation peaks at 0.40, 0.33 V and 0.25 V, respectively. A shift of  $-0.45$ ,  $-0.52$  V and  $-0.60$  V was obtained with the CNTs/GC, CNTs-PDDA/GC and CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrodes, respectively, compared to the peak observed at GC electrode. The sulfite signals from CNTs/GC, CNTs-PDDA/GC and CNTs-PDDA-AuNPs/GC are also much larger than that for GC. These results indicate that CNTs can be used to promote electron transfer reactions due to their significant high electrical conductivity, high surface area as well as good chemical stability. These results also show that CNTs-PDDA reduces the overpotential of sulfite oxidation and in fact imparts electrocatalytic activity. There is an enhancement of the anodic peak potential and peak current at CNTs-PDDA-AuNPs/GC relative to that obtained at CNTs-PDDA/GC. This result further shows that the electrocatalytic activity of CNTs-PDDA-AuNPs/GC was higher than the CNTs-PDDA/GC electrode due to the high conductivity and high surface-to-volume ratio of AuNPs, which facilitates electron transfer. This improvement in sensor sensitivity and selectivity using AuNPs is similar to that reported for hydrogen peroxide sensor studied by Xiao et al. [36]. From these results, it can be concluded that the highest electrocatalytic effect for sulfite oxidation is observed at CNTs-PDDA-AuNPs/GC (curve d).

The effect of buffer pH on oxidation peak current and peak potential was investigated for pH 5 to pH 8 using the 0.1 M phosphate buffer as supporting electrolyte (Fig. 4a). It was observed that the values of peak potential shifted slightly towards less positive values (Fig. 4b) when the pH increased. Fig. 4(c) shows that the maximum peak current was obtained for pH 7.0. Therefore, pH 7.0 was selected as the optimum pH for amperometric detection of sulfite.

Fig. 5(a) shows the cyclic voltammograms of a sulfite solution at the CNTs-PDDA-AuNPs/GC in 0.1 M phosphate buffer (pH7) for various scan rates. As shown in the inset of Fig. 5(a), the oxidation peak current ( $\mu\text{A}$ ) increased linearly with the square root of scan rate ( $\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}$ ) within the scan range of 0.01–0.15  $\text{V s}^{-1}$ . Linear regression analysis provided  $r^2$  value of 0.996. These results indicated that the current is limited by diffusion of sulfite to the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode. It can also be seen in Fig. 5a that with increasing scan rate, the peak potential for the

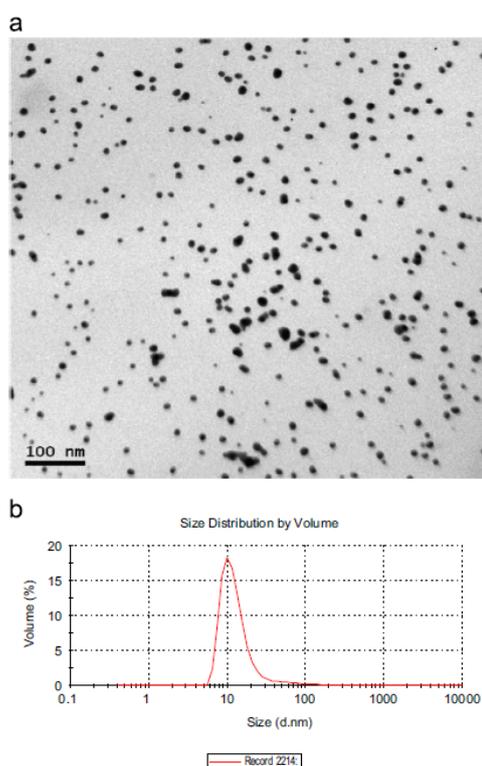


Fig. 1. (a) TEM image and (b) particle size distribution of as-prepared AuNPs.

138

M. Amatongchai et al. / Talanta 133 (2015) 134–141

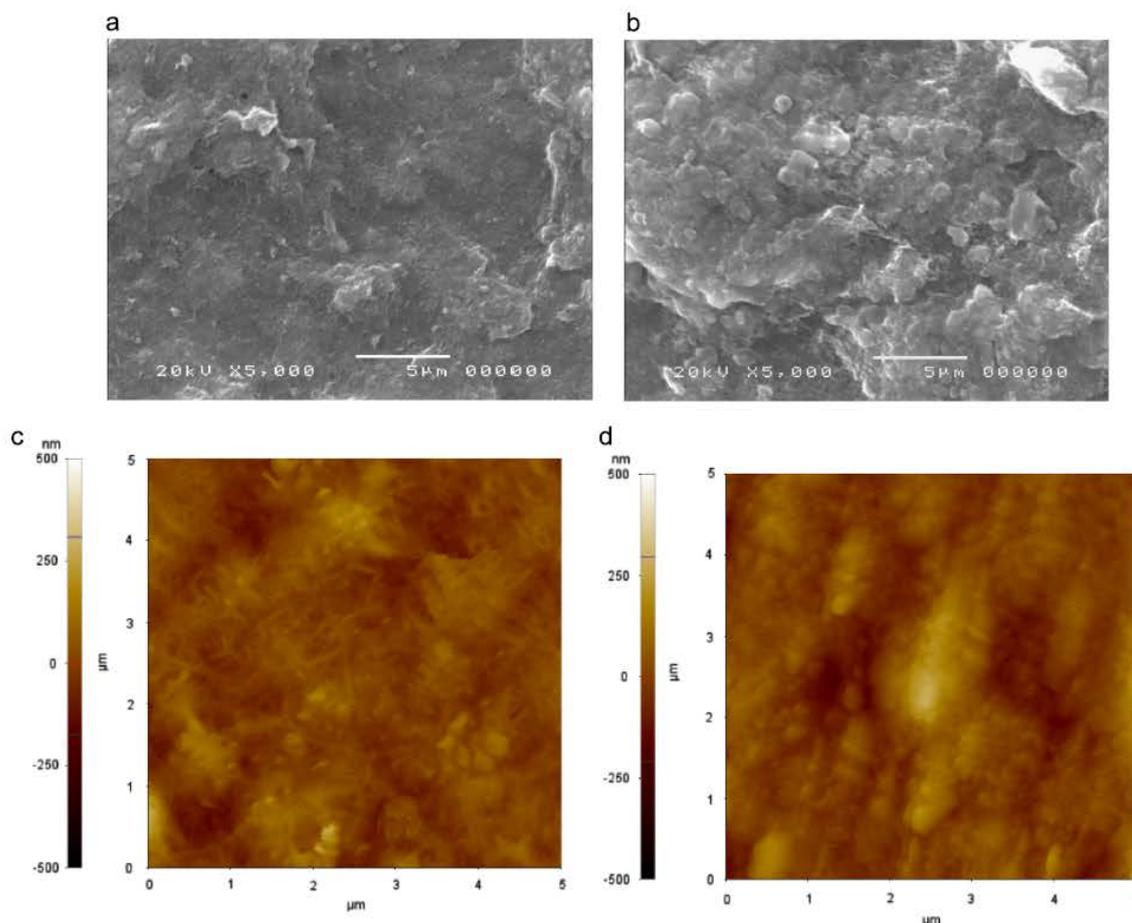


Fig. 2. SEM (a, b) and AFM (c, d) images of CNTs-PDDA (a, c) and CNTs-PDDA-AuNPs (b, d).

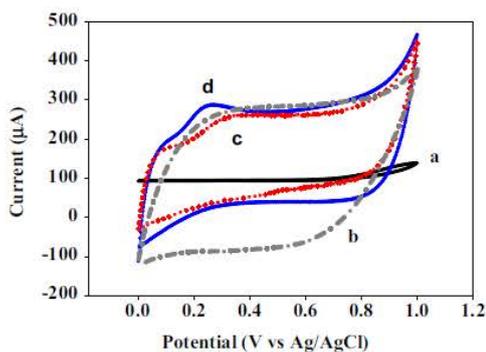


Fig. 3. Cyclic voltammograms of 4 mM sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 on (a) bare glassy carbon (GC), (b) CNTs/GC, (c) CNTs-PDDA/GC and (d) CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrodes; scan rate:  $0.05 \text{ V s}^{-1}$ .

electro-oxidation of sulfite is shifted to more positive values. This result suggests that the reaction between the oxidation sites of CNTs-PDDA-AuNPs/GC with sulfite is rate limiting.

Fig. 5(b) shows the relationship between peak current ( $\mu\text{A}$ ) and sulfite concentration at 2 to 10 mM. Linear calibration ( $r^2=0.999$ ) was obtained with a slope of  $38.1 \mu\text{A mM}^{-1}$  (inset of Fig. 5(b)). These data confirm that the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode is suitable for quantitation of sulfite.

