

3. วัตถุประสงค์

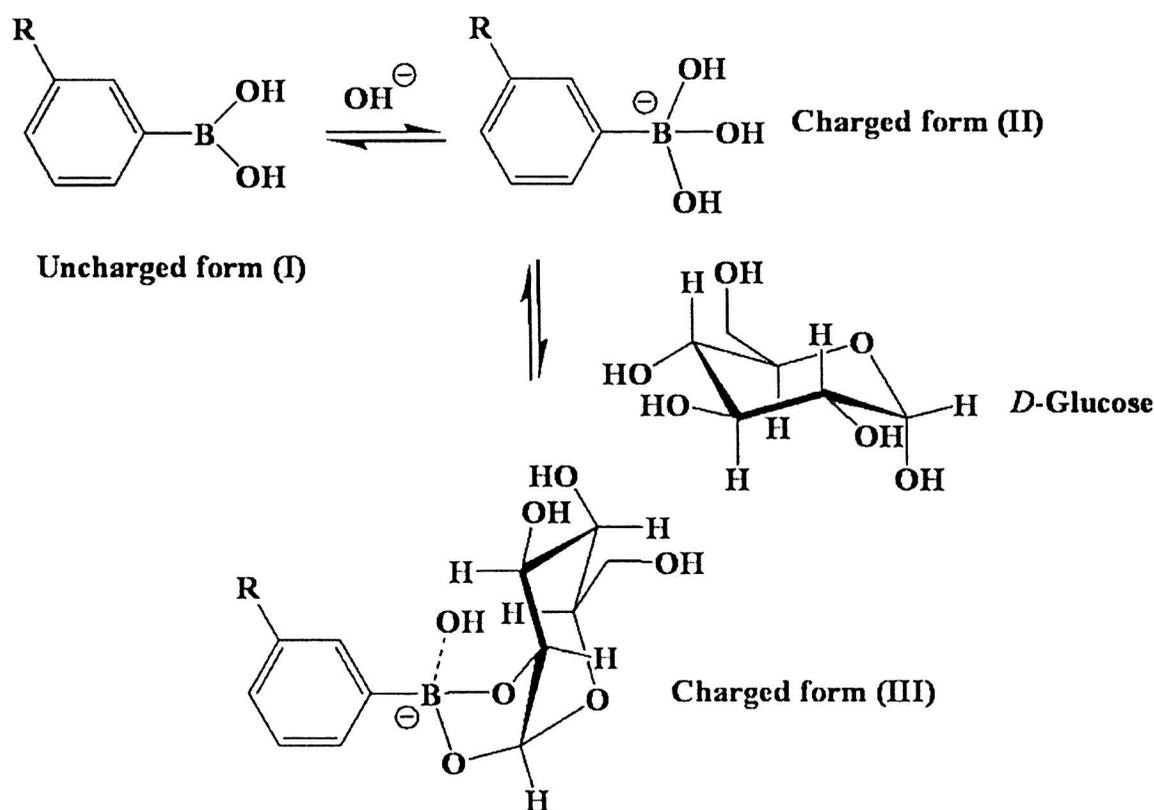
พัฒนาเทคนิคแอฟฟิไนตี้สมาร์ทพอลิเมอร์เจล สำหรับการตรวจวัดกลูโคสที่สามารถใช้งานได้ง่าย และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น รวมทั้งศึกษาวิธีการที่ทำให้การตรวจวัดมีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคส และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริง

4. วิธีทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกคือการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์กลูโคสอย่างง่ายที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนที่สองจะเป็นการพัฒนาระบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส เพื่อใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่อาจมีน้ำตาลอื่นที่ไม่ใช่กลูโคสรวมอยู่ด้วย จึงขอแบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

4.1 ศึกษาและพัฒนาแอฟฟิไนตี้สมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการตรวจวัดกลูโคสอย่างง่าย

แอฟฟิไนตี้สมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ มีหลักการทำงานโดยอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจง (affinity binding) ของหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกในพอลิเมอร์เจลที่สังเคราะห์ขึ้นกับหมู่อิซโอดอล (cis-diol) ที่มีอยู่ในกลูโคส เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous media) กรดฟีนิลโบโรนิกจะอยู่ในสมดุลระหว่าง 2 โครงสร้าง (รูปที่ 1) คือ โครงสร้างสามเหลี่ยมแบนราบที่ไม่มีประจุ (neutral trigonal planar form หรือ uncharged form I ในรูปที่ 1) กับโครงสร้างปิระมิดฐานสามเหลี่ยมที่มีประจุลบ (tetrahedral anionic form หรือ charged form II ในรูปที่ 1) ซึ่งกลูโคสสามารถเกิดพันธะได้ดีกว่าเมื่อกรดฟีนิลโบโรนิกอยู่ในโครงสร้างแบบที่มีประจุ เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น ทำให้สมดุลเลื่อนไปที่ในทิศทางที่ทำให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีประจุของกรดฟีนิลโบโรนิกมากขึ้น (รูปที่ 1) เกิดความแตกต่างกันของปริมาณไอออนที่อยู่ภายในเนื้อเจลกับในสารละลายรอบ ๆ เจล ส่งผลให้เกิด Donnan potential ทำให้พอลิเมอร์เจลเกิดการบวมตัวขึ้นและมีลักษณะใสขึ้นกว่าเดิม (Ivanov *et al.*, 2008) สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงก่อนและหลังการจับกับกลูโคสได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสที่อยู่ในสารละลาย พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างกรดฟีนิลโบโรนิกและกลูโคสเป็นแบบผันกลับได้ ดังนั้นเมื่อโมเลกุลของกลูโคสถูกปล่อยออกจากหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกของแอฟฟิไนตี้สมาร์ทพอลิเมอร์เจล จะทำให้เจลเกิดการหดตัวและค่าการดูดกลืนแสงก็จะเปลี่ยนกลับไปเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงก่อนการจับกับกลูโคส เนื่องจากเจลที่สังเคราะห์ขึ้นมีการบวมตัวเมื่อมีการจับกับกลูโคสและเมื่อกลูโคสหลุดออกไปเจลก็จะเกิดการหดตัวกลับมาอยู่ในสภาพเดิม ทำให้เรียกเจลดังกล่าวว่า “แอฟฟิไนตี้สมาร์ทพอลิเมอร์เจล”



รูปที่ 1 สมดุลของอนุพันธ์ของกรดฟีนิลโบโรนิกและหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) และหรือกลูโคสในสารละลายที่มีน้ำ (aqueous media)

4.1.1 การสังเคราะห์แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี

สังเคราะห์โคพอลิเมอร์ของ กรด 3-อะคริลามิโดฟีนิลโบโรนิกอะคริลาไมด์ (3-acrylamidophenylboronic acid-acrylamide copolymer) เพื่อให้ได้แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจล ที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่มีความเหมาะสมในการที่จะนำพัฒนาต่อเป็นกลูโคสเซนเซอร์ ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้ตามวิธีดังนี้

4.1.1.1 ละลายส่วนผสมของมอนอเมอร์ (monomer mixture) ที่ประกอบด้วย กรด 3-อะคริลามิโดฟีนิลโบโรนิก 9.6 มิลลิกรัม อะคริลาไมด์ 30.6 มิลลิกรัม ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 0.50 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นจึงเติม *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเฟิร์จด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อกำจัดเอาออกซิเจนออก

4.1.1.2 เตรียมสารละลายที่เป็นตัวริเริ่มปฏิกิริยา (initiator solution) โดยการละลาย แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 19.9 มิลลิกรัมในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร



4.1.1.3 นำสารละลายทั้งสองส่วนข้างต้น คือ สารละลายส่วนผสมของมอนอเมอร์ และสารละลายที่เป็นตัวริเริ่มปฏิกิริยา ผสมกันในอัตราส่วน 2:1 จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันได้ ผลิตภัณฑ์เป็นแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่มีลักษณะขาวขุ่น

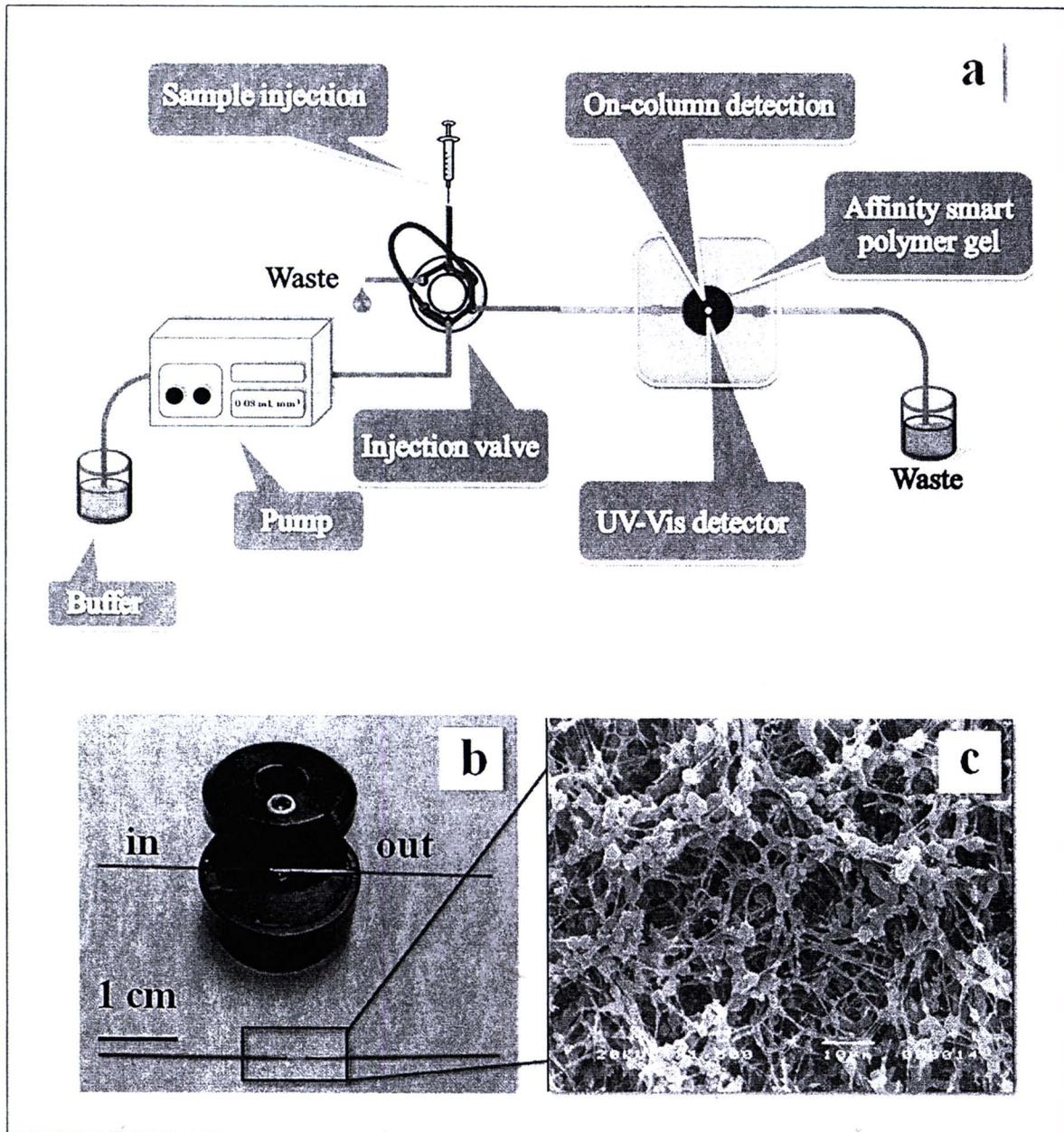
4.1.1.4 เตรียมท่อคาปิลลารี โดยตัดท่อให้มีความยาว 5 เซนติเมตร โดยใช้ท่อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.32 มิลลิเมตร เพื่อการทดสอบในเบื้องต้นก่อน เมื่อได้ท่อที่มีความยาวที่ต้องการแล้ว ก็นำท่อที่ได้สอดเข้าไปในอุปกรณ์สำหรับเผาชั้นของพอลิอิมิด (polyimide) ออก ทำให้ได้ส่วนที่มีลักษณะใสบริเวณตอนกลางของท่อคาปิลลารี ใช้สำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

4.1.1.5 นำท่อที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.2.4 จุ่มลงในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.2.3 ทันทีหลังผสมสารตั้งต้นทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ในขั้นตอนนี้อาจจะใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวช่วยทำให้สารละลายไหลผ่านท่อคาปิลลารีได้ดีขึ้น หรือ อาจจะทำให้สารละลายไหลผ่านท่อด้วยแรงคาปิลลารีก็ได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาว่าวิธีการใดจะมีความเหมาะสมมากที่สุด

4.1.1.6 แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลจะเกิดขึ้นทันทีภายในท่อคาปิลลารี โดยปริมาตรของสารละลายที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้ง สามารถเคลือบท่อคาปิลลารีได้จำนวน 3 ท่อ จากนั้นจึงนำท่อทั้งสามมาต่อกันแบบอนุกรมในระบบไหลผ่านที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อชะสารตั้งต้นที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก และทำให้แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลมีความคงตัวมากขึ้น ในขั้นตอนนี้จะได้แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่เคลือบอยู่ในท่อคาปิลลารีที่พร้อมสำหรับการนำไปใช้งาน

4.1.2 สภาวะที่เหมาะสมของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ ที่ต่อกับระบบโฟลอิเจคชัน

นำท่อคาปิลลารีที่เคลือบด้วยแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลและผ่านการชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จากข้อ 4.1.1.6 มาต่อเข้ากับระบบโฟลอิเจคชัน ตามรูปที่ 2a ซึ่งจะประกอบไปด้วยปั๊มสำหรับขับเคลื่อนสารละลายในระบบ (400 Solvent Delivery System, Applied Biosystem, USA) อินเจคชัน วาล์ว (6 port valve, Valco Instruments Co. Inc., USA) สำหรับฉีดสารละลายมาตรฐาน สารตัวอย่าง และสารละลายสำหรับละลายพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกับหมู่ซีส-ไดออลของน้ำตาลกลูโคส และตัวตรวจวัดแบบอบนคอลลิมน์ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Absorbance Detector, Applied Biosystem, USA)



- รูปที่ 2 (a) ระบบตรวจวัดแบบออนคอลัมน์แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ ที่ต่อกับระบบโฟลอินเจคชัน
- (b) เซลล์ที่ใช้สำหรับการตรวจวัดแบบออนคอลัมน์และท่อคาปิลลารีที่เคลือบด้วยแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล
- (c) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1500 เท่า

ในการเซาระบบโพลีอินเจคชันนั้น ส่วนใสของท่อคาปิลลารีที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์เจลจะมีตำแหน่งตรงกับช่องที่ให้แสงเดินทางผ่านของเซลล์สำหรับการตรวจวัดแบบออนคอลัมน์ (on-column detection cell) ดังแสดงในรูปที่ 2b ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่มีการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของ แอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล หลังจากหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่ซีส-ไดออล ของ น้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

หลังจากเซาระบบโพลีอินเจคชันเรียบร้อยแล้ว จึงทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ และทำการศึกษาที่ละลาย หรือถ้ามีปัจจัยใดที่ส่งผลต่อกันก็จะทำการศึกษาในลักษณะที่เป็น แพลททอเรียล โดยใช้สารละลายมาตรฐานของกลูโคสความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ในการทดสอบ เพื่อให้เห็นสัญญาณการตอบสนองที่ชัดเจน ในการพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะที่ให้ค่าสัญญาณในการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อน้ำตาลกลูโคสสูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย มีปัจจัยและ ช่วงของการศึกษาสรุปได้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์ ที่ต่อกับระบบโพลีอินเจคชัน

ปัจจัยที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่	
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	10-25
pH	7.00-8.00
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นสารละลายสลายพันธะ	
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	15-30
pH	5.00-7.00
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	100-400
อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.02-0.10



