

**บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)**

ชื่อโครงการวิจัย **การพัฒนา glukose biosensor โดยใช้ไฟโบรอินจากไหมไทย**

Development of glucose biosensor based on Thai silk fibroin

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงิน 214,200 บาท

ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

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

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเคมีคัลเซนเซอร์และไบโอเซนเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความเสถียรสูงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ glukose โดยในการศึกษาและพัฒนาได้แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติของไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นได้โดยการวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี และเทคนิคทรานสมิทเทนซ์อิเล็กตรอนไมโครสโคปี ส่วนที่สองจะพัฒนา glukose เคมีคัลเซนเซอร์ โดยใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุขนาดนาโนลูกผสมของคาร์บอนนาโนทิวป์-อนุภาคแมกนีไทต์-นิกเกิลขนาดนาโน ($GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs$) ส่วนที่ 3 ศึกษาและพัฒนา glukose biosensor ที่อาศัยการตรึงเอนไซม์ glukose ออกซิเดสลงในวัสดุเชิงประกอบขนาดนาโนของ $Fe_3O_4-CNTs-SF-AuNPs$ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) จะได้ glukose biosensor ชนิด $GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs/GOx/SF-AuNPs-CS$ ส่วนที่ 4 จะเป็นการพัฒนา glukose biosensor โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเฟลสโดยใช้นาโนคอมโพสิตของ $CNTs-PDDA-PtNPs-GOx$ มาสร้างเป็น glukose biosensor คาร์บอนเฟลสชนิด $CNTs-PDDA-PtNPs-GOx-CPE$

บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อพัฒนาวัสดุโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมให้มีความถูกต้อง แม่นยำและมีสภาพไวสูงได้รับความสนใจและมีผู้ทำวิจัยเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากปริมาณโกลด์นาโนไอออนในปัสสาวะและเลือดสามารถบ่งชี้ถึงสถานะของโรคเบาหวาน และสามารถใช้เป็นดัชนีในการชี้บอกคุณภาพของอาหาร งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวัสดุโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความเสถียรสูง และมีการตอบสนองที่ดีขึ้น ในการศึกษาและพัฒนาได้แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติของไฟโบรอินที่เตรียมขึ้นได้โดยการวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี และเทคนิคทรานสมิทเทนซีอิเล็กตรอนไมโครสโคปี

ส่วนที่สองจะพัฒนาวัสดุโกลด์นาโนไอออนเซอเรียม โดยใช้ขั้วไฟฟ้าโกลด์นาโนที่ดัดแปรด้วยวัสดุขนาดนาโนลูกผสมของคาร์บอนนาโนทิวป์-อนุภาคแมกนีไทต์-นิกเกิลขนาดนาโน ($GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs$) วัสดุโกลด์นาโนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ +0.6 โวลต์ เมื่อใช้สารละลายไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์กึ่งหนืด ผลจากการตรวจวัดปริมาณโกลด์นาโนแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยเทคนิคโครโนแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าโกลด์นาโนเซอเรียมชนิด $GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs$ ที่ศักย์ไฟฟ้า +0.55 โวลต์ พบว่าค่ากระแสของโกลด์นาโนจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมสารละลายมาตรฐานโกลด์นาโนโดยมีช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 1.8 มิลลิโมลาร์ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 333.25 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.998 ชัดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 6.7 ไมโครโมลาร์ (3S/N) ค่ากระแสที่ได้จากการวัดมีความเที่ยง (precision) ดีมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 2.7 (วัดจากสัญญาณของโกลด์นาโนความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, $n = 5$) เคมิแคลเซอเรียมชนิด $GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs$ ที่พัฒนาขึ้นมีสภาพไวสูงในการวิเคราะห์ปริมาณโกลด์นาโน และให้สัญญาณที่มีความเสถียรสูง

ส่วนที่ 3 ศึกษาและพัฒนาวัสดุโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมที่อาศัยการตรึงเอนไซม์โกลด์นาโนออกซิเดสลงในวัสดุเชิงประกอบขนาดนาโนของ $Fe_3O_4-CNTs-SF-AuNPs$ โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดโกลด์นาโนคาร์บอน (GC) จะได้โกลด์นาโนไอออนเซอเรียมชนิด $GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs/GOx/SF-AuNPs-CS$ ผลการทดลองวัดสัญญาณของโกลด์นาโนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7.0) พบว่าเมื่อใช้อัตราเร็วในการสแกนที่สูงขึ้นจะได้ค่ากระแสที่สูงขึ้น เมื่อนำค่ากระแสที่ได้มาพล็อตกับค่าสแควร์รูทของอัตราเร็วในการสแกน ค่ากระแสเอนโดติกและกระแสคาโทดิกแปรผันตรงกับค่าสแควร์รูทของอัตราเร็วในการสแกน ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.994 และ 0.999 ตามลำดับ แสดงว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นถูกควบคุมด้วยกระบวนการแพร่และไม่เกิดการดูดซับของผิวของขั้วโกลด์นาโนไอออนเซอเรียม $GC/Fe_3O_4-CNTs-NiNPs/GOx/SF-AuNPs-CS$ เมื่อนำโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมที่เตรียมได้มาวัดสัญญาณของโกลด์นาโน พบว่าค่ากระแสที่วัดได้มีค่าลดลงเมื่อมีปริมาณโกลด์นาโนในสารละลายเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของขั้วไฟฟ้างดงามไม่เหมาะสม หรือมีการหลุดของอนุภาคนาโนที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หรือมีการหลุดของเอนไซม์ GOx ทำให้ค่ากระแสที่วัดได้มีค่าลดลง

ส่วนที่ 4 จะเป็นการพัฒนาขั้วไฟฟ้าโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมโดยการตรึงเอนไซม์โกลด์นาโนออกซิเดสลงในคาร์บอนเพดสโกลด์นาโนที่โมดิฟายด์ด้วยนาโนคอมโพสิตของ $CNTs-PDDA-PtNPs-GOx$ ผลการทดลองจากไซคลิกโวลแทมเมทรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7) พบว่าขั้วโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมที่พัฒนาขึ้นให้สัญญาณของโกลด์นาโนที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ +0.37 โวลต์ แสดงถึงการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดีของ $CNTs-PDDA-PtNPs$ ที่เป็นองค์ประกอบในโกลด์นาโนไอออนเซอเรียม เมื่อนำเทคนิคโพลินิเจอร์ชันอะนาไลซิสมาใช้ร่วมกับการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วโกลด์นาโนไอออนเซอเรียมที่พัฒนาขึ้น ($CNTs-PDDA-PtNPs-GOx/CPE$) ที่ศักย์ไฟฟ้า +0.50 โวลต์ โดยใช้ $Ag/AgCl$ และลวดแพลทินัม (Pt) เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ

เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (พีเอช 7) เป็นสารละลายตัวพา พบว่า กราฟมาตรฐานของขั้วโกลด์ไปโอเซนเซอร์มีการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานโกลด์ อยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-100 มิลลิโมลาร์ โดยมีความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรงสองช่วงความเข้มข้น ดังนี้ ช่วงแรกความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 มิลลิโมลาร์ ค่าความชันเท่ากับ 0.127 ไมโครแอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.995 ช่วงที่สองความเข้มข้น 5 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความชันเท่ากับ 0.06 ไมโครแอมแปร์ต่อ มิลลิโมลาร์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.997 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดคำนวณ จาก (3S/N) มีค่าเท่ากับ 0.015 มิลลิโมลาร์ ค่ากระแสที่ได้จากการวัดมีความเที่ยงดีมากที่สุดคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 2.8 ระบบโพลีอินเจคชันอะนาไลซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรีที่ขั้วโกลด์ไปโอเซนเซอร์ที่ พัฒนาขึ้น (CNTs-PDDA-PtNPs-GOx/CPE) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโกลด์ใน ตัวอย่างเครื่องดื่ม, น้ำผึ้ง และสารละลายโกลด์สำหรับฉีดเข้าร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ และวิเคราะห์ได้ รวดเร็วถึง 200 ตัวอย่างต่อชั่วโมง

Key words: โกลด์, ไปโอเซนเซอร์, คาร์บอนนาโนทิวป์, ไฟโบรอิน, แมกนีไทต์, อนุภาคแพลตินัมนาโน, ระบบโพลีอินเจคชัน-อะนาไลซิส

Abstract

Methods for monitoring glucose levels in blood for clinical and diagnostic purposes, and of glucose concentration in pharmaceutical products and beverages for industrial quality control, have attracted much attention. This work presents the development of selective, stable, and sensitive sensors for the determination of glucose. This work consists of 4 parts. In the first part, work was carried out in synthesis and characterization of silk fibroin with UV-visible spectroscopy and transmittance electron microscope.

In the second part, glucose chemical sensor was developed based on glassy carbon (GC) modified with Fe_3O_4 -CNTs-NiNPs composites film. Electrochemical investigations indicated that the GC/ Fe_3O_4 -CNTs-NiNPs electrode exhibits excellent performance in the electrochemical oxidation of glucose at the potential of +0.60 V in 0.1 M NaOH solution. Amperometry ($E_{\text{app}} = +0.55$ V) exhibits a linear dynamic range for glucose from 0.01 – 1.8 mM ($r^2 = 0.998$) with the sensitivity of 335.25 $\mu\text{A}/\text{mM}$; and a low detection limit of 6.7 μM (S/N = 3). The fabricated chemical sensor also provides good precision of 2.7% R.S.D (calculated from signals of 0.5 mM glucose, n= 5).

In the third part, glucose biosensor based on glucose oxidase (GOx) immobilized on Fe_3O_4 -CNTs-SF-AuNPs modified glassy carbon (GC) electrode. Cyclic voltammetry of glucose was conducted in a 0.1 M phosphate buffer pH 7. Glucose signals of the cyclic voltammograms were observed about +0.6 V at the biosensor (GC/ Fe_3O_4 -CNTs-SF-AuNPs). The potential sweep rate dependence exhibited that the anodic and cathodic peak currents of glucose varied linearly ($r^2 = 0.994$ and 0.999) with the square root of the scan rate. This result indicates that the reaction is a diffusion-controlled process with negligible adsorption on the electrode surface. However, this biosensor provides poor electrocatalytic activity and retention of nanoparticles or GOx, indicated by the decrease of current response when increasing glucose concentration.

In the fourth part, a glucose biosensor based on GOx immobilized on a carbon nanotube (CNTs)-poly(diallyldimethyl-ammonium chloride) (PDDA)-platinum nanoparticle (PtNPs) modified carbon-paste electrode (CNTs-PDDA-PtNPs/CPE). Cyclic voltammetric reveal glucose signals at a potential of +0.37 V in phosphate buffered solution (PBS) (0.10 M, pH 7). The biosensor provides good glucose oxidation activity and retention of GOx electrocatalytic activity due to CNTs-PDDA-PtNPs enhancement of the redox response. The carbon paste electrode was installed as working electrode in a flow through electrochemical cell of a flow injection (FI) system. Glucose was quantified using amperometric measurements at +0.50 V vs. Ag/AgCl and PBS carrier (0.10 M, pH 7.0). The linear working ranges for glucose measurements were 0.1–3 mM ($r^2 = 0.995$) and 5–100 mM ($r^2 = 0.997$), with corresponding sensitivities of 0.127 and 0.060 $\mu\text{A s}/\text{mM}$, respectively. The system provides good precision of 2.8% R.S.D with a calculated detection limit (3 S/N) of 15 μM . The proposed method was

successfully applied to determination of glucose in food and pharmaceutical samples with throughput of 200 samples/h.