The repeatability of the measurements and the reproducibility between electrodes were also studied. The relative standard deviation (RSD) of the sensor response with  $10 \text{ mg L}^{-1}$  sulfite was 1.6% for 10 successive measurements. The amperometric responses remained within 90% of the initial response for 4 days without any surface treatment. The sensor exhibited 70% of the initial response on the 7th day of use. Repeat of the set of experiments as described in Section 2.3.4 showed satisfactorily results between electrodes.

### 3.3. Amperometric detection in FIA system

#### 3.3.1. Optimal potential

The proposed amperometric method for detection of sulfite is based on the electrochemical monitoring of the oxidation signal from sulfite at the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode. Detection potential strongly affects the size of the current signal from sulfite. To find the optimal detection potential, hydrodynamic voltammogram was

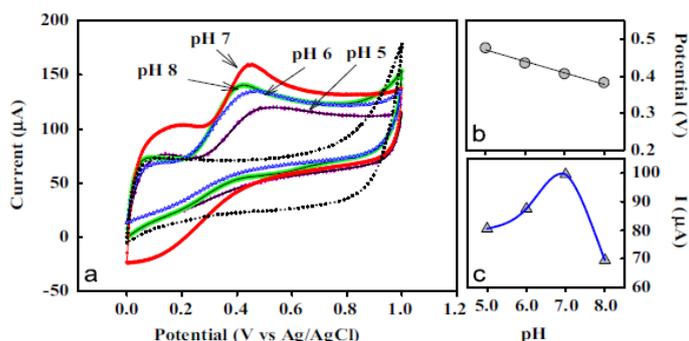


Fig. 4. Results from cyclic voltammetry at various pHs for 2 mM sulfite in 0.1 M phosphate buffer showing (a) CVs on CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode, (b) peak potential and (c) peak current for various pHs.

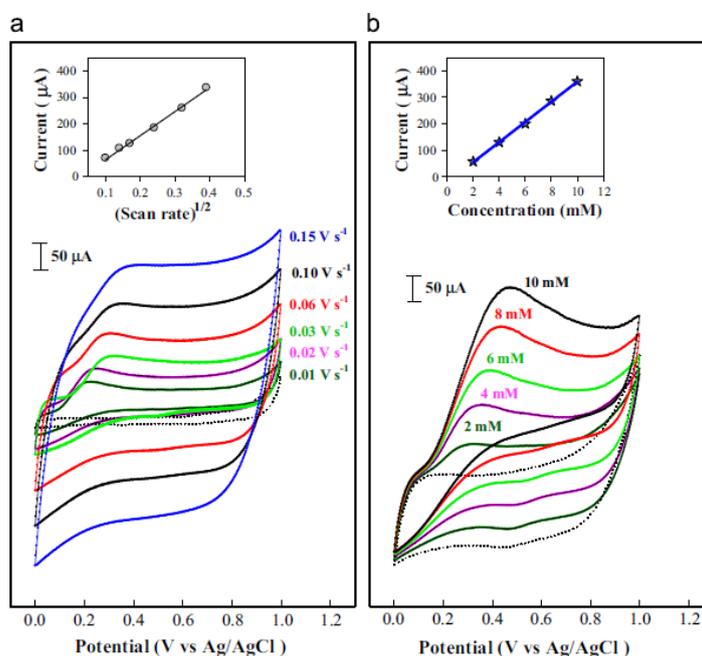


Fig. 5. Cyclic voltammograms for sulfite in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at sulfite electrode (a) with variation of the scan rate from 0.01 to 0.15 V s<sup>-1</sup>; sulfite: 2 mM and (b) variation of the sulfite concentration from 2 to 10 mM; scan rate: 0.05 V s<sup>-1</sup>. Optimal conditions; modifying solution: 2 mg L<sup>-1</sup> of CNTs-PDDA containing 0.125% of AuNPs dispersion; modifying volume: 40 μL.

measured. Hydrodynamic voltammetry was obtained from injection of 20 μL of 2 mg L<sup>-1</sup> standard sulfite solution into the flow injection system with varying detection potential from 0.0 to 1.0 V as shown in Fig. 6. The oxidation current increased with the increase of detection potential between 0 and 0.4 V. Beyond that, a sharp decrease in the peak current response was noted. Therefore, detection potential of 0.4 V was selected for the FIA experiments.

### 3.3.2. Analytical features

Using the optimum condition, representative signal profiles for multiple injections and calibration plot are depicted in Fig. 7. Calibration curve is linear in the range of 0.1–200 mg L<sup>-1</sup>.

The regression equation is given by  $y = 10.054x + 42.304$  ( $r^2 = 0.998$ ), where  $y$  and  $x$  are the height of peak current (nA) and sulfite concentration (mg L<sup>-1</sup>), respectively, with the slope of the straight line corresponding to linear sensitivity of 10.054 nA mg<sup>-1</sup> L. The detection limit ( $3\sigma$ ) is  $\sim 0.03$  mg L<sup>-1</sup>. The system provides good precision (%R.S.D = 1.5) for 20 μL injections ( $n = 10$ ) of 2 mg L<sup>-1</sup> sulfite. Throughput of analysis is 23 samples per hour.

A comparison of the analytical characteristics of the present amperometric sulfite sensor with other modified electrodes for sulfite detection is summarized in Table 1. The applied potential of the proposed method is lower [15,17,18,37] or comparable to those of previous reports [14,16,38]. This has the advantage of reducing the risk of interference from sample matrices. Moreover, the use of

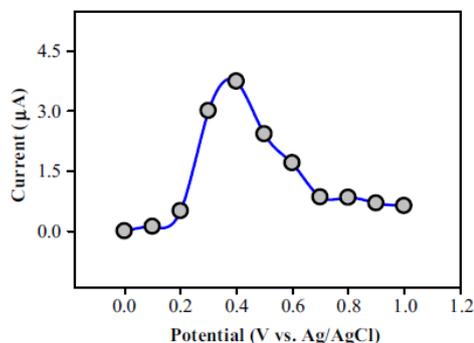


Fig. 6. Influence of the applied potential on the detection of sulfite at CNTs-PDDA-AuNPs/GC. Conditions: sulfite: 2 mg L<sup>-1</sup>, carrier solution: phosphate buffer pH 7.0, flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

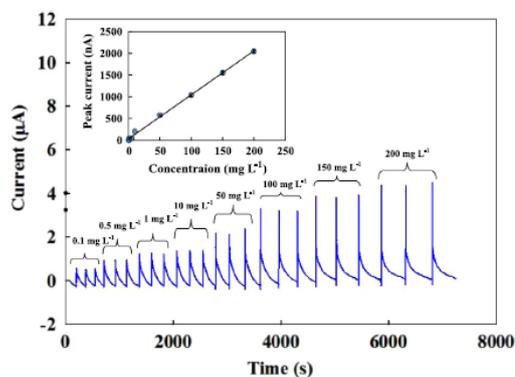


Fig. 7. Typical FIA response obtained for injections of sulfite standards. The inset shows the linear relationship between the signal of sulfite and concentration. Conditions: operating potential: +0.4 V vs Ag/AgCl, carrier solution: phosphate buffer pH 7.0, flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode gives an improved analytical performance for sulfite determination in terms of lower detection limit and wider linearity range than those of other previously reported modified electrodes. It was observed that our method was easier (*i.e.* more rapid) for modifying the electrode than the previous methods [17,18,37,38]. Although the previous electrodes of NiPCNF [37] and FDA-CNT [38] could provide as high sensitivity as our method, the fabrication or methods for modifying electrodes were relatively more complicated. For example, in Ref. [37], a two-step sol-gel technique was required to construct nickel pentacyanonitrosylferate (NiPCNF) modified composite ceramic carbon electrodes. Whereas, in Ref. [38], grinding for 40 min using mortar and pestle was required to obtain a uniformly-wetted paste to construct the ferrocene dicarboxylic acid modified carbon nanotubes paste (FDA-CNT) electrode. On the other hand, our electrode was easily prepared by drop casting of the CNTs-PDDA-AuNPs dispersion on the surface of glassy carbon electrode. The applicability of electrode surfaces formed with hybrid materials of CNTs-PDDA-AuNPs for simple construction of chemical sensor was demonstrated. This novel way to fabricate amperometric sulfite sensor by CNTs-PDDA-AuNPs composites-covered GC electrode showed obvious synergistic augmentation of the sensor performance. The advantages of this developed method are the ease of preparation and the high stability of the electrode.