4.1.3 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารีที่มีต่อความไว

วิเคราะห์ของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์

เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารีจะเป็นตัวกำหนด ปริมาณของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่จะเคลือบไว้ภายในท่อ ดังนั้นจึงศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อที่มีต่อความไววิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) ของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารีที่ทำการศึกษา คือ 0.25 มิลลิเมตร 0.32 มิลลิเมตร และ 0.53 มิลลิเมตร และฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 20.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจึงนำสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์มาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความชันของกราฟ และเปรียบเทียบความชันที่ได้จากการใช้ท่อคาปิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในแตกต่างกัน

4.1.4 ประสิทธิภาพและพิสูจน์การใช้ได้ของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจล กลูโคส

เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

4.1.4.1 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดของระบบ จึงทำการศึกษาช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงของเซนเซอร์ โดยการฉีดสารมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.50 – 18.0 มิลลิโมลาร์ โดยจะพิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรงจากค่าสหสัมพันธ์เชิงปริมาณ (R^2) ซึ่งควรจะมีค่าเข้าใกล้ 1 พร้อมกับศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่เซนเซอร์สามารถตรวจวัดได้ โดยที่พิจารณาจากความเข้มข้นที่ให้สัญญาณการตอบสนอง (signal) สูงกว่าสัญญาณรบกวน (noise) มากกว่าหรือเท่ากับ 3 เท่า

4.1.4.2 ความเที่ยงของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ เมื่อ

ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และระหว่างวัน (inter-day precision)

สำหรับกรณีของ intra-day precision ทำการทดลองโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 8.0 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นซึ่งอยู่ในช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน) จำนวน 15 ซ้ำ จากนั้นนำค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้มาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

ส่วนในกรณีของ inter-day precision ทำการทดลองโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (8.0 มิลลิโมลาร์) ด้วยอونคอล์มน์แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลอันเดียวกันต่อเนื่องกัน 3 วัน โดยฉีดซ้ำวันละ 15 ครั้ง แล้วนำค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้มาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์



4.1.4.3 ความเสถียรในการใช้งานของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคส

เซนเซอร์

เพื่อทดสอบว่าแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นภายในท่อคาปิลลารี 1 ท่อ สามารถใช้วิเคราะห์ซ้ำได้จำนวนกี่ครั้ง ทำการศึกษาโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 8.0 มิลลิโมลาร์ซ้ำอย่างต่อเนื่อง และกำหนดให้สัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการฉีดครั้งแรกเป็น 100% แล้วสัญญาณที่ได้จากการฉีดในครั้งถัดไปมาก็เทียบสัดส่วนจาก 100% ดังกล่าว แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนครั้งที่ฉีดและ %สัญญาณการตอบสนองที่ได้

4.1.4.4 ความสามารถในการทำซ้ำได้ของการสังเคราะห์แอฟฟิไนต์สเมาร์ท

พอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ในท่อคาปิลลารี

ทำการศึกษาโดยการสังเคราะห์และเคลือบท่อคาปิลลารีด้วยแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจล ทั้งหมด 6 ท่อ (ใช้สารละลายมอนอเมอร์และสารละลายริเริ่มปฏิกิริยาที่เตรียมครั้งเดียวกัน) จากนั้นนำแต่ละท่อ (ทำการทดลองครั้งละ 1 ท่อ) มาต่อเข้ากับระบบโฟลอินเจกชัน แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 16.0 มิลลิโมลาร์ นำสัญญาณการตอบสนองที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน แล้วเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) ที่ได้จากท่อแต่ละอัน

4.1.4.5 ความจำเพาะเจาะจงของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจล

เนื่องจากหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์แบบผันกลับได้กับหมู่ซีส-ไดออล ของกลูโคส ซึ่งในความเป็นจริงแล้วน้ำตาลหลายชนิดมีหมู่ซีส-ไดออล จึงต้องการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ว่าให้ผลอย่างไร โดยเลือกศึกษาน้ำตาลที่แตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประกอบด้วยกลูโคส (น้ำตาลที่ต้องการวิเคราะห์) แมนนิส และกาแลคโตส และน้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ ซูโครส และ แลคโตส ซึ่งทำการศึกษาโดยฉีดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลแต่ละชนิดในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 16.0 มิลลิโมลาร์ นำสัญญาณการตอบสนองที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน แล้วเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) ที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำตาลแต่ละชนิด

4.1.4.6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐาน

เพื่อเป็นการพิสูจน์การใช้ได้ของวิธี จึงต้องมีการเปรียบเทียบผล ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน ทำการศึกษาโดยวิเคราะห์ตัวอย่างกลูโคสที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเตรียมให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 5.0–

50.0 มิลลิโมลาร์ แบ่งตัวอย่างดังกล่าวออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกวิเคราะห์ด้วยแอฟฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์ เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น อีกส่วนหนึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid (DNS) method) ซึ่งจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่อัลดีไฮด์ของน้ำตาลกลูโคส และการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 3,5-dinitrosalicylic acid ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส จะได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลแดงของ 3-อะมิโน 5-กรดไนโตรซาลิไซลิก และวัดการดูดกลืนแสงของสารดังกล่าวที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร (Miller, 1959) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี โดยการทดสอบทางสถิติด้วยเทคนิค Wilcoxon Signed Rank

4.1.4.7 วิเคราะห์ตัวอย่างจริง

ได้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะ 3 ตัวอย่างจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา นำตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman® grade 1, pore size 11 µm, Whatman International Ltd., Maidstone, England) เพื่อที่จะแยกเอาอนุภาคต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะออก โดยก่อนจะวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ต้องศึกษาก่อนว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างรบกวนการวิเคราะห์หรือไม่ สามารถทำการศึกษาได้ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 2 แบบ แบบที่ 1 คือ เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในตัวอย่างปัสสาวะแต่ละตัวอย่าง เพื่อให้ในตัวอย่างปัสสาวะมีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน แบบนี้จะเรียกว่า matrix matched calibration curve ส่วนแบบที่ 2 จะเป็นการเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบปกติ คือ เตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แบบนี้จะเรียกว่า standard curve ช่วงความเข้มข้นของกลูโคสเตรียมทั้งสองแบบจะอยู่ในช่วงเดียวกัน คือ 0.0 2.0 4.0 และ 8.0 มิลลิโมลาร์

ทำการวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมขึ้นทั้งหมดด้วยแอฟฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์ เจลกลูโคสเซนเซอร์ แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับสัญญาณการตอบสนองที่ได้ นำค่าความชันที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานทั้งสองแบบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง จำเป็นต้องใช้ matrix matched calibration curve ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง ด้วยข้อมูลข้างต้นสามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (recovery) โดยอ้างอิงจากวิธีการคำนวณที่แนะนำไว้โดย EURACHEM (Guide EURACHEM, 1998)

จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงด้วยแอฟฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์ เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น กับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันด้วย strip test (ARKRAY AUTION™ Sticks, ARKRAY, Inc. Kyoto, Japan) ที่ได้จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์ที่เทียบเท่ากับวิธีที่ใช้จริงในโรงพยาบาล



4.2 ศึกษาและพัฒนาแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการ

ตรวจวัดกลูโคส

วิธีทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยเดิม

เนื่องจากกรดฟีนิลโบโรนิกสามารถเกิดพันธะกับสารที่มีหมู่ซีส-ไดออลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีอยู่ในน้ำตาลเกือบทุกชนิด แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่พัฒนาขึ้นในช่วงปีแรกจึงไม่จำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงต้องการศึกษาและพัฒนาต่อยอดจากเทคนิคเดิมให้สามารถแยกตรวจวัดกลูโคสจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่สามารถจับตัวกับสเมาร์ทพอลิเมอร์เจลได้ โดยการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารีตลอดช่วงความยาวที่เหมาะสม เพื่อให้เป็นทั้งเฟสอยู่กับที่เพื่อแยกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และใช้เป็นบริเวณสำหรับการตรวจวัดด้วยยูวี วิสิเบิล โดยมีปัจจัยที่ต้องศึกษาดังนี้

4.2.1 ความยาวของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์ที่เหมาะสม

ในการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารีตลอดความยาวของท่อ จำเป็นต้องอาศัยการขับเคลื่อนสารละลายให้เข้าไปภายในท่อโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ไม่สามารถเคลือบโดยใช้แรงคาปิลลารีได้เหมือนกับการทดลองในครั้งแรก เนื่องจากความยาวของท่อที่ใช้ยาวมากขึ้น โดยในช่วงแรกศึกษาที่ความยาว 15 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงค่อยลดหรือเพิ่มความยาวของท่อ เพื่อหาความยาวที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การแยก (separation factor) และจำนวนเพลททางทฤษฎี (theoretical plate) รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.2.2 ความสามารถในการทำซ้ำได้ของการสังเคราะห์และการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจล

ศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์และการเคลือบซ้ำได้ โดยพิจารณาจากสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากระบบการตรวจวัดและค่าสัมประสิทธิ์การแยก (separation factor) จากโครมาโทแกรมที่ได้

4.2.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกน้ำตาลแต่ละชนิด

ปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษา คือ อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์มีประสิทธิภาพในการแยกสูงที่สุด นั่นคือ เพื่อให้แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์สามารถแยกกลูโคสออกจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ได้

4.2.4 ประสิทธิภาพการทำงานของทั้งระบบ

ปัจจัยที่จำเป็นต้องศึกษา เช่น การตอบสนองเชิงเส้นของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่มีต่อน้ำตาลแต่ละชนิด (ศึกษาจากค่าสัมประสิทธิ์การตรวจวัด >0.99) ขีดจำกัดการตรวจวัดของ

น้ำตาลแต่ละชนิด (signal/noise ≥ 3) เสถียรภาพของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจล โดยดูจากผลการวิเคราะห์ซ้ำ และอายุการใช้งาน (ศึกษาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงของสัญญาณการตอบสนอง) เป็นต้น

4.2.5 ผลรบกวนที่เกิดจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ

โดยศึกษาทั้งในเชิงคุณภาพ (ประสิทธิภาพในการแยก) และเชิงปริมาณ (สัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้)

4.2.6 ประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

นำเทคนิคการแยกและการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) หรือ ซีรัม โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับเทคนิคมาตรฐาน

วิธีทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่

จากแผนงานวิจัยเดิมที่เสนอไว้ สามารถสังเคราะห์แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์ได้และสามารถต่อเข้ากับระบบของ μ -HPLC ได้ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการที่เจลจะเกิดการบวมตัวเมื่อเกิดพันธะกับกลูโคสหรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ทำให้มีโอกาสที่เจลจะหลุดออกจากท่อคาปิลลารีในขณะที่สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ไหลผ่าน จึงจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแผนดำเนินงานวิจัยใหม่

สำหรับแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่ ผู้วิจัยจึงได้สังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์ที่มีกรดฟีนิลโบโรนิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน เนื่องจากหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกสามารถเกิดอันตรกิริยาด้วยอัตราที่แตกต่างกันระหว่างน้ำตาลแต่ละชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะนำคอลัมน์มอนอลิทที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในการแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันได้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเทคนิคการสังเคราะห์ ตลอดจนสารเคมีที่ต้องใช้เพื่อการสังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์ที่มีกรดฟีนิลโบโรนิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน และค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับเทคนิคการตรวจวัดน้ำตาล จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้เทคนิคทางไฟฟ้าเคมี เพราะน้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีสภาวะเป็นเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าสามารถใช้มอนอลิทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นในการแยกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน และตรวจวัดโดยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี โดยมีการปรับปรุงผิวหน้าของอิเล็กโทรดด้วยอนุภาคทองแดง น่าจะทำให้ได้เทคนิคการตรวจวัดน้ำตาลที่สามารถวิเคราะห์น้ำตาลได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยได้ศึกษาทั้งในส่วนของการสังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์และระบบของการตรวจวัดไปพร้อม ๆ กัน ดังนี้

4.2.7 ศึกษาการสังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์และศึกษาการแยกน้ำตาลแต่ละชนิด

4.2.7.1 เตรียมท่อคาปิลลารีสำหรับการสังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์

ล้างผิวภายในท่อโดยการผ่านสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเช่นกัน เพื่อให้ค่าพีเอชเป็นกลาง แล้วจึงทำให้ท่อคาปิลลารีแห้งโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ต่อมาจึงปรับมุมฟังก์ชันที่ผิวภายในของท่อคาปิลลารีโดยการผ่านสารละลายของ γ -MAPS (γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane) ที่ละลายในอะซิโตน (20/80 โดยปริมาตร) เมื่อภายในท่อเต็มไปด้วยสารละลาย γ -MAPS ปิดปลายท่อทั้งสองด้านด้วย septum แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C ทิ้งไว้ข้ามคืน (Choodum *et al.*, 2009^o) หลังจากนั้นจึงล้างสารเคมีที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยอะซิโตน ก็จะได้ท่อคาปิลลารีที่พร้อมสำหรับการนำไปใช้งาน

4.2.7.2 สังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์

ชั่งน้ำหนักสารเคมีในตารางที่ 2 โดยมีสัดส่วนคือ 3-กรดอะมิโนฟีนิลโบโรนิกและเอทิลีนไดเมททาไดรเลท เป็น 40% 1-โพรพานอล และ 1,4-บิวเทนไดออล เป็น 60% โดยใน 60% นี้ มี 1-โพรพานอลอยู่ 45% และ 1,4-บิวเทนไดออล อยู่ 55% และใช้ AIBN เป็น 1% ของน้ำหนักสารทั้งหมด (Choodum *et al.*, 2009^b) หลังจากนั้นจึงนำส่วนผสมของสารละลายทั้งหมดไป sonicate เพื่อให้เป็นสารละลายเนื้อเดียว ทำการ degas โดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เพื่อไล่ออกซิเจนที่ละลายอยู่ ออกให้หมด ผ่านสารละลายที่เตรียมได้เข้าไปในท่อคาปิลลารีที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.7.1 ที่มีความยาว 20 เซนติเมตร เมื่อภายในท่อเต็มไปด้วยสารละลายดังกล่าว ปิดปลายท่อทั้งสองด้านด้วย septum แล้วจึงทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 75°C ข้ามคืน (Ren *et al.*, 2009) หลังจากนั้นจึงนำมอนอลิทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ได้ มาต่อเข้ากับปั๊มของเครื่องของเหลวโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อล้างสารละลายส่วนเกินออกด้วยเมทานอล ก็จะได้มอนอลิทคอลัมน์ที่พร้อมสำหรับการนำไปใช้งาน

4.2.7.3 ทดสอบการแยกน้ำตาลด้วยมอนอลิทคอลัมน์

ทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดสำหรับวัดค่าดัชนีหักเห เนื่องจากเป็นตัวตรวจวัดที่สามารถวิเคราะห์น้ำตาลได้โดยตรงโดยที่ไม่ต้องทำอนุพันธ์ เพื่อทดสอบก่อนว่าคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถแยกน้ำตาลได้หรือไม่ ก่อนที่จะนำคอลัมน์ดังกล่าวไปต่อเข้ากับระบบตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์มอนออลิโทคอลล์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นกรดฟีนิลโบโรนิกสำหรับการแยกน้ำตาล

สารเคมี	บทบาท/หน้าที่
กรด 3-อะคริลามิโดฟีนิลโบโรนิกอะคริลาไมด์ โคพอลิเมอร์	มอนอเมอร์
เอทิลีนไดเมทาคริเลท (ethylene di- methacrylate)	สารเชื่อมโซ่
1-โพรพานอล (1-propanol)	สารก่อรูพรุน
1,4-บิวเทนไดออล (1,4-butane-diol)	สารก่อรูพรุน
AIBN (Azobisisobutyronitrile)	สารตัวเริ่มปฏิกิริยา

4.2.8 ศึกษาการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี

4.2.8.1 การปรับปรุงผิวหน้าของแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด (glassy carbon electrode) ด้วยอนุภาคทองแดง

4.2.8.1.1 ขัดทำความสะอาดผิวหน้าอิเล็กโทรดด้วยผงอลูมินาขนาด 5.0 μm และ 0.3 μm ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณมาก เเพร์จด้วยแก๊สไนโตรเจน นำมาทำความสะอาดผิวหน้าอีกครั้งด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ จนได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่เสถียร จะได้แกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดที่พร้อมสำหรับการนำไปใช้งาน