Key words: glucose, biosensor, carbon nanotubes, fibroin, magnetite, PtNPs, Flow injection analysis

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

การวิจัยเพื่อพัฒนาไกลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้มีความถูกต้อง แม่นยำและมีสภาพไวสูงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากปริมาณกลูโคสในปัสสาวะและเลือดสามารถบ่งชี้ถึงสภาวะของโรคเบาหวาน (diabetes) [1-4] โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะควบคุมระดับกลูโคสในเลือดอย่างเข้มงวดซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการรักษาสสมดุลของร่างกาย ให้มีค่าอยู่ที่ประมาณ 3.6-5.8 mM หรือ 64.8-104.4 mg/dL [5] สมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกาแนะนำว่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารควรจะอยู่ที่ระดับน้อยกว่า 10 mM (180 mg/dL) และระดับกลูโคสในพลาสมาก่อนรับประทานอาหารควรจะอยู่ที่ระดับ 5.0-7.2 mM (90-130 mg/dL) [5] การวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานจะใช้เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังการอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง สูงกว่า 7.0 mM (126 mg/dL) การตรวจวัดปริมาณกลูโคสนอกจากจะใช้ในการตรวจและวินิจฉัยทางการแพทย์แล้ว ในขบวนการหมักและผลิตภัณฑ์อาหารปริมาณกลูโคสก็มีความสำคัญเนื่องจากสามารถใช้เป็นตัวชี้ในการชี้บอกคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ [4] นอกจากนี้การวิจัยเพื่อพัฒนาไกลูโคสไบโอเซนเซอร์เพื่อนำไปใช้เป็นชีวไฟฟ้าไบโอแอนโดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพก็เป็นที่ได้รับความสนใจและมีผู้ทำวิจัยเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่ได้รับความสนใจและนิยมนำมาใช้สร้างไกลูโคสไบโอเซนเซอร์เนื่องจากเป็นสารชีวภาพที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงสูงต่อกลูโคส [5] การปรับปรุงประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยการตรึงกลูโคสออกซิเดสในสภาพแวดล้อมที่เข้ากันได้ดีทางชีวภาพและองค์ประกอบอื่นที่ช่วยส่งเสริมการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างผิวหน้าชีวไฟฟ้ากับกลูโคสออกซิเดสจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง [4, 6] วัสดุที่มีความสามารถส่งเสริมการถ่ายโอนอิเล็กตรอนและมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เข้ากันได้กับกลูโคสออกซิเดสที่นิยมนำมาใช้เช่น คาร์บอนนาโนทิวบ์ เฟอร์โรซีนและอนุพันธ์ ไบโอฟลิเมอร์ เช่น โบวินซีรัมอัลบูมิน ไคโตซาน ไฟโบรอินจากไหม ถูกนำมาใช้เป็นเมทริกซ์ในการปรับปรุงประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ [7-13]

คาร์บอนนาโนทิวบ์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาดัดแปลงชีวไฟฟ้า เนื่องจากมีความเสถียรภาพทางเคมี มีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถเข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพ คาร์บอนนาโนทิวบ์จึงกลายเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับช่วยสนับสนุนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างกลูโคสออกซิเดสกับผิวหน้าของชีวไฟฟ้า [3, 11,12]

Silk fibroin (SF) เป็นไบโอฟลิเมอร์ชนิดโปรตีนจากธรรมชาติ ที่สกัดมาจากรังไหม (silk cocoon) ที่ประกอบด้วยหมู่ carboxyl และหมู่ amino บนพื้นผิวซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ สามารถใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์ ได้ดี เนื่องจาก สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ (biocompatibility), เสถียรต่อความร้อน (thermal stability), ไม่เป็นพิษ (non toxicity), สามารถดูดความชื้นได้ดี (hygroscopicity), ราคาถูก (low cost) และทนทานต่อจุลินทรีย์ (microbial resistance) เมื่อนำ SF มาใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์จึงทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมได้มีความเสถียรสูง (high stability) [15, 16]

ผ้าไหมไทยเป็นหนึ่งในเอกลักษณ์ของชาติไทยที่สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรในชนบททั่วประเทศไทย และสร้างชื่อเสียงไปทั่วโลก ผลิตภัณฑ์ผ้าไหมไทย ทอจากเส้นไหมซึ่งเป็นใยธรรมชาติที่แข็งแรง

ที่สุด มีความมั่นใจว่า ดูแล้วสวยงามแตกต่างจากผ้าที่ทอด้วยเส้นใยชนิดอื่น และเป็นเอกลักษณ์ที่สำคัญอย่างยิ่งของประเทศไทย และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในปัจจุบันเพราะ ประเทศไทยส่งออกผ้าไหมมูลค่าปีละประมาณ 500 ล้านบาท [17] ซึ่งคิดเป็น 40 % ของปริมาณผ้าไหมที่ผลิตส่วนอีก 60% ของผ้าไหมไทยจำหน่ายให้แก่นักท่องเที่ยว และบุคคลทั่วไปในประเทศ ซึ่งคิดเป็นมูลค่ารวม 8000 - 1,000 ล้านบาท [18] ในกระบวนการผลิตผ้าไหมจะมีเศษเส้นใยไหมและรังไหมเหลือทิ้งเป็นปริมาณมาก การแปรรูปไหมเพื่อเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้นเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อรองรับการแข่งขันในอนาคต นอกเหนือจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น ทางกายภาพ เคมี สิ่งทอ วัสดุวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ถือเป็นกลยุทธ์สำคัญที่เพิ่มพูนรายได้ให้กับเกษตรกรและประเทศไทย โดยเฉพาะการเพิ่มมูลค่าให้กับสารสกัดจากรังไหมหรือเศษไหม

งานวิจัยนี้สนใจที่จะวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวัสดุโอสไปโอเซนเซอร์ให้มีการตอบสนองที่ตื้น (high sensitivity) มีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) และ มีความเสถียรสูง (high stability) สามารถนำไปใช้เป็นโอสไปโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสแบบแอมเพอร์โรเมตรีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะเน้นพัฒนาวัสดุโอสไปโอเซนเซอร์ โดยใช้เส้นใยและไฟโบรอินจากไหมไทย ซึ่งเป็นโอสไปโอโพลิเมอร์ที่บนพื้นผิวประกอบด้วยหมู่ carboxyl และหมู่ amino สามารถนำอนุภาคนาโน เช่น อนุภาคทองนาโน, คาร์บอนนาโนทิวป์ หรือ โพลิเมอร์นำไฟฟ้า มาดัดแปรให้มีคุณสมบัติพิเศษเพื่อนำมาใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์เพื่อพัฒนาเป็นวัสดุโอสไปโอเซนเซอร์ เพื่อให้ได้โอสไปโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไว (high sensitivity) และมีความเสถียรสูง (high stability) โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1) ศึกษาและพัฒนาโอสไปโอเซนเซอร์เพื่อหาค่าประกอบของวัสดุเชิงประกอบระดับนาโน (nano composites) ของเส้นใยไฟโบรอินและอนุภาคนาโน เช่น อนุภาคทองนาโน คาร์บอนนาโนทิวป์ หรือ โพลิเมอร์นำไฟฟ้า ที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงบนขั้วไฟฟ้า เพื่อใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส

2) ศึกษาถึงผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อสภาพไวของขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส เช่น วิธีในการดัดแปรวัสดุเชิงประกอบลงบนขั้วไฟฟ้าและ pH ของสารละลาย ที่เหมาะสม

3) ประเมินคุณลักษณะของโอสไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส เช่น ช่วงการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรง (linearity range), ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (limit of detection), ผลของตัวรบกวน (interference study) และนำโอสไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สร้างองค์ความรู้ในการพัฒนาวัสดุโอสไปโอเซนเซอร์ โดยอาศัยเส้นใยและไฟโบรอินจากไหมไทย ซึ่งเป็นโอสไปโอโพลิเมอร์ ให้มีคุณสมบัติพิเศษที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์

2) สร้างความเข้มแข็งของประเทศในด้านการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยนำไฟโบรอินที่ได้จากไหมไทยมาแปรรูปให้มีคุณสมบัติที่ดีมากขึ้น เป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อรองรับการแข่งขันในอนาคต โดยการพัฒนาเกี่ยวกับไหมไทยซึ่งเป็นเอกลักษณ์อย่างหนึ่งของประเทศไทย

และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของประเทศ ถือเป็นกลยุทธ์สำคัญที่จะเพิ่มพูนรายได้ให้กับเกษตรกรและประเทศไทย โดยเฉพาะการเพิ่มมูลค่าให้กับสารสกัดจากรังไหมหรือเศษไหม

3) สร้างความเข้มแข็งของทีมนักวิจัยไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทีมนักวิจัยในระดับภูมิภาคให้ทัดเทียมกับระดับนานาชาติ และเพิ่มผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการในวารสารนานาชาติ

4) สร้างบุคลากรในระดับปริญญาโท-เอกที่มีคุณภาพทั้งในเชิงวิชาการและวิจัยเพื่อเป็นนักวิจัยหรืออาจารย์ในมหาวิทยาลัย โดยเฉพาะมหาวิทยาลัยราชภัฏหรือหน่วยงานเอกชน และขยายขอบเขตในการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับไฟโบรอินในไหมไทย และเซนเซอร์ในการตรวจวัดให้กับผู้ที่สนใจ

5) ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นจะถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ หรือนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

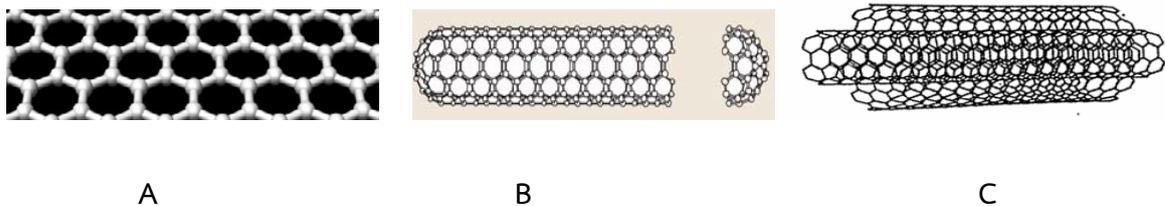
งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาวัสดุโพลีเมอร์ไบโอเซนเซอร์ ที่มีการตอบสนองที่ดีขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงสูง และมีความเสถียรสูงขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสแบบแอมเพอร์โรเมตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่าของรังไหมหรือเศษไหมโดยนำมาแปรรูปให้มีคุณสมบัติที่ดีมากขึ้นเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาวัสดุวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อรองรับการแข่งขันในอนาคต ถือเป็นกลยุทธ์สำคัญที่จะเพิ่มพูนรายได้ให้กับเกษตรกรและประเทศไทย โดยเฉพาะการเพิ่มมูลค่าให้กับสารสกัดจากรังไหมหรือเศษไหม โดยงานวิจัยจะเน้นการพัฒนาวัสดุโพลีเมอร์ไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้เส้นใยไฟโบรอินของไหมไทยชนิดใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษบนพื้นผิว โดยใช้อนุภาคทองคำนาโน , คาร์บอนนาโนทิวป์ และโพลีเมอร์นำไฟฟ้า สำหรับใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยคาดว่า การใช้วัสดุเชิงประกอบของเส้นใยไฟโบรอินของไหมไทยและอนุภาคนาโนมาตรึงเอนไซม์ลงบนขั้วไฟฟ้าจะทำให้ได้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่มีสภาวะไวสูง มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็ว และมีความเสถียรสูง เนื่องจากคุณสมบัติของไฟโบรอินจากไหมที่สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ (biocompatibility) ได้ดี และคุณสมบัติของวัสดุนาโนที่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