Table 1

Comparison of analytical performance of the proposed sulfite sensor towards sulfite determination with previously reported modified electrodes.

Electrode	E <sub>app</sub> (V)	Linear range (mg L <sup>-1</sup> )	Detection limit (mg L <sup>-1</sup> )	References
Ph <sup>a</sup>	+0.40	0.6–200	0.28	[14]; FIA
FeHCF <sup>b</sup>	+0.85	20–190	6.4	[15]; batch
CHIT-Fc/CNT <sup>b</sup>	+0.35	0.4–120	0.22	[16]; batch
CuHCF-CNT <sup>c</sup>	+0.55	0.5–50	0.40	[17]; FIA
CILE	+0.55	0.48–80	0.32	[18]; batch
NiPCNF <sup>d</sup>	+0.60	0.25–252	0.06	[37]; batch
FDA-CNT <sup>c</sup>	+0.35	0.75–12.6	0.04	[38]; batch
CNT-PDDA-AuNPs <sup>b</sup>	+0.40	0.1–200	0.03	This work

Ph=phenothiazine, FeHCF=iron hexacyanoferrate, CHIT-Fc=ferrocene-branched chitosan, CNT=carbon nanotube, CuHCF=copper hexacyanoferrate, CILE=carbon ionic liquid electrode, CNT-COOH=carboxylic-functionalized carbon nanotube; PDDA=poly(diallyldimethyl ammoniumchloride), NiPCNF=nickel pentacyanonitrosylferate, FDA=ferrocenedicarboxylic acid, E<sub>app</sub>=applied potential,

- <sup>a</sup> Screen-printed carbon electrode.
- <sup>b</sup> Glassy carbon electrode (GCE).
- <sup>c</sup> Carbon paste electrode.
- <sup>d</sup> Ceramic carbon electrode.

Table 2

Effect of foreign ions on the alteration of FI signal obtained from replicate injections (n=3) of sulfite 10 mg L<sup>-1</sup> standard.

Foreign species/added as	Results <sup>a</sup>
Fructose	Do not interfere (studied up to 1000 mg L <sup>-1</sup> )
Glucose	
Sucrose	
Ethanol/C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NaNO <sub>3</sub>	
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Cl <sup>-</sup> /NaCl	
Ascorbic acid/C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Interfere (at 50 mg L <sup>-1</sup> )

<sup>a</sup> Greater than ± 5% signal alteration is classified as interfering condition.

### 3.4. Interference study and application to real samples

Interference study was conducted to identify species that may affect the analysis. Compounds were selected for the three types of ingredients which are always found in fruit juices and wines. These include electroactive species (ascorbic acid, nitrate, sulfate and chloride), sugars (fructose, glucose and sucrose) and ethanol. The effect of these substances on the FI signals of a standard 10 mg L<sup>-1</sup> sulfite using the proposed method was examined. The tolerance limit was defined as the amount which caused signal changes greater than ± 5%. The results are summarized in Table 2. The results show that sugars (fructose, glucose and sucrose), inorganic acids (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and Cl<sup>-</sup>) and ethanol, at 100-fold excess, did not exceed the tolerance limit. However, ascorbic acid produced considerable interference. As it can be seen, ascorbic acid at any five-fold excess caused erratic response. In this method, it is particularly important that ascorbic acid which is a serious interference for sulfite determination in many analytical methods including electrochemical methods [17,18] do not interfere at concentration up to five-fold excess of sulfite. Nevertheless, the determination of sulfite in juices and wines with the CNTs-PDDA-AuNPs/GC electrode includes sample dilution and therefore, at the usual concentration ratios in these samples, the interference from ascorbic acid negligible. Thus, the selectivity of the developed method is satisfied.

The possibility for the use of the developed system in real sample analysis was investigated. Samples of juices and wines were analyzed using our developed system. The results were

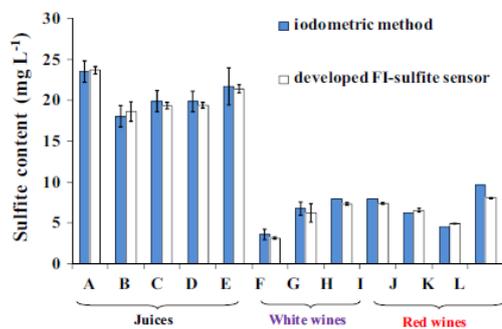


Fig. 8. Comparison of the sulfite content found in fruit juices (A–E), white (F–H) and red (I–L) wines obtained by the developed FI-sulfite sensor (CNTs–PDDA–AuNPs/GC) and the iodometric method [33]. Determination for each method was carried out in triplicate.

compared with the values obtained from the iodometric method and are shown in Fig. 8. It can be seen that the results from our developed system are in good agreement to those obtained from standard iodometric method. The results determined by both methods are considered not significantly different at 95% confidence by paired *t*-test ( $t_{\text{observed}} = 1.7276$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.2009$ ) [39]. The results confirm that the present amperometric sulfite sensor is suitable for the determination of sulfite in juices and wines.

#### 4. Conclusion

In this work, a flow injection system with amperometric detection using a novel sulfite sensor is proposed. The sensor was a CNTs–PDDA–AuNPs composites-modified glassy carbon electrode. The nanocomposite materials were formed by coating negatively charged carboxylated CNTs with positively charged PDDA, followed by capping with negatively charged AuNPs *via* electrostatic interaction. The presence of CNTs–PDDA–AuNPs on the modified GC surface produced an electrocatalytic effect for the detection of sulfite. Enhancement of the anodic peak potential and peak current at CNTs–PDDA–AuNPs/GC with respect to bare glassy carbon electrode was obtained. Sulfite was quantified using amperometric measurement in simple flow injection at the CNTs–PDDA–AuNPs/GC electrode at +0.4 V vs Ag/AgCl. The proposed sensor exhibited wide linearity range (0.1–200 mg L<sup>-1</sup>), low detection limit (0.03 mg L<sup>-1</sup>), acceptable reproducibility (%R.S. D=1.5), and rapid sample throughput (23 samples per hour). The application of the developed method to sulfite determination in fruit juices and wines gave results which are in good agreement with those obtained by the standard iodometric method. The method was also applicable for colored sample, including red wines, which is usually a serious interference for sulfite determination in many analytical methods.

#### Acknowledgments

Financial supports from the National Research Council of Thailand (NRCT, 2557A11702006), the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education and Faculty of Science and Ubon Ratchathani University (UBU) are gratefully acknowledged. The authors are grateful to Assoc. Prof. Prapin Wilairat for useful discussion and the editing.