4.2.8.1.2 นำอนุภาคทองแดงที่เตรียมใน 0.5 % Nafion ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 5 μL ไมโครลิตรมาหมดลงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดที่ได้จากข้อ 4.2.8.1.1 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้เย็น หลังจากนั้นนำอิเล็กโทรดที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อชะเอาอนุภาคทองแดงที่ไม่ได้ยึดเกาะที่ผิวหน้าอิเล็กโทรดออก

4.2.8.2 ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

ศึกษาศักย์ไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัดกลูโคสเบื้องต้นในระบบ batch โดยใช้ อิเล็กโทรดทั้ง 2 แบบ ทั้งที่ยังไม่ได้ปรับปรุง (bare glassy carbon) และปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงแล้ว (copper particles modified glassy carbon) โดยใช้อิเล็กโทรดดังกล่าวเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ใช้ Ag/AgCl อิเล็กโทรดเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และทอัสแตนเลสเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย โดยสแกนศักย์ไฟฟ้าในช่วง -0.2 โวลต์ ถึง 0.8 โวลต์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 2.0–22.0 มิลลิโมลาร์



4.2.8.3 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในระบบโพลีอินเจกชันแอมเพอโรเมทรี

เมื่อได้ศักย์ไฟฟ้าที่กลูโคสเริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ผิวหน้าอิเล็กโทรด แล้วจึงทำการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสในระบบโพลีอินเจกชันด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีที่ 0.20 0.30 0.40 0.45 0.50 0.55 และ 0.60 โวลต์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร และใช้อัตราไหลของสารละลายไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2.8.4 อัตราไหลและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

ในการศึกษานี้ใช้สารละลายไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากจากกลูโคสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส และเพื่อให้ได้สัญญาณการตอบสนองที่สูงที่สุดจึงทำการศึกษ้อัตราไหลของสารละลายไฮดรอกไซด์ตั้งแต่ 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที และความเข้มข้นของสารละลายไฮดรอกไซด์ที่ 0.01 0.05 0.10 0.25 และ 0.50 โมลาร์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษา

4.2.8.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอนุภาคทองแดง

เตรียมอนุภาคทองแดงในสารละลาย 0.5% Nafion ในเอทานอล ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 2.5 5.0 และ 10% (มวลต่อปริมาตร) โดยใช้ปริมาตรของสารละลายดังกล่าว 5.0 ไมโครลิตรในการหยดลงบนผิวหน้าของแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน วางทิ้งไว้ให้แห้งในที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน หลังจากนั้นจึงนำอิเล็กโทรดที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้ามาล้างด้วยน้ำกลั่น และต่อเข้ากับระบบโพลีอินเจกชันแอมเพอโรเมทรีเพื่อทำการตรวจวัดกลูโคส โดยแต่ละความเข้มข้นของอนุภาคทองแดง จะทำการฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.01–1.0 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำความไววิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับกัน เพื่อหาความเข้มข้นของอนุภาคทองแดงที่เหมาะสมที่สุด

4.2.8.6 ความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้าที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วย

อนุภาคทองแดง

ฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ สลับกันเป็นช่วง ๆ เข้าไปในระบบโพลีอินเจกชันแอมเพอโรเมทรีที่มีอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยให้สัญญาณที่ได้จากการฉีดครั้งแรกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงเขียนกราฟระหว่างจำนวนครั้งที่ฉีดกับเปอร์เซ็นต์ของสัญญาณที่ได้ แล้วหาค่าเฉลี่ยรวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำที่ได้

4.2.8.7 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด

ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงจะต้องให้ค่าสหสัมพันธ์เชิงปริมาณ (R^2) เข้าใกล้ 1 และทำการศึกษาโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 30.0 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดการตรวจวัดคือความเข้มข้นที่ให้สัญญาณการตรวจวัดเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน ($S/N \geq 3$)

4.2.9 มอนอลิทคอลัมน์ควบคู่กับระบบโพลินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

หลังจากที่แยกศึกษาทั้งในส่วนของการแยกและส่วนของการตรวจวัดเรียบร้อยแล้ว นำมอนอลิทคอลัมน์ที่สังเคราะห์มาต่อเข้ากับระบบโพลินเจคชันแอมเพอโรเมทรีที่สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกัน เพื่อให้เทคนิคการตรวจวัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองแบ่งออกเป็นสองส่วนเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง โดยผลการทดลองส่วนแรกจะเป็นของการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์กลูโคสอย่างง่ายที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนที่สองจะเป็นผลของการพัฒนาระบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส เพื่อใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่อาจมีน้ำตาลอื่นที่ไม่ใช่กลูโคสรวมอยู่ด้วย จึงขอแบ่งผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองออกเป็นสองส่วนดังนี้

5.1 ผลการศึกษาและพัฒนาแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการตรวจวัดกลูโคสอย่างง่าย

5.1.1 ทดสอบเทคนิคการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี

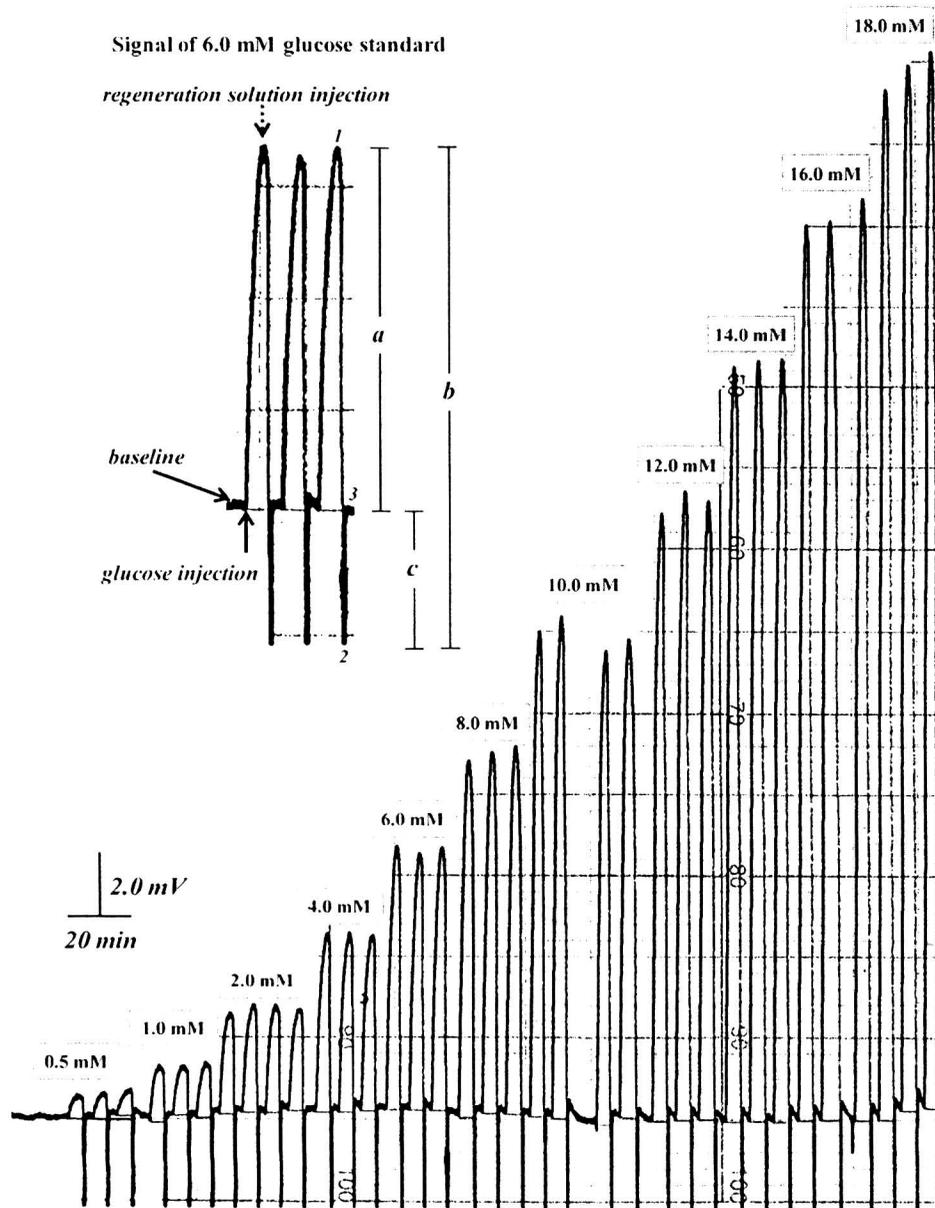
ทดสอบการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี 2 แบบ คือแบบที่ใช้แก๊สไนโตรเจนและแบบที่ใช้แรงคาปิลลารี (capillary force) ในการขับเคลื่อนสารละลายผสมของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลไหลผ่านท่อคาปิลลารี จากการทดสอบพบว่าการเคลือบโดยใช้แรงคาปิลลารีสามารถทำได้ง่ายกว่า และควบคุมการไหลของสารละลายผสมได้ดีกว่า จึงได้เลือกใช้วิธีดังกล่าวในการเคลือบเจลในท่อคาปิลลารี จากนั้นจึงนำท่อคาปิลลารีที่เคลือบด้วยแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลมาต่อเข้ากับระบบโพลของ μ -HPLC เพื่อทดสอบว่าเมื่อเคลือบแล้วนำมาต่อเข้ากับระบบและมีสารละลายไหลผ่าน แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่เคลือบไว้จะหลุดออกมาหรือไม่ เพราะการเคลือบเป็นการดูดซับทางกายภาพของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล บนผิวด้านในของท่อคาปิลลารีเท่านั้น โดยที่แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลไม่ได้เกิดพันธะทางเคมีกับผิวของท่อคาปิลลารี ผลการทดสอบพบว่าแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิ

เมอร์เจลสามารถยึดติดกับผิวภายในของท่อคาปิลลารีได้โดยที่ไม่หลุดออกมากับสารละลายตัวพา ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเป็นโครงข่ายพอลิเมอร์ที่มีรูพรุนของเจลที่สังเคราะห์ได้ทำให้สารละลายสามารถไหลผ่านเจลได้ดีขึ้น โดยสังเกตได้จากภาพที่ได้กล้องจุลทรรศน์อิตรอนแบบส่องกราด (JSM 5200 Microscope, JEOL, USA) ที่กำลังขยาย 1500 เท่า (รูป 2c)

5.1.2 สภาวะที่เหมาะสมของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่ต่อกับระบบโฟลอิเจคชัน

5.1.2.1 ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้สลายพันธะ

เนื่องจากกลูโคสสามารถเกิดพันธะกับแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส ในขณะที่ถ้าอยู่ในสารละลายที่มีสภาวะเป็นกรดจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับไปทางซ้ายมือของรูปที่ 1 ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี pH ในช่วงที่เป็นกรดเพื่อการสลายพันธะระหว่างแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกับกลูโคส โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 15 20 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ และที่ทุกความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าวศึกษาที่ pH 5.00 5.50 6.00 6.60 และ 7.00 โดยใช้สภาวะเบื้องต้นในการศึกษาดังนี้ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.30 เป็นสารละลายตัวพา ปริมาตรตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร และอัตราไหลของสารละลายตัวพา 0.05 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการศึกษาพบว่าทั้งความเข้มข้นและ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วงที่ศึกษาไม่มีผลต่อความสูงของสัญญาณที่ได้ แต่มีผลต่อระยะเวลาในการวิเคราะห์ กล่าวคือเมื่อ pH ลดลงจาก 7.00 เป็น 5.00 เวลาในการสลายพันธะระหว่างกลูโคสและกรดพีนิลโบโรนิก (เวลาจากจุด “1” มายังจุด “2” ของสัญญาณ b ในภาพแทรกของรูปที่ 3) ลดลงจากนาที่เป็นวินาที ในขณะที่เวลาในการกลับเข้าสู่เบสไลน์เพิ่มขึ้นเมื่อ pH ลดลง นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการกลับสู่เบสไลน์ (เวลาที่ใช้จากจุด “2” มายังจุด “3” ของสัญญาณ c ในภาพแทรกของรูปที่ 3) เร็วขึ้น เช่น ที่ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 พบว่าเวลาในการกลับเข้าสู่เบสไลน์เป็น 10 นาที ในขณะที่เวลาที่ใช้ในการกลับสู่เบสไลน์ลดลงเหลือเพียง 5 นาทีเท่านั้นถ้าใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ที่ pH เดียวกัน ดังนั้นความเข้มข้นและ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการสลายพันธะที่เหมาะสมคือ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 ตามลำดับ เพราะใช้เวลาทั้งในการสลายพันธะและการกลับสู่เบสไลน์ที่ไม่ยาวนานนัก



รูปที่ 3 ลักษณะของสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากแอฟฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ภาพแทรก: หลังจาก (a) ฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 6.0 มิลลิโมลาร์ (b) ฉีดสารละลายสลายพันธะ (c) pH ของสารละลายปรับเข้าสู่สภาวะปกติ ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.1.2.2 ความเข้มข้นและ pH ของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

เคลื่อนที่

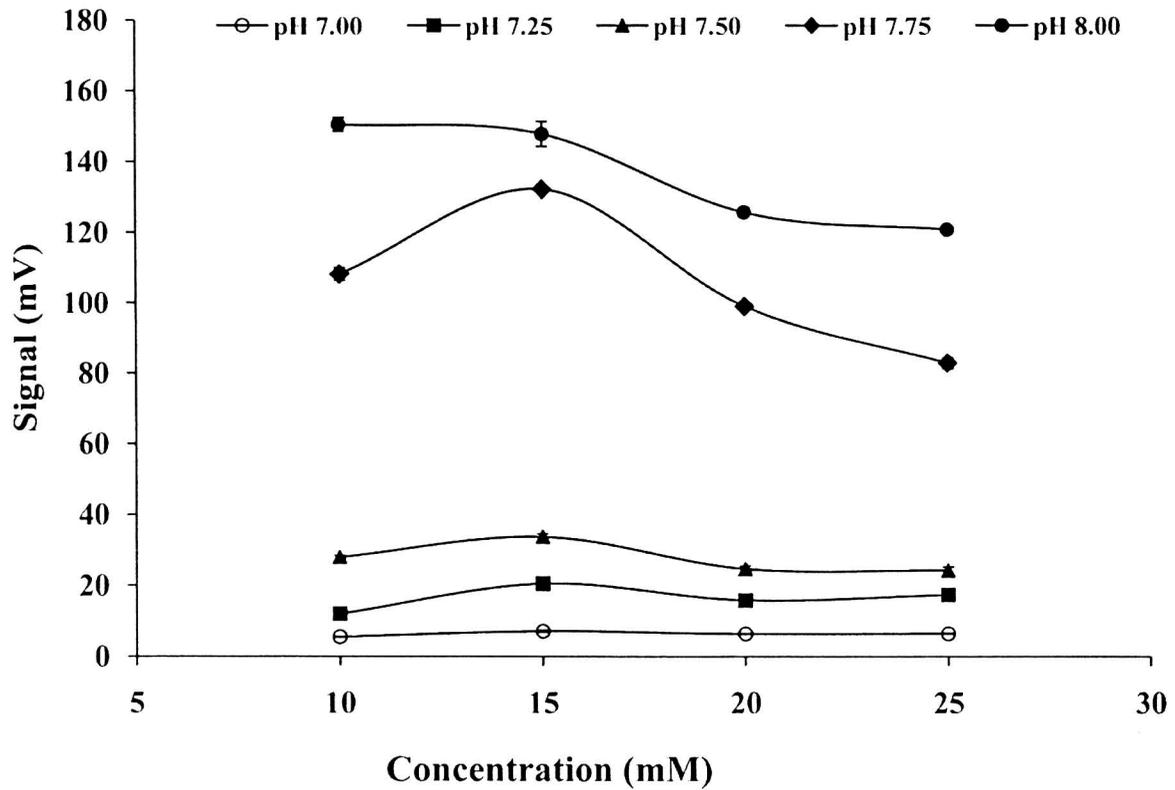
ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่มีต่อสัญญาณการตอบสนองที่ 10 15 20 และ 25 มิลลิโมลาร์ โดยที่แต่ละความเข้มข้นศึกษาที่ทุก pH ดังนี้ 7.00 7.25 7.50 7.75 และ 8.00 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 15 มิลลิโมลาร์ สำหรับทุกค่า pH ที่ทำการศึกษา (รูปที่ 4) แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่า 15 มิลลิโมลาร์ สัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลง ส่วนในกรณีของผลของ pH นั้น พบว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้น สัญญาณการตอบสนองเพิ่มขึ้นที่ทุกความเข้มข้นที่ศึกษา พิจารณาที่ทุกความเข้มข้นเมื่อมีการเพิ่มค่า pH จาก 7.50 เป็น 7.75 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 3.8 ± 0.3 เท่า ในขณะที่เมื่อเพิ่มค่า pH จาก 7.75 เป็น 8.00 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเพียง 1.3 ± 0.1 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นที่ 15 มิลลิโมลาร์ และ pH 7.75 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