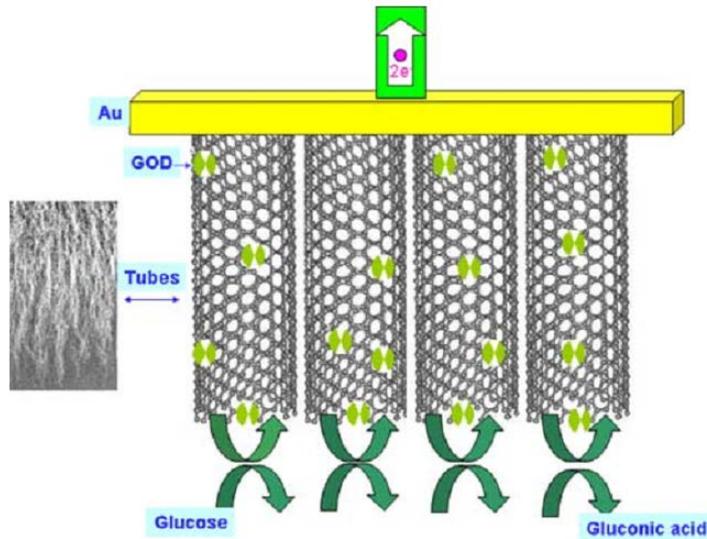
วัสดุเชิงประกอบขนาดนาโน (nanocomposites) มีบทบาทในกระบวนการสำคัญที่มีผลต่อคุณลักษณะการวิเคราะห์ของไบโอเซนเซอร์ คือขบวนการในการตรึงเอนไซม์ให้ติดอยู่ที่ขั้วไฟฟ้าและคงคุณสมบัติในการเร่งเอนไซม์ ทำให้สามารถช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา เพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สัญญาณที่ได้จึงเพิ่มมากขึ้น การวิจัยเพื่อพัฒนาวัสดุขนาดนาโนให้มีสมบัติพิเศษ เช่น เร่งปฏิกิริยา (catalytic activity) ความเข้ากันได้กับเอนไซม์ (biocompatibility) เสถียร (stability) พื้นที่ผิวสูง (high surface area) และ นำไฟฟ้าได้ดี (high conductivity) เพื่อนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ในไบโอเซนเซอร์ เพื่อพัฒนาให้การวิเคราะห์มีความจำเพาะ มีสภาพไวสูง แม่นยำและมีความถูกต้อง จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก [1-4]

คาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube; CNT) คือรูปหนึ่งของคาร์บอนที่เกิดจากแผ่นกราฟีน (graphene) ม้วนตัวเกิดเป็นท่อขนาดนาโน (nanotube) ถ้าการม้วนตัวดังกล่าวเกิดเป็นท่อโดยใช้กราฟีนแผ่นเดียวจะเรียกว่าซิงเกิลวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (single-walled carbon nanotube ; SWCNT) หรือถ้าเกิดจากแผ่นกราฟีนหลายแผ่นม้วนตัวเกิดเป็นท่อขนาดนาโนจะเรียกว่ามัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (multi-walled carbon nanotube ; MWCNT) ดังรูปที่ 2.1 ทั้ง SWCNT และ MWCNT แสดงคุณสมบัติเด่นทางด้านแสง เคมี กล ไฟฟ้า และไฟฟ้าเคมี สามารถปรับปรุงพื้นผิว (surface) ของ CNT ได้ง่าย ทำให้มีการประยุกต์ใช้ CNT ในหลายด้านได้แก่ nanocomposites, nanotube-probe และ nanotube-protein conjugates นอกจากนี้ CNT ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีโดยการติดหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) กับหมู่ต่าง ๆ เช่น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides), เอนไซม์ (enzymes) และ โปรตีน (proteins) เพื่อให้เกิดความจำเพาะเจาะจง (selectivity) มากขึ้น



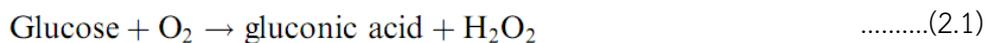
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ A แผ่นกราฟีน (graphene sheet), B single-walled carbon nanotube; SWCNT และ C multi-walled carbon nanotube; MWCNT

คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งของคาร์บอนนาโนทิวป์คือความเข้ากันได้กับสารชีวภาพ (biocompatibility) ของคาร์บอนนาโนทิวป์ นำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์คอมโพสิตชนิดต่างๆ เช่น การนำไปใช้ในการพัฒนาเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดกลูโคส โดยการนำขั้วไฟฟ้า Au/MWCNT [4] มาใช้ในการวัดปริมาณกลูโคส แผนภาพของการสร้างขั้วไฟฟ้าแสดงดังรูปที่ 2.2

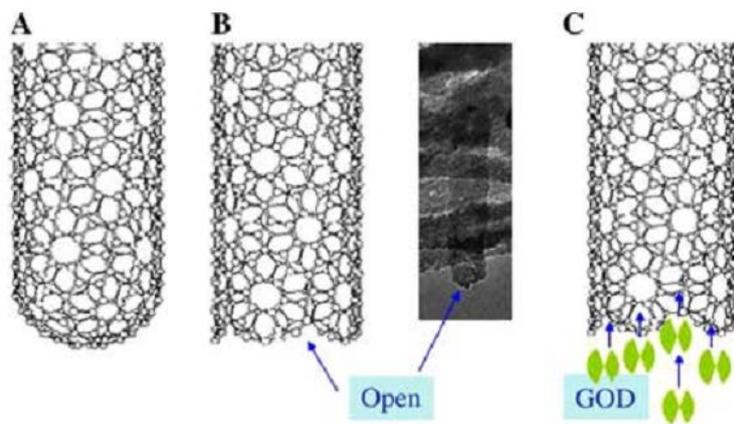


รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงการสร้างขั้วไฟฟ้า Au/MWCNT และกลไกในการวัดปริมาณกลูโคส [4]

เซนเซอร์ดังกล่าว [4] มีอายุการใช้งานที่นานขึ้นโดยไม่เสียแอกติวิตีของเอนไซม์ ประสิทธิภาพที่ดีขึ้นของกลูโคสเซนเซอร์เกิดจากการที่เอนไซม์กลูโคสสามารถไหลเข้าไปอยู่บนขั้วไฟฟ้าได้มากขึ้นและประสิทธิภาพของการเชื่อมต่อทางไฟฟ้าระหว่างชั้นของเอนไซม์กับผิวสัมผัสของขั้วไฟฟ้าดีขึ้นกว่าการไม่มีคาร์บอนนาโนทิวป์ และเกิดองค์ความรู้ใหม่คือการค้นพบการขนถ่ายอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) กลไกในการเกิดวัดปริมาณกลูโคสแสดงดังสมการที่ 1 และ 2



โครงสร้างของนาโนทิวป์ที่ได้จากการสังเคราะห์จะมีลักษณะปลายปิด (รูปที่ 2.2A) ในการตัดแปรโดยการ treat ด้วยกรดจะทำให้ได้นาโนทิวป์ที่มีลักษณะปลายเปิด (2.2B) ทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOD) สามารถเข้าไปบรรจุอยู่ในท่อของนาโนทิวป์ปลายเปิดได้ดังรูปที่ 2.3C



รูปที่ 2.3 แผนภาพของนาโนทิวป์ก่อนการ treat ด้วยกรดจะมีลักษณะปลายปิด (A) แต่เมื่อนำไป treat ด้วยกรด (acid etching) จะได้นาโนทิวป์ปลายเปิด (B) โกลด์ออกซิเดส สามารถเข้าไปบรรจุอยู่ในท่อของนาโนทิวป์ปลายเปิด (C) [4]

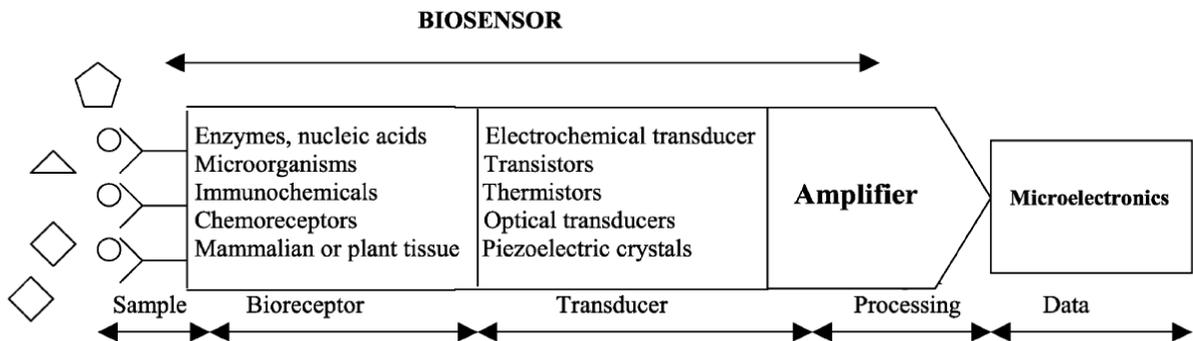
การนำคาร์บอนนาโนทิวป์ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในการนำไฟฟ้า มาใช้ในไบโอเซนเซอร์จะช่วยส่งเสริมให้ประสิทธิภาพของการเชื่อมต่อทางไฟฟ้าระหว่างชั้นของสารชีวภาพกับกับผิวสัมผัสของขั้วไฟฟ้าดีขึ้น การใช้ไฟโบรอินซึ่งมีสมบัติความเข้ากันได้กับสารชีวภาพ (biocompatibility) จะนำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์คอมโพสิตที่ทำให้เอนไซม์โกลด์ออกซิเดสมีความคงตัว โดยคาดว่า การใช้วัสดุเชิงประกอบของเส้นใยไฟโบรอินของไทยและอนุภาคนาโนมาตรึงเอนไซม์ลงบนขั้วไฟฟ้าจะทำให้ได้โกลด์นาโนทิวป์ที่มีสภาพไวสูง มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่เร็ว และมีความเสถียรสูง เนื่องจากคุณสมบัติของไฟโบรอินจากไหมที่สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ (biocompatibility) ได้ดี และคุณสมบัติของวัสดุนาโนที่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดี

2.1 ไบโอเซนเซอร์ (biosensor)

ไบโอเซนเซอร์ (biosensor) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของสารใดๆ โดยใช้สัญญาณที่ได้จากการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า คุณลักษณะเด่นของไบโอเซนเซอร์คือ มีความเฉพาะเจาะจง (selectivity) และความไว (sensitivity) สูงเมื่อเทียบกับเทคนิคการตรวจวัดชนิดอื่น ๆ เช่น ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน [19-20] คือ

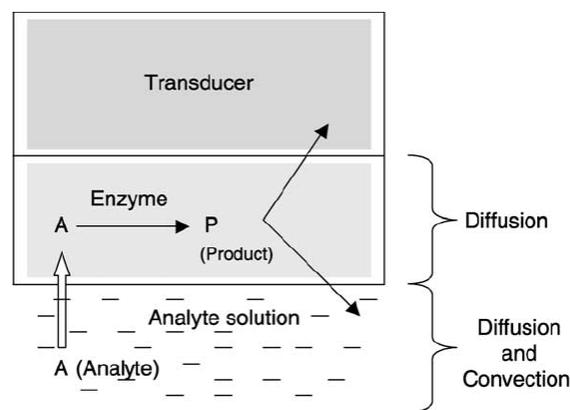
i) ส่วนของสารทางชีวภาพ (biomaterials) ที่ทำหน้าที่จดจำ (recognition) หรือเลือกเฉพาะ (selection) สารตัวอย่างที่จะทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอย่างจำเพาะ ส่วนที่ 1 นี้จะถูกตรึง (immobilization) อยู่บนผิวหน้าของส่วนที่ 4

ii) ทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งทรานสดิวเซอร์นี้จะทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณดังกล่าวไปยังส่วนประมวลผล (processor) เพื่อวัดหรือแสดงสัญญาณให้เราได้ทราบ (signal elaboration) ซึ่งทำหน้าที่ในการวัดสัญญาณและแปรค่าออกมาเป็นหน่วยต่างๆ ที่ต้องการ ไดอะแกรมส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์แสดงได้ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ไดอะแกรมของไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบไปด้วย (1) ส่วนของรีเซพเตอร์ที่เป็นสารชีวโมเลกุล (Bioreceptor) และ (2) ทรานสดิวเซอร์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล [19]

กระบวนการเกิดกระแสทางไฟฟ้าเคมีนั้นสามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 2.5 เริ่มจากสารที่สนใจ (analyte; A) เคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าไปที่ชั้นของเอนไซม์ (enzyme layer) ผ่านกระบวนการแพร่ เกิดปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ (enzymatic reaction) กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Product; P) ซึ่งตรวจวัดได้ที่ทรานสดิวเซอร์ ปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องมือวัดทางไฟฟ้าเคมีหรือเรียกว่าเครื่องโพเทนชิโอสแตท (potentiostat) และสามารถนำไปแปรผลได้ต่อไป

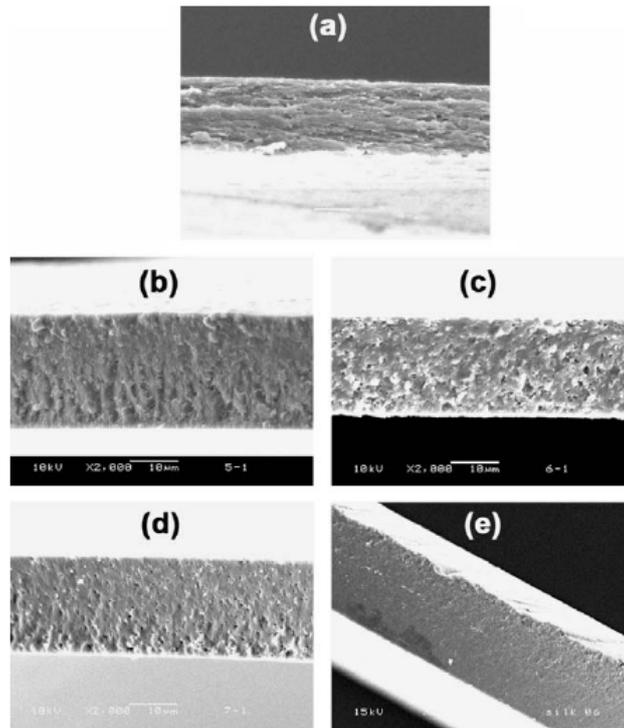


รูปที่ 2.5 ไดอะแกรมของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ซึ่งเกิดจากสารที่สนใจ (analyte; A) เคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าผ่านกระบวนการแพร่ไปที่ชั้นของเอนไซม์ (enzyme layer) เกิดปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ (enzymatic reaction) กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Product; P) ซึ่งตรวจวัดได้ที่ทรานสดิวเซอร์ [18]

Silk fibroin (SF) เป็นไบโอโพลิเมอร์จากธรรมชาติ ที่สกัดมาจากรังไหม (silk cocoon) ที่ประกอบด้วยหมู่ carboxyl และหมู่ amino บนพื้นผิวซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ สามารถใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์ ได้ดี เนื่องจาก สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ (biocompatibility), เสถียรต่อความร้อน (thermal stability), ไม่เป็น

พิษ (non toxicity), สามารถดูดความชื้นได้ดี (hygroscopicity), ราคาถูก (low cost) และ ทนทานต่อจุลินทรีย์ (microbial resistance)

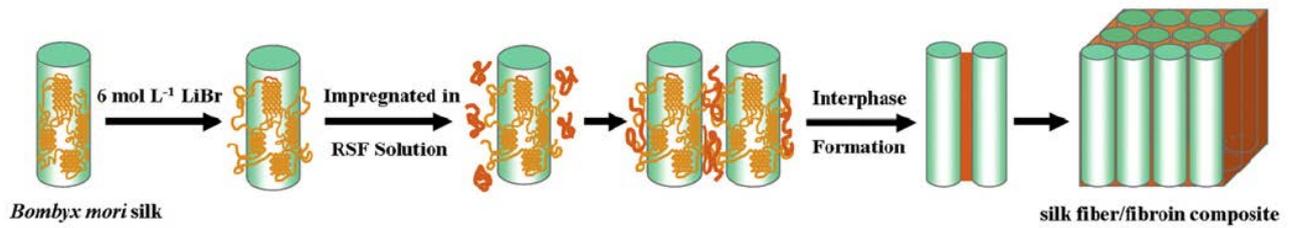
มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาคุณสมบัติและการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยไฟโบรอินของไหม เพื่อให้มีคุณสมบัติพิเศษตามที่ต้องการบนพื้นผิวมากมาย เช่น ในปี ค.ศ. 2012 Niamsa และคณะ [22] ได้พัฒนาการเตรียมแผ่นฟิล์มของ nanocomposite ระหว่าง chitosan/fibroin (CS/SF) ที่มี methoxy poly(ethylene glycol)-b- poly (D, L lactide) หรือ MPEG-b-PDLL nano particles ผลจาก scanning electron microscope แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ภาพถ่าย SEM แสดงหน้าตัดขวาง (cross-section) ของ nanocomposites chitosan/fibroin blend films ที่มี MPEG-b-PDLL nano particles ที่เตรียมจาก CS/SF ในอัตราส่วน (a) 2/0, (b) 2/1, (c) 2/2, (d) 1/2 และ (e) 0/2 [22]

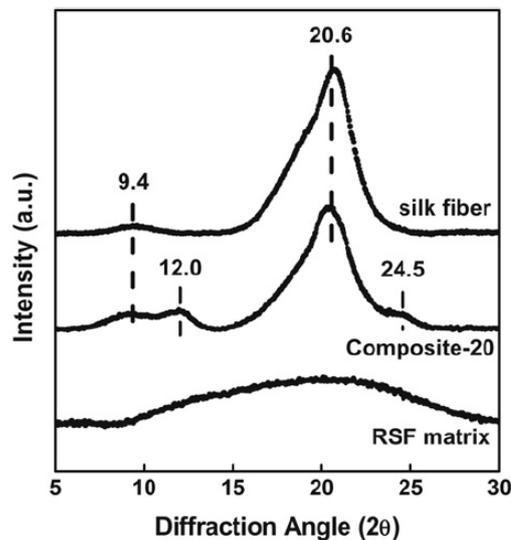
แผ่นฟิล์ม CS/SF ที่มี MPEG-b-PDLL nano particles แสดงคุณสมบัติที่ดี สามารถพัฒนาให้เป็นวัสดุที่มีค่า tensile strength และ มีความสามารถในการดูดซับความชื้นได้มากขึ้น เป็นวัสดุธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable nanocomposite) มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการนำส่งยา (drug delivery)

Yuan และคณะ [23] ได้พัฒนาการเตรียม silk fiber/fibroin composite โดยใช้สารละลาย LiBr ในการ pretreatment เพื่อช่วยในการผสมเกิดได้ดียิ่งขึ้น วิธีในการเตรียมแสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 วิธีเตรียม silk fiber/fibroin composites ด้วยการ pretreatment ด้วยสารละลาย LiBr เพื่อช่วยให้เกิดแรงดึงดูด (adhesion) ระหว่าง silk fiber และ regenerated silk fibroin (RSF) [23]

silk fiber/fibroin composites film ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) มีขนาด $100 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ และมีความหนา $0.1\text{-}0.5 \text{ nm}$ จากการศึกษาด้วย X-ray diffractometer (XRD) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 พบว่า regenerate silk fibroin (RSF) แสดงสัญญาณที่ broad และมีค่า scattering peak ที่ประมาณ 20° แสดงถึงโครงสร้างที่เป็นอสัณฐาน (amorphous conformation) ส่วน silk fiber แสดง scattering peak ที่แคบ ที่ประมาณ 20.6° ซึ่งเนื่องจากโครงสร้างที่เป็นระเบียบมากกว่าของไฟโบรอิน ที่เป็นแบบแผ่นพับบิดแบบสวนขนาน (anti-parallel- β -sheet structure) โครงสร้างดังกล่าวยังพบใน composite-20 ที่เตรียมได้

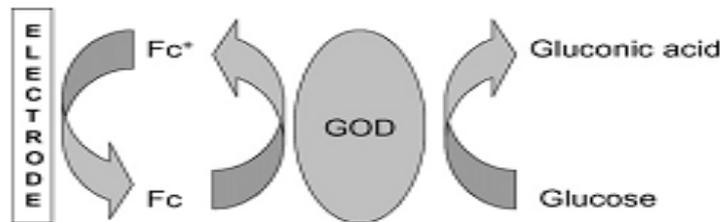


รูปที่ 2.8 X-ray diffraction pattern ของ regenerated silk fibroin (RSF), เพื่อช่วยให้เกิดแรงดึงดูด (adhesion) ระหว่าง silk fiber และ regenerate silk fibroin (RSF), silk fiber/fibroin composites (composite-20) และ silk fiber [23]

2.2 การพัฒนาโกลโคสไปโอเซนเซอร์

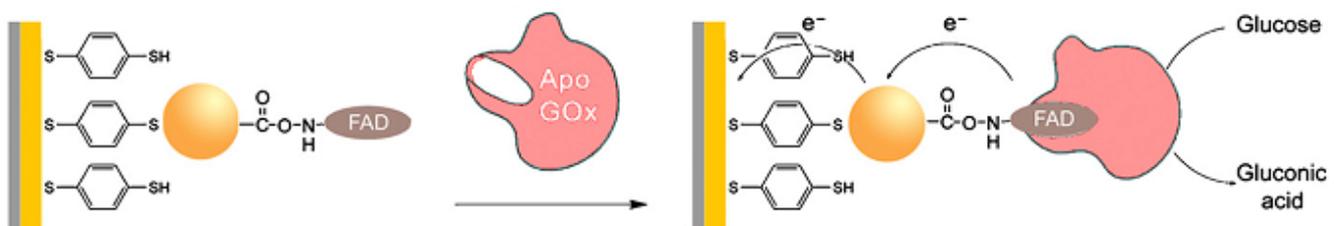
ในปี ค.ศ. 2002 Pizzariello และคณะ [24] พัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งประกอบด้วยขั้วแอโนดชนิดคาร์บอนที่ตรึงด้วยเอนไซม์ glucose oxidase และใช้ ferrocene เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน กลไกการ

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มี ferrocene เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอนแสดงดังรูปที่ 2.9 ส่วนแคโทดมีลักษณะคล้ายกันแต่ใช้เอนไซม์แตกต่างคือใช้ horseradish peroxidase เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้นมาเมื่อให้ศักย์แก่ระบบ 0.22 โวลต์ พบว่าสามารถที่จะให้กำลังออกมา $0.15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ เซลล์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมานี้มีอายุการใช้งานได้ 30 วัน



รูปที่ 2.9 แสดงการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยมี Ferrocene เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน [24]

ในปี ค.ศ. 2003 กลุ่มวิจัยของ Xiao [25] ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าที่มีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อพัฒนาไปเป็นแอโนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยใช้ Flavin adenine dinucleotide (FAD) เชื่อมต่อกับอนุภาคทองนาโนเพื่อพัฒนาให้เป็น semiconductor nanoparticle และทำหน้าที่เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน และมี dithio เป็นตัวเชื่อมระหว่างตัวนำส่งกับผิวหน้าอิเล็กโทรดที่ทำด้วยทอง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งอิเล็กตรอนแสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของ Au-semiconductor nanoparticle glucose oxidase electrode [25]

ปี ค.ศ. 2006 Barriere และคณะ [26] ได้ศึกษาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วยแอโนดตรึงด้วยเอนไซม์ glucose oxidase และขั้วแคโทดตรึงด้วยเอนไซม์ laccase โดยใช้ osmium-based redox polymer เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน บนแกรไฟต์อิเล็กโทรด ศึกษาภายใต้อุณหภูมิ $37 \text{ }^\circ\text{C}$ เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer ที่ pH 4.4-7.4 พบว่าสามารถให้พลังงาน $10 - 40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$

ในปี ค.ศ. 2006 Ivnitski และคณะ [27] ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าแอโนดที่มีการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยตรึงเอนไซม์บน multi-wall carbon nanotube (MWCNT) ซึ่งจะช่วยในการนำส่งอิเล็กตรอนโดยตรง ทำการทดลองภายใต้อุณหภูมิ $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ในสารละลาย phosphate buffer pH 6.9 ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 20 mM ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 0.1 M KCl ให้ศักย์แก่แอโนด -0.38 และ

-0.4 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl ผลทำให้เกิดการไหลของอิเล็กตรอนโดยตรงในระบบโดยไม่ต้องใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน

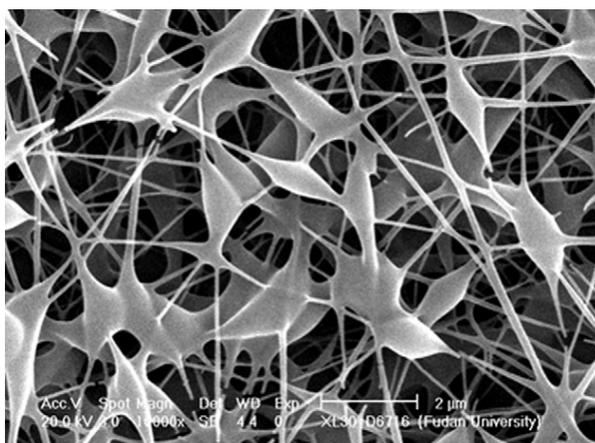
ปี ค.ศ. 2007 Lui และ Dong [28-29] ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าสำหรับเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase และ laccase บน MWCNT เป็นแคตตาไลติกแอโนดและแคโทดตามลำดับ เซลล์เชื้อเพลิงที่พัฒนาขึ้นใช้ ferrocene mono carboxylic acid เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน ของขั้วแอโนด จากผลการทดลองสามารถให้พลังงาน 4.1 μW

ในปี ค.ศ. 2008 Togo และคณะ [30] ศึกษาและพัฒนาการย่อยระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีขนาดไมโคร (micro fluidic biofuel cell) โดยระบบที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วย กลูโคสแอโนดโดยตรึงเอนไซม์ glucose dehydrogenase, ไดอะฟลอเรส (diaphorase) และ VK_3 -pendent poly-L-lysine ส่วนขั้วแคโทดทำการตรึงเอนไซม์ bilirubin oxidase บนออกซิเจนแคโทด ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกระแสได้ดีขึ้นกว่าเซลล์ปกติ 10 %

2.3 การนำไฟโบรอินมาประยุกต์ใช้

2.3.1 การถนอมอาหาร (food preservation)

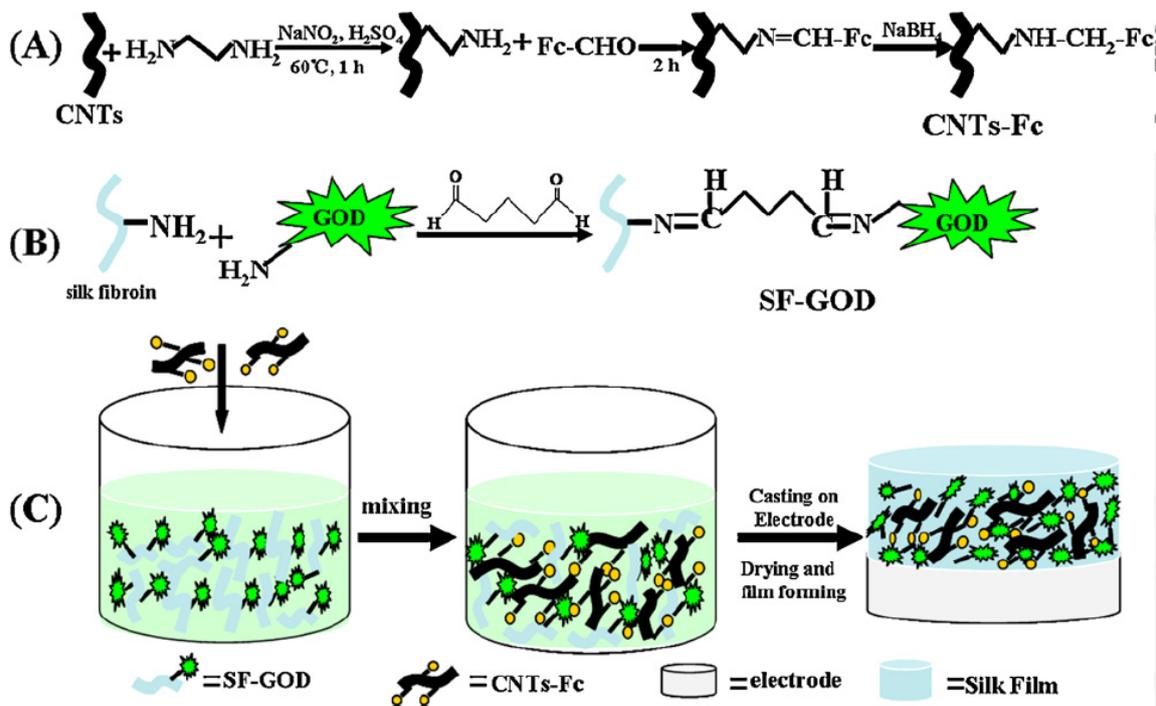
ในปี ค.ศ. 2012 Ge และคณะ [31] ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์บรรจุอาหาร (packaging material) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) โดยการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase (GOD) ลงบนเส้นใยเยื่อบาง (nanofibrous membrane) ของวัสดุเชิงประกอบของ poly(vinyl alcohol)/chitosan/สารสกัดจากชา (PVA/CS/tea extract) วัสดุเชิงประกอบดังกล่าวเตรียมโดยซัง poly(vinyl alcohol) มา 0.4 กรัม และ chitosan 0.1 กรัม ละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% ปริมาตร 5 mL กวนสารละลายเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารสกัดจากชา (1.5 wt%) ปริมาตร 1 mL และ เอนไซม์ glucose oxidase จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปขึ้นรูป โดยการทำให้ electrospinning ภาพถ่าย SEM เส้นใยนาโนของวัสดุเชิงประกอบ PVA/CS/tea extract/GOD แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 แสดงภาพถ่าย SEM ของ PVA/CS/tea extract/GOD nanofiber [31]

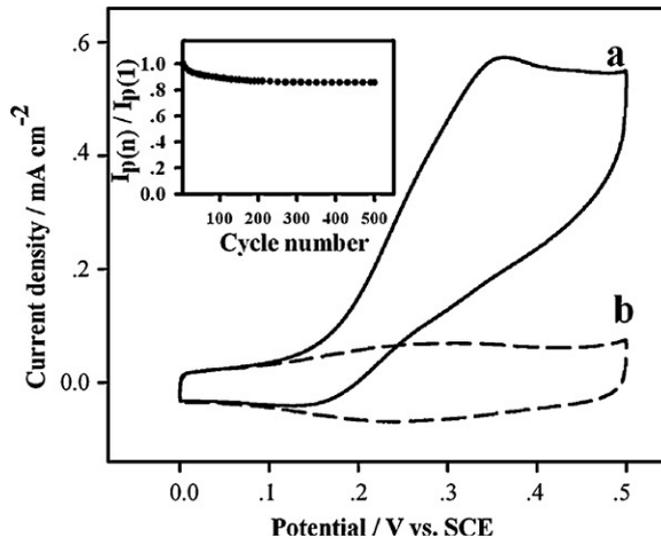
2.3.2 การพัฒนาไบโอเซนเซอร์

Silk film immobilized glucose oxidase ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้เป็นขั้วไบโอแอโนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel cells) ชนิด glucose/O₂ biofuel cell โดย Liu และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 [15] โดยนำ ferrocene (fc) ซึ่งเป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน มาสร้างพันธะโควาเลนต์กับ multi-walled carbon nanotube (CNT) จะได้ CNTs-Fc เพื่อช่วยให้นำส่งอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์กับขั้วไฟฟ้า ดังรูปที่ 2.12A ส่วนเอนไซม์ไกลูโคสออกซิเดส (GOD) จะถูกตรึงบน Silk fibroin (SF) โดยนำเอนไซม์ไกลูโคสออกซิเดสมา 0.50 mg เติมลงในสารละลาย SF (1.90 wt%) ปริมาตร 50 μ L ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม glutaraldehyde (Glu) ความเข้มข้น 2.50 wt% ปริมาตร 50 μ L (รูปที่ 2.12b) จากนั้นเติมสารละลาย CNTs-Fc (5 mg/mL), ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.0) ปริมาตร 100 μ L ผสมให้เข้ากันจะได้ CNTs-Fc/SF-GOD ดังรูปที่ 2.12C นำสารละลายที่ได้ไปโม่ตีฟายด์บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าเคลาส์คาร์บอน จะได้ขั้วไบโอแอโนด CNTs-Fc/SF-GOD



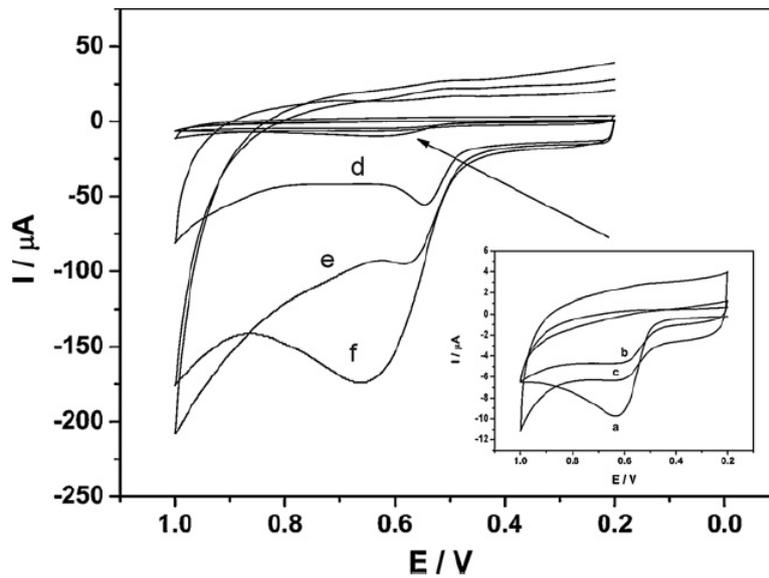
รูปที่ 2.12 แผนภาพแสดงขั้นตอนในการเตรียม (A) CNTs-Fc, (B) SF-GOD และ (C) ขั้วไฟฟ้า CNTs-/SF-GOD/GCE [15]

ขั้วไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น (CNTs-Fc/SF-GOD) ตอบสนองต่อกลูโคสได้ดีดังแสดงในโวลแทมโมแกรม รูปที่ 2.13 และขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้มีความเสถียรดี (รูปแทรก)



รูปที่ 2.13 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรม ที่ขั้วไบโอแอโนด MWCNTs-Fc/SF-GOD (a) เมื่อเติม กลูโคสความเข้มข้น 0.07 M และ (b) เมื่อไม่มีกลูโคส (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH = 7.0) รูปแทรก แสดงการศึกษาความเสถียรของขั้วไบโอแอโนด MWCNTs-Fc/SF-GOD [15]

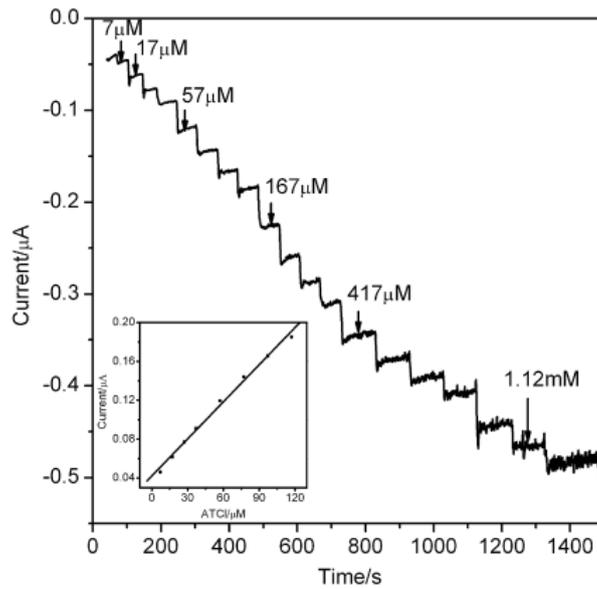
ในปี ค.ศ. 2010 Yin และคณะ [32] ได้พัฒนาแอมเพอร์โมเมตริกซีไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ bisphenol A (BPA) ซึ่งเป็นสารมลพิษที่มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์พลาสติก โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยวัสดุเชิงประกอบ (Tyr-SF-MWCNTs-CoPc/GCE) การเตรียมขั้วไฟฟ้าง่ายๆ เริ่มจากการเตรียมสารละลายเอนไซม์ Tyr-SF โดยนำสารละลาย Tyr ความเข้มข้น 2 mg/mL มาผสมกับสารละลาย silk fibroin (SF) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ส่วนสารละลาย MWCNTs-CoPc เตรียมโดยนำ cobalt phthalocyanine (CoPc) และ MWCNTs มาอย่างละ 2 mg เติมนลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลาย MWCNTs-CoPc ปริมาตร 10 μ L ไปโมดิฟายด์ที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าด้วย สารละลาย Tyr-SF ปริมาตร 10 μ L จะได้ขั้วไฟฟ้า Tyr-SF-MWCNTs-CoPc/GCE ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการโมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้าแสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ BPA ความเข้มข้น 2.5 mM ที่ขั้ว (a) GCE, (b) Tyr/GCE, (c) Tyr-SF/GCE, (d) MWCNTs-CoPc/GCE, (e) Tyr-MWCNTs-CoPc/GCE และ (f) Tyr-SF-MWCNTs-CoPc/GCE [32]

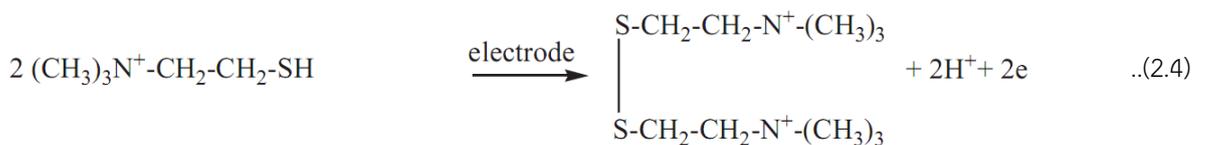
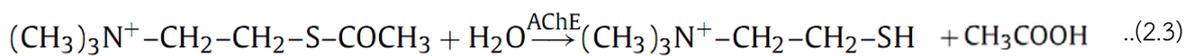
ไซคลิกโวลแทมโมแกรมในรูปที่ 2.14 พบว่าองค์ประกอบของขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ สภาวะ (f) Tyr-SF-MWCNTs-CoPc/GCE และ ขั้วไฟฟ้างกล่าวสามารถพัฒนาเป็น amperometric sensor สำหรับวัดปริมาณ BPA ได้โดยจะได้ช่วงในการตอบสนองแบบเป็นเส้นตรงที่ 0.05- 3.0 μM และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ ความเข้มข้น 0.03 μM

ในปี ค.ศ. 2012 Xue และคณะ [33] ได้พัฒนาแอมเพอร์โมเมตริกซ์ไปโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ organophosphate และ carbamate ขึ้นมาโดยอาศัยการตรึงเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ด้วยการดูดซับ (non-covalent adsorption) ลงในเมทริกซ์ของ silk fibroin และ multi wall carbon nanotube (MWCNT) โดยนำ CNTs (10 mg/mL ใน DMF) ปริมาตร 12 μL มา coat บนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยการ coat สารละลาย SF ปริมาตร 2 μL และเอนไซม์ AChE ปริมาตร 8 μL ตามลำดับจะได้ขั้วไฟฟ้า AChE-SF/MWCNTs/GCE แอมเพอร์โรแกรมที่ขั้ว AChE-SF/MWCNTs/GCE ที่พัฒนาขึ้นแสดงดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 แสดงแอมเพอโรแกรมที่ขั้ว AChE-SF/MWCNTs/GCE เมื่อเติม acetylthiocholine chloride (ATCl) ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.65 V (เทียบกับ SCE) รูปแทรกแสดงกราฟมาตรฐานของ ATCl [33]

เมทริกซ์ของ SF และ MWCNT สามารถใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์ AChE ได้ดี เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ของ SF ไบโอสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (AChE-SF/MWCNTs/GCE) สามารถวัดปริมาณ ของ ATCl โดยมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา คือ เอนไซม์ AChE เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ATCl ดังสมการ 3 และ 4



บทที่ 3 การทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

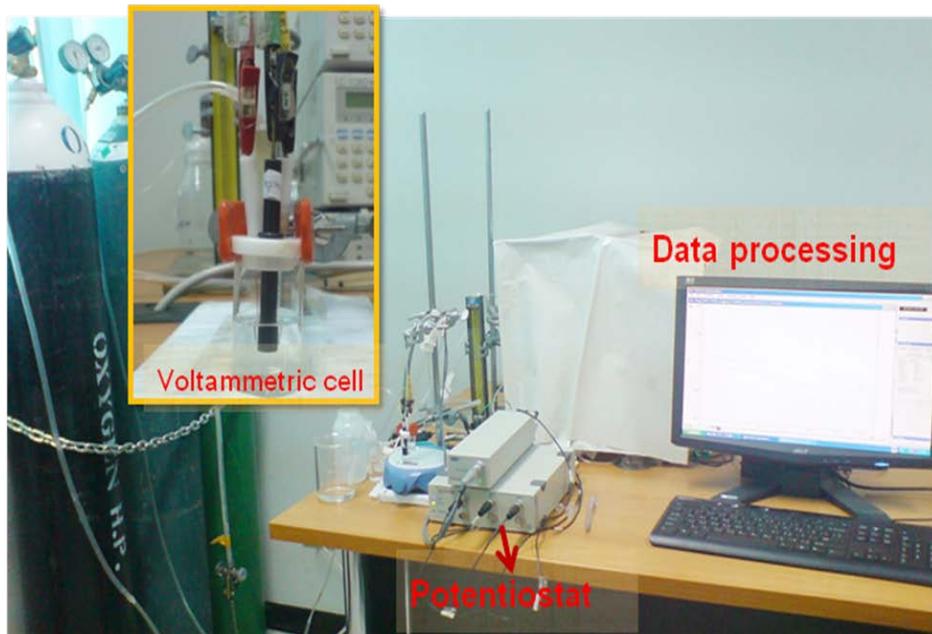
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองแสดง

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

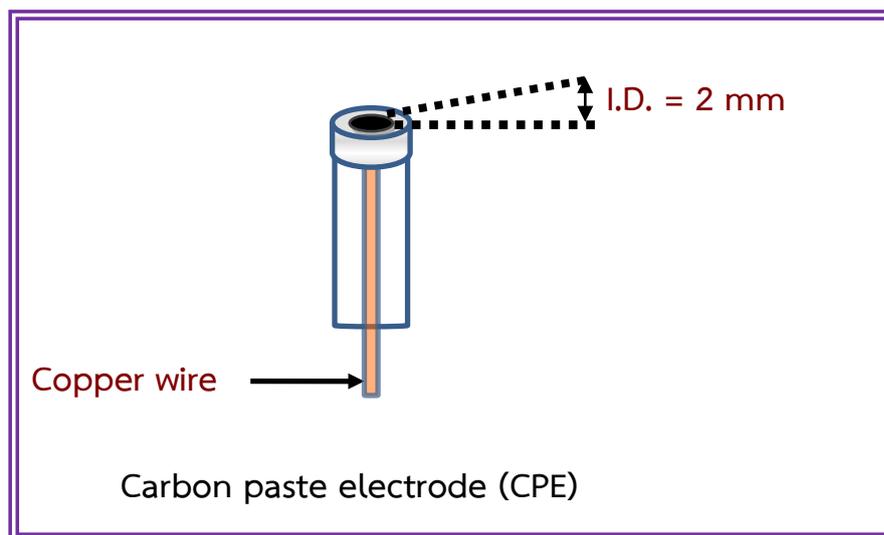
3.1.1 ไชคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic voltammetry)

การทดลองไชคลิกโวลแทมแสดงดังรูปที่ 3.1 เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท EDAQ) และ โวลแทมเมทริกเซลล์ ขนาด 25 mL (รูปแทรก, รูปที่ 3.1) ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา (3 mm diameter) หรือ ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยคอมโพสิตของอนุภาคทองนาโน-ไฟโบรอิน เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (AuNPs-SF/GC), ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ลวด Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย



รูปที่ 3.1 การทดลองไซคลิกโวลแทมโมแกรมเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง รูปแทรกแสดงโวลแทมเมตริกเซลล์

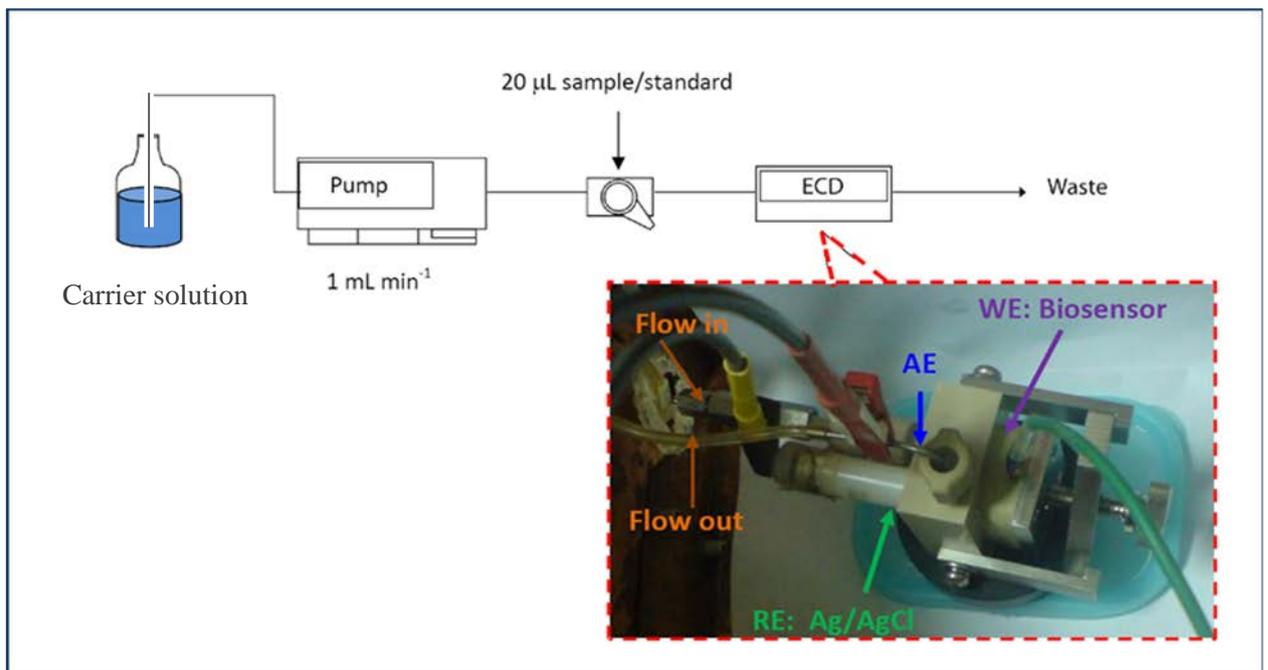
องค์ประกอบของขั้วไฟฟ้าแบบแม่เหล็กแบบ carbon paste electrode (CPE) ที่พัฒนาเป็นอิเล็กโทรดคาร์บอนโอสไมต์แสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ขั้วไฟฟ้าแบบแม่เหล็กแบบ carbon paste ที่นำมาพัฒนาเป็นอิเล็กโทรดคาร์บอนโอสไมต์

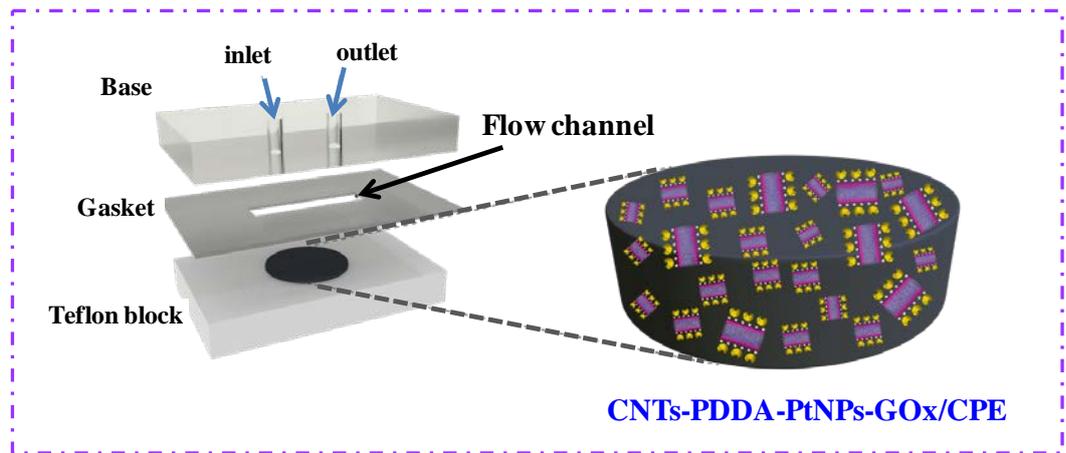
3.1.2 ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบที่มีการไหล

ระบบวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่พัฒนาขึ้น แสดงดังรูปที่ 3.3 HPLC ปุ่ม รุ่น LC-10AD (บริษัท Shimadzu), Injector ปริมาตร loop 20 μL (บริษัท Rheodyne), เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท eDAQ) และ thin layer flow cell (รูปแทรก, รูปที่ 3.3) ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ขั้วไฟฟ้ากลาสคาร์บอนที่เคลือบด้วยคาร์บอนนาโนคอมโพสิตเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน, ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ท่อ stainless steel เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย active area สำหรับขั้วไฟฟ้าใช้งานเท่ากับ 0.06 cm^2 ใช้สารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 M เป็นสารละลายตัวพา (carrier solution)



รูปที่ 3.3 แมนิโฟลด์ของระบบโพลินเจคชันอะนาลิซิสที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น รูปแทรกแสดงภาพของ thin layer flow cell

ในกรณีที่ใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดขั้วไฟฟ้าแบบ CPE เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน จะใช้ thin layer flow cell ที่สร้างขึ้นจากแผ่นคริลิกดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 thin layer flow cell ที่สร้างขึ้นจากแผ่นอคริลิกสำหรับใช้กับขั้วไฟฟ้าใช้งานชนิด CPE

สารเคมีที่ใช้ เกรดของสารเคมีและบริษัทผู้ผลิตสารเคมีแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	เกรด	บริษัท
aniline (C ₆ H ₅ NH ₂)	AR	Sigma-Aldrich
<i>o</i> -Aminobenzoic acid (C ₇ H ₇ NO ₂)	AR	Sigma-Aldrich
Ammonium persulfate ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	AR	Fluka
Chitosan, CS (C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _n	AR	Sigma-Aldrich
di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na ₂ HPO ₄)	AR	Carlo Erba
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	AR	Merck
Potassium di-hydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	AR	Sigma-Aldrich
glucose oxidase (GOx) from <i>Aspergillus niger</i> (E.C. 1.1.3.4; type X-S, 50 kU g ⁻¹)	AR	Sigma-Aldrich
Ascorbic acid (C ₆ H ₈ O ₆)	AR	Sigma-Aldrich
Dopamine (C ₈ H ₁₁ NO ₂)	AR	Sigma-Aldrich
poly (diallyldimethylammonium chloride) MW: 100,000-200,000, 20% w/w	AR	Sigma-Aldrich
Hydrogen tetrachloro aurate (HAuCl ₄)	AR	Sigma-Aldrich
Nafion® 117 solution (~5%)	AR	Sigma-Aldrich
Poly(dimethylsiloxane) and PDMS (Sylgard® 184)	-	Dow Corning
Uric acid (C ₅ H ₄ N ₄ O ₃)	AR	Acros
D(+)-glucose	AR	Sigma-Aldrich
Multiwall carbon nanotubes, MWCNT (95%)	-	NanoLab

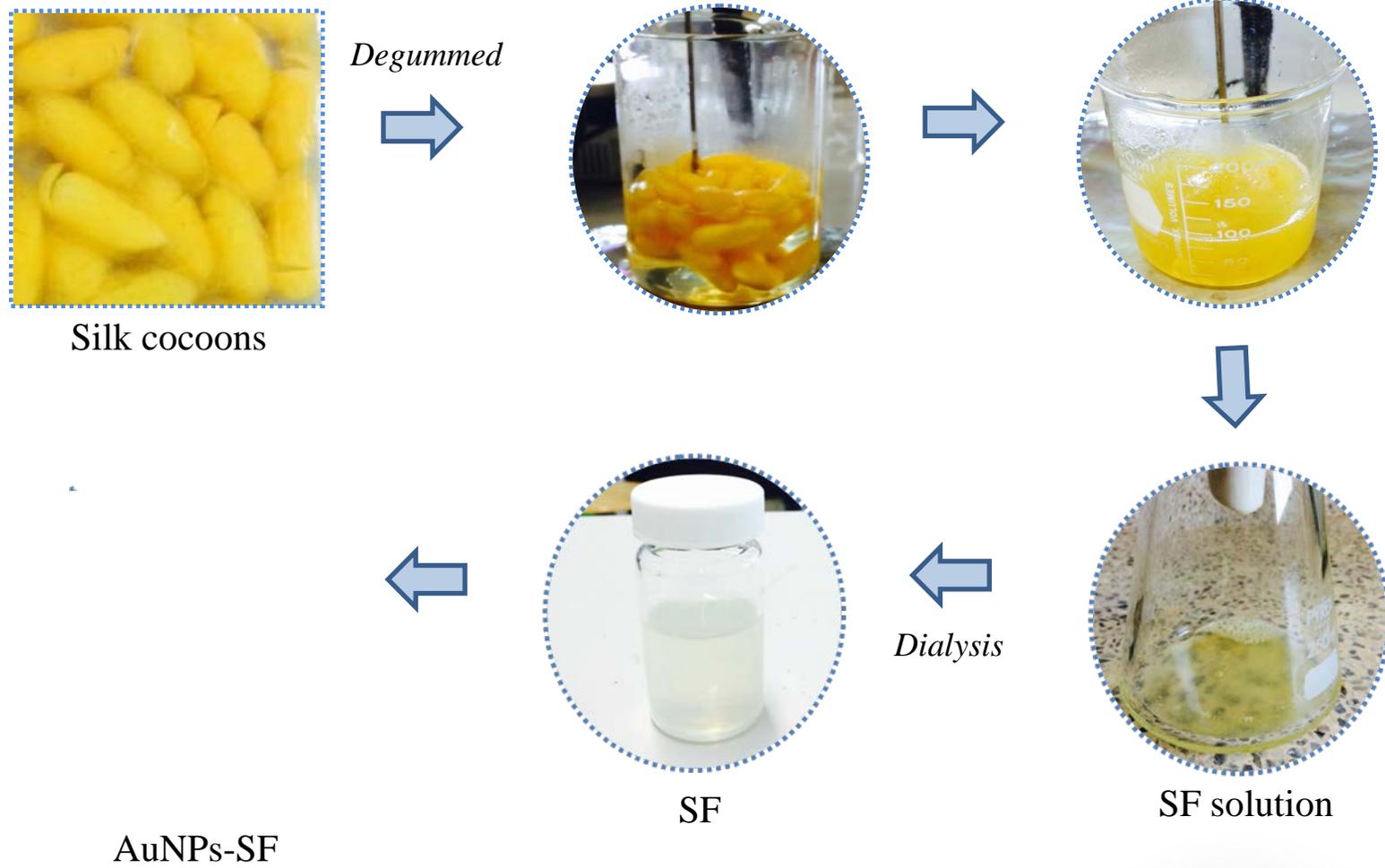
3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 การเตรียมไฟโบรอินจากรังไหม

รังไหม (silk cocoons) ที่ใช้ในการทดลอง จากจังหวัดศรีสะเกษ แสดงดังรูปที่ 3.5 วิธีในการแยกเซริซินและไฟโบรอินจากไหมรังไหม แสดงดังรูปที่ 3.6 โดยนำรังไหม 2 g มาลอกกาวไหมออกโดยนำไปต้มในสารละลาย 0.05% Na_2CO_3 ปริมาตร 200 mL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ $98-100^\circ\text{C}$ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง ผึ่งให้แห้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง จะได้ไหมที่ลอกกาวออกแล้ว (degummed silk) จากนั้นนำไหมที่ลอกกาวออกมาละลายในสารละลาย $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (mole ratio 1: 2: 8) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 98°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองลดความดันนำไปทำ dialysis ในน้ำเป็นเวลา 3 วัน จะได้สารละลาย silk fibroin (SF)



รูปที่ 3.5 รังไหม (silk cocoons) ที่ใช้ในการทดลอง จากจังหวัดศรีสะเกษ



รูปที่ 3.6 วิธีในการแยกเซรีซินและไฟโบรอินจากไหมรังไหม

3.2.1 การเตรียมอนุภาคทองคำนาโน-ไฟโบรอิน (AuNPs-SF)

นำสารละลาย HAuCl₄ ความเข้มข้น 6×10^{-3} M ปริมาตร 2 mL มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80°C จากนั้นเติมสารละลาย silk fibroin (SF) ความเข้มข้น 3% ปริมาตร 2 mL ที่ละลายพร้อมกับกวนสารละลายอย่างสม่ำเสมอด้วยแท่งแม่เหล็ก ปรับ pH ของสารละลายให้มีค่า 9-10 เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการรวมตัวกัน (aggregation) โดยใช้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 M จะได้สารละลายลายสีม่วงของ AuNPs-SF

3.2.2 การเตรียมสารละลายแนฟฟิออน (Nafion solution)

ปิเปตสารละลายแนฟฟิออน (Nafion® 117) ปริมาตร 1.00 mL ใส่ในขวดใส่สารปริมาตร 2 mL ทำให้เป็นเบสเล็กน้อยโดยเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 80 μ L (pH ของสารละลายมีค่าประมาณ 7-8)

3.2.3 การเตรียมสารละลายกลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase solution)

สารละลาย Stock solution ของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (200 mg/mL) เตรียมโดยชั่งเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.200X g มาละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) ปริมาตร 1.00 mL ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมวอร์เทก (Vortex mixer) เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที

สารละลายกลูโคสออกซิเดส (80 mg/mL) เตรียมโดยปิเปตสารละลาย stock solution ของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส มาปริมาตร 400 μ L ใส่ลงในหลอดใส่สารที่มีฝาปิดขนาด 1.00 mL เติมสารละลายแนฟฟิออน ปริมาตร 100 μ L และน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 500 μ L ผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมวอร์เทก ประมาณ 5-10 นาที

3.2.5 การเตรียม Fe₃O₄/CNTs

ชั่ง COOH-CNTs มา 10 mg เติมน้ำกลั่น 10 mL นำสารละลายที่ได้ไปสั่นด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม FeCl₃ · 6H₂O ลงไป 15 mg กวนสารละลายอย่างรุนแรงด้วยแท่งแม่เหล็ก 600 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที (ทำการทดลองภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน) จากนั้นเติม FeCl₂ · 4H₂O 20 mg กวนสารละลายอย่างรุนแรงด้วยแท่งแม่เหล็ก 600 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยดสารละลาย NH₃ (สารละลาย NH₃ เข้มข้น ปริมาตร 1 mL และน้ำกลั่น 5 mL) ลงในสารละลายอย่างช้าๆ ภายใน 1 ชั่วโมง ให้ความร้อน 60°C ทำปฏิกิริยาต่ออีก 2 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน นำสารที่ได้ไป centrifuged และ ล้างตะกอนด้วย ethanol และน้ำกลั่น ตามลำดับ นำของแข็งที่ได้มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ Fe₃O₄-CNTs

3.2.6 การเตรียมสารละลาย Fe₃O₄-CNTs-NiNPs

ชั่ง Fe₃O₄-CNTs มา 2 mg และ NiNPs มา 2 mg เติมลงใน 1%DMF ปริมาตร 1 mL นำสารละลายที่ได้ไปสั่นด้วยเครื่อง ultrasonic bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารละลาย Fe₃O₄-CNTs-NiNPs ความเข้มข้น 2 mg/mL

3.3 การเตรียมวัสดุโกลด์นาโนไฮดรอกไซด์

3.3.1 การทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าโกลด์คาร์บอน

ทำความสะอาดขั้วไฟฟ้าโกลด์คาร์บอน โดยขัดผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด ขัดขั้วไฟฟ้าโดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นด้วยเครื่องอัลตราโซนิกกับน้ำ DI เป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้งหดยดสารละลายคาร์บอนนาโน ทิวป์-โคโตซานคอมโพสิตบนขั้วไฟฟ้าโกลด์คาร์บอน 20 ไมครอลิตร ที่งัวในแห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การเตรียมขั้วไฟฟ้าชนิด GC/Fe₃O₄-CNTs

นำขั้วโกลด์คาร์บอน ที่ทำความสะอาดและแห้งแล้วนี้มาเตรียมขั้ว Fe₃O₄-CNTs/GC โดยหดยดสารละลาย Fe₃O₄-CNTs (2 mg/mL) 40 μ L ที่งัวจนขั้วไฟฟ้าแห้ง จะได้ขั้วไฟฟ้า Fe₃O₄-CNTs/GC

3.3.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าโกลด์เคลือบเซมิคอนดักเตอร์ GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs

นำขั้วโกลด์คาร์บอน ที่ทำความสะอาดและแห้งแล้วนี้มาเตรียมขั้ว Fe₃O₄-CNTs-NiNPs/GC โดยหดยดสารละลาย Fe₃O₄-CNTs-NiNPs (2 mg/mL) 40 μ L ที่งัวจนขั้วไฟฟ้าแห้ง จะได้ขั้วไฟฟ้า Fe₃O₄-CNTs-NiNPs/GC

3.3.4 การเตรียมขั้วไฟฟ้าชนิด GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs-GOx

หดยดสารละลายโกลด์ออกไซด์ (80 mg/mL) ที่เตรียมดังหัวข้อ 2.2.4 ปริมาตร 20 μ L ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs ที่งัวให้แห้งจะได้ขั้วไฟฟ้า GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs-GOx

3.3.5 การเตรียมขั้วไฟฟ้าโกลด์เคลือบเซมิคอนดักเตอร์ชนิด GC/Fe₃O₄-CNTs-SF-AuNPs-CS

หดยดสารละลาย SF-AuNPs ปริมาตร 40 μ L ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า Fe₃O₄-CNTs/GC ที่งัวให้แห้ง หดยดสารละลายโคโตซาน 0.25% ปริมาตร 20 μ L ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ที่งัวให้แห้ง จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/Fe₃O₄-CNTs-SF-AuNPs-CS

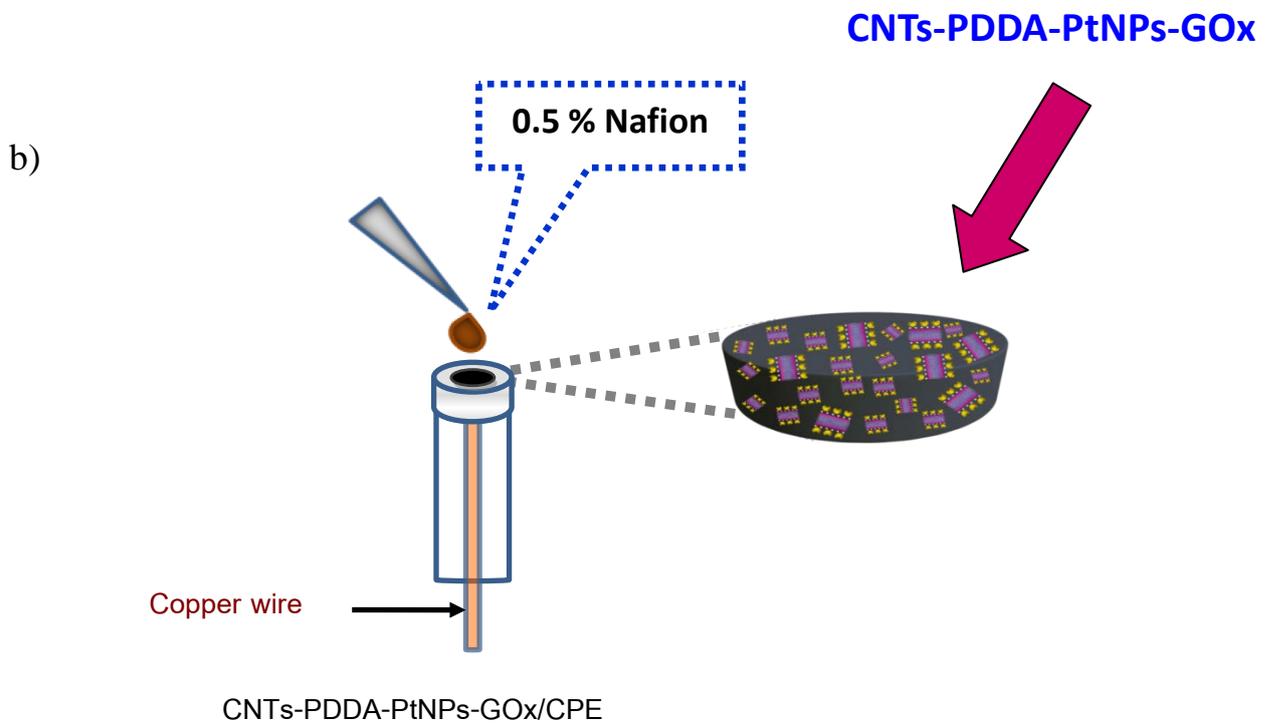
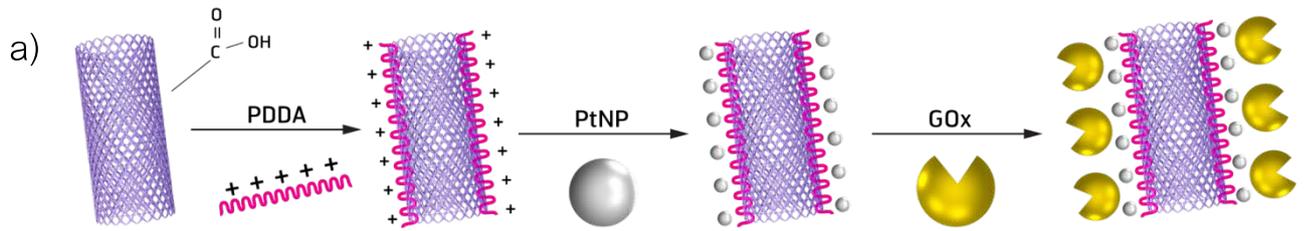
3.3.6 การเตรียมวัสดุโกลด์นาโนไฮดรอกไซด์ชนิด GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs/GOx/SF-AuNPs-CS

หดยดสารละลายโกลด์ออกไซด์ (80 mg/mL) ปริมาตร 20 μ L ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs ที่งัวให้แห้ง หดยดสารละลาย SF-AuNPs ปริมาตร 40 μ L ที่งัวให้แห้ง จากนั้นหดยดสารละลายโคโตซาน 0.25% ปริมาตร 20 μ L ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ที่งัวให้แห้ง จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/Fe₃O₄-CNTs-NiNPs/GOx/SF-AuNPs-CS

3.3.7 การเตรียมวัสดุโกลด์นาโนไฮดรอกไซด์ชนิด CNTs-PDDA-PtNPs-GOx/CPE

การเตรียมของผสม CNTs-PDDA-PtNPs-GOx และการสร้างขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเพลส carbon paste electrode แสดงดังรูปที่ 3.7 ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพลส (รูปที่ 3.7 b) จะใช้ท่อแก้ว ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน ขนาด 0.2 cm ยาวประมาณ 7.5 cm ใช้ลวดทองแดงเป็นตัวนำไฟฟ้าและติดกาวยิปซัมเพื่อติดให้อยู่ด้านในท่อ คาร์บอนเพลสที่โม่ดีฟายด์ด้วยวัสดุเชิงประกอบเตรียมโดย ชั่งของแข็งสัดส่วนดังนี้ ผงกราฟไฟต์ ปริมาณ 0.075x กรัม: ผง CNT-PDDA ปริมาณ 0.0125 กรัม: PDMS ปริมาณ 0.007 g: PtNPs

ปริมาตร 37.5 μL : GOx (200 mg/mL) ปริมาตร 40 μL : mineral oil ปริมาตร 30 μL). ผสมให้เข้ากันจนเกิดเป็นของผสมเนื้อเดียวกัน นำคาร์บอนเพสต์ที่เตรียมได้ไปบรรจุลงในช่องว่างปลายท่อ อัดให้แน่น และขัดให้ผิวหน้าเรียบโดยใช้กระดาษขึงสาร แผนภาพการสร้างสารประกอบ



รูปที่ 3.7 พัฒนาขั้วไฟฟ้ากลูโคสไปโอเซนเซอร์โดยใช้นาโนคอมโพสิตของ (a) CNTs-PDDA-PtNPs-GOx และ (b) การสร้าง CNTs-PDDA-PtNPs-GOx carbon paste electrode.