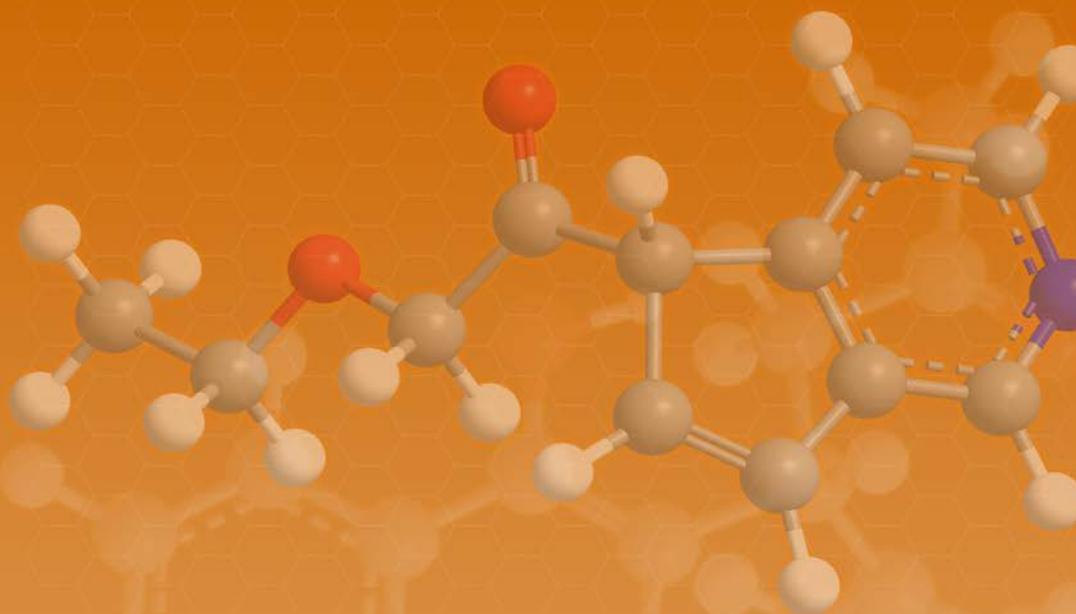
#### References

- [1] A. Isaac, C. Livingstone, A.J. Wain, R.G. Compton, J. Davis, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 589.
- [2] S.M. Oliveira, T.I.M.S. Lopes, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 3415.
- [3] S. Satiemperakul, P. Phongdong, S. Liawruangrath, Food Chem. 121 (2010) 893.
- [4] R. Rawal, C.S. Pundir, Int. J. Biol. Macromol. 51 (2012) 449.
- [5] Fazio, C.R. Warner, Food Addit. Contam. 7 (1990) 433.
- [6] S. Theisen, R. Hänsch, L. Kothe, U. Leist, R. Galensa, Biosens. Bioelectron. 26 (2010) 175.
- [7] Ü.T. Yilmaz, G. Somer, Anal. Chim. Acta 603 (2007) 30.
- [8] B. Bahmani, F. Moztafzadeh, M. Rabiee, M. Tahriri, Synth. Met. 160 (2010) 2653.
- [9] S.S.M. Hassan, M.S.A. Hamza, A.H.K. Mohamed, Anal. Chim. Acta 570 (2006) 232.
- [10] P.D. Tzanavaras, E. Thiakouli, D.G. Themelis, Talanta 77 (2009) 1614.
- [11] R.L. Bonifácio, N. Coichev, Anal. Chim. Acta 517 (2004) 125.
- [12] G. Jankovskiene, Z. Daunoravicius, A. Padarauskas, J. Chromatogr. A 934 (2001) 67.
- [13] T.R.L. Dadamos, M.F.S. Teixeira, Electrochim. Acta 54 (2009) 4552.
- [14] P.Y. Chen, Y.M. Chi, H.H. Yang, Y. Shih, J. Electroanal. Chem. 675 (2012) 1.
- [15] T. García, E. Casero, E. Lorenzo, F. Pariente, Sens. Actuators B106 (2005) 803.
- [16] H. Zhou, W. Yang, C. Sun, Talanta 77 (2008) 366.
- [17] L.S.T. Alamo, T. Tangkuaram, S. Satiemperakul, Talanta 81 (2010) 1793.
- [18] A. Safavi, N. Maleki, S. Momeni, F. Tajabadi, Anal. Chim. Acta 625 (2008) 8.
- [19] K. Scott, W.M. Taama, Electrochim. Acta 44 (1999) 3421.
- [20] T. Balduf, G. Valentin, F. Lopicque, Can. J. Chem. Eng. 76 (1998) 790.
- [21] H. Li, Q.J. Wang, J.M. Xu, W. Zhang, L.T. Jin, Sens. Actuators B 87 (2002) 18.
- [22] R. Rawal, S. Chawla, C.S. Pundir, Anal. Biochem. 419 (2011) 196.
- [23] M. Eguílaz, R. Villalonga, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, J. Electroanal. Chem. 661 (2011) 171.
- [24] R. Cui, H. Huang, Z. Yin, D. Gao, J.-J. Zhu, Biosens. Bioelectron. 23 (2008) 1666.
- [25] A. Merkoci, M. Pumera, X. Llopis, B. Perez, M. del Valle, S. Alegret, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 826.
- [26] V.G. Gavalas, S.A. Law, C. Ball, R. Andrews, L.G. Bachas, Anal. Biochem. 329 (2004) 247.
- [27] D. Kul, M.E. Chica, R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, Talanta 111 (2013) 76.
- [28] J. Wang, M. Musameh, Y. Lin, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 2408.
- [29] S.P. Jiang, Z. Liu, H.L. Tang, M. Pan, Electrochim. Acta 51 (2006) 5721.
- [30] Y. Wang, X. Wang, B. Wu, Z. Zhao, F. Yin, S. Li, X. Qin, Q. Chen, Sens. Actuators B 130 (2008) 809.
- [31] A. Matsumoto, Prog. Polym. Sci. 26 (2001) 189.
- [32] K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello, Chem. Rev. 112 (2012) 2739.
- [33] Y. Yu, Z. Chen, S. He, B. Zhang, X. Li, M. Yao, Biosens. Bioelectron. 52 (2014) 147.
- [34] A.D. McFarland, C.L. Haynes, C.A. Mirkin, R.P. Van Dyne, H.A. Godwin, J. Chem. Educ. 81 (2004) 544A.
- [35] AOAC, Official methods of analysis of AOAC international, sixteenth ed., AOAC international, USA, 1995.
- [36] Y. Xiao, H.X. Ju, H.Y. Chen, Anal. Chim. Acta 391 (1999) 73.
- [37] A. Salimi, K. Abdi, G-R. Khayatyan, Electrochim. Acta 49 (2004) 413.
- [38] A.A. Ensaifi, H.K. Maleh, Int. J. Electrochem. Sci. 5 (2010) 392.
- [39] J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th ed., Pearson Education Limited, Essex, 2005.

# PACCON2014 PROCEEDINGS

Pure and Applied Chemistry  
International Conference 2014

*Moving Towards Innovation in Chemistry*



January 8 - 10, 2014

**Organized by**

Department of Chemistry, Faculty of Science  
Khon Kaen University

Chemical Society of Thailand  
under the Patronage of  
Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mahidol

## AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR SULFITE DETERMINATION USING GLASSY CARBON MODIFIED WITH HYBRID NANO-MATERIALS ELECTRODE IN SIMPLE FLOW INJECTION SYSTEM

Wongduan Sroysee, Maliwan Amatongchai\*

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University Ubon Ratchathani, 34190, Thailand.

\*E-Mail: amaliwan@gmail.com, Tel. +66 4535 3401 ext. 4576, Fax. +66 45 288379

**Abstract:** A simple flow injection system with amperometric detection on a sulfite biosensor was developed for sensitive and rapid measurement of sulfite. The biosensor was developed based on the hybrid materials, composed of carboxylic functionalized carbon nanotubes, poly(diallyldimethylammoniumchloride) and gold nanoparticle (CNTs-PDDA-AuNPs) coated on a glassy carbon (GC) electrode, which constructed an effective immobilization matrix and made the immobilized components hold high stability and bioactivity. Sulfite oxidase (SOx) was immobilized to CNTs-PDDA-AuNPs and cytochrome C composites film by using glutaraldehyde (Glu). Electrochemical oxidation of sulfite was studied at the developed biosensor (GC/CNTs-PDDA-AuNPs/SOx) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 using cyclic voltammetry. The biosensor displayed good electrocatalytic activity towards the oxidation of sulfite. The estimated apparent Michaelis-Menten constant was 0.49 mM. The developed biosensor was applied in the flow injection system for amperometric detection of sulfite using solution of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) as a carrier and applying a potential of +0.3 V at the working electrode. The proposed sulfite biosensor exhibits linear calibration over the range of 2-200 mg L<sup>-1</sup> of sulfite with slope of 204.66 nA mg<sup>-1</sup>L and correlation coefficient of 0.9991. The detection limit (3 S/N of blank) was 1.3 mg L<sup>-1</sup> and the estimated precision of 3.8%.

### 1. Introduction

Sulfiting agent in various forms (sulfite, sulfur dioxide, hydrogen sulfite, metabisulfite) are commonly used as preservatives in food, beverages and several product such as dried fruits and vegetable to prevent microbiological growth, to control browning reaction and to assist in preserving vitamin C [1-3]. However, the level of sulfite in food has been the subject of legislation since it was discovered that certain concentration level causes allergic reactions in some individuals [4, 5]. The United States Food and Drug Administration (FDA) have required labeling of products containing more than 10 µg mL<sup>-1</sup> of sulfite in food or beverages [6]. Therefore, it is essential to have accurate and precise methods available to determine the sulfite content in these products. Many analytical methods for the sulfite assays such as high-performance liquid chromatography [7], spectrophotometry [8] and electrochemical methods [9] have been reported. Among these methods, electrochemical detection is more attractive because of its simplicity, high sensitivity, fast response and cheap equipment.

In this work, a simple flow injection system, which employs an amperometric detection on a novel sulfite biosensor, was proposed. The biosensor was fabricated using CNTs-PDDA-AuNPs composites as an effective matrix to immobilized sulfite oxidase (SOx). The nanocomposite materials were formed by coating negatively charged carboxylated CNTs with positively charged PDDA followed by capping with negatively charged AuNPs via electrostatic interaction. The CNTs-PDDA-AuNPs nanocomposite is used to construct a sulfite biosensor by drop coating on the surface of the glassy carbon (GC) electrode. The developed biosensor (GC/CNTs-PDDA-AuNPs/SOx) exhibits many good characteristics including high activity, excellent sensitivity and selectivity in detection of sulfite.

### 2. Materials and Methods

#### 2.1 Apparatus

Voltammetric and amperometric measurements were performed with an e-DAQ potentiostat (model EA 161, Australia) equipped with e-corder. Three electrode systems were employed in this study. The active surface area of the GC electrode in voltammetry was approximately 0.07 cm<sup>2</sup>. The FI system for amperometric detection at the developed sulfite biosensor comprised of a Shimadzu pump (model LC-10 AD, Japan), Rheodyne injector (model 7725, USA) fitted with 20 µL sample loop and detection system. The electrode area of thin layer flow cell was utilized at 0.06 cm<sup>2</sup>.

#### 2.2 Chemical

Multiwall carbon nanotubes (CNTs, diameter: 30±15 nm, length: 1-5 micron, purity: > 95%) were purchased from Nanolab inc. (MA, USA). Sodium sulfite (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA, MW: 100,000-200,000, 20% w/w) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, Au > 48%) and cytochrome C (Cyt C, 90% from horse heart) were purchased from Acros Organic (Geel, Belgium). Sulfite oxidase (SOx, 30-70 U mg<sup>-1</sup>) was purchased from ProNique Scientific, Inc. (Castle Rock, USA). All solutions were prepared in deionized-distilled water (Water Pro PS, USA).

#### 2.3 Procedures

### 2.3.1 Preparation of CNTs-PDDA

CNTs was chemically shorten and carboxylated by acid treatment mixture of HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3:1, v/v) under ultra sonic stirring for 5 h. After that, the suspension was centrifuged at 10,000 rpm and washed repeatedly with deionized water until the pH of washing was 7. The resulting product was then dried at 110°C. The CNTs-COOH was then functionalized with PDDA (CNTs-PDDA) using the method adopted from Cui *et al.* [10, 11]. Briefly, 10 mg of CNTs-COOH were dispersed in 20 mL of a 0.25% PDDA aqueous solution containing 0.5 M NaCl and ultrasonic stirring for 30 min. The resulting dispersion was centrifuged and washed with water for three times to remove residual PDDA. Finally, 4 mg of the collected product was dispersed in 1 mL water and the resulting solution was sonicated for 30 min before use.

### 2.3.2 Preparation of sulfite biosensor (GC/CNTs-PDDA-AuNPs/SOx)

The sulfite biosensor was prepared by casting 40 µL of the CNTs-PDDA dispersion on the surface of the well-polished glassy carbon (GC) electrode, and then dried at ambient temperature. The surface of the electrode was further coated with 40 µL of 0.02% AuNPs solution. After that, immobilization of SOx was carried out by dropping 15 µL of solution containing of SOx (0.1 U mg<sup>-1</sup>) and Cyt C (4 mg mL<sup>-1</sup>) onto the modified electrode. Finally, 15 µL of 0.01 % glutaraldehyde was dropped on the modified electrode and dried at room temperature.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Cyclic voltammetry of sulfite

The electrochemical behavior of sulfite at sulfite biosensor (GC/CNTs-PDDA-AuNPs/SOx) was studied using cyclic voltammetry. Figure 1 compared the response of the bare GC and sulfite biosensor toward the electro-oxidation of sulfite at pH 8. Sulfite oxidation is an electrochemically irreversible process. Bare GC electrode results in a peak shape signal at about 0.85 V versus Ag/AgCl, whereas the sulfite biosensor provides the oxidation peak at 0.30 V. These results show that sulfite oxidase (SOx) immobilized on the CNTs-PDDA-AuNPs composite reduces the overpotential of sulfite oxidation and in fact imparts electrocatalytic activity for sulfite oxidation. Enzyme SOx was effectively immobilized on the biocompatibility matrix of CNTs-PDDA-AuNPs and cytochrome C (Cyt C). Then SOx catalyzes a 2e<sup>-</sup> oxidation of sulfite to sulfate as described in Eq.1.

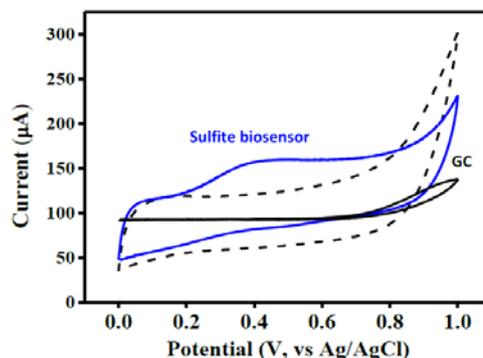
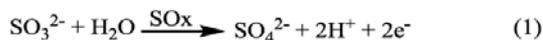


Figure 1. Cyclic voltammograms of 4 mM sulfite (solid line) at bare GC and sulfite biosensor (GC/CNTs-PDDA/SOx) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7). Background voltammograms (0.1 M phosphate buffer) is also shown at dotted line for the sulfite biosensor. The scan rate was fixed at 50 mV s<sup>-1</sup>.

It was observed that the values of peak potential shifted slightly towards less positive values (Figure 2b) when the pH increased. Figure 2 c shows that the maximum peak current was observed at pH 8. Therefore, pH 8 was selected as the optimum pH for amperometric detection of sulfite. This result was consistent with the previous report [12] that enzyme SOx provides the best catalytic activity at pH 8.

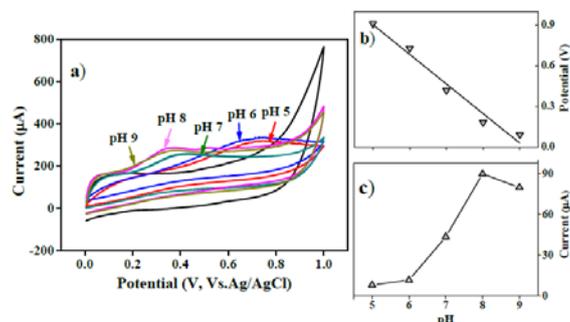


Figure 2. (a) Cyclic voltammetric responses of 2 mM sulfite at various buffer pHs and the dependence of buffer pH on the (b) peak potential (c) peak current obtained from the biosensor, scan rate 50 mVs<sup>-1</sup>.

### 3.2 Michaelis-Menten constant

The apparent Michaelis-Menten constant ( $K_m^{app}$ ), which gave an indication of enzyme-substrate kinetics, could be estimated from the electrochemical version of the Lineweaver-Burk equation (2) [12].

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m^{app}}{I_{max}c} \quad (2)$$

Where c is a substrate concentration in a bulk solution,  $I_{ss}$  the steady-state current after the addition of substrate and  $I_{max}$  is the maximum current measured under saturated substrate conditions. Figure 3 shows the Lineweaver-Burk plot of SOx

immobilized on the modified electrode in the presence of different concentration of sulfite and the calculated  $K_m^{app}$  of 0.49 mM. A low  $K_m^{app}$  value obtained represents a strong substrate binding and demonstrates a high affinity of sulfite for the modified electrode.

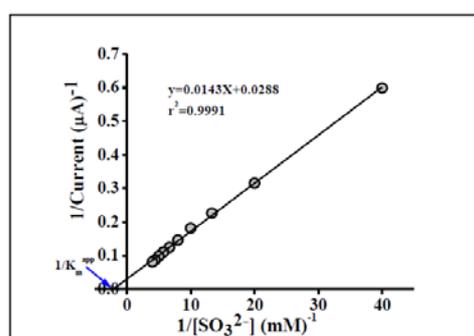


Figure 3. Lineweaver-Bulk plot of sulfite immobilized on the sulfite biosensor.

### 3.3 Parameters affecting the sulfite biosensor response

Parameters affecting amperometric detection of sulfite at GC/CNTs-PDDA-AuNPs/SOx electrode was examined using the potential of 0.3 V. The effect of CNTs-PDDA concentration on the current signal was studied from 0 to 8 mg mL<sup>-1</sup>. As shown in Figure 4a the current response increased with increasing CNTs-PDDA loading from 0 to 4 but decreased from 4 to 8 mg mL<sup>-1</sup>. Therefore, 4 mg mL<sup>-1</sup> CNTs-PDDA was chosen for modified electrode and for further experiments.

Figure 4b shows the effect of AuNPs loading on the oxidation current of sulfite. The current increased with increasing amount of AuNPs from 0 to 0.02 and reached the maximum when 0.02 % AuNPs was casted. Therefore, this condition was selected for the biosensor fabrication.