5.1.2.3 ปริมาตรสารตัวอย่างและอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่

ศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่างที่ 100 200 300 และ 400 ไมโครลิตร โดยแต่ละปริมาตรสารตัวอย่างศึกษาที่อัตราไหล 0.02 0.04 0.06 0.08 และ 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าที่ทุกปริมาตรของสารตัวอย่าง เมื่อใช้อัตราไหลช้า ค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้จะสูง พิคจะมีลักษณะเป็นพีกกว้าง (broad peak) และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ในขณะที่ที่อัตราไหลเร็วขึ้น ค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลง พิคจะมีลักษณะแหลม (sharp peak) และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลง ทั้งนี้เนื่องจากที่อัตราไหลช้า กลูโคสจะมีเวลาและโอกาสในการเกิดอันตรกิริยากับกรดฟีนิลโบโรนิกได้ดีขึ้น

เมื่อพิจารณาที่อัตราไหลเดียวกัน เช่น ที่อัตราไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเพิ่มปริมาตรสารตัวอย่างจาก 100 เป็น 400 ไมโครลิตร สัญญาณการตอบสนองที่ได้เพิ่มขึ้นจาก 6.5 ± 0.3 มิลลิโวลต์ (เวลาในการวิเคราะห์ 2 นาที) เป็น 14.9 ± 0.7 มิลลิโวลต์ (เวลาในการวิเคราะห์ 5 นาที) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาโดยเลือกจากสภาวะที่เหมาะสมจากสภาวะที่ให้สัญญาณในการตอบสนองสูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ไม่ยาวนานนัก พบว่าปริมาตรตัวอย่างและอัตราไหลที่เหมาะสมคือ 300 ไมโครลิตร 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมของออนคอล์มันแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคส เซนเซอร์ควบคู่กับระบบโพลีอินเจคชัน สรุปลไว้ในตารางที่ 3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะสามารถวิเคราะห์กลูโคสได้ภายในระยะเวลา 6 นาที



รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นและ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีต่อสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 8.0 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.05 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร



ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมของออนคอลัมน์แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ควบคู่กับระบบโพลอินเจคชัน

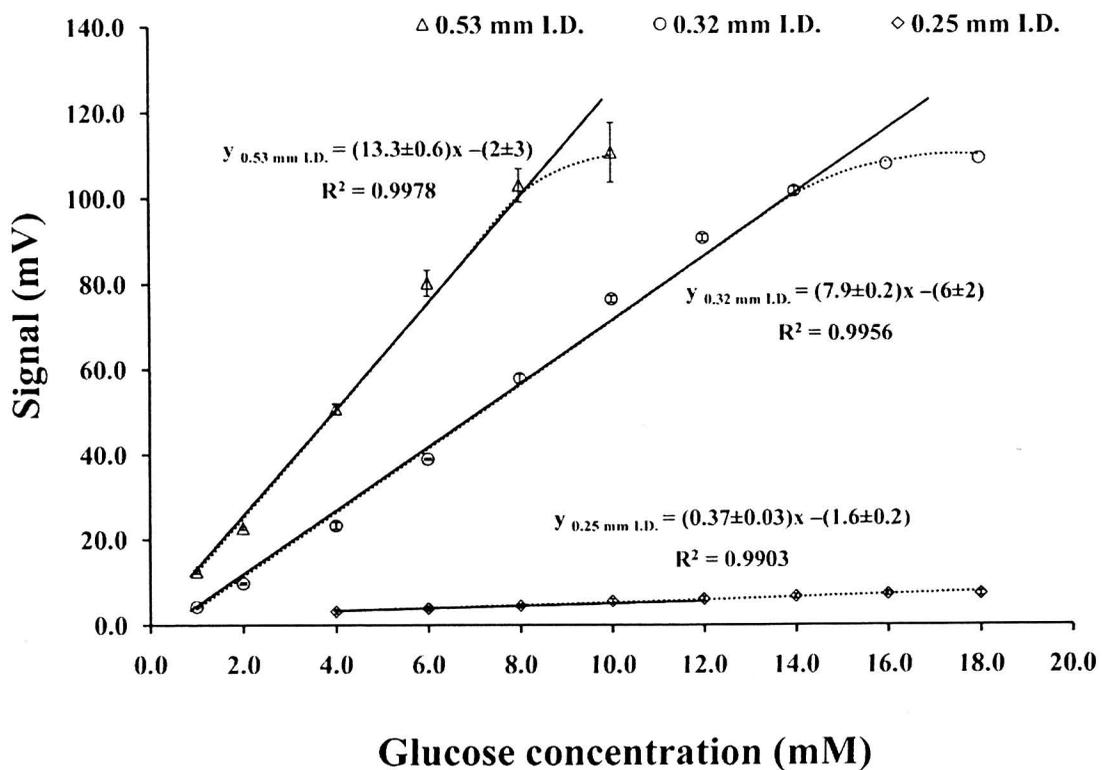
ปัจจัยที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่	
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	15.0
pH	7.75
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นสารละลายสลายพันธะ	
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	20.0
pH	5.50
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	300
อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.08

5.1.3 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารีที่มีต่อความไว

วิเคราะห์ของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์

ศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารี ที่มีผลต่อความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) ของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ โดยศึกษาขนาดตั้งแต่ 0.25 0.32 และ 0.53 มิลลิเมตร พบว่าท่อคาปิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่จะให้ค่าความไวในการวิเคราะห์สูง (รูปที่ 5) เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่กว่าจะมีปริมาณแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับกลูโคสได้มากกว่า การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงจึงมากกว่า นอกจากนี้ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ขึ้นก็จะทำให้ระยะทางที่แสงเดินทางผ่านยาวขึ้น ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ค่าความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น ตามกฎของเบียร์ (Beer's law) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 8.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้เริ่มเบี่ยงเบนไปจากช่วงการตอบสนองเชิงเส้น ทำให้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่แคบ (รูปที่ 5) เมื่อสังเกตพบว่าโดยละเอียดพบว่าเมื่อใช้แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลบางส่วน หลุดออกมาจากปลายท่อน้ำทิ้งของระบบโพลอินเจคชัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารีเป็นการเคลือบที่อาศัยการเกาะติดกับผิวภายในท่อทางกายภาพเท่านั้น (Hoare and Pelton, 2007; Kuzimenkova *et al.*, 2008) นอกจากนี้ในการสังเคราะห์เจลไม่มีการใช้สารเชื่อมไขว้ (cross-linking agent) ดังนั้นเมื่อมีการฉีดกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงเข้าไปในท่อที่มีขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลางภายในใหญ่ หลังจากที่เกิดการบวมตัวเมื่อเกิดการจับกันกับกลูโคส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูง ๆ เจลบางส่วนที่ไม่ได้ถูกยึดเกาะไว้ที่ผิวท่อคาปิลลารีจะหลุดออกมาพร้อมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ส่งผลให้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส สัญญาณการตอบสนองไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงแคบ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้มีค่าสูง ถึงแม้ว่าท่อคาปิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.53 มิลลิเมตร จะให้ค่าความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุดก็ตาม แต่เพื่อให้ผลของการทำซ้ำที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสสูงมีค่าดี (มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำ) จึงเลือกใช้ท่อคาปิลลารีที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 0.32 มิลลิเมตร ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 5 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในท่อคาปิลลารีที่มีต่อความไวในการวิเคราะห์ของออนคอล์มัน แอฟฟิโนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ โดยที่แต่ละความเข้มข้นของกลูโคสทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.1.4 ประสิทธิภาพและการพิสูจน์การใช้ได้ของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์

5.1.4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection)

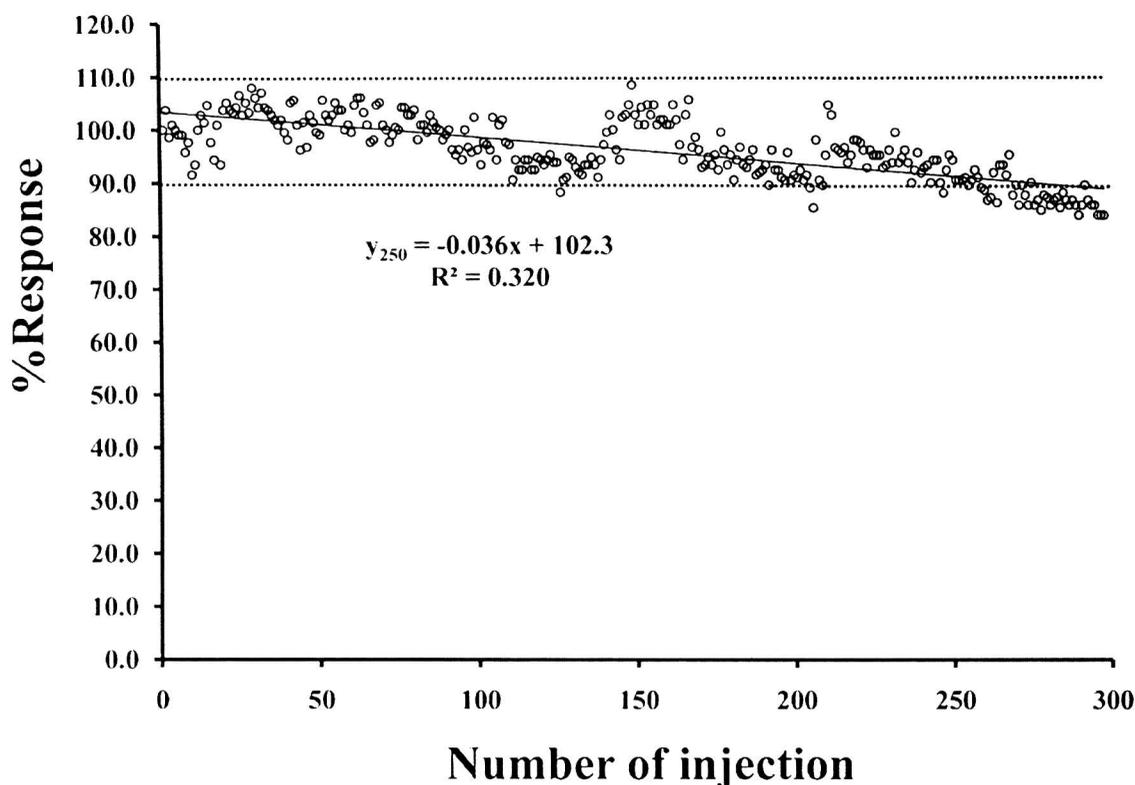
ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3 โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.5–18.0 มิลลิโมลาร์ ได้สัญญาณการตอบสนองดังรูปที่ 3 เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณการตอบสนองที่ได้ พบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น คือ 0.5–16.0 มิลลิโมลาร์ (ไม่ได้แสดงกราฟมาตรฐาน) โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y(\text{mV}) = (7.1 \pm 0.2) X(\text{mM}) - (4 \pm 2)$ มีค่าสหสัมพันธ์เชิงปริมาณ (R^2) เป็น 0.994 และมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ ($S/N \geq 3$)

5.4.1.2 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day precisions) และระหว่างวัน (inter-day precisions)

ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ ซึ่งจะพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทำซ้ำ พบว่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับวันที่ 1 2 และ 3 เป็น 3.7 1.5 และ 2.5% ตามลำดับ ส่วนค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (3 วัน) มีค่าเป็น 2.8% จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้สามารถสรุปได้ว่า แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC (AOAC International, 2000)

5.4.1.3 ความเสถียรของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์

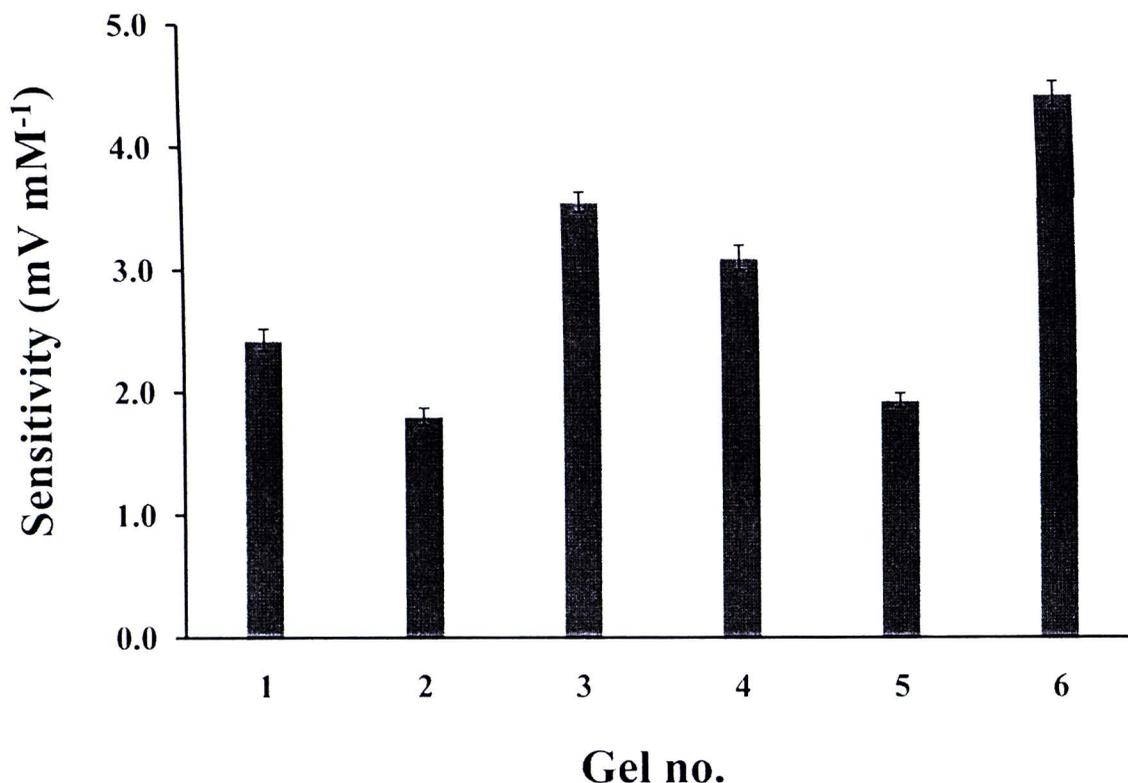
เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้ จึงศึกษาความเสถียรในการใช้งานของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่เคลือบอยู่ในท่อคาปิลลารี จากการศึกษาพบว่าแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์สามารถใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ถึง 250 ครั้ง (รูปที่ 6) โดยที่ค่าเฉลี่ยของ % สัญญาณการตอบสนองอยู่ที่ $98 \pm 5\%$ และด้วยจำนวนซ้ำของการฉีดถึง 250 ครั้ง สัญญาณการตอบสนองที่ได้ยังอยู่ในช่วง $\pm 10\%$ (t_{10}) (Taverniers *et al.*, 2004) ของสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการฉีดครั้งแรก การลดลงของสัญญาณจากการฉีดแต่ละครั้งมีค่าเพียง 0.036% เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออคอลสม์แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรในการใช้งานสูง และให้ค่าการทำซ้ำที่ดี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 5%)



รูปที่ 6 ความเสถียรในการใช้งานของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ ภายใต้สภาวะการทดลองดังนี้: สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 8.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลือบที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหล่ของเฟสเคลือบที่ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.4.1.3 ความสามารถในการทำซ้ำได้ของการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลในท่อคาปิลลารี

จากการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี 6 ท่อ โดยแต่ละท่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0–16.0 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความไววิเคราะห์ ความไววิเคราะห์ที่ได้จากท่อแต่ละอันแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ความไววิเคราะห์ที่ได้จากการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลในท่อคาปิลลารี 6 ท่อด้วยสารละลายมอนอเมอร์และสารละลายริเริ่มปฏิกิริยาที่เตรียมขึ้นครั้งเดียวกัน สภาพที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความไววิเคราะห์ที่ได้จากแต่ละท่อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากการเคลือบเจลภายในท่ออาศัยการเกาะติดทางกายภาพของเจลบนพื้นผิวภายในของท่อคาปิลลารีเท่านั้น ซึ่งหลังจากเคลือบเสร็จเรียบร้อยแล้วจะนำท่อมาต่อเข้ากับระบบโฟลอินเจกชัน แล้วให้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไหลผ่านเจลที่เคลือบไว้ในท่อ เพื่อล้างเอาสารละลายส่วนเกินออก ในขั้นตอนนี้จะมีเจลบางส่วนที่ไม่ได้ถูกยึดเกาะไว้ที่ผิวของท่อคาปิลลารีหลุดออกมาด้วย ทำให้ปริมาณเจลที่เหลืออยู่ในท่อแต่ละอันไม่เท่ากัน ส่งผลให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากแต่ละท่อมีค่าไม่เท่ากัน นั่นคือความสามารถในการทำซ้ำได้ของการเคลือบแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลใน

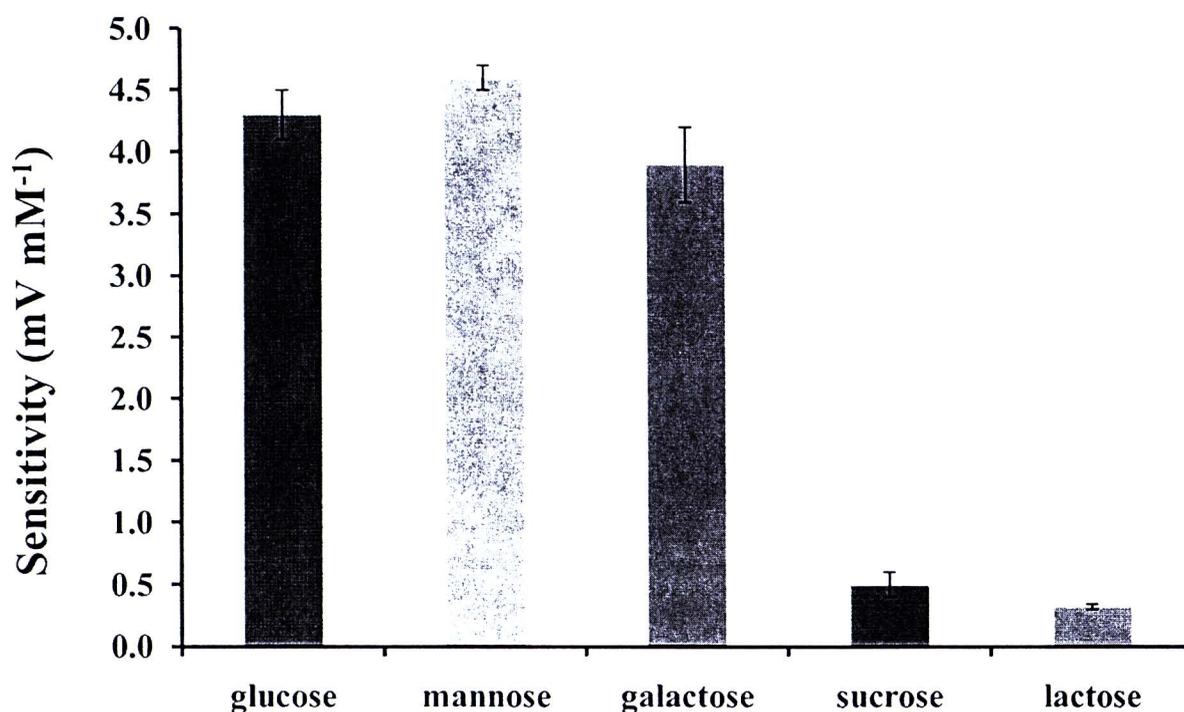
ท่อคาปิลลารีมีค่าไม่ติดนั่นเอง อย่างไรก็ตามเนื่องจากแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่เคลือบไว้ในแต่ละท่อ มีความเสถียรในงานใช้งานสูง แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องเปลี่ยน การทำกราฟมาตรฐานสามารถทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ข้อด้อยในเรื่องดังกล่าวจึงไม่เป็นอุปสรรคในการที่จะนำเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กลูโคส สำหรับงานวิจัยในอนาคตถ้ามีความต้องการเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำได้ของการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลในท่อคาปิลลารี อาจจะสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเคลือบที่อาศัยการเกิดพันธะทางเคมีเข้ามาช่วยทั้งระหว่างเจลกับพื้นผิวคาปิลลารีผ่านกระบวนการ silanisation และทำให้เกิดการเชื่อมโยงภายในพอลิเมอร์เจลเองโดยอาศัยสารเชื่อมโยง (cross-linking agent) (Kuzimenkova *et al.*, 2008)

5.4.1.3 ความจำเพาะเจาะจงต่อกลูโคสของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล

จากการวิเคราะห์น้ำตาล 5 ชนิด คือ กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส ซูโครส และแลคโตส ในช่วงความเข้มข้น 1.0–16.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงของกลูโคส ชนิดเดียวเท่านั้นที่อยู่ในช่วง 1.0–16.0 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงของแมนโนส กาแลคโตส ซูโครส และ แลคโตส อยู่ที่ 4.0–16.0 1.0–8.0 2.0–8.0 และ 4.0–16.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยความไววิเคราะห์ของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์ที่มีต่อน้ำตาลแต่ละชนิด แสดงดังรูปที่ 8

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลไม่มี

ความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส โดยความไววิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์แมนโนสและกาแลคโตส มีค่าใกล้เคียงกับค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคส ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในขณะที่ค่าดังกล่าวสำหรับซูโครสและแลคโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ต่ำกว่าค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ศึกษาถึง 9 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำตาลโมเลกุลคู่มีพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) เป็นพันธะพื้นฐานที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้มีหมู่ฮิสไดรอกซิลที่เหลือสำหรับการเกิดพันธะกับกรดฟีนิลโบโรนิกน้อย (Lee *et al.*, 2004) นอกจากนี้ น้ำตาลโมเลกุลคู่ อาจจะมีผลจากความเกะกะ (steric effect) จึงทำให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำกว่ากรณีของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยในอนาคต อาจมีเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของกรดฟีนิลโบโรนิกที่ใช้เป็นลิแกนด์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อตำแหน่งและการจัดวางตัวของหมู่ฟังก์ชันดังกล่าว อาจช่วยทำให้มีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคสมากขึ้น เช่น การใช้มอนอเมอร์ที่มีหมู่ tertiary amine ในการสังเคราะห์ polyacrylamide hydrogel ที่มีหมู่ 3-กรดอะคริลามิโดฟีนิลโบโรนิกอยู่จะช่วยให้ความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์กลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Dean *et al.*, 2006)

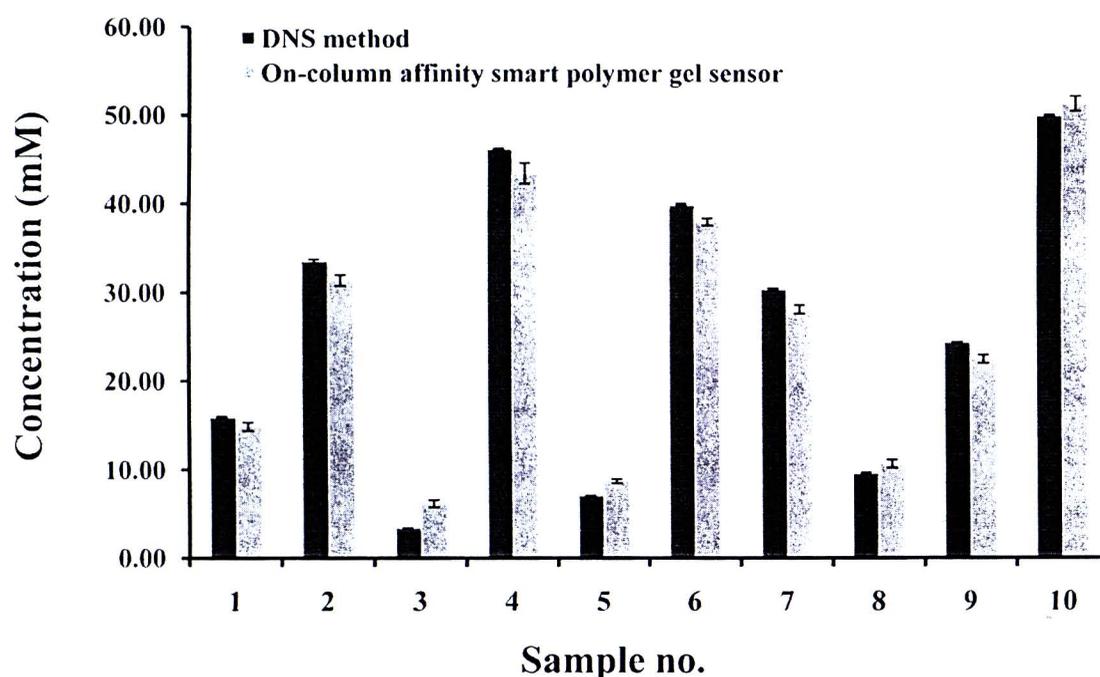


รูปที่ 8 ความไววิเคราะห์ของออนคอลลัมน์แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลหลายชนิด โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหล่ของเฟสเคลื่อนที่ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.4.1.4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธี dinitrosalicylic acid (DNS)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าเทคนิคออนคอลลัมน์แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่นิยมใช้ใน ปัจจุบัน จึงได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 10 ตัวอย่างที่เตรียมในน้ำกลั่น ทั้งนี้เนื่องจากต้องการตัดปัญหาที่เกิดผลรบกวนอื่น ๆ ที่อาจมีอยู่ในตัวอย่างออกไปก่อน ทั้ง 10 ตัวอย่างมีกลูโคสอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5.0–50.0 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นที่เลือกศึกษาอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค strip test (2.8–55.0 มิลลิโมลาร์ (Urine test AUTION™ Sticks, 2010) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทางโรงพยาบาลนิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในปัสสาวะ) ทำการศึกษาโดยแบ่งแต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยทั้งเทคนิคออนคอลลัมน์แอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่พัฒนาขึ้น และ

เทคนิค DNS โดยมีการเจือจางแต่ละตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ด้วย แพลตเตอร์ที่เหมาะสม เพื่อให้ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงของแต่ละ เทคนิค จากนั้นจึงเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) กลูโคสใน 10 ตัวอย่างที่ได้จากทั้งสองเทคนิค (รูปที่ 9) และเมื่อทดสอบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Wilcoxon Signed Rank พบว่า ทั้งสองเทคนิคให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P > 0.05$)



รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์กลูโคสในตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคออนคอลัมน์แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลและเทคนิค DNS (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทั้ง 2 เทคนิค)

5.4.1.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

เพื่อเป็นการยืนยันว่าเทคนิคออนคอลัมน์แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล กลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้ จึงได้ขอความอนุเคราะห์ ตัวอย่างปัสสาวะพร้อมทั้งผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างดังกล่าวด้วยเทคนิค strip test จาก โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

จากผลการศึกษาผลรอบกวนขององค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ได้จาก matrix matched calibration curve กับกราฟมาตรฐานที่เตรียม สารละลายมาตรฐานกลูโคสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าความเข้มข้นที่ได้



ด้วยเทคนิค two ways ANOVA โดยใช้โปรแกรม R (R Development Core Team, 2006) พบว่าค่าความชันของกราฟมาตรฐานทั้งสองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างมีผลรบกวนการวิเคราะห์กลูโคสด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะจึงจำเป็นต้องใช้ matrix matched calibration curve เพื่อผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

จากนั้นนำค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ 1 คือ 1.8 ± 0.2 มิลลิโมลาร์ ตัวอย่างที่ 2 คือ 2.5 ± 0.4 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างที่ 3 คือ 2.8 ± 0.1 มิลลิโมลาร์ แสดงดังตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในปัสสาวะด้วยเทคนิค strip test ที่ได้จากโรงพยาบาลทั้ง 3 ตัวอย่าง ระบุไว้ว่าเป็น “trace level” (ดูข้อมูลในตารางที่ 4) ซึ่งหมายความว่าความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 3 ตัวอย่างนั้นมีค่าน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ น้อยกว่า 2.8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นขีดจำกัดการตรวจวัดของเทคนิค strip test (Urine test AUTION™ Sticks, 2010) นั่นคือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรายงานได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค strip test เป็น 2.8 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนั้นอยู่ที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะเห็นได้ว่ามีค่าต่ำกว่าเทคนิค strip test ถึง 5.6 เท่า จากการค้นข้อมูลพบว่า ความเข้มข้นปกติของกลูโคสในปัสสาวะอยู่ในช่วง 0.0–0.8 มิลลิโมลาร์ หรือไม่ควรตรวจพบเลย และถ้าปริมาณกลูโคสในเลือดมีค่าเกินว่าความสามารถที่ไตจะรับได้คือ อยู่ในช่วง 10–12 มิลลิโมลาร์ กลูโคสจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ ทำให้เราสามารถตรวจพบปริมาณกลูโคสในปัสสาวะ ซึ่งสามารถใช้ในการบ่งชี้ภาวะ renal glycosuria หรือ ภาวะเบาหวานได้ (Position Statement–Urine Glucose Monitoring, 2010) ดังนั้นถ้าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในปัสสาวะสามารถระบุค่าในเชิงปริมาณได้ ก็จะมีประโยชน์มากต่อการวินิจฉัยโรค และจากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า ออนคอล์มน์แอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอ์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถระบุความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 3 ตัวอย่างเป็นค่าเชิงปริมาณคือเป็นตัวเลขได้เลย ในขณะที่ข้อมูลที่ได้จาก strip test ระบุได้แค่เพียง “trace level” เท่านั้น

จากนั้นจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) ตามวิธีมาตรฐานที่ได้แนะนำไว้โดย EURACHEM (Guide EURACHEM, 1998) ดังแสดงในสมการที่ 1 จากการคำนวณพบว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง $88 \pm 2\%$ ถึง $103 \pm 4\%$

$$\% \text{ Recovery} = \left[\frac{A-B}{C} \right] \times 100 \quad (1)$$

โดย A คือ ความเข้มข้นที่ได้จากตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

B คือ ความเข้มข้นที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เติมลงไปในตัวอย่าง

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมของออนคอลลัมน์แอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ควบคู่กับระบบโฟลอินเจคชัน

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิโมลาร์)		เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเมื่อเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น ^a (มิลลิโมลาร์)		
	ออนคอลลัมน์แอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ ^b	Strip test	2.0	4.0	8.0
1	1.8±0.2	trace level ^b	103±4	99±1	100±6
2	2.5±0.4	trace level ^b	98±9	95±10	88±2
3	2.8±0.1	trace level ^b	91±5	96±2	99±6

^a ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง

^b ความเข้มข้นของกลูโคสน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 2.8 มิลลิโมลาร์

5.2 ผลการศึกษาและพัฒนาแอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส

ผลการทดลองตามแผนดำเนินงานวิจัยเดิม

5.2.1 ความยาวของแอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลลัมน์ที่เหมาะสม

จากการใช้ความยาวของท่อคาปิลลารีที่ 15 เซนติเมตร พบว่าสามารถสังเคราะห์แอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์ให้เกิดขึ้นตลอดทั้งความยาวของท่อได้ และมีอนุภาคคอลลัมน์ดังกล่าวมาต่อเข้ากับระบบของ μ -HPLC เฟสเคลื่อนที่สามารถไหลผ่านคอลลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้ แต่พบปัญหาหลายอย่างคือ

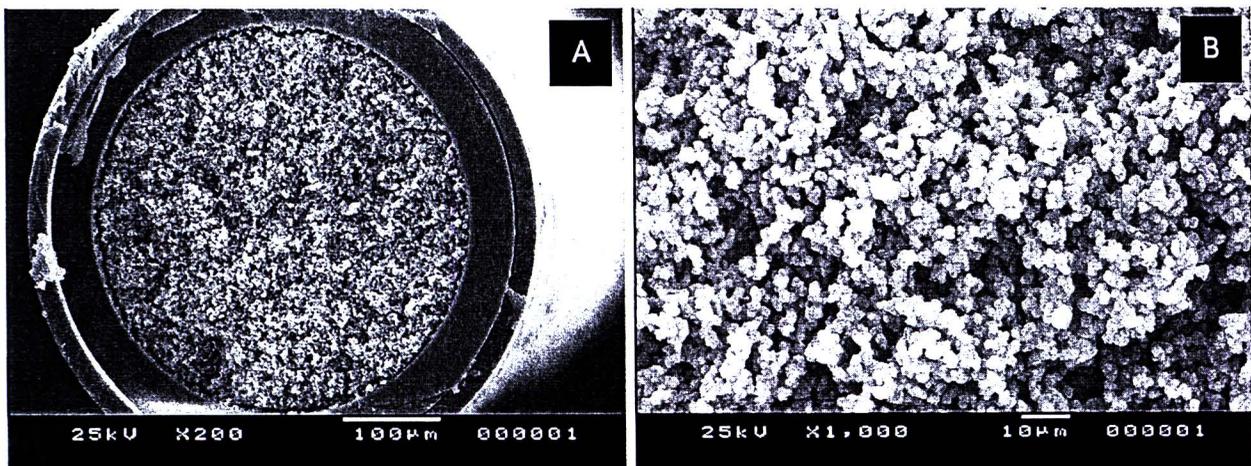
- เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสผ่านแอฟฟิไนตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลลัมน์แล้ว มีเจลบางส่วนหลุดออกจากท่อคาปิลลารีในขณะที่สารละลายไหลผ่าน
- ในส่วนของระบบการตรวจวัดก็ใช้เจลชนิดเดียวกัน ซึ่งอัตราการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดฟีนิลโบโรนิกกับกลูโคสค่อนข้างช้า และจากการทดลองในส่วนแรกพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 6 นาที ยิ่งเมื่อสารละลายต้องมีการไหลผ่านคอลลัมน์จะทำให้ใช้เวลาในการเคลื่อนที่นานขึ้น

สัญญาณการตอบสนองที่ได้มีลักษณะเป็นพีคกว้าง จึงมีความเป็นไปได้น้อยมากที่จะแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกัน ซึ่งเมื่อทำการทดสอบโดยการนิตสารลายมาตรฐานผสมระหว่างกลูโคสและซูโครสพบว่าไม่สามารถระบุได้ว่ามีน้ำตาลชนิดใดผสมกันอยู่ เพราะได้สัญญาณที่เป็นพีคกว้างเพียงพีคเดียว ดังนั้นในส่วนของผลการทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยเดิมจึงสามารถรายงานผลได้เพียงหัวข้อเดียว และมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนแผนการดำเนินงานวิจัยโดยมีผลการทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่ดังนี้

ผลการทดลองตามแผนดำเนินงานวิจัยใหม่

5.2.2 การสังเคราะห์มอนอลิธคอลัมน์

จากการสังเคราะห์มอนอลิธคอลัมน์ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2.7.2 พบว่าได้มอนอลิธคอลัมน์ตามที่ต้องการ แต่ต้องยืนยันผลโดยการดูลักษณะของมอนอลิธพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นภายในท่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) อีกครั้งหนึ่ง และเมื่อนำมาทดสอบการไหลผ่านของสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 พบว่าการไหลผ่านที่ดี จากนั้นจึงได้ตัดท่อคาปิลลารีที่มีมอนอลิธคอลัมน์อยู่ภายในออกมาบางส่วนเพื่อนำไปดูลักษณะภายในท่อ ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 10) ยืนยันได้ว่าด้วยสัดส่วนของสารตั้งต้นและสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้ เราสามารถสังเคราะห์มอนอลิธพอลิเมอร์ในท่อคาปิลลารีได้ โดยมอนอลิธที่สังเคราะห์ขึ้นเกิดขึ้นเต็มภายในท่อคาปิลลารี และมีรูพรุนที่ช่วยให้มีการไหลผ่านของสารละลายที่ดี

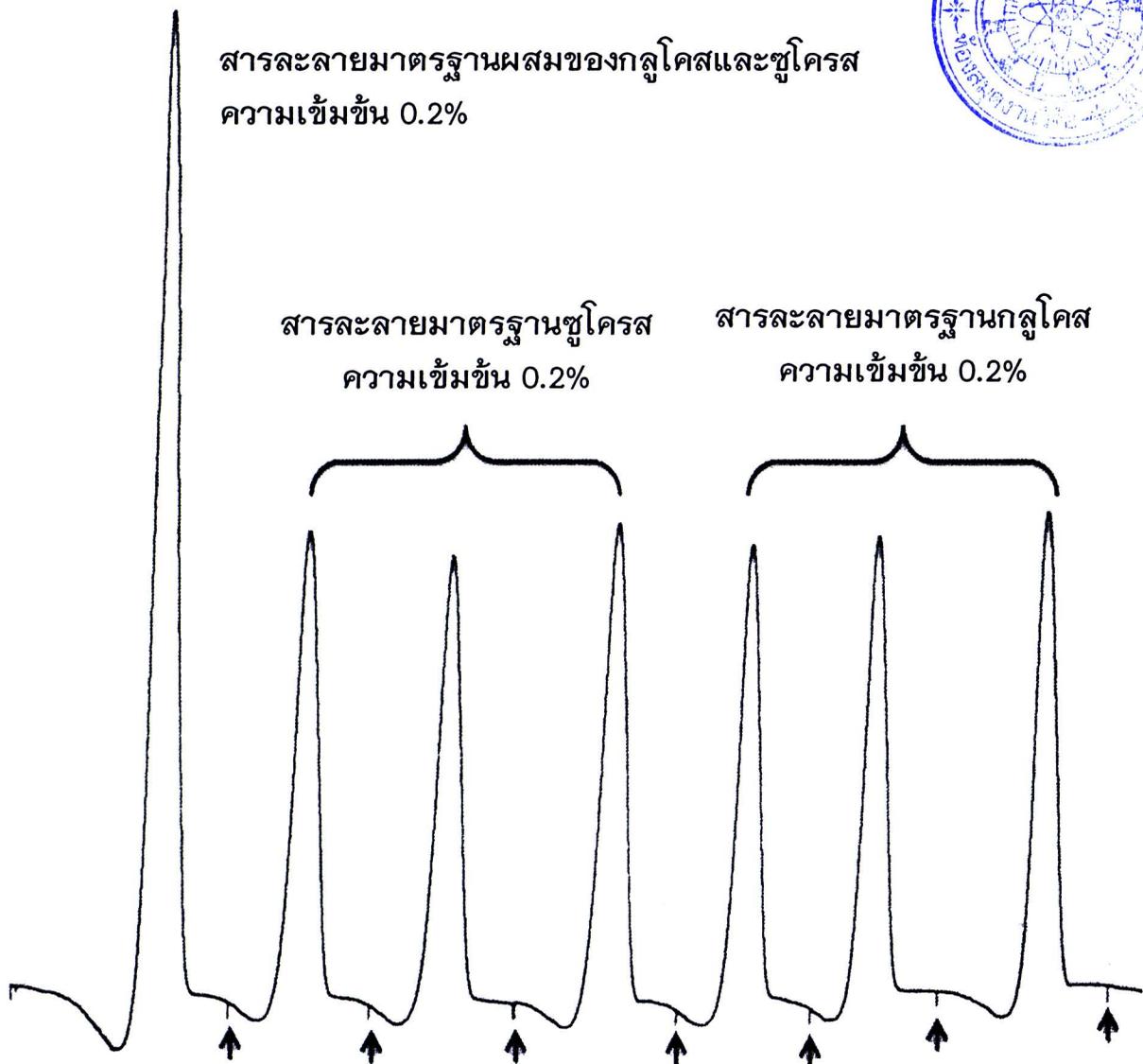


รูปที่ 10 ภาพหน้าตัดของท่อคาปิลลารีที่มีมอนอลิธพอลิเมอร์ภายในท่อจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า (A) และ 1000 เท่า (B)

5.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลของมอนอลิธคอลัมน์

นำมอนอลิธคอลัมน์ที่ได้ไปต่อเข้ากับเครื่อง HPLC ที่มีตัวตรวจวัดค่าดัชนีหักเห เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นก่อนที่จะนำคอลัมน์ไปต่อเข้ากับระบบตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี โดยใช้สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (อ้างอิงจากผลการทดลองในงานวิจัยส่วนแรก) และอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ในเบื้องต้นเป็น 0.03 มิลลิลิตรต่อนาที และเนื่องจากตัวตรวจวัดชนิดนี้ มีความไวในการวิเคราะห์ที่ไม่สูงนัก จึงจำเป็นต้องทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเบื้องต้นโดยใช้ สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง หลังจากฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.2% (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าสามารถตรวจวัดพีคหรือโครมาโทแกรมของกลูโคสได้ที่เวลา ประมาณ 2.5 นาที (ฉีดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง) ความสูงของพีคและค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จากการทำซ้ำทั้ง 3 ครั้ง มีค่าใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นทำการฉีดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าทั้งความสูงของพีคและค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซูโครสมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ กลูโคสมาก จากการทดสอบเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สามารถแยกน้ำตาลแต่ละ ชนิดออกจากกันได้ ต่อจากนั้นจึงลดอัตราการไหลเหลือ 0.01 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการทดลองฉีด สารละลายมาตรฐานของกลูโคสและซูโครสที่ละตัว ก็พบว่าค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้ยังมีค่าใกล้เคียงกันมาก ซึ่ง ถ้าวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมก็จะไม่สามารถแยกน้ำตาลทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ดังนั้นจึงทำการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่าง ๆ ที่ละปัจจัยดังนี้

- ปรับเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ โดยมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ คือ อะซิโตนไนโตรล์เพิ่มลงไปในเฟสเคลื่อนที่เดิม เพื่อลดสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ โดยศึกษาที่ 70:30 60:40 และ 50:50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
- เพิ่มความยาวของคอลัมน์จาก 20 เซนติเมตรเป็น 30 เซนติเมตร เพื่อเพิ่ม ปริมาณหมู่กรดฟีนิลโบโรโรนิกและเพิ่มเวลาในการหน่วงสารให้อยู่ในคอลัมน์นานขึ้น



รูปที่ 11 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้มอนอลิโทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นคอลัมน์ในการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดค่าดัชนีหักเห ภายใต้สภาวะการทดลองดังนี้: ความยาวคอลัมน์ 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 50:50 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรของอะซิโตไนโตรล: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 ที่อัตราไหล 0.01 มิลลิลิตรต่อนาที ลูกศรชี้ขึ้นหมายถึงตำแหน่งของการฉีดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและซูโครส

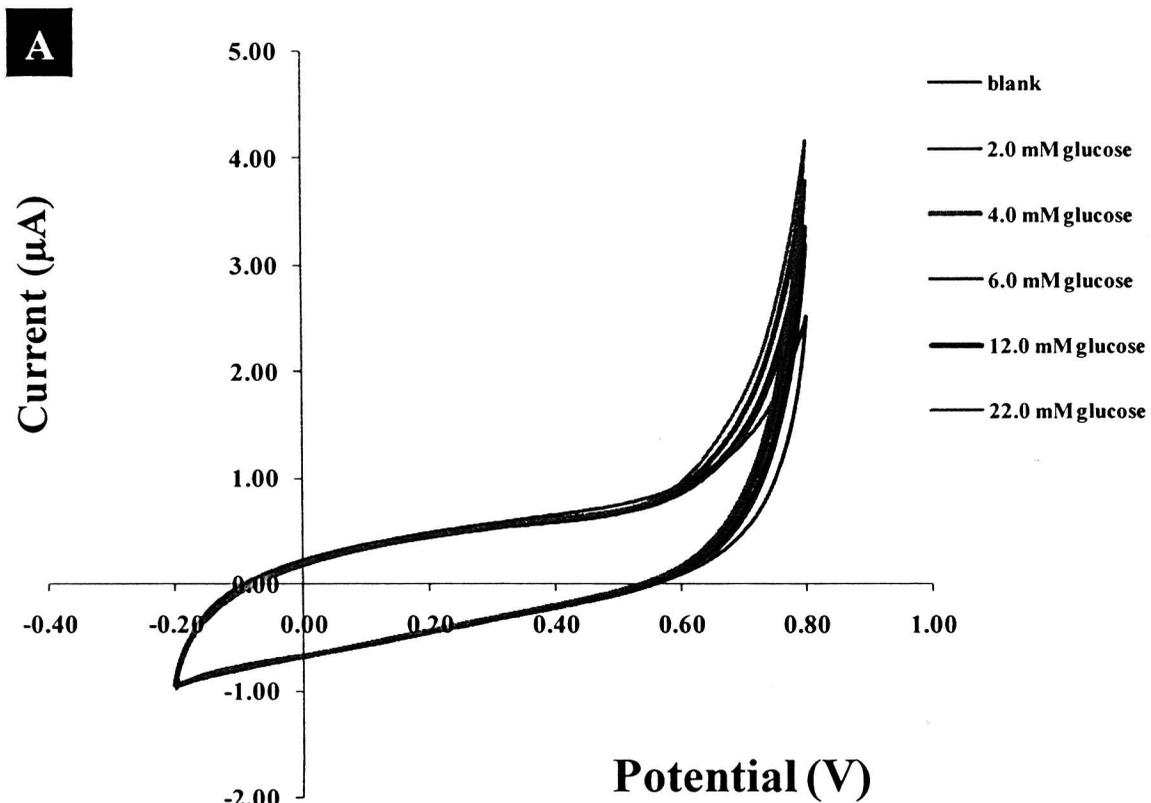
จากการปรับเปลี่ยนปัจจัยที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ก็ยังไม่สามารถแยกน้ำตาลที่เลือกมาทดสอบเพียงสองชนิดนี้ออกจากกันได้ โดยที่คาร์เทินชั้นใหม่ของกลูโคสและซูโครสยังมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อทดลองฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของน้ำตาล 2 ชนิด สิ่งที่เปลี่ยนแปลงไปมีเพียงความสูงของ

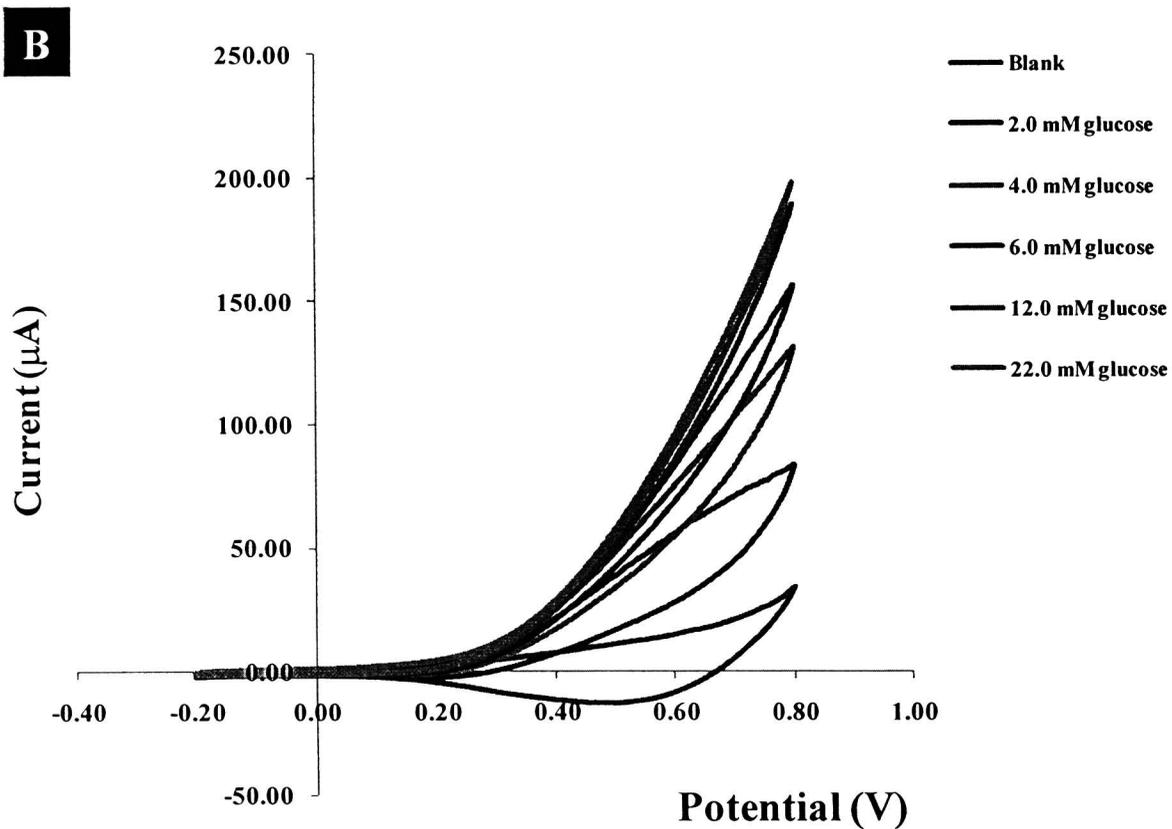
พีคที่เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า โดยที่โครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมมีเพียงพีคเดียว ดังแสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นจึงสรุปว่ามอนอลิโทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่สามารถนำมาใช้ในการแยกน้ำตาลเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์กลูโคสได้

5.2.4 การตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี

5.2.4.1 ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

จากการสแกนช่วงศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ -0.2 โวลต์ถึง 0.8 โวลต์ (50 มิลลิโวลต์ต่อนาที) ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี เพื่อศึกษาช่วงศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสใน 0.05 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 12





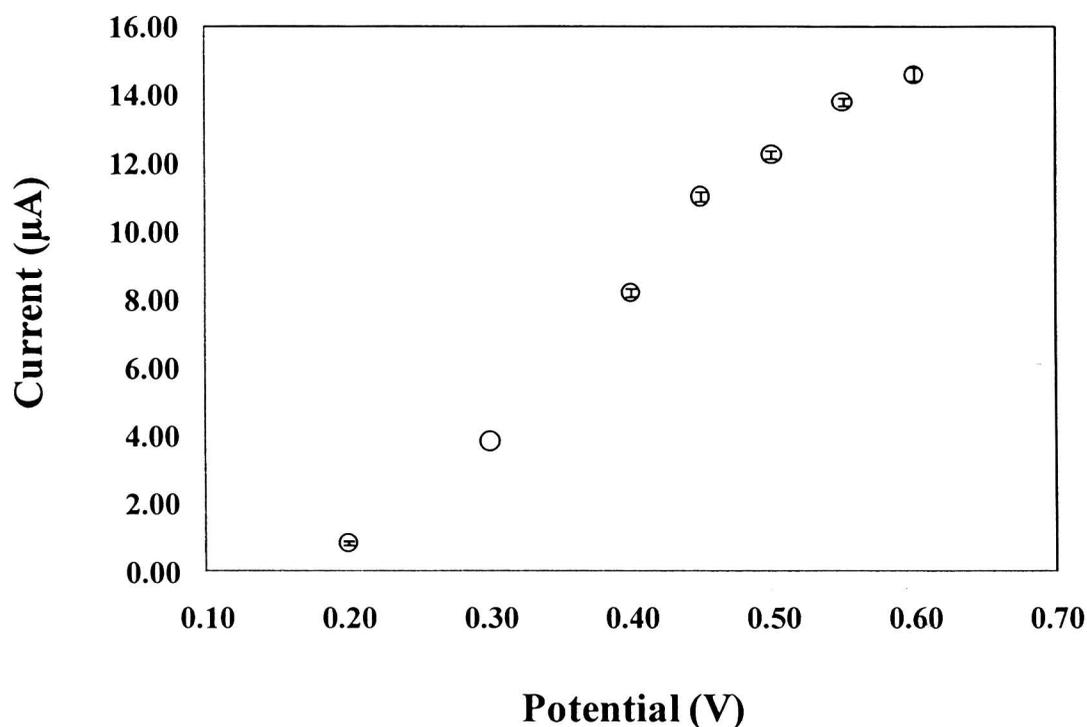
รูปที่ 12 โครโนแอมเพอโรแกรมที่ได้จากการสแกนศักย์ไฟฟ้าช่วง -0.2 โวลต์ถึง 0.8 โวลต์ โดยมีแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการปรับปรุงผิวหน้า (รูปที่ 12A) และแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง (รูปที่ 12B) เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์

จากโครโนแอมเพอโรแกรมที่ได้ พบว่าในกรณีที่ใช้แกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการปรับปรุงผิวหน้า กลูโคสจะเริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.6 โวลต์ (รูปที่ 12A) ในขณะที่ถ้าใช้แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง ศักย์ไฟฟ้าที่เริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสจะลดลง โดยจะเริ่มเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.25 โวลต์ (รูปที่ 12B) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองแดงช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ทำให้กลูโคสสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำลง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากอิเล็กโทรดทั้งสองแบบจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคส (2.0 – 22.0 มิลลิโมลาร์) แต่แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงจะให้ค่า

กระแสไฟฟ้าที่สูงกว่า ดังนั้นการศึกษาในลำดับต่อไปจะใช้เพียงแกสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเท่านั้น

5.2.4.2 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

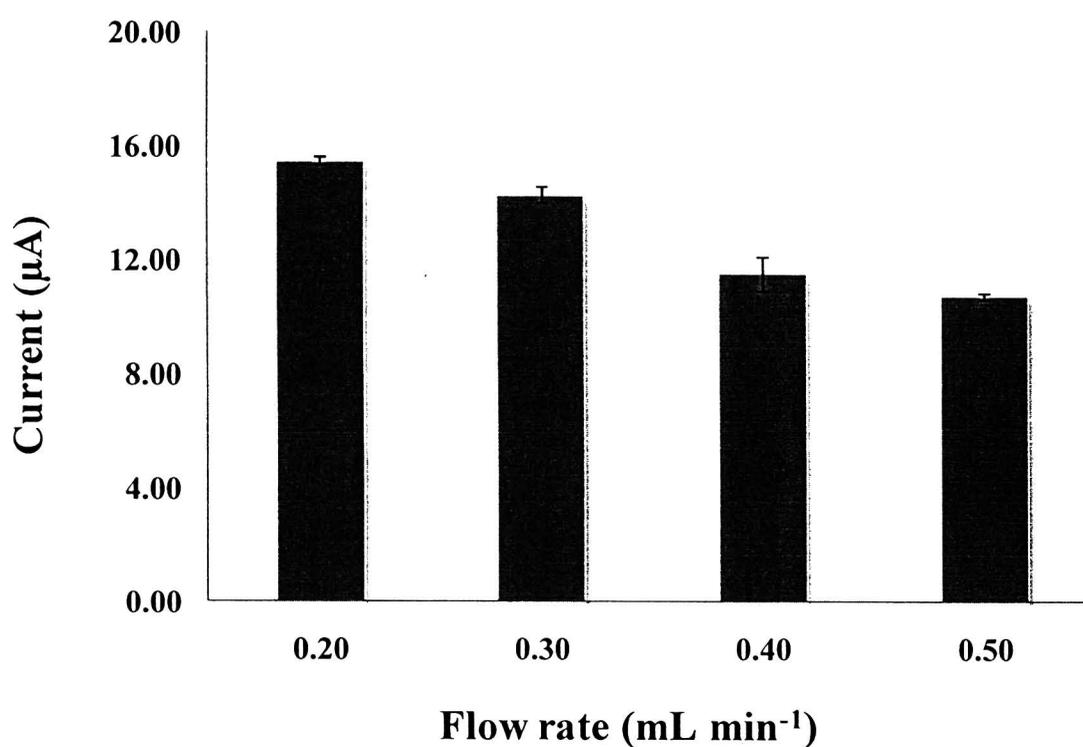
จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากข้อ 5.2.4.1 จึงเลือกศักย์ไฟฟ้าช่วง 0.2-0.6 โวลต์ในการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบโพลีอินเจคชันด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าเมื่อศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ค่าสัญญาณการตอบสนอง (ความสูงของพีค) เพิ่มขึ้น แต่ถ้าใช้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปก็จะทำให้ตัวรบกวนอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ขั้วไฟฟ้าได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลการรบกวนและยังคงค่าสัญญาณการตอบสนองที่สูง จึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ 0.45 โวลต์ ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 13 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่แกสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้: แกสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

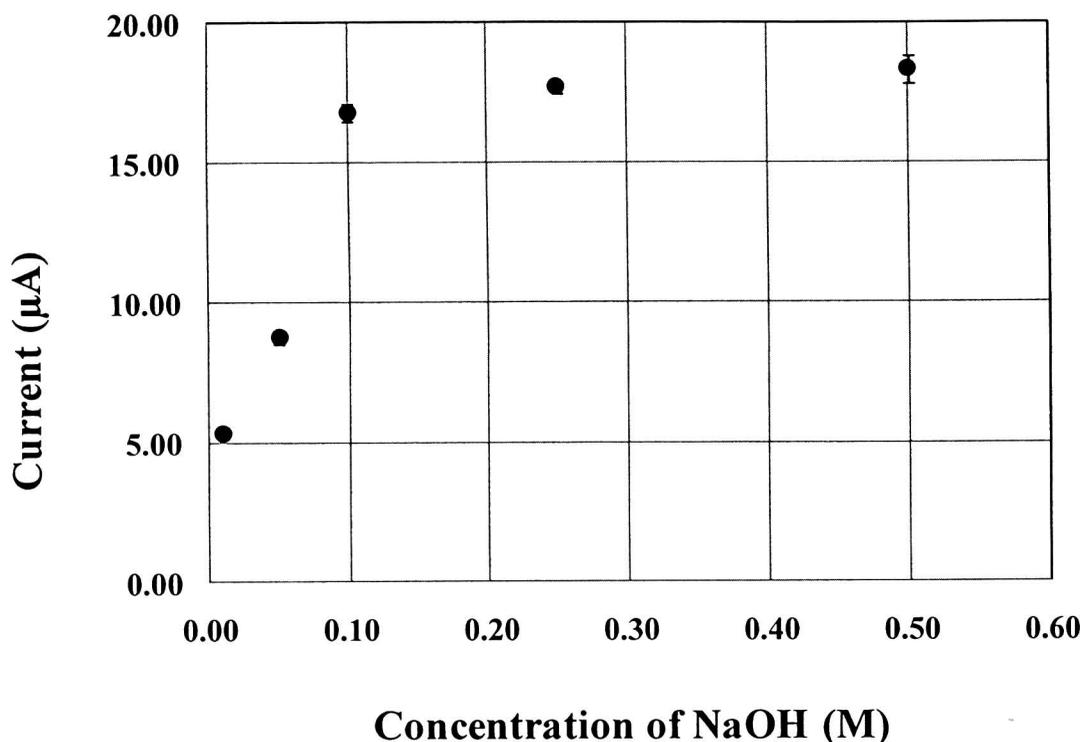
5.2.4.3 อัตราไหลและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

จากการศึกษาอัตราไหลของสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ที่ 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที และความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ที่ 0.01 0.05 0.10 0.25 และ 0.50 โมลาร์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่อัตราไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ค่าสัญญาณการตอบสนองสูงที่สุด และสัญญาณการตอบสนองที่ได้จะลดลงเมื่ออัตราไหลเพิ่มขึ้น (รูปที่ 14) ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคสมีเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าอิเล็กโทรดได้นานกว่า แต่เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็นานด้วย ดังนั้นเพื่อให้ได้ค่าสัญญาณการตอบสนองสูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ไม่นานนัก จึงเลือกใช้อัตราไหลที่ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นอัตราไหลที่เหมาะสม



รูปที่ 14 ผลของอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีต่อสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคส 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีสภาวะการทดลองดังนี้: แกสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

จากนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อัตราไหลดังกล่าวพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น สัญญาณการตอบสนองก็สูงขึ้นตามไปด้วย และจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ (รูปที่ 15) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาต่อไป

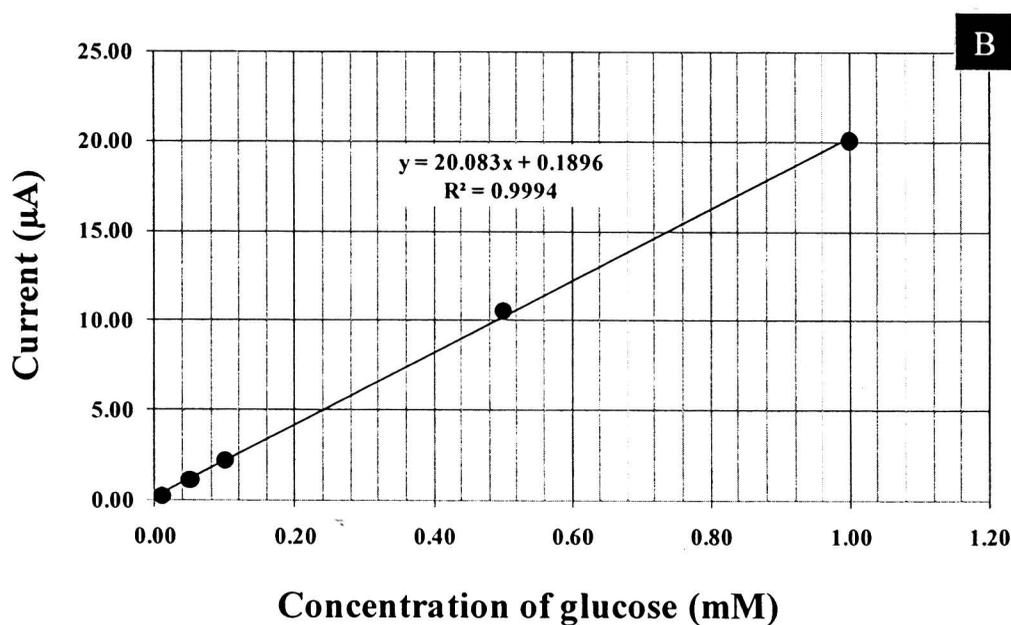
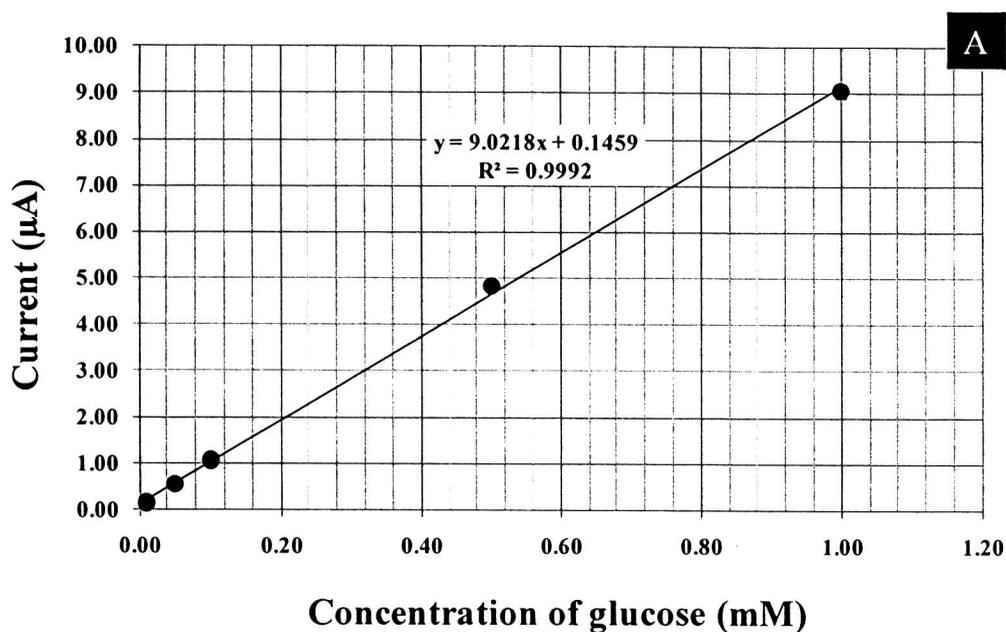


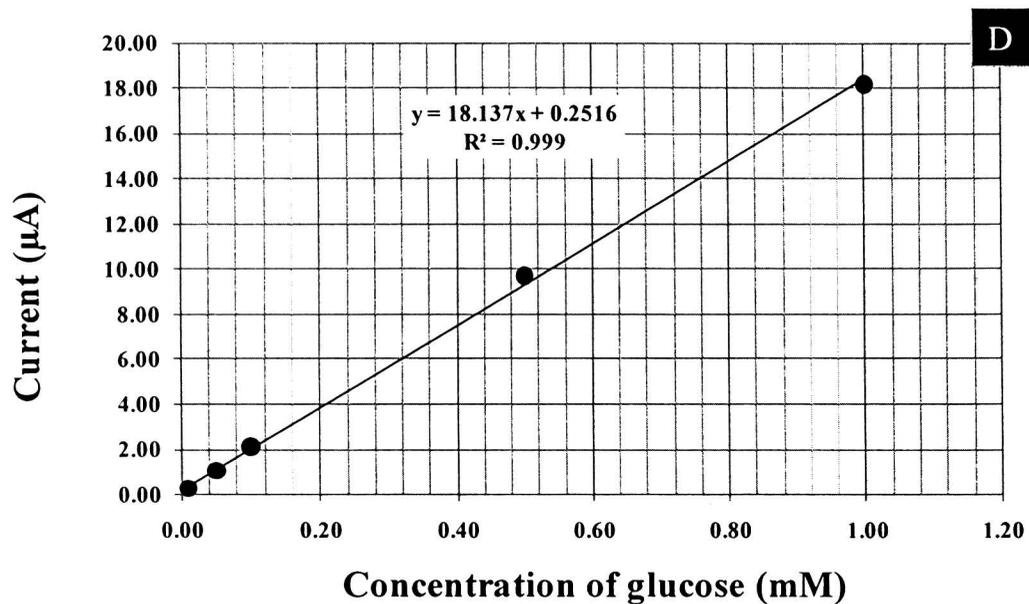
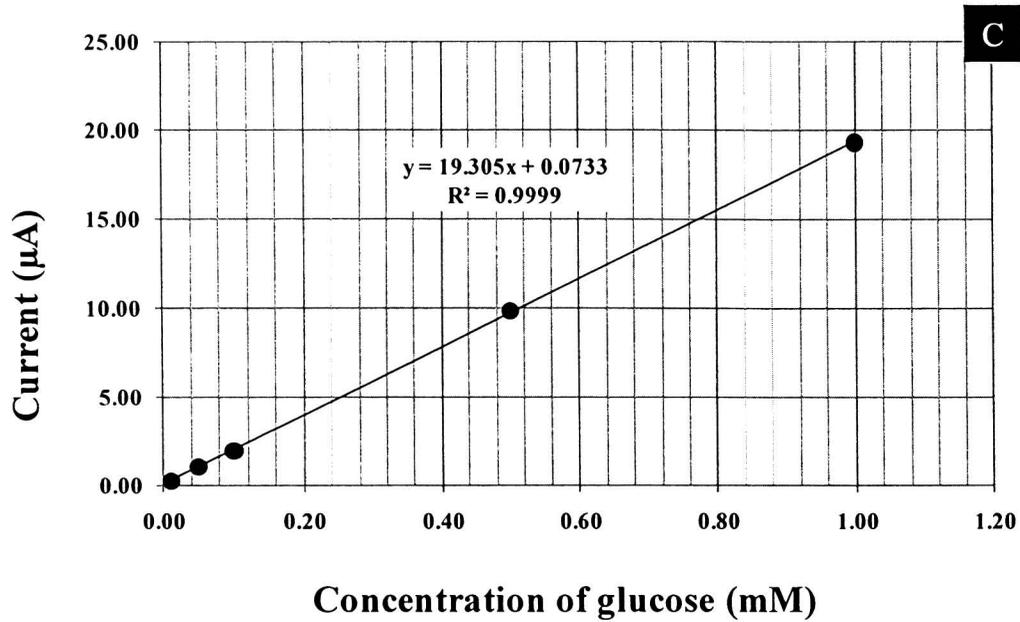
รูปที่ 15 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในระบบโพลินเจคชันแอมเพอโรเมทรี โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์ โดยมีอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที

5.2.4.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอนุภาคทองแดง

เพื่อให้ระบบตรวจวัดมีค่าความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุด จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของอนุภาคทองแดงที่ใช้ในการปรับปรุงผิวหน้าอิเล็กโทรด ผลการศึกษาพบว่าความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอนุภาคทองแดงเพิ่มขึ้นจาก 1% (รูปที่ 16A) เป็น 2.5% (รูปที่ 16B) และหลังจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองแดง เป็น 5% (รูปที่ 16C) และ 10% (รูปที่ 16D)

ค่าความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดเริ่มคงที่ และจากการสังเกตในขณะที่เตรียมอิเล็กโทรดพบว่าอนุภาคทองแดงครอบคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 2.5% จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้หลังจากความเข้มข้นดังกล่าวแล้วค่าความไววิเคราะห์เริ่มคงที่ ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของอนุภาคทองแดงคือ 2.5% ในสารละลาย 0.5% Nafion ในเอทานอล



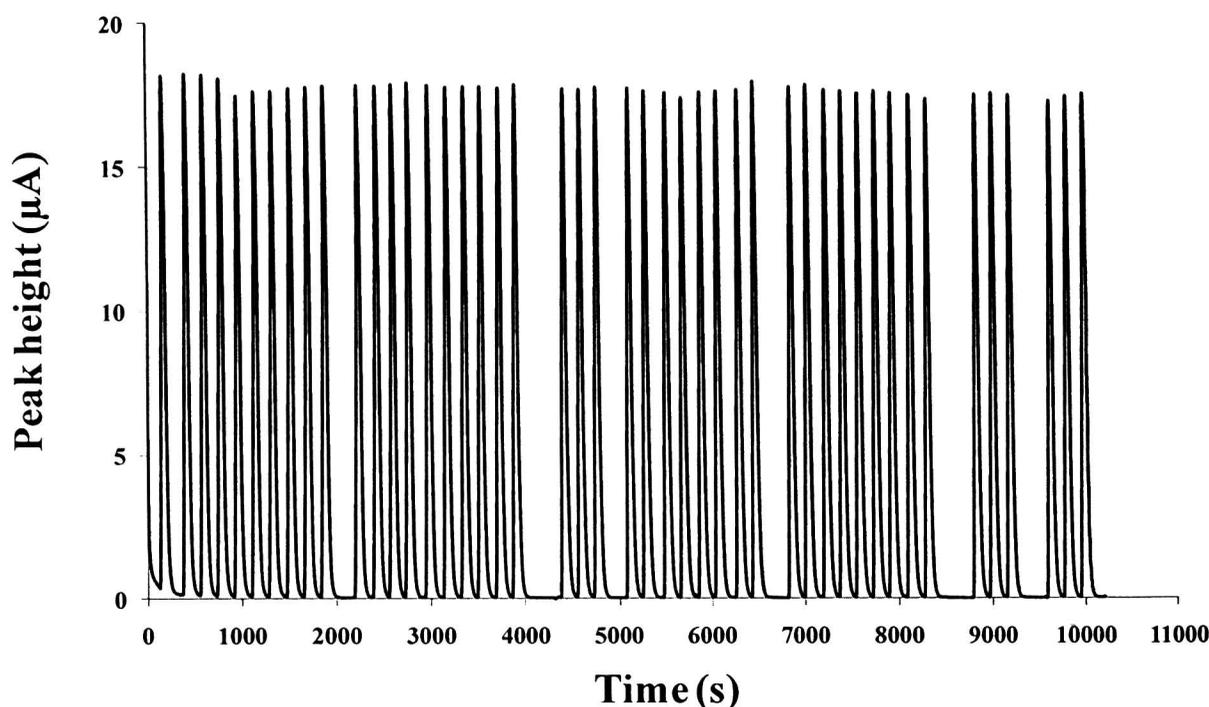


รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคสด้วยแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงที่ความเข้มข้น 1% (A) 2.5% (B) 5.0% (C) และ 10% (D) โดยมีสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

5.2.4.5 ความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้าที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วย

อนุภาคทองแดง

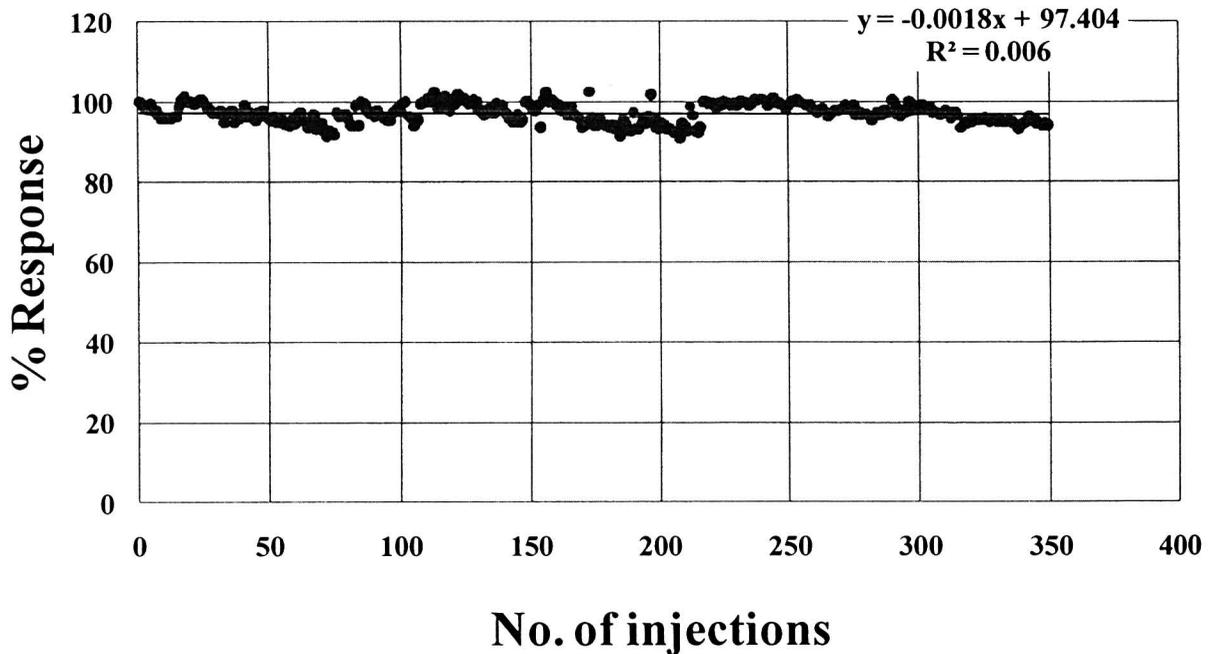
จากการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสอย่างต่อเนื่อง โดยฉีดสลับกันระหว่างสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ตัวอย่างของค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ แสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ตัวอย่างค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์อย่างต่อเนื่องในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพโรเมทรี โดยมีสถานะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

เมื่อนำความสูงของสัญญาณที่ได้มาคิดเป็น %ค่าการตอบสนองโดยให้การฉีดครั้งแรกที่แต่ละความเข้มข้นเป็น 100% ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 18 พบว่าหลังจากวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยระบบโพลีอินเจคชันแอมเพโรเมทรีที่มีแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน สลับกันถึง 350 ครั้ง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัมพัทธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าเพียง 2.5% โดยมีค่าเฉลี่ยของ %สัญญาณการตอบสนองอยู่ที่ $98 \pm 2\%$ แสดงให้เห็นว่าแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงมีความเสถียรในการทำงานในสถานะที่ศึกษาสูงมาก โดยสามารถใช้การวิเคราะห์หกลูโคสซ้ำได้อย่างน้อย 350 ครั้ง และค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลงเพียง 0.0018% ต่อการฉีดแต่ละครั้ง

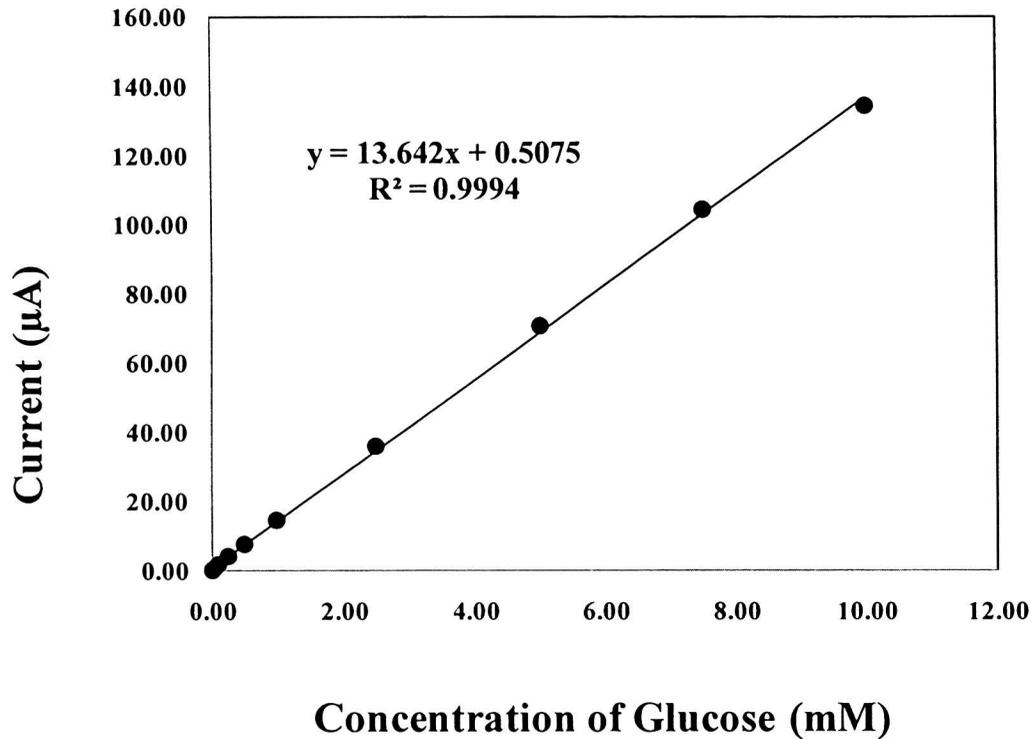


รูปที่ 18 ความเสถียรในการทำงานของแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงในการวิเคราะห์หกลูโคสความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์อย่างต่อเนื่องในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี โดยมีสถานะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.1 โมลาร์ไซเตียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

5.2.4.6 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด

หลังจากได้สถานะที่เหมาะสมของการทดลองในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรีแล้ว จึงใช้สถานะดังกล่าวในการศึกษาช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0010 – 30.00 มิลลิโมลาร์ โดยทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากผลการทดลองพบว่าระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรีที่มีแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ให้ช่วงการตอบสนองที่เป็น

เส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.0010–10.00 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 19) โดยให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 0.005 มิลลิโมลาร์ ($S/N \geq 3$)



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี โดยมีสถานะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียม ไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

5.2.4.7 มอนอลิทคอลัมน์ควบคู่กับระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

ในส่วนนี้จะไม่มีผลการทดลอง เนื่องจากผลการทดสอบมอนอลิทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่สามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันได้ จึงไม่ได้ทำการทดลองในส่วนที่นำมอนอลิทคอลัมน์มาต่อควบคู่กับระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี