

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานประมาณแผ่นดินที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2556-2557 ทำให้สามารถทำงานวิจัยชิ้นนี้ได้สำเร็จ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ดวงใจ และ รศ.ดร.ประพิณ วิไลรัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย และนักศึกษาทุกท่านที่ได้ช่วยเสนอความคิด และได้ทำงานวิจัยอย่างเต็มที่ ทำให้งานวิจัยและการนำเสนอผลงานในระดับต่าง ๆ ประสบความสำเร็จด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	4
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	6
1.2 วัตถุประสงค์	7
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	9
<b>บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม</b>	
2.1 ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor)	10
2.2 การวัดปริมาณซัลไฟต์ (Sulfite measurement)	11
2.3 การวัดด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรี/แอมเพอร์โรเมทรี (direct voltammetric/ amperometric measurement)	12
2.4 การพัฒนาไบโอสเซนเซอร์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์	13
2.5 การพัฒนาซัลไฟต์ไบโอสเซนเซอร์	14
2.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เซนเซอร์ (Hydrogen peroxide sensor)	12
2.7 เทคนิคในการตรึงเอนไซม์ในเอนไซม์รีแอกเตอร์	16
2.7.1 ซัลไฟต์ไบโอสเซนเซอร์	18
<b>บทที่ 3 วิธีการทดลอง</b>	
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	22
3.2 การเตรียมสารเคมี	25
3.3 การพัฒนาซัลไฟต์เคมีคัลเซนเซอร์ และขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์	26
3.3.1 การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลีอะนิลีน	26
3.3.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปร ด้วยมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์-พีดิตีเอ-อนุภาคทองนาโน (CNTs-PDDA-AuNPs/GC)	28
3.3.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอสเซนเซอร์ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE	31

<b>บทที่ 4</b>	<b>ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>	
4.1	การทำอิเล็กโทรโพลิเมอร์เซชันของโพลีอะนิลีน	33
4.2	ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยมัลติวอลล์-คาร์บอนนาโนทิวป์-พีดีดีเอ-อนุภาคทองนาโน	46
4.3	การเตรียมขั้วไฟฟ้าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ CS/HRP-p(Ani-co-o-Aba)/GCE	53
<b>บทที่ 5</b>	<b>สรุปผลการวิจัย</b>	70
	<b>Output จากโครงการวิจัย</b>	76

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	22
ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	24
ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณของ $Ani_x : Aba_y$ ในอัตราส่วนต่างๆ	31
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้าที่ยอดพีกออกไซด์ ( $E_{p,a}$ ) และค่ากระแสออกไซด์ ( $i_{0.6V}$ ) ของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 15 mM	33
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาผลของตัวรบกวน	45

## สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 2.1	ไดอะแกรมของไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบไปด้วย (1) ส่วนของรีเซพเตอร์ที่เป็นสารชีวโมเลกุล (Bioreceptor) และ (2) ทรานสดิวเซอร์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล	11
รูปที่ 2.2	ไดอะแกรมของปฏิกิริยาที่เกิดบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ซึ่งเกิดจากสารที่สนใจ (analyte; A) เคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าผ่านกระบวนการแพร่ไปที่ชั้นของเอนไซม์ (enzyme layer) เกิดปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ (enzymatic reaction) กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Product; P) ซึ่งตรวจวัดได้ที่ทรานสดิวเซอร์	11
รูปที่ 2.3	(A) ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของซัลไฟต์และ แอสคอร์เบทที่ขั้วไฟฟ้าทาสีคาร์บอนในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 อัตราเร็วในการสแกน 50mV/s และ (B) อิทธิพลของแอสคอร์เบทที่มีต่อสัญญาณของซัลไฟต์เมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี	12
รูปที่ 2.4	ไดอะแกรมแสดงกระบวนการในการสังเคราะห์ Mn-phenazine complex	15
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
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	18
รูปที่ 2.7	ไดอะแกรมแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าของซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เมื่อ SOD คือซัลไฟต์ออกซิเดส และ Cyt c คือ cytochrom c	18
รูปที่ 2.8	(A) แสดงผลของ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวัดสัญญาณ และ (B) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีโดยใช้ซัลไฟต์ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เมื่อเติม 0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ที่ละ 20 µL ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (a) pH = 8.0 และ (b) pH = 8.7	19
รูปที่ 2.9	ไดอะแกรมแสดงด้านข้าง (side view) ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (A) s-type biosensor และ (B) b-type biosensor	20
รูปที่ 2.10	สัญญาณที่ได้จากการวัด SO <sub>2</sub> ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (s-type)	20
รูปที่ 2.11	แสดงสูตรโครงสร้างของ polyaniline	21
รูปที่ 3.1	การทดลองไซคลิกโวลแทมโมแกรมเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง รูปแทรกแสดงโวลแทมเมทริกเซลล์	23

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 3.2	แมนิโฟลด์ของระบบโพลีอินเจกชันอะนาลิซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ ขั้วไฟฟ้า ที่พัฒนาขึ้น รูปแทรกแสดงภาพของ thin layer flow cell	24
รูปที่ 3.3	ขั้นตอนการโม่ดีฟายด์ขั้วไฟฟ้าด้วยกระบวนการ (A) electropoly- merization อะนิลีน (PANi) และ (b) electro-deposit อนุภาคทองนา โนบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากาสซีคาร์บอน	28
รูปที่ 3.4	ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารละลายอนุภาคทองนาโน	29
รูปที่ 3.5	ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารละลายมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก	29
รูปที่ 3.6	ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย MWCNT-PDDA	30
รูปที่ 3.7	แสดงสารละลาย $Ani_x : ABA_y$ ที่เตรียมได้โดยใช้การผสมในอัตราส่วน ต่างๆ	31
รูปที่ 3.8	ขั้นตอนเตรียมขั้ว CS/HRP-p(Ani-co-o-ABA)/GCE	32
รูปที่ 3.9	การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า	32
รูปที่ 4.1	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM	34
รูปที่ 4.2	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM ที่ขั้วไฟฟ้า A) AgNPs_MWCNT_PANi_GC และ B) AuNPs_MWCNT_PANi_GC	35
รูปที่ 4.3	แอมเพอร์โรแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1-7 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0	36
รูปที่ 4.4	ไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 5,10 และ 15 mM ที่ขั้วไฟฟ้าที่โม่ดีฟายด์โดยใช้มัลติวอลล์คาร์บอนนาโน ทิวป์ชนิดต่าง ๆ	38
รูปที่ 4.5	กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัล ไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT ชนิดต่างๆ	39
รูปที่ 4.6	แอมเพอร์โรแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1-7 mM ที่วัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่โม่ดีฟายด์ด้วยสารละลาย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน	40
รูปที่ 4.7	กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัล ไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT- COOH:aniline ในอัตราส่วนต่างๆ โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของอะนิลีน	41
รูปที่ 4.8	กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัล ไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วย MWCNT-COOH:aniline ในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณ ของ MWCNT-COOH	42

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.9	กราฟแท่งแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากระแสของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้าที่โม่ติพายด์ด้วยอนุภาคทองคำในปริมาณต่างกัน	43
รูปที่ 4.10	แสดงค่ากระแสเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 1 mM ที่ใช้ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.067 M ที่มีค่า pH ต่างกันเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบหนืด	43
รูปที่ 4.11	แอมเพอร์โรแกรม แสดงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของซัลไฟต์ ที่ได้จากการเติมสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1 – 16 mM	44
รูปที่ 4.12	แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบค่ากระแสของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1 mM ที่ตรวจวัดได้จากขั้วไฟฟ้า ที่ใช้สำหรับศึกษาช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง และศึกษาตัวรบกวน	46
รูปที่ 4.13	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 4 mM ที่ขั้วไฟฟ้าแต่ละชนิด (a) กลาสซีคาร์บอน (GC), (b) CNTs/GC, (c) CNTs-PDDA/GC และ (d) CNTs-PDDA-AuNPs/GC	47
รูปที่ 4.14	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการวัดค่ากระแสไฟฟ้าสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 2 mM ที่มีค่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ที่ต่างกัน	48
รูปที่ 4.15	a) ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของซัลไฟต์ ความเข้มข้น 2mM ที่อัตราเร็วในการสแกนค่าต่างๆ (0.01- 0.15 Vs <sup>-1</sup> ) และ b) ที่อัตราเร็วในการสแกน 0.05 Vs <sup>-1</sup> เมื่อมีของซัลไฟต์ความเข้มข้น 2-10 mM	49
รูปที่ 4.16	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของซัลไฟต์กับศักย์ไฟฟ้าที่ให้แกขั้วขั้วซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC) ในระบบโพลีอินเจคชัน	50
รูปที่ 4.17	ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโพลีอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีขั้วซัลไฟต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-AuNPs/GC)	51
รูปที่ 4.18	<b>18</b> ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ของปริมาณซัลไฟต์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำผลไม้ (A-E) ตัวอย่างไวน์ขาว (F-H) และไวน์แดง (I-L) จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโพลีอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า CNTs-PDDA-AuNPs/GC และวิธีวิธีมาตรฐานแบบไอโอโดเมทรี	53
รูปที่ 4.19	สารละลายผสม p(Ani-co-o-Aba) ในอัตราส่วนต่างๆ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินผ่านไป (a) 1 นาที และ (b) 10 นาที	54
รูปที่ 4.20	ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของ aniline (Ani) และ o-aminobenzoic acid (o-Aba) ด้วยวิธี Interfacial copolymerization เมื่อ $x$ ( $0 \leq x \leq 1$ ) เป็นอัตราส่วนโมลของ o-Aba ในโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba)	54

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

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	55
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	56
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	57
รูปที่ 4.24	ไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของ p(Ani <sub>1-x</sub> -co-o-Aba <sub>x</sub> ) เมื่อ x (0 ≤ x ≤ 1) เป็นอัตราส่วนโมลของ o-Aba ในโคพอลิเมอร์ของ p(Ani-co-o-Aba)	58
รูปที่ 4.25	ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ (a) GCE, (b) p(Ani <sub>0.6</sub> -co-o-Aba <sub>0.4</sub> )/GCE (c) HRP-p(Ani <sub>0.6</sub> -co-o-Aba <sub>0.4</sub> )/GCE และ (d) CS/HRP-p(Ani <sub>0.6</sub> -co-o-Aba <sub>0.4</sub> )/GCE	59
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)	60
รูปที่ 4.27	แผนภาพแสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทางไฟฟ้าเคมีด้วยขั้ว CS/HRP-p(Ani <sub>0.6</sub> -co-o-Aba <sub>0.4</sub> )/GCE	61
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	62
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	63
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	64
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	65
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	66
รูปที่ 4.33	(A) กราฟแสดงความสัมพันธ์ กระแส-เวลา ( <i>i-t</i> ) 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) กราฟมาตรฐานแสดง	67

ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์  
สารบัญญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.34	การศึกษาความเสถียรของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ จากค่ากระแสรีดักชันของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.2 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V mM	68
-------------	---	----