As seen in Figure 4c, the current responses increased with the increase of Cyt c concentration from 0 to 4 and then decreased from 4 to 16 mg mL<sup>-1</sup>. Thus, to make a sensitive biosensor, 4 mg mL<sup>-1</sup> of Cyt c concentration was selected for further investigations.

The effect of SOx concentration on the biosensor response was studied and the results illustrated in Figure 4d. It was found that the current responses increased with increasing the SOx concentration to maximum value at 0.1 U mL<sup>-1</sup>, and then tended to decrease with further increase in the SOx concentration. This behavior is typical of the enzyme-based biosensors [13]. Thus, 0.1 U mL<sup>-1</sup> SOx was chosen for subsequent experiments.

### 3.4 Effect the potential

In order to obtain the optimal potential for amperometric detection in FIA, hydrodynamic

voltammetric behavior of sulfite was investigated at various potential from 0.0 to 1.0 V. As shown in Figure 5, the peak area reached a maximum value at 0.3 V. Thus, this potential was selected for for amperometric detection in FIA system.

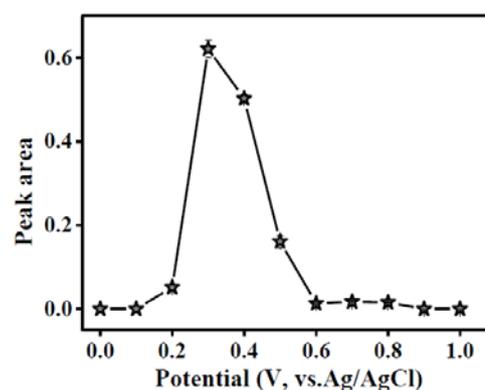


Figure 5. Influence of the applied potential on the biosensor response for 10 mg L<sup>-1</sup> sulfite.

### 3.5 Analytical feature

Representative signal profiles for multiple injections and calibration plot are depicted in Figure 6. Calibration curve is linear in the range of 2 to 200 mg L<sup>-1</sup>. The detection limit (3 S/N) is ~1.3 mg L<sup>-1</sup>. The system provides an impressively good precision (%R.S.D = 3.8) for 20 μL injections (n = 20) of 5 mg L<sup>-1</sup> sulfite. Throughput of sample is 57 samples h<sup>-1</sup>.

## 4. Conclusions

A simple flow injection system with amperometric detection on a novel sulfite biosensor was developed. The biosensor was fabricated using CNTs-PDDA-AuNPs composites as an effective matrix to immobilized sulfite oxidase (SOx). The developed biosensor (GC/CNTs-PDDA-AuNPs/SOx) exhibits good electrocatalytic activity, high sensitivity and selectivity in detection of sulfite.

## Acknowledgements

Financial supports from the National Research Council of Thailand (NRCT, 2557 A11702006) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) are gratefully acknowledged. W.S. would like to thank the scholarship from Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST).

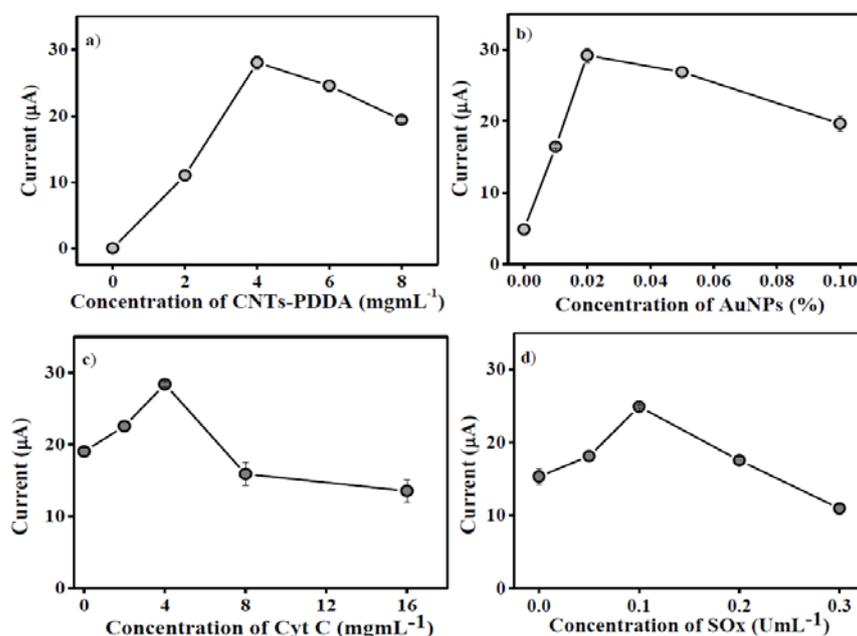


Figure 4. Dependence of current response to 0.5 mM sulfite in 0.1 M phosphate buffer at GC/CNT-PDDA-AuNPs/SOx: a) concentration of CNTs-PDDA, b) concentration of AuNPs, c) concentration of Cyt C and d) concentration of SOx.

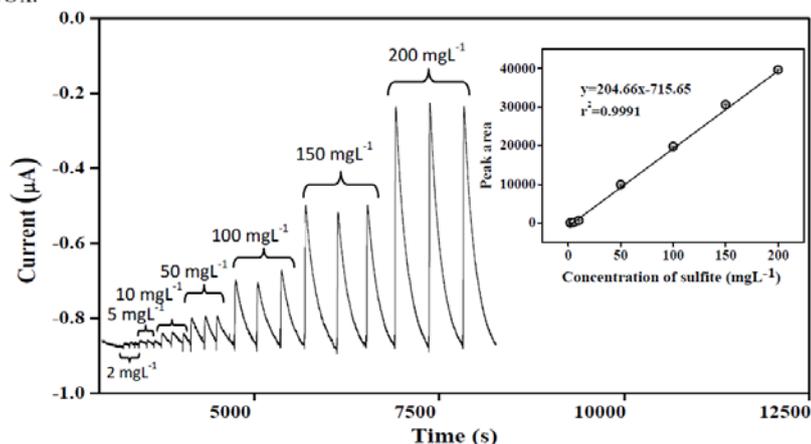


Figure 6. FIA chromatograms obtained for injections of sulfite standards. The inset shows the linear relationship between the signal of sulfite and the concentration.

## References

- [1] S. S. M. Hassan, M. S. A. Hamza, A. H. K. Mohamed, *Anal. Chim. Acta.* **570** (2006) 232-239.
- [2] S. M. Oliveira, T. I. M. S. Lopes, I. V. Tóth, A. n. O. S. S. Rangel, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 3415-3422.
- [3] S. Satiemperakul, P. Phongdong, S. Liawruan-grath, *Food Chem.* **121** (2010) 893-898.
- [4] S. Theisen, R. Hänsch, L. Kothe, U. Leist, R. Galensa, *Biosens Bioelec.* **26** (2010) 175-181.
- [5] Ü. T. Yilmaz, G. Somer, *Anal. Chim. Acta.* **603** (2007) 30-35.
- [6] B. Bahmani, F. Moztafzadeh, M. Rabiee, M. Tahri, *Synthetic Metals.* **160** (2010) 2653-2657.
- [7] R. F. Mcfeeters, A. O. Barish, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 1513-1517.
- [8] S. S. M. Hassan, M. S. A. Hamza, A. H. K. Mohamed, *Anal. Chim. Acta.* **570** (2006) 232-239.
- [9] R. Spricigo, R. Dronov, F. Lisdat, S. Leimkühler, F. Scheller and U. Wollenberger, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009) 225-233.
- [10] R. Cui, H. Huang, Z. Yin, D. Gao and J.-J. Zhu, *Biosens Bioelec.* **23** (2008) 1666-1673.
- [11] M. Eguilaz, R. Villalonga, L. Agüi, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.* **661** (2011) 171-178.
- [12] J. Hong, A. A. Moosavi-Movahedi, H. Ghourchian, A. M. Rad and S. Rezaei-Zarchi, *Electrochim. Acta.* **52** (2007) 6261-6267.
- [13] R. Rawal, S. Chawla, T. Dahiya and C. Pundir, *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011) 2599-2608.

ABSTRACT CONFERENCE

**18<sup>th</sup> ICFIA**  
INTERNATIONAL  
CONFERENCE ON  
FLOW INJECTION  
ANALYSIS

**15 - 20 SEPTEMBER 2013**

**PORTO, PORTUGAL**

INSTITUTIONAL SPONSORS

 **CATÓLICA  
PORTO**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PORTO

 **U. PORTO**  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

 **Instituto  
Português  
de Química**  
**100 ANOS**

 **Japanese  
Association for  
Flow  
Injection  
Analysis**



## CERTIFICATE

This is to certify that **Maliwan Amatatongchai**

presented the Oral communication entitled

**Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection on sulfite sensor using glassy carbon electrode modified with AuNPs/carbon nanotubes-PDDA**

at the 18th International Conference on Flow Injection Analysis - ICFIA18 in Porto, from 15/09/2013 to 20/09/2013

---

**The Organizing Committee**

*Porto, 20 of September of 2013*

**António Rangel, Chair**

O6

**SIMPLE FLOW INJECTION FOR DETERMINATION OF SULFITE  
BY AMPEROMETRIC DETECTION ON SULFITE SENSOR USING  
GLASSY CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH AuNPS/CARBON  
NANOTUBES-PDDA**

**Maliwan AMATATONGCHAI<sup>1</sup>, Wongduan Sroysee<sup>1</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Chemistry and center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani , 34190, Thailand.

<sup>2</sup> Department of Chemistry and center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand.

E-mail: scnaliam@ubu.ac.th or amaliwan@gmail.com

A new approach is presented for sensitive measurement of sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) in beverages based on simple flow injection system with amperometric detection on sulfite sensor. In this work, sulfite sensor was fabricated using a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles (AuNPs)/ poly(diallyldimethylammonium chloride)-multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) nanocomposites. Electrochemical oxidation of sulfite was studied in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 using cyclic voltammetry. The sensor displayed good electrocatalytic activity towards the oxidation of sulfite with relatively high sensitivity. In the flow injection analysis, sulfite was quantified using amperometric measurement at the sensor at +0.4 V vs Ag/AgCl. The linear working range for the quantitative of sulfite was 2 to 140 ppm ( $r^2 = 0.9976$ ) with detection limit of 0.25 ppm ( $S/N = 3$ ). This method provides high stability, selectivity and precision. Potential use of this method for sulfite determination in fruit juices and wines and the agreement with the standard method will be discussed.

### References

- [1] M. Eguilaz.; R. Villalonga.; L. Agui.; P. Yanez-Sedeno.; J. M. Pingarron.; *J. Electroanal. Chem.* 661 (2011) 171.
- [2] R. Rawal.; S. Chawla.; T. Dahiya.; C. S. Pundir. *Anal Bioanal Chem.* 401 (2011) 2599.
- [3] P. Y. Chen.; Y. M. Chi.; H. H. Yang.; Y. Shih. *J. Electroanal Chem.* 675 (2012) 1.

63

**หัวหน้าโครงการวิจัย**

1. (ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) น.ส. มะลิวรรณ อมตงไชย  
(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) Ms Maliwan Amatongchai
2. หมายเลขบัตรประชาชน XXXXXXXXXXXXXXXX
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ต. ศรีโค อ. วารินชำราบ  
จ. อุบลราชธานี 34190  
โทร. 045-353-400-1 ต่อ 4576  
โทรสาร 045-288-379  
โทรศัพท์มือถือ 08-9623-7545  
e-mail: scmaliwam@ubu.ac.th หรือ amaliwan@gmail.com

**5. ประวัติการศึกษา**

วุฒิการศึกษา	สถาบันการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
Ph.D. (Analytical Chemistry)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2549
วท.ม. (Applied Analytical and Inorganic Chemistry)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2542
วท.บ. (เคมี)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2539

**6. สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ**

- 6.1 Electrochemistry
- 6.2 Biosensors
- 6.3 Analytical Chemistry
- 6.4 Flow Injection Analysis, Microfluidics and Chromatography

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำ การวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็น ต้น

**งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว**

-ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่จากสำนักงานส่งเสริมการวิจัย (สกว.) ในปี พ.ศ. 2550-2552 เรื่อง “New approach for evaluation of total antioxidant capacity” (หัวหน้าโครงการวิจัยที่รับทุน)

-ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เรื่อง “การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย (Development of new amperometric method for characterization and evaluation of

antioxidant properties in Thai herbs) งบประมาณจากสำนักงานงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 (หัวหน้าโครงการวิจัย, มีผู้ร่วมวิจัย 1 ท่าน)

-ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เรื่อง “การพัฒนาไบโอแคโทดและไบโอแอนโนดชนิดใหม่โดยใช้เอนไซม์เพื่อการประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ” งบประมาณจากสำนักงานงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2554 (หัวหน้าโครงการวิจัย, มีผู้ร่วมวิจัย 3 ท่าน)

-ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เรื่อง “ระบบวิเคราะห์ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วด้วยไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่ (A high throughput screening method for assessing total antioxidant capacity using new biosensors)” งบประมาณจากสำนักงานงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 (หัวหน้าโครงการวิจัย, มีผู้ร่วมวิจัย 3 ท่าน)

-ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เรื่อง “การพัฒนาเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างผลไม้และเครื่องดื่ม (Development of new amperometric method for determination of sulfite in fruit and beverage)” งบประมาณจากสำนักงานงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2557 (หัวหน้าโครงการวิจัย, มีผู้ร่วมวิจัย 3 ท่าน)

#### **งานวิจัยที่กำลังทำ :**

-ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เรื่อง “การพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยใช้ไฟโบรอินจากไหมไทย (Development of glucose biosensor based on Thai silk fibroin)” งบประมาณจากสำนักงานงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 (หัวหน้าโครงการวิจัย, มีผู้ร่วมวิจัย 3 ท่าน) สำเร็จไปแล้ว 95%

#### **7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์การเผยแพร่ และสถานภาพในการวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร**

1. **M. Amatatongchai**, W. Sroysee, S. Chairam and D. Nacapricha “Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes-PDDA-gold nanoparticles” *Talanta*, 2015, 133, 134-141. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

2. P. Jarujamrus, **M. Amatatongchai**, A. Thima, T. Khongrangdee, C. Mongkontong “Selective colorimetric sensors based on the monitoring of an unmodified silver nanoparticles (AgNPs) reduction for a simple and rapid determination of mercury” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 142, 86-93. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

3. S. Chairam, W. Sroysee, C. Boonchit, C. Kaewprom, T. Goedsak Na Wangnoi, **M. Amatatongchai**, P. Jarujamrus, S. Tamung, E. Somsook. Nonenzymatic sensor for hydrogen peroxide using a carbon paste electrode modified with a composite consisting of silver nanoparticles, poly(o-aminobenzoic acid) and magnetite, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2015, 10, 4611 – 4625. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

4. **M. Amatatongchai**, W. Sroysee, S. Laosing and S. Chairam “Rapid Screening Method for Assessing Total Phenolic Content Using Simple Flow Injection System with Laccase

based-biosensor” *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 10526-10539. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

5. S. Chairam, P. Buddhalee and **M. Amatatongchai**, A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) Modified Glassy Carbon Electrode Coated with Chitosan Film. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 10250-10264. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้วิจัยร่วม

6. **M. Amatatongchai**, S. Laosing, O. Chailapakul and D. Nacapricha “Simple Flow Injection for Screening of Total Antioxidant Capacity by Amperometric Detection of DPPH Radical on Carbon Nanotube Modified-Glassy Carbon Electrode”, *Talanta*, 2012, 97, 267-272. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

7. S. Chairam, W. Sriraksa, **M. Amatatongchai** and E. Somsook “Electrocatalytic Oxidation of Ascorbic Acid Using a Poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline) Modified Glassy Carbon Electrode” *Sensors*, 2011, 11(11), 10166-10179. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมโครงการวิจัย

8. ยูวากร เสนศรี, เสนอ ชัยรัมย์, ดวงใจ นาคะปรีชา และ **มะลิวรรณ อมตรองไชย** “การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ด้วยเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวป์-โคโดซานเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยแลคเคส” วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 16 ฉบับที่ 2. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

9. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์, ศิริธร อ่างแก้ว และ **มะลิวรรณ อมตรองไชย** “เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ขั้วไฟฟ้าทึบกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวป์” วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ฉบับพิเศษ 2554. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

10. **มะลิวรรณ อมตรองไชย** “วิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมอย่างรวดเร็ว” วารสารวิชาการ ม.อบ. ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 หน้า 49-59. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

11. X. Wang, **M. Amatatongchai**, D. Nacapricha, O. Hofmann, J.C. deMello, D.D.C Bradley and A.J. deMello “Thin-film organic photodiodes for integrated on-chip chemiluminescence detection- application to antioxidant capacity screening”, *Sensors and Actuators B: chemical*, 140 (2009) 643-648. มี impact factor 3.122 สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

12. **M. Amatatongchai**, O. Hofmann, D. Nacapricha, O. Chailapakul and A.J. deMello “Microfluidic system for evaluation of antioxidant capacity based on a peroxyoxalate chemiluminescence assay”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387(2007) 277-285. มี impact factor 2.695. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

13. O. Chailapakul, **M. Amatatongchai**, P. Wilairat, K. Grudpani and D. Nacapricha. “Flow-injection determination of iodide in nuclear emergency tablets, using boron-doped diamond thin film electrode”, *Talanta*, 2004, 64, 1253-1258. มี impact factor 2.546. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

13. N. Ratanawimarnwong, N. Amornthammarong, N. Choengchan, P. Chaisuwan, **M. Amatatongchai**, P. Wilairat, I. D. McKelvie and D. Nacapricha. “Determination of iodide by

detection of iodine using gas-diffusion flow injection and chemiluminescence”, *Talanta*, 2005, 65, 756-761. มี impact factor 2.532. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

### นำเสนอในงานประชุม

1. M. Amatatongchai, Y. Sensri and D. Nacapricha “Development of flow injection system with amperometric detection on laccase-based biosensor for antioxidant assay” 6<sup>th</sup> Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2012), Chiang Mai, Thailand. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ
2. M. Amatatongchai, J. Phanthuwat and D. Nacapricha “Development of glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped in the matrix of carbon nanotube/chitosan modified glassy carbon electrode” 16<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2010) including related techniques 25-30 April 2010 as poster contribution (Pattaya, Thailand). สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ
3. Y. Sensri, S. Chairam, D. Nacapricha and M. Amatatongchai “Development of biosensor based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite for laccase-catalyzed oxygen reduction” 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT36) 26 - 28 October 2010 (Bangkok, Thailand) as poster presentation. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ
4. M. Amatatongchai, S. Laosing, Y. Sakuldech, S. Angkaew, O. Chailapakul and D. Nacapricha “New Method for evaluation of total antioxidant capacity based on flow injection with amperometric detection of free radical reaction” Proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2008), Bangkok, Thailand. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ
5. M. Amatatongchai, S. Laosing, O. Chailapakul and D. Nacapricha “New approach for evaluation of total antioxidant capacity based on flow injection with amperometric detection of free radical reaction” 14<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2007) including related techniques 3-7 September 2007 (Berlin, Germany). สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นาย เสนอ ชัยรัมย์  
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Sanoe Chairam
2. หมายเลขบัตรประชาชน XXXXXXXXXXXXX
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ต. ศรีโค อ. วารินชำราบ  
จ. อุบลราชธานี 34190  
โทร. 045-353-400-1 ต่อ 4137  
โทรสาร 045-288-379  
e-mail: chairam019@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบันการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
Ph.D. (Science & Technology Education)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2551
Certificate (Teaching Profession)	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	2546
วท.บ. (เคมี)	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	2545

6. สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- Polymer-assisted synthesis of nanostructures and catalysis
- Magnetic materials
- Molecular catalysis
- Electrochemistry
- Science education (Chemistry)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์การเผยแพร่ และสถานภาพในการวิจัย

1. **S. Chairam**, W. Sroysee, C. Boonchit, C. Kaewprom, T. Goedsak Na Wangnoi, M. Amatatongchai, P. Jarujamrus, S. Tamung, E. Somsook. Nonenzymatic sensor for hydrogen peroxide using a carbon paste electrode modified with a composite consisting of silver nanoparticles, poly(o-aminobenzoic acid) and magnetite, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2015, 10, 4611 – 4625. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

2. M. Amatatongchai, W. Sroysee, **S. Chairam** and D. Nacapricha “Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes-PDDA-gold nanoparticles” *Talanta*, 2015, 133, 134-141. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

3. **S. Chairam**, P. Buddhalee and M. Amatatongchai, A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) Modified Glassy Carbon Electrode Coated with Chitosan Film. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 10250-10264. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

3. M. Amatatongchai, W. Sroysee, S. Laosing and **S. Chairam** "Rapid Screening Method for Assessing Total Phenolic Content Using Simple Flow Injection System with Laccase based-biosensor" *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 10526 - 10539. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

4. **S. Chairam**, W. Sriraksa, M. Amatatongchai, E. Somsook. 2011. Electrocatalytic Oxidation of Ascorbic Acid Using a Poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline) Modified Glassy Carbon Electrode. *Sensors*, 2011, 11(11), 10166-10179. สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

5. ยูวากร เสนศรี, **เสนอ ชัยรัมย์**, ดวงใจ นาคะปรีชา และ มะลิวรรณ อมตธงไชย "การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ด้วยเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวป์-ไคโตซานเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยแลคเคส" วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 16 ฉบับที่ 2. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

6. **S. Chairam**, E. Somsook, Starch vermicelli template for synthesis of magnetic iron oxide nanoclusters. *J. Magn. Magn. Mater.* 2008; 320 (15): 2039-2043.

สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

7. L. Chaicharoenwimolkul, A. Munmai, **S. Chairam**, U. Tewasekson, S. Sapudom, Y. Lakliang, E. Somsook, Effect of Stabilizing Ligands Bearing Ferrocene Moieties on the Gold Nanoparticle-Catalyzed Reactions of Arylboronic Acids" *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 7299-7302. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

8. **S. Chairam**, C. Poolperm, E. Somsook, Starch Vermicelli Template-Assisted Synthesis of Size/Shape-Controlled Nanoparticles *Carbohydr. Polym.* 2009, 75, 694-704.

สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

9. **S. Chairam**, E. Somsook, R. K. Coll, Enhance Thai Student Learning of Chemical Kinetics *Res. Sci. Tech. Educ.* 2009, 27, 95-115. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

**ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัย 2**

1. (ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) น.ส. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์  
(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) Miss Saowanee Laosing
2. หมายเลขบัตรประชาชน 3340700380746
3. ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ต. ศรีโค อ.วารินชำราบ  
จ. อุบลราชธานี 34190  
โทร. 045-433-110-2 ต่อ 4113 โทรสาร 045-288-379  
โทรศัพท์มือถือ 08-6726-6688  
e-mail: Isouwane@hotmai.com
5. ประวัติการศึกษา  
วท.บ. (เคมี) 2543 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
วทม (เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม) 2553 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
6. สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ  
6.1 Analytical Chemistry  
6.2 High Performance Liquid Chromatography
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำ  
การวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็น  
ต้น
  - 7.1. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์การเผยแพร่ และสถานภาพในการวิจัย
    1. M. Amatongchai, W. Sroysee, **S. Laosing** and S. Chairam “Rapid Screening Method for Assessing Total Phenolic Content Using Simple Flow Injection System with Laccase based-biosensor” *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 10256-10539. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย
    2. M. Amatongchai, **S. Laosing**, O. Chailapakul and D. Nacapricha “Simple Flow Injection for Screening of Total Antioxidant Capacity by Amperometric Detection of DPPH Radical on Carbon Nanotube Modified-Glassy Carbon Electrode”, *Talanta*, 2012, 97, 267-272. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมโครงการวิจัย
    2. **เสาวนีย์ เหล่าสิงห์**, ศิริธร อ่างแก้ว และ มะลิวรรณ อมตธงไชย “เทคนิคตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมแบบใหม่ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหลที่ชั่วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปร

ด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์” วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ฉบับพิเศษ 2554. สถานภาพในการ  
การทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

### *นำเสนอในงานประชุม*

1. M. Amatatongchai, S. Laosing, Y. Sakuldech, S. Angkaew, O. Chailapakul and D. Nacapricha “New Method for evaluation of total antioxidant capacity based on flow injection with amperometric detection of free radical reaction” Proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2008), Bangkok, Thailand. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมโครงการ
2. M. Amatatongchai, N. Laokok, S. Laosing, D. Nacapricha “A New Flow Injection Spectrophotometric Method for Evaluation of Total Antioxidant Capacity Based on Permanganate Reducing Capacity Measurement” 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT 34) 31 October-2 November 2008 (Bangkok, Thailand) as poster presentation. สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมโครงการ
3. M. Amatatongchai, S. Laosing, O. Chailapakul and D. Nacapricha “New approach for evaluation of total antioxidant capacity based on flow injection with amperometric detection of free radical reaction” 14<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2007) including related techniques 3-7 September 2007 (Berlin, Germany). สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมโครงการ
4. M. Amatatongchai, S. Laosing, O. Chailapakul and D. Nacapricha “New amperometric method for evaluation of total antioxidant capacity” The 9<sup>th</sup> Asian Conference on Analytical Science (ASIANALYSIS IX) 4-8 November 2007 as poster contribution (Jeju island, Korea). สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมโครงการ