

คำนำ

น้ำตาลกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของร่างกาย การขาดแคลนหรือมีมากเกินไปเนื่องจากความผิดปกติของเซลล์ที่ใช้กลูโคสจะส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ เช่นโรคเบาหวาน (Diabetes) โรคความบกพร่องจากการขาดกลูโคส (Hypoglycemia) นอกจากนี้ น้ำตาลกลูโคสยังเป็นสารอาหารที่ขจัดเซกการขาดพลังงานอย่างเฉียบพลันของเซลล์ ซึ่งพบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในเรื่องดื่มเกลือแร่ชนิดต่างๆ

น้ำผึ้งเป็นสารให้ความหวานตามธรรมชาติที่ได้จากผึ้ง ลักษณะเป็นของเหลวค่อนข้างข้น มีสีเหลืองจนถึงน้ำตาล ผึ้งผลิตน้ำตาลโดยใช้น้ำหวานที่ได้จากดอกไม้ โดยเก็บไว้ในกระเพาะอาหารแล้วนำมาเก็บไว้ในรังผึ้ง น้ำตาลในน้ำผึ้งมีถึง 95-99 % ได้แก่ฟรุคโทส กลูโคส ที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปสร้างพลังงานได้ทันที น้ำผึ้งที่ดีควรมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 20-40 % น้ำผึ้งสามารถใช้เป็นสารแทนความหวานแทนน้ำตาลทั่วไปได้โดยเหมาะสำหรับบุคคลที่ไม่ต้องการควบคุมน้ำตาลมากนัก การมีปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งมากเกินไป จะทำให้การเก็บรักษาและอายุของน้ำผึ้งลดลง เนื่องจากรสชาติและกลิ่นของน้ำผึ้งเปลี่ยนไปเพราะกลูโคสที่มากเกินไปจะเป็นแหล่งพลังงานที่ทำให้จุลินทรีย์ทำงานเร็วขึ้น (Cavia *et al.*, 2002)

การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในน้ำผึ้งส่วนใหญ่ทำได้โดยอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างแพงเช่น HPLC-UV-Vis , ICP-AES (Cavia *et al.*, 2002; Ioannidou *et al.*, 2005) ทำให้การวิเคราะห์ทำได้ช้า ไม่สามารถทำในภาคสนามได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาเทคโนโลยีไอเซนเซอร์ในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้งเพื่อให้การวิเคราะห์ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความไวมากขึ้น เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปให้ชุมชนใช้ได้ และเป็นการทำให้อุปกรณ์ที่ผลิตน้ำผึ้งมีมาตรฐานมากขึ้นซึ่งได้จากวิธีการตรวจสอบที่ง่าย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์การวิจัยดังนี้

1. สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ
2. ทำคาร์บอนนาโนทิวบ์ให้บริสุทธิ์
3. สร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้มีราคาถูกสามารถทำในภาคสนามได้

ขอบเขตการวิจัย

ในการวิจัยนี้มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. สังเคราะห์ ศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำ
2. สร้างและทดสอบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน
3. ประกอบและสร้างเซนเซอร์โดยใช้กลูโคสออกซิเดส
4. ศึกษาผลของตัวแปรได้แก่ พีเอช, ศักย์ไฟฟ้าที่ให้, ปริมาณของอนุภาคนาโนทองคำ และ ปริมาณของไคโตซาน
5. ศึกษาคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์, ขีดจำกัดการตรวจวัด และค่าการทำซ้ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ตารางที่ 1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและดัชนีวัดความสำเร็จ

ประโยชน์	ดัชนีตัววัดความสำเร็จ
1. เทคโนโลยีใหม่	ไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่โดยใช้เทคโนโลยีพิมพ์สกรีน
2. องค์ความรู้ใหม่	2.1 การสังเคราะห์สารนาโนเทคโนโลยีแบบใหม่ 2.2 นาโนเทคโนโลยี-ไบโอคอมโพสิต
3. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	3.1 ชุมชนในท้องถิ่น 3.2 สถาบันการศึกษาต่างๆ
4. การผลิตนักศึกษา	ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาตรีจำนวน 1 คน
5. การตีพิมพ์ผลงานวิชาการ	ตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง
6. การนำเสนอผลงานในที่ประชุม	6.1 เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ 6.2 เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

นิยามศัพท์

Ag/AgCl = ขั้วไฟฟ้าชนิดซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์

AuNP = อนุภาคนาโนทองคำ

CE = ขั้วไฟฟ้านับ

e^- = อิเล็กตรอน

RE = ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

CNT = คาร์บอนนาโนทิวบ์

GOx = เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

m = เมตร

M = ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ (Molar)

MWCNT = คาร์บอนนาโนทิวบ์แบบผนังหลายชั้น

nm = ความยาวในหน่วยนาโนเมตร (10^{-9} เมตร)

PB = ปรีสเซ็นบลู

SPCE = ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx = กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

TEM = กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

WE = ขั้วไฟฟ้าทำงาน

UV-Vis = เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

%RSD = เปอร์เซนต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

λ = ความยาวคลื่น

μL = ปริมาตรในหน่วยไมโครลิตร

การตรวจเอกสาร

น้ำผึ้ง (Honey)

น้ำผึ้ง คือ เป็นของเหลวที่ผึ้งดูดเก็บจากต่อมน้ำหวานของพืชนำกลับไปแปรรูปและเก็บสะสมไว้ในรวงผึ้ง มีลักษณะเหลืองใสดังรูปที่ 1 น้ำผึ้งที่ผลิตออกมาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี มีความเข้มข้นสูงจนในที่สุดจะมีปริมาณน้ำเหลืออยู่ไม่เกินร้อยละ 20 ของน้ำหนัก ซึ่งระดับของความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่สมบูรณ์จะมีปริมาณน้ำตาล 79% ขึ้นไป



รูปที่ 1 น้ำผึ้ง (Wikipedia, 2012)

คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำผึ้ง

ที่อุณหภูมิ 20 C มีความถ่วงจำเพาะ = 1.4225 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

น้ำผึ้ง 3,785 มิลลิลิตร (1 แกลลอน)หนัก 5,375 กรัม

น้ำผึ้ง 0.453 กิโลกรัม (1 ปอนด์) มีปริมาตร 318.9 มิลลิลิตร

น้ำผึ้ง 0.453 กิโลกรัม (1 ปอนด์) ให้พลังงาน 1,380 แคลอรี

น้ำผึ้ง 100 กรัม ให้พลังงาน 303 แคลอรี

องค์ประกอบของน้ำผึ้ง

1. ปริมาณความชื้น น้ำผึ้งที่ดีควรมีปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 21
2. น้ำตาลของน้ำผึ้ง น้ำผึ้งเป็นแหล่งของสารอาหารคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ เพราะถ้าหักปริมาณน้ำหรือความชื้นออกเสียแล้ว ร้อยละ 95-99 ที่เหลือจะเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ชนิดที่สำคัญคือ น้ำตาลลิวูโลส (ฟรุกโทส) และเดกซ์โทรส (กลูโคส) ที่ผึ้งย่อยสลายจากน้ำตาลซูโครสในน้ำหวาน น้ำตาล

ทั้งสองชนิดซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปสร้างพลังงานได้ทันที นอกจากนี้ น้ำตาลทั้งสองชนิดแล้ว น้ำผึ้งยังประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส, มอลโทส, แล็กโทส และน้ำตาลอื่น ๆ รวม 17 ชนิด

3. กรดในน้ำผึ้ง เนื่องจากน้ำผึ้งมีรสหวานจัด รสเปรี้ยวของสภาพความเป็นกรดจึงถูกปิดบังเอาไว้ กรดในน้ำผึ้งมีหลายชนิด เช่น กรดฟอร์มิก อะซีติก มีวาร์ค ซิตรีค มาลิก และซัคซินิก กรดที่สำคัญที่สุดในน้ำผึ้งคือ กรดกลูโคนิก ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลเดกซ์โทรส ในน้ำผึ้งยังมีกรดอะมิโนถึง 16 ชนิด นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์ คือกรดฟอสฟอริก และกรดเกลือ

4. แร่ธาตุในน้ำผึ้ง ปริมาณแก้ว (ส่วนของแร่ธาตุต่างๆ) ในน้ำผึ้งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.17% ของน้ำหนักน้ำผึ้ง แร่ธาตุที่พบในน้ำผึ้ง ได้แก่ แคลเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม สังกะสี เหล็ก แมงกานีส

5. เอนไซม์ในน้ำผึ้ง เอนไซม์สำคัญที่สุดที่พบในน้ำผึ้ง คือ “อินเวอร์เทส” ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำหวานของดอกไม้ให้เป็นน้ำตาลแปรสภาพ คือ น้ำตาลเดกซ์โทรสและกลูโคส ในน้ำผึ้งมีเอนไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ “ไดเอสเทส” (หรืออัมยเลส) เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในน้ำผึ้งมี เอนไซม์คาตาเลส และฟอสฟาเทส และในรายงานล่าสุดพบว่าในน้ำผึ้งมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ กลูโคสออกซิเดส เป็นเอนไซม์จากฟาริงเกลกลแลนด์ของผึ้ง ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ “อินฮิบิท” ที่ทำหน้าที่ยับยั้งและทำลายเชื้อโรคได้

6. วิตามินในน้ำผึ้ง ในน้ำผึ้งมีวิตามินอยู่หลายชนิด ได้แก่ ไทอามีน (บี1), ไรโบฟลาวิน (บี 2), กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี), ไพริดอกซิน (บี 6), กรดแพนโทธิก, กรดนิโคตินิก หรือที่เรียกรวมกลุ่มว่า วิตามินบีคอมเพล็กซ์ ปริมาณวิตามินในน้ำผึ้งแต่ละชนิดแตกต่างกันตามที่มาของน้ำผึ้ง เดกซ์ทรินในน้ำผึ้ง เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นโซ่ยาว เป็นส่วนที่ทำให้ น้ำผึ้งข้นคอกและเคลือบผิว

7. สารแขวนลอยในน้ำผึ้ง สารแขวนลอย หมายถึง โมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดจากการรวมกลุ่มกันของโมเลกุลขนาดเล็ก และกระจายตัวอยู่ในของเหลวนั้น ๆ โมเลกุลของสารแขวนลอยจะไม่ตกตะกอน สารแขวนลอยส่วนใหญ่ในน้ำผึ้งจะเป็นเกสรดอกไม้ ทั้งที่ไม่ถูกน้ำย่อยย่อย และที่ถูกน้ำย่อยย่อยแล้วบางส่วน และพบว่ามีโปรตีน 4-7 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน ปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งจะมีอยู่ประมาณ 0.1% - 0.6%

8. อินฮิบิท หรือ คุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อโรคของน้ำผึ้ง สารอินฮิบิทมีผลต่อต้านเชื้อโรค เพราะมีการผลิต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปฏิกิริยาเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกลูโคสในแลคโตน โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส จึงมีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาบาดแผลสด ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก

ผลิตภัณฑ์ สารกระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวภาพอื่น ๆ ในน้ำผึ้ง ได้แก่ วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ ในน้ำผึ้ง นับว่าเป็นส่วนหนึ่งของสารที่กระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวภาพด้วย

องค์ประกอบโดยรวมของน้ำผึ้งสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง

องค์ประกอบพื้นฐาน	จำนวนเปอร์เซ็นต์	จำนวนกรัม
ฟรุกโตส (d-fructose)	38.19	173.20
เด็คโทรส (d-glucose)	31.28	141.90
ซูโครส (น้ำตาลทราย)	1.31	5.90
มอลโทส	7.31	33.20
น้ำตาลอื่นๆ	1.50	6.80
รวมปริมาณน้ำตาล	79.59	361.00
น้ำ (ความชื้น)	17.20	78.0
กรด	0.57	2.60
โปรตีน	0.26	0.20
แอส (ash)	0.17	0.80
อื่นๆ	2.21	10.00
รวม	100.00	453.60

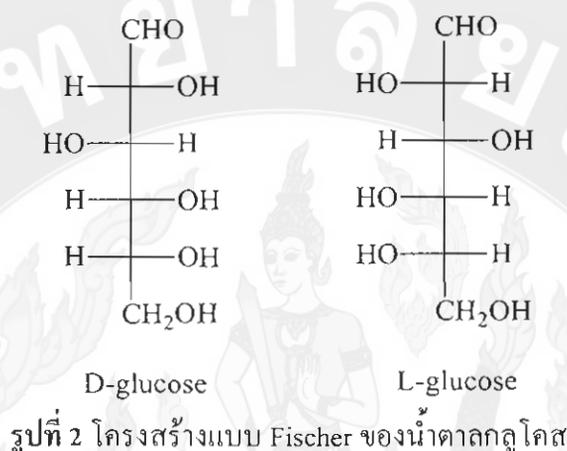
ประโยชน์ของน้ำผึ้ง

- บรรเทาอาการไอและหวัด
- ลดกรดในกระเพาะอาหาร ช่วยให้อาหารย่อยดีขึ้น
- แก้ความดันโลหิตสูง
- ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวพรรณและเส้นผม
- ช่วยคลายความเหน็ดเหนื่อยและอ่อนเพลีย

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)

น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และกลูโคสเป็น

หนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) โครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของกลูโคสมี 2 รูป คือ รูป L และ D ดังรูปที่ 2 กลูโคสนี้จะอยู่ในรูปที่เรียกว่า เดกซ์โตรส (dextrose) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะใช้ในในอุตสาหกรรมอาหาร



กลูโคสเป็นน้ำตาลที่พบได้ทั่วไปในรูปอิสระ โดยเฉพาะในส่วนต่างๆของพืชพบมากในผักผลไม้ น้ำผึ้ง และน้ำเลือดเป็นน้ำตาลที่สลายให้พลังงานมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต มีความหวานเป็นที่สองรองจากน้ำตาลฟรักโทส ทางการแพทย์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่ต้องการใช้อย่างรวดเร็ว เช่น ในคนป่วยที่อ่อนแอ น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลชนิดเดียวในกระแสเลือดของมนุษย์ที่ได้จากการย่อยคาร์โบไฮเดรตจึงเรียกว่า น้ำตาลในเลือด (blood sugar)

หน้าที่ของกลูโคส

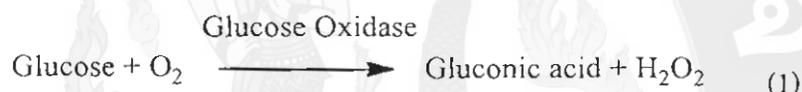
ทำหน้าที่หลัก 3 ประการในขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์คือ

1. เป็นแหล่งของคาร์บอนในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) กรดอะมิโน (amino acids) และสารประกอบอื่นๆ
2. ในกระบวนการเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) จะสามารถผลิต NADPH ซึ่งจำเป็นในขบวนการสังเคราะห์ไขมัน (Lipogenesis)
3. เป็นแหล่งพลังงานโดยตรง

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase : GOx)

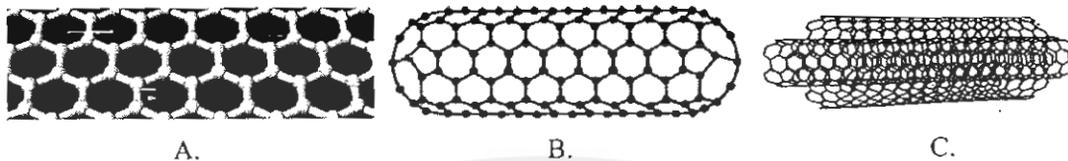
มีชื่อตามระบบคือ β -D-glucose : oxygen oxidoreductase : พบเมื่อปี ค.ศ. 1982 โดย Muller โดยสกัดจาก *Aspergillus* และ *Penicillium glaucum* เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ D-glucose ไปเป็น δ -D-gluconolactone ในสภาวะที่มีออกซิเจน เดิมมีการเรียกชื่อเอนไซม์นี้ว่า penicillium B, notatin และ glucose aerodehydrogenase และต่อมาได้มีการเสนอให้เรียกว่า glucose oxidase หรือใช้ตัวย่อว่า GOx

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับกลูโคสเท่านั้น จะจับกับกลูโคสแบบ lock and key ในไบโอเซนเซอร์เมื่อนำกลูโคสมาทำปฏิกิริยากับกลูโคสออกซิเดสจะได้กรดกลูโคนิกกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเมื่อเกิดปฏิกิริยากับกลูโคสจะกลายเป็นกรดกลูโคนิกดังสมการ (1)



คาร์บอนนาโนทิวส์และคุณสมบัติโดยทั่วไป

คาร์บอนนาโนทิวส์ (Carbon nanotube) คือรูปหนึ่งของคาร์บอนที่เกิดจากแผ่นกราฟีน (graphene) ม้วนตัวเกิดเป็นท่อขนาดนาโน (nanotube) ถ้าการม้วนตัวดังกล่าวเกิดเป็นท่อโดยใช้กราฟีนแผ่นเดียวจะเรียกว่าซิงเกิลวอลล์คาร์บอนนาโนทิวส์ (single-walled carbon nanotube ; SWCNT) หรือเกิดจากแผ่นกราฟีนหลายแผ่นม้วนตัวเกิดเป็นท่อขนาดนาโนเรียกว่ามัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวส์ (multi-walled carbon nanotube ; MWCNT) ดังรูปที่ 3 ทั้งซิงเกิลวอลล์และมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวส์แสดงคุณสมบัติเด่นทางด้านแสง เคมี กล ไฟฟ้า และไฟฟ้าเคมี (Rao *et al.*, 2004; Gogotsi, 2006) ด้วยการถูกละลายได้ดีและสามารถปรับปรุงพื้นผิว (surface) ของคาร์บอนนาโนทิวส์ได้ง่าย ทำให้มีการใช้คาร์บอนนาโน-ทิวส์ในแอปพลิเคชันด้านนาโนเทคโนโลยี ได้แก่ nanocomposite, nanotube-probe และ nanotube-proteins conjugates นอกจากนี้คาร์บอนนาโนทิวส์ยังถูกใช้ในแอปพลิเคชันด้านไบโอเทคโนโลยีโดยการติดหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides), เอนไซม์ (enzymes) และ โปรตีน (proteins) เพื่อให้ได้ความเลือกเฉพาะ (selectivity) มากขึ้น



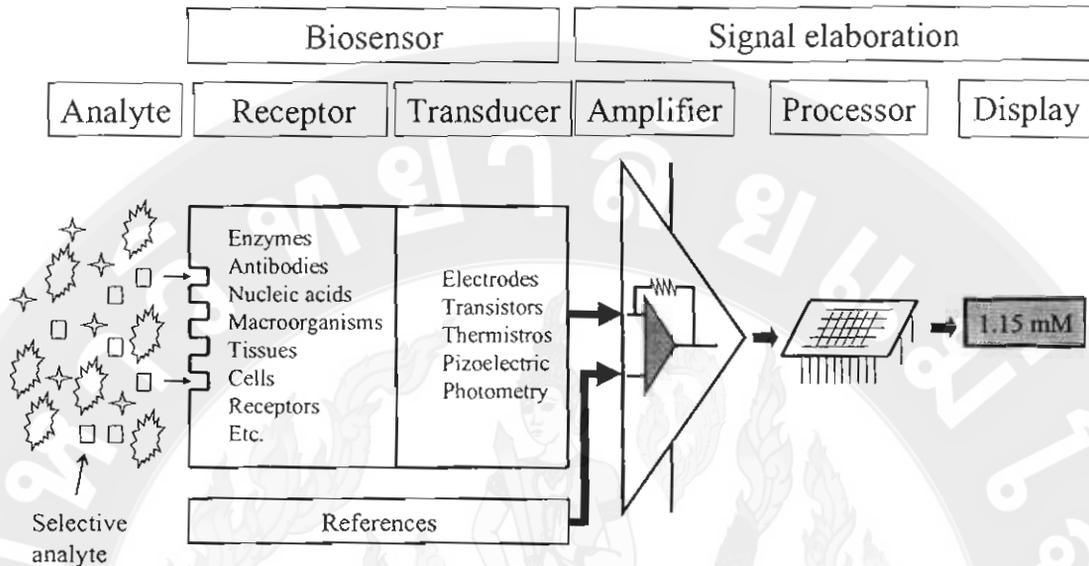
รูปที่ 3 แผ่นกราฟีน (grapheme sheet), B. ซิลิกลิวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (single-walled carbon nanotube) และ C. มัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (multi-walled carbon nanotube)

คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งของคาร์บอนนาโนทิวป์คือความเข้ากันได้ (compatibility) ของคาร์บอนนาโนทิวป์กับสารชีวภาพ (biomaterials) นำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ คอมโพสิต ชนิดต่างๆ เช่นการนำซิลิกลิวอลล์และมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ไปใช้ในการพัฒนาเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดกลูโคส ซึ่งทำให้เซนเซอร์ดังกล่าวมีอายุการใช้งานที่นานขึ้นโดยไม่เสียแอกติวิตีของเอนไซม์ ประสิทธิภาพที่ดีขึ้นของกลูโคสเซนเซอร์เกิดจากการเอนไซม์กลูโคสสามารถไหลคเข้าไปได้มากขึ้นและประสิทธิภาพของการเชื่อมต่อทางไฟฟ้าระหว่างชั้นของสารชีวภาพกับผิวสัมผัสของขั้วไฟฟ้าดีขึ้นกว่าการไม่มีคาร์บอนนาโนทิวป์ และเกิดองค์ความรู้ใหม่คือการค้นพบการขนถ่ายอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) ระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับขั้วไฟฟ้า เนื่องจากคาร์บอนนาโนทิวป์ได้เข้าไปอยู่ในบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ทำให้สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนได้โดยตรง นอกจากนี้ยังได้ก่อให้เกิดความเข้าใจถึงปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการพัฒนานาโนไบโอเซนเซอร์ (nanobiosensors) นาโนไบโอรีแอคเตอร์ (nanobioreactors) และเซลล์พลังงานชีวภาพขนาดนาโน (nanobio fuel cells) ต่อไปในอนาคต

ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี

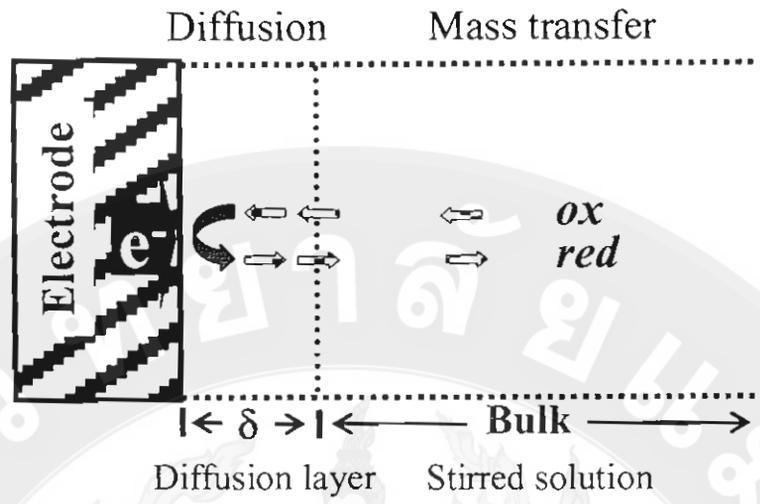
ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical biosensors) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของสารใดๆ โดยใช้สัญญาณที่ได้จากการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ มีความเลือกเฉพาะสูง มีความไวสูงเมื่อเทียบกับเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน (Kissinger, 2005; Luong *et al.*, 2008) คือ (1) ส่วนของสารทางชีวภาพ (biomaterials) ที่ทำหน้าที่จดจำ (recognition) หรือเลือกเฉพาะ (selection) สารตัวอย่างที่จะทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอย่างจำเพาะ ส่วนที่ (1) นี้จะถูกตรึง (immobilization) อยู่บนผิวหน้าของ (2) ทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งทรานสดิวเซอร์นี้จะทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณดังกล่าวไปยังส่วนประมวลผล (processor) เพื่อวัดหรือแสดงสัญญาณให้เราได้ทราบ (signal elaboration) ซึ่งจะ

ทำหน้าที่ในการวัดสัญญาณและแปลค่าออกมาเป็นหน่วยต่างๆ ที่ต้องการ ไบโอสเซนเซอร์นี้แสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครงสร้างของไบโอสเซนเซอร์ซึ่งประกอบไปด้วย (1) ส่วนของรีเซพเตอร์ที่เป็นสารชีวโมเลกุล และ (2) ทรานสดิวเซอร์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล

การเกิดกระแสทางไฟฟ้าเคมีนั้นสามารถอธิบายได้ง่ายๆ ดังรูปที่ 5 เริ่มจากการที่ตัวออกซิไดซิง (oxidizing species : *ox*) จากสารละลายบัลค์ (bulk solution) เคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของการแพร่ (diffusion layer : δ) ใกล้ๆ บริเวณผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่มีการจ่ายศักย์ไฟฟ้าจากเครื่องโพเทนชิโอสแตท ตัวออกซิไดซิง ซึ่งดังกล่าวจะรับอิเล็กตรอนที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเกิดเป็นตัวรีดิวซิง (reducing species : *red*) แล้วเคลื่อนที่ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเข้าสู่ชั้นของการแพร่และออกสู่สารละลายบัลค์ ปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องมือวัดคุมทางไฟฟ้าเคมีหรือเรียกว่าเครื่องโพเทนชิโอสแตท (potentiostat) และสามารถนำไปแปลผลได้ต่อไป



รูปที่ 5 ไดอะแกรมของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ลูกศร \leftarrow บอกทิศทางของการเคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าของตัวออกซิไดซิง (ox) และลูกศร \rightarrow บอกทิศทางการเคลื่อนที่ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าของตัวรีดิวซิง (red) ส่วนสัญลักษณ์ δ คือความหนาของชั้นของการแพร่

การตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคคอมโพสิต

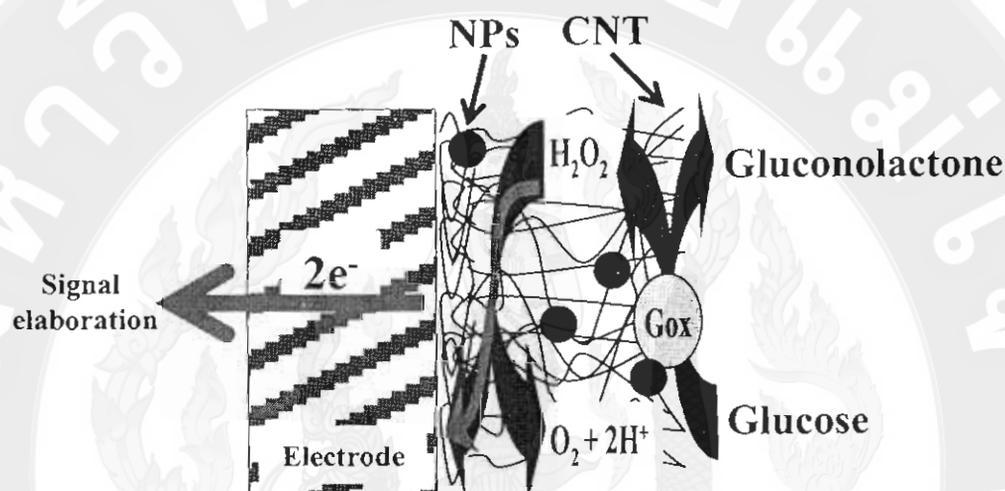
การปรับปรุงขั้วไฟฟ้าโดยเทคนิคคอมโพสิต เป็นการรวมองค์ประกอบของส่วนการรับรู้ (recognition) ร่วมกับส่วนซัพพอร์ต (supporting part) ต่างๆ ที่ทำให้การตรึงดังกล่าวมีความแข็งแรง (strength) มีความทนทาน (endurance) ให้สัญญาณดีขึ้น (signal enhancing)

การตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า สามารถทำได้โดยการผสมส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำไปตรึงด้วยเทคนิคที่เฉพาะ เช่น การตรึงโดยการยึดเกาะ (adsorption), การตรึงโดยวิธีโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerization), การตรึงโดยวิธีทำให้เกิดพันธะทางเคมี (chemical bonding), การตรึงโดยวิธีเคลือบ (entrapment) ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดี-ข้อเสียที่แตกต่างกัน การตรึงเอนไซม์ส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคการตรึงแบบการยึดเกาะเพราะจะทำให้เอนไซม์ยังคงดีสภาพการทำงานที่ดี สามารถเติมองค์ประกอบต่างๆ ที่สำคัญได้ง่าย ทำการตรึงได้รวดเร็ว และสามารถทำได้ในปริมาณมาก

การตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคคอมโพสิต

กลูโคสไบโอโอเซนเซอร์เป็นเซนเซอร์ที่ทำงานได้โดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้กลูโคโนแลกโตน (gluconolactone) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ที่เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับกลูโคส (Chen et al., 2008;

Crespilho *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; Luong *et al.*, 2008; Musameh *et al.*, 2008; Olea *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2008) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นี้จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าได้แก๊สออกซิเจนและโปรตรอนออกมา ดังรูปที่ 6 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น โดยอาศัยนาโนเทคโนโลยีเช่นคาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT) และอนุภาคนาโน (nanoparticles ; NPS)



รูปที่ 6 กลไกการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase : Gox) ตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube : CNT) และอนุภาคนาโน (nanoparticles : NPs) กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสแล้วได้กลูโคโนแลคโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดส์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

การเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจะให้กระแสไฟฟ้าออกมา ซึ่งปริมาณกระแสไฟฟ้างี้จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความสัมพันธ์กับกลูโคส ดังนั้นกระแสที่ได้จึงเป็นความสัมพันธ์กับกลูโคส ดังสมการ (2) (Lacourse, 1997; Settle, 1997)

$$i = \frac{nFADC}{\delta} \quad (2)$$

เมื่อ i คือกระแสไฟฟ้า, n คือจำนวนอิเล็กตรอนที่ใช้ในปฏิกิริยา, A คือพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้า, D คือสัมประสิทธิ์ของการแพร่, C คือความเข้มข้นของกลูโคส, δ คือความหนาของชั้นการแพร่

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาวัสดุโกลด์นาโนไอเซนเซอร์มีมาอย่างต่อเนื่อง โดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase ; GOx) ทำหน้าที่รับรู้ (recognition) กับกลูโคสที่มีอยู่ในสารละลาย มีการนำเทคโนโลยีและวัสดุต่างๆ เช่น เทฟลอน[®] (Teflon[®]), คาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT), แพลทินัมโซลเจล (Pt-sol-gel), ไคโตซาน (chitosan, CHIT), แนฟฟิออน[®] (nafion[®]), โพลีไพโรล (polypyrrole ; PPy), คาร์บอนนาโนทิวบ์-คาร์บอนเพสต์ (CNTPE), อนุภาคนาโนทองคำ (AuNP), อนุภาคแพลทินัมนาโน (PtNP) โดยนำอนุภาคเหล่านั้นตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าชนิดต่างๆ กัน เช่น กลาสคาร์บอน (GCE), กราไฟต์ (graphite), เบซอลเฟลนไฟโรลิติกกราฟต์ (BBPG) การปรับปรุงดังกล่าวทำประสิทธิภาพและคุณลักษณะของขั้วไฟฟ้าเช่นศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ขั้วไฟฟ้า (E_{applied}), ช่วงที่เป็นเส้นตรง (linear range), ความไว (sensitivity), ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection ; LOD), อายุการใช้งาน (useful lifetime), ค่าการยับยั้งของไมเซลล์ิส (K_M^{app}) แสดงได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ที่ได้จากการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าโดยใช้วัสดุที่แตกต่างกัน

Biosensor	E_{applied} (V)	Linearity (mM)	Sensitivity (mA M^{-1})	LOD (μM)	Useful life time	K_M^{app} (mM)	References
GOx-CNT-Teflon	+0.1	2-20					(Wang and Musameh, 2003)
GOx-CoNP-CNT-CHIT-GCE	-0.2 vs SCE	0.01-10		5			(Yang <i>et al.</i> , 2006)
PDDA/GOx/PDDA/CNT-GCE	-0.1 vs Ag/AgCl ^a	0.015-6		7	1 month ^b		(Liu and Lin, 2006)
GOx-Pt-sol-gel/CNT	+0.1	1-25	1.2				
(CNT-GOx) _n -graphite	+0.6	0.5-15	0.039	90	15 days ³		(Huang <i>et al.</i> , 2006)
GOx-CNT-CHIT	+0.4	up to 78	0.52		14 days ³		(Liu <i>et al.</i> , 2005)

Biosensor	E_{applied} (V)	Linearity (mM)	Sensitivity (mA M^{-1})	LOD (μM)	Useful life time	$K_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (μM^{-1})	References
Pd-GOx-Nafion-CNT	+0.3 vs Ag/AgCl	up to 12		150		8.2	(Lim <i>et al.</i> , 2005)
PPy/CNT/GOx-GCE	+0.9 vs Ag/AgCl	4-50	0.023	200			(Wang and Musameh, 2005)
CNTPE-GOx	-0.1	up to 25	0.013	600	3 months ^a		(Rubiane s and Rivas, 2003)
AuNP/CNT-GOx	+0.45	0.05-13	0.01	10	22 days		(Wang <i>et al.</i> , 2003)
Gox/PiNP/CNT/graphite	+0.6 vs SCE	0.1-13.5			3 weeks		(Tang <i>et al.</i> , 2004)
CNT-sol-gel-GOx/BBPG	+0.3 vs SCE	0.2-20	0.196	50		10.11	(Salimi <i>et al.</i> , 2004)
GOx/CHIT/Nafion-CNT/GCE	+0.7	up to 7.5	0.28	35			(Rivas <i>et al.</i> , 2007)

a = Flow injection stability

b = Storage stability

อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานการทำไบโอเซนเซอร์โดยใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนเป็นวัสดุใช้งาน จึงทำให้คณะผู้จัดทำโครงการนี้ เล็งเห็นว่าควรปรับปรุงด้วยขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนซึ่งสามารถผลิตขึ้นได้เอง สำหรับตัวอย่างที่จะนำไปใช้คือตัวอย่างน้ำผึ้ง ซึ่งจะเป็นการนำเทคโนโลยีนี้สู่ชุมชน เพื่อให้ชุมชน ได้ตระหนักและเพิ่มคุณภาพของน้ำผึ้งซึ่งเป็นสินค้าของจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีการตรวจวัดที่ง่ายและมีราคาถูก

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมีและอุปกรณ์

ในการทำการวิจัยนี้ได้จัดเตรียมสารเคมี ดังตารางที่ 4 เพื่อนำไปเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง หรือใช้ในการสังเคราะห์สารสำคัญ สำหรับนำมาปรับปรุงกลูโคสไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดหาปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 4 สารเคมี

ลำดับ	ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1.	Ascorbic acid	AR grade	May & Barker	England
2.	Carbon ink	-	Acheson	USA
3.	Multi-walled carbon nanotube	> 98.9%	Nanolab	USA
4.	Caffeine	AR grade	Sigma	USA
5.	D-glucose anhydrous (C ₆ H ₁₂ O ₆)	99.0%	Ajax Chemical	Australia
6.	Dimethylformamide (DMF)	HPLC	Ajax Chemical	Australia
7.	Disodium hydrogen orthophosphate (Na ₂ HPO ₄)	99.0%	Ajax Chemical	Australia
8.	Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	AR grade	Merck	Germany
9.	Ferric chloride anhydrous (FeCl ₃)	99.0%	Fluka	Switzerland
10.	Glucose oxidase (GOx) from aspergillus niger	100,000 – 25,000 units/g	Sigma	USA
11.	Gold (III) chloride trihydrate (HAuCl ₄)	49.0%	Sigma	USA
12.	Hydrochloric acid (HCl)	37.0%	Merck	Germany
13.	Nitric acid (HNO ₃)	70.0%	Ajax Chemical	Australia
14.	Potassium chloride (KCl)	99.5%	Merck	Germany
15.	Potassium ferricyanide (K ₃ Fe(CN) ₆)	99.0%	Ajax Chemical	Australia
16.	Silver/silver chloride ink	-	Acheson	USA
17.	Sodium dihydrogen orthophosphate (NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	99.0%	Ajax Chemical	Australia

ลำดับ	ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
18.	Trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	99.0%	Ajax Chemical	Australia

เครื่องมือและอุปกรณ์

ในการทำการวิจัยนี้ได้จัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญเพื่อใช้ในการทดลอง เช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร หรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในสารตัวอย่าง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

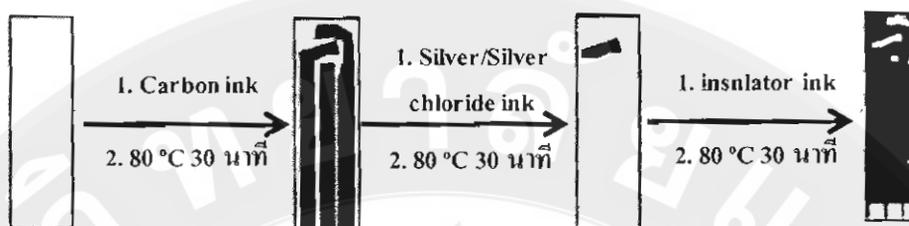
ลำดับ	ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/รุ่น	ประเทศ
4.	เครื่องชั่งตีตำแหน่ง	Mettler Toledo / pg 5002-s	Switzerland
5.	เครื่องไมโครเวฟ	Samsung / M181GN	Thailand
6.	เครื่องวัดคัมสัทซ์-กระแสไฟฟ้า	CH Instrument/CH1230A	USA
7.	เครื่องวัดกลูโคส	Medisense/optium xceed	USA
8.	เครื่องยิววีลบีลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	Hitachi / U-2900	Japan
9.	เครื่องอัลตราโซนิก	Labquip	England
10.	เตาอบ (Oven)	Gallenkamp	Germany

การประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน (Screen printed electrode preparation)

ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ได้สร้างขึ้นโดยใช้โปรแกรม CAD/CAM ในการออกแบบ ซึ่งขั้วนี้เป็นขั้วที่มี 3 ขั้วในพิมพ์เดียว โดยมีขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode; WE) เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 2.21 ตารางเซนติเมตร มีขั้วไฟฟ้าช่วยขนาดใหญ่กว่าขั้วไฟฟ้าทำงาน และมีขั้วไฟฟ้าอ้างอิงขนาดเล็กกว่าขั้วทำงาน ดังรูปที่ 7 วิธีการสร้างนี้ได้ใช้ตามวิธีของ Tangkauram (Tangkuaram *et al.*, 2007) สรุปได้ดังนี้คือ

1. สกรีนสีคาร์บอน (Carbon-ink) ลงไปบนแผ่น PVC เพื่อทำเส้นนำไฟฟ้า, ขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าช่วย
2. สกรีนคอลลอยด์เงิน/เงินคลอไรด์ (Ag/AgCl ink) เพื่อเป็นขั้วอ้างอิง
3. สกรีนทับด้วยสีฉนวน (Insulator ink) เพื่อกำหนดขอบเขตของขั้วไฟฟ้า

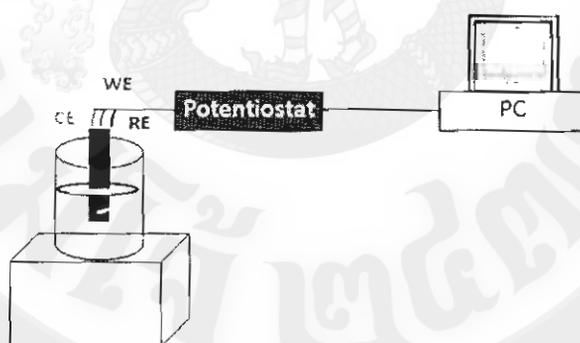
4. อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 °C



รูปที่ 7 ขั้นตอนการสร้างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน

การทดสอบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทำงานมาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยจัดการทดลองดังรูปที่ 8 ทำการวัดสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ จากนั้น ก็ทำการวัดโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ เพื่อหาขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ให้สัญญาณสูงที่สุด



รูปที่ 8 การจัดเซลล์สำหรับการทดลองด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี

การเตรียมทองคำนาโน (Gold nanoparticle)

นำ 0.010% ทองคลอไรด์ (HAuCl_4) มา 5.0 mL แล้วให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 1% ไตรโซเดียมซิติเรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ปริมาณ 18 μL ลงไปใน 0.01% ทองคลอไรด์ทั้ง 5 บีกเกอร์ จากนั้นให้นำทองคำนาโนทั้งหมดไปหาลักษณะทางกายภาพทางแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

การล้างคาร์บอนนาโนทิวป์ (Carbon nanotube purification)

ล้างคาร์บอนนาโนทิวป์มา 0.0300 g แล้วเติมกรดไนตริก (HNO_3) ลงไป 40.0 mL แล้วปิดด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปใส่ก๊าซ (sonicate) 10-12 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอีก 10-12 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ เทน้ำออกเอาเฉพาะตะกอน นำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำปราศจากไอออนจนเต็มบีกเกอร์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน วัดค่า pH ให้ได้ค่า ~ 7 แต่ถ้า $\text{pH} \neq 7$ ทำการตกตะกอนไปเรื่อยๆ จนได้ $\text{pH} \sim 7$ เมื่อได้ $\text{pH} \sim 7$ เทน้ำออกให้เหลือเฉพาะตะกอน แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 90°C

การเตรียมสเลอรี คาร์บอนนาโนทิวป์ (Carbon nanotube slurry preparation)

นำคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ได้จากข้อ 2.3.2 มา 2 mg เติม DMF ลงไป 1 mL จากนั้นก็นำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ในขวดปิด ก่อนนำมาใช้ต้องทำการเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกทุกครั้ง

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.4

1. เตรียม 0.2 M Dibasic sodium phosphate (สาร A)

ชั่ง Na_2HPO_4 มา 7.1 g ละลายด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 250 mL

2. เตรียม 0.2 M Monobasic sodium phosphate (สาร B)

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ต้องชั่งมา 7.80 g ละลายด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 250 mL

3. เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

นำสาร A มา 40.5 mL + สาร B มา 9.5 mL ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 100 mL ในขวดวัดปริมาตร 100 mL จะได้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M pH 7.4

การเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์

การเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) ทำได้โดยการตรึงคาร์บอนนาโนทิวป์-โกลโคซานบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคการเกาะติดด้วยไฟฟ้า (Electrodeposition) หลังจากนั้นจึงทำการตรึงด้วยปรัสเซียนบลู (Prussian blue) โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า -2.0 V ด้วยเครื่องเครื่องวัดคุมศักย์กระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นจึงทำการตรึงต่อด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้เอนไซม์เข้มข้น 3 mg L^{-1} ปริมาตร $30 \mu\text{L}$ รอให้แห้ง แล้วจึงตรึงทับด้วยอนุภาคนาโนทองคำ จะได้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พร้อมใช้งาน

การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

นำกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาไปตรวจวัดหาปริมาณของกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้จากหลายๆ ยี่ห้อ โดยไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัด



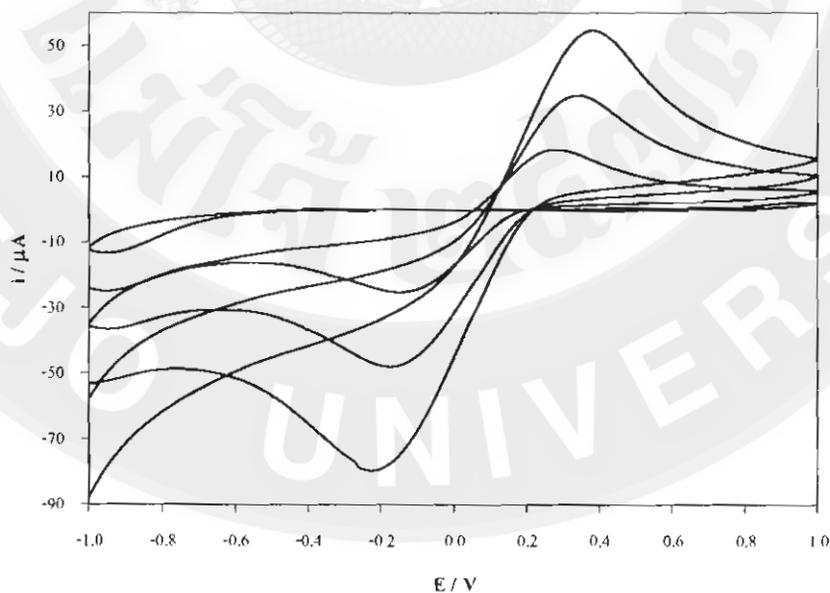
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การสร้างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน

นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทำงานแบบสี่เหลี่ยมที่ประดิษฐ์ได้ดังรูปที่ 9 มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ทำการวัดสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับโดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วยเป็นโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยสแกนศักย์ไฟฟ้าในช่วง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ ที่อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 10



รูปที่ 9 การออกแบบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแบบสี่เหลี่ยม



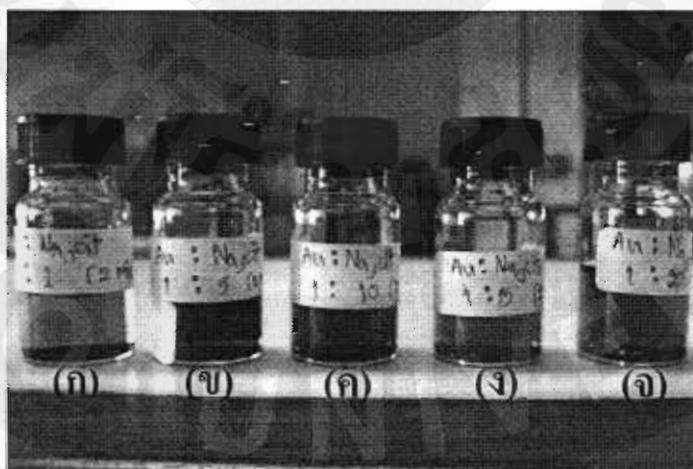
รูปที่ 10 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน โดยทดลองในสารละลายของโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ความเข้มข้น ก) 0.0 ข) 10.0 ค) 20.0 และ ง) 30.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย

จากรูปที่ 10 พบว่าความสูงของกระแสฟลักซ์ที่ได้จากขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน มีความสอดคล้องในแง่ของความสูงของกระแสแอโนดิกและกระแสแคโทดิก ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างกระแสฟลักซ์กับความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอเรตมีความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปตามสมการของ Randles-Sevcik [(Wang, 2006)]

การเตรียมสารละลายทองคำนาโน

ผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีของทองคำนาโน

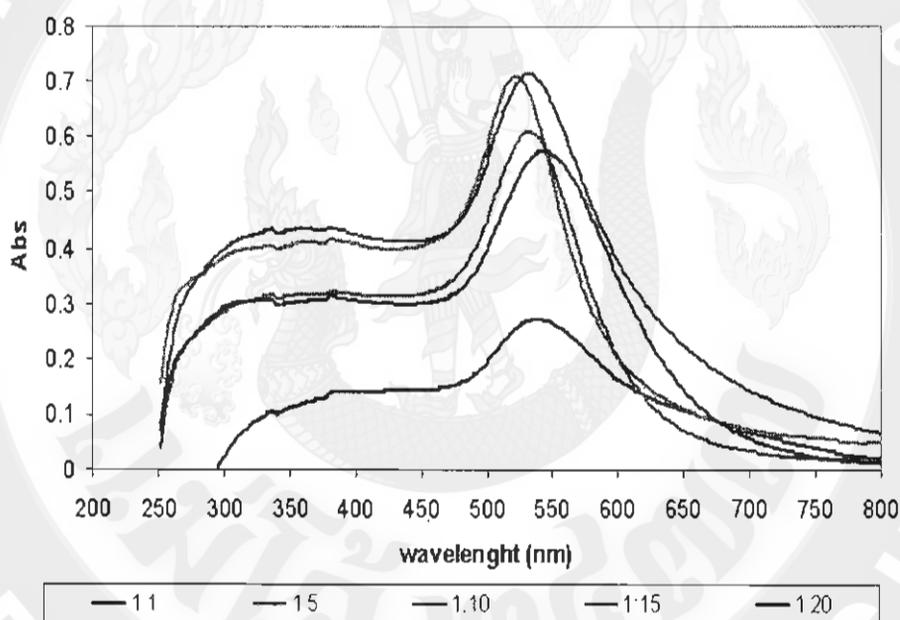
สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:1 และ 1:20 ดังรูปที่ 11 ก และ รูปที่ 11 จ ตามลำดับ ให้สารละลายสีม่วงอ่อนเกิดเป็นทองคำนาโนยังไม่สมบูรณ์และไม่เสถียร สืบเนื่องจากการตั้งสารละลายทองคำนาโนนี้ไว้เป็นเวลานานๆ จะเกิดเป็นตะกอนเกิดขึ้น ส่วนสารละลายทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:5 และ 1:10 ดังรูปที่ 11 ข และรูปที่ 11 ค ตามลำดับ มีสีแดงเชอร์รี่จะเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Tangkuarlam et.al [1] และสารละลายทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:15 ดังรูปที่ 11 ง มีสีแดงอ่อนเนื่องจากยังเกิดเป็นทองคำนาโนยังไม่สมบูรณ์เพราะปริมาณตัวรีดิวซ์ของไตรโซเดียมซิเตรตมีปริมาณมากเกินไป



รูปที่ 11 สารละลายของทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20

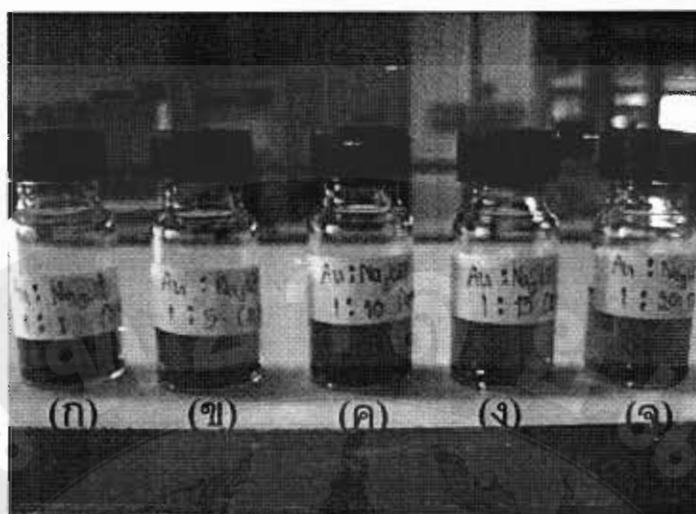
จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปก

โพรโทมิเตอร์ พบว่าสารละลายทองขนาดนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร สอดคล้องกับผลของ Tangkuaram et.al [1] และการให้ความร้อนตอนสุดท้ายที่เวลา 2 นาที อัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด (Abs=0.271) และที่อัตราส่วน 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (Abs=0.713) ส่วนที่อัตราส่วน 1:5, 1:15 และ 1:20 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.710, 0.609 และ 0.574 ตามลำดับ ดังรูปที่ 12 ซึ่งจากผลการทดลองนี้ พบว่าที่อัตราส่วนต่ำปฏิกิริยายังเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์จึงมีค่าการดูดกลืนแสงน้อย เมื่อเพิ่มอัตราส่วนมากขึ้นอีกค่าการดูดกลืนแสงก็จะเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งอัตราส่วน 1:10 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดและเกิดเป็นทองขนาดนาโน จากนั้นค่าการดูดกลืนแสงก็จะลดลงเมื่อมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากปริมาณตัวรีดิวซ์ของ ไตรโซเดียมซิเตรดมีปริมาณมากเกินไปทองขนาดนาโนจึงลดลง



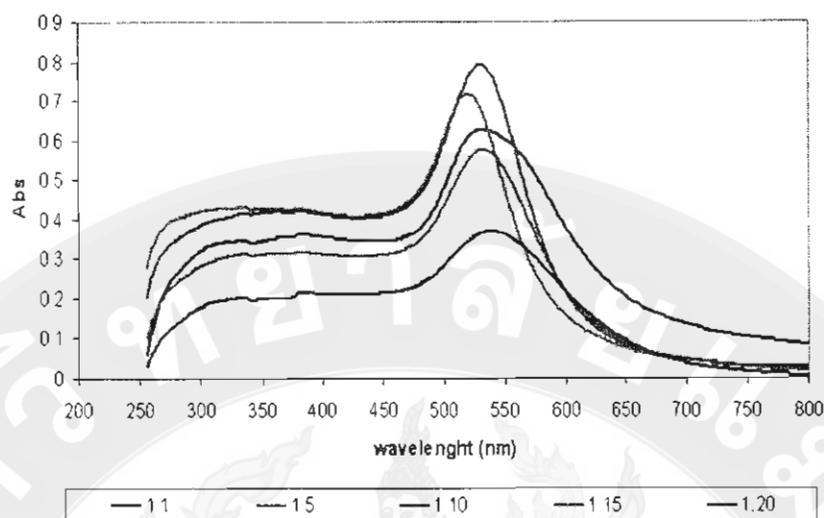
รูปที่ 12 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำไรด์:ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที

สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1 และ 1:20 ดังรูปที่ 13ก และ รูปที่ 13จ ตามลำดับ ให้สารละลายสีม่วงอ่อนเกิดเป็นทองคำนาโนยังไม่สมบูรณ์และไม่เสถียร ส่วนสารละลายทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:5, 1:10 และ 1:15 ดังรูปที่ 13ข, 13ค และรูปที่ 13ง ตามลำดับ มีสีแดงเชอร์รี่จะเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์เนื่องจากการเติมตัวรีดิวซ์ของ ไตรโซเดียมซิเตรดในปริมาณที่เหมาะสม



รูปที่ 13 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20

จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารละลายทองคำนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร และพบว่าการให้ความร้อนตอนสุดท้ายที่เวลา 4 นาที อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ($Abs=0.370$) และที่อัตราส่วน 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ($Abs=0.792$) ส่วนที่อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:15 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.627, 0.719 และ 0.578 ตามลำดับ ดังรูปที่ 14 ซึ่งพบว่าที่อัตราส่วนต่ำก็จะให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อย เมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้นอีกถึงค่าหนึ่งก็จะทำให้เกิดเป็นทองขนาดนาโนที่มีสีแดงเชอร์รี่ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนขึ้นอีกค่าการดูดกลืนแสงก็จะลดลงเนื่องจากมีปริมาณตัวรีดิวซ์ของไตรโซเดียมซิเตรดมีปริมาณมากเกินไปทองขนาดนาโนจึงลดลง



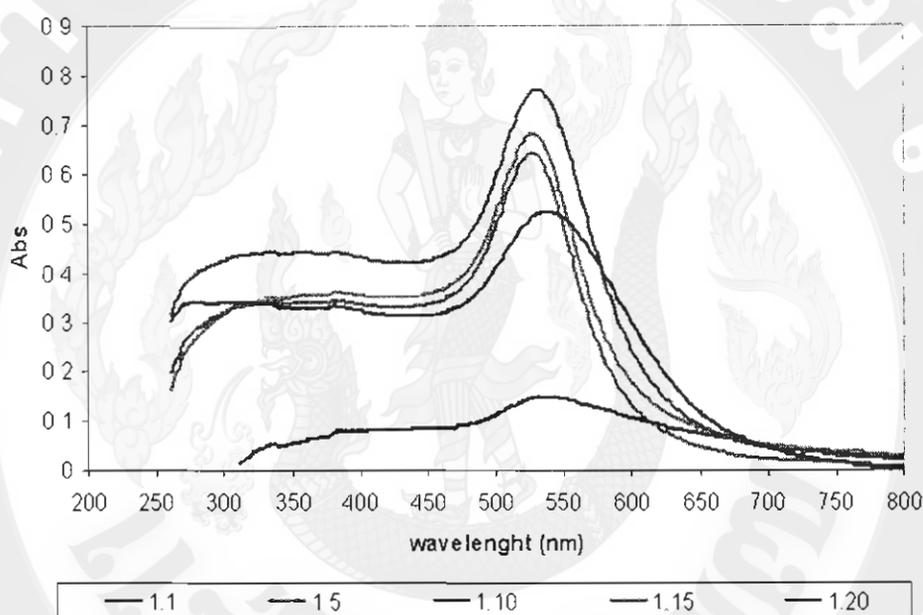
รูปที่ 14 ยูวิสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์:ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 4 นาที

สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 6 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ :ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:5, 1:10 และ 1:15 ดังรูปที่ 15ข, 15ค และ 15ง ตามลำดับ ให้สารละลายเป็นสีแดงเชอร์รี่ซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์ ส่วนสารละลายทองคำนาโนในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ :ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:1 และ 1:20 ดังรูปที่ 15ก และ 15จ ตามลำดับ เป็นสารละลายสีม่วงซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนไม่สมบูรณ์ซึ่งให้ผลเหมือนกับสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 และ 4 นาที



รูปที่ 15 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 6 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ :ไตรโซเดียมซิเตรตที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20

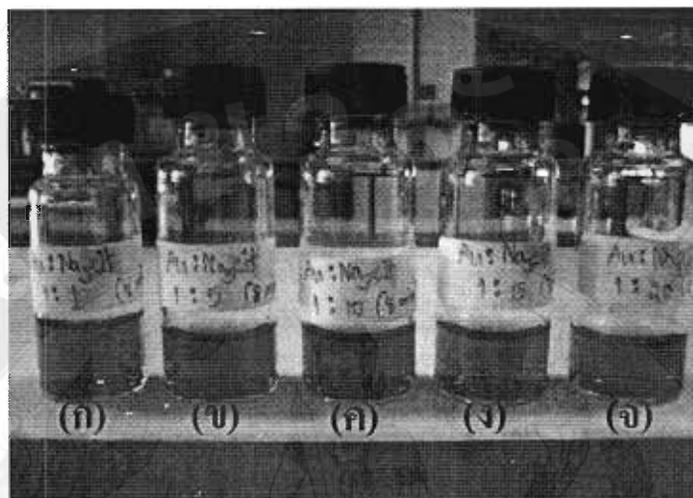
จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารละลายทองคำนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร และพบว่าการให้ความร้อนจนสุดท้ายที่เวลา 6 นาที อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด (Abs=0.148) และที่อัตราส่วน 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (Abs=0.770) ส่วนที่อัตราส่วน 1:5, 1:15 และ 1:20 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.681, 0.642 และ 0.524 ตามลำดับ ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 6 นาที

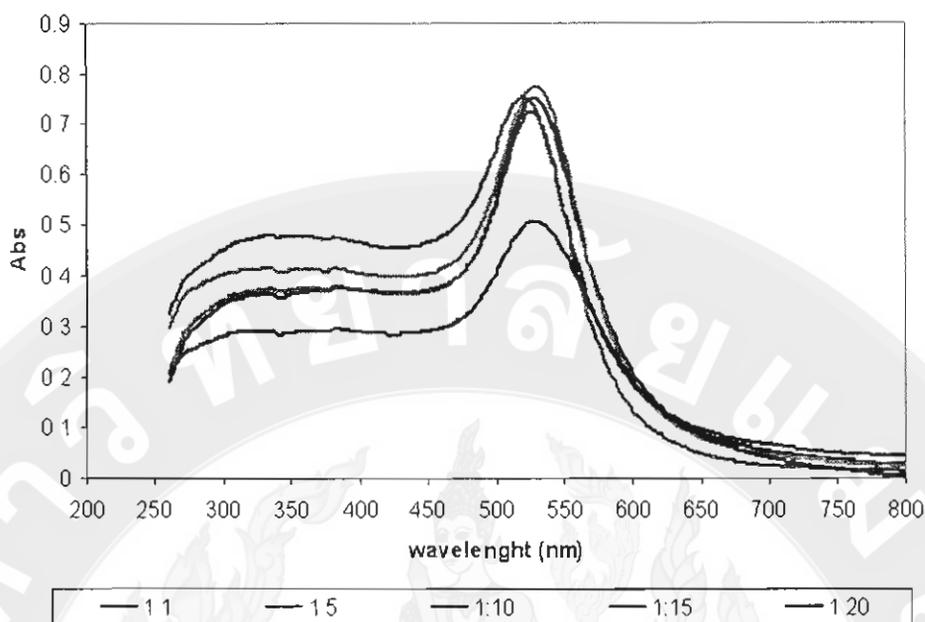
สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 8 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10 และ 1:15 ดังรูปที่ 17ก, 17ข, 17ค และ 17ง ตามลำดับ ให้สารละลายเป็นสีแดงเชอร์รี่ซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์ ส่วนสารละลายทองคำนาโนในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:20 ดังรูปที่ 17จ เป็นสารละลายสีม่วงเข้มซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนไม่สมบูรณ์ ซึ่งผลการทดลองนี้พบว่าสารละลายทองคำนาโนนี้มีสีใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 17 อาจเนื่องมาจากเวลาที่ให้ความร้อนมากขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ขึ้น โดยทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดเป็น 1:5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ดังนั้นเวลาจึงมีผลต่อการสังเคราะห์ทองคำนาโน ถ้าใช้เวลาในการให้ความร้อนนานอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดในปริมาณน้อยก็สามารถทำให้เกิดเป็นทองคำนาโนได้แต่ถ้าใช้เวลาในการ

ให้ความร้อนเร็วก็ต้องเพิ่มปริมาณของอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตมากขึ้นจึงจะเกิดเป็นทองคำขนาดนาโน



รูปที่ 17 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 8 นาที

จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 8 นาทีในอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารละลายทองคำขนาดนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร และพบว่าการให้ความร้อนจนสุดท้ายที่เวลา 2 นาที อัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตที่ 1:20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ($Abs=0.508$) และที่อัตราส่วน 1:5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ($Abs=0.776$) ส่วนที่อัตราส่วน 1:1, 1:10 และ 1:15 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.752, 0.754 และ 0.723 ตามลำดับ ดังรูปที่ 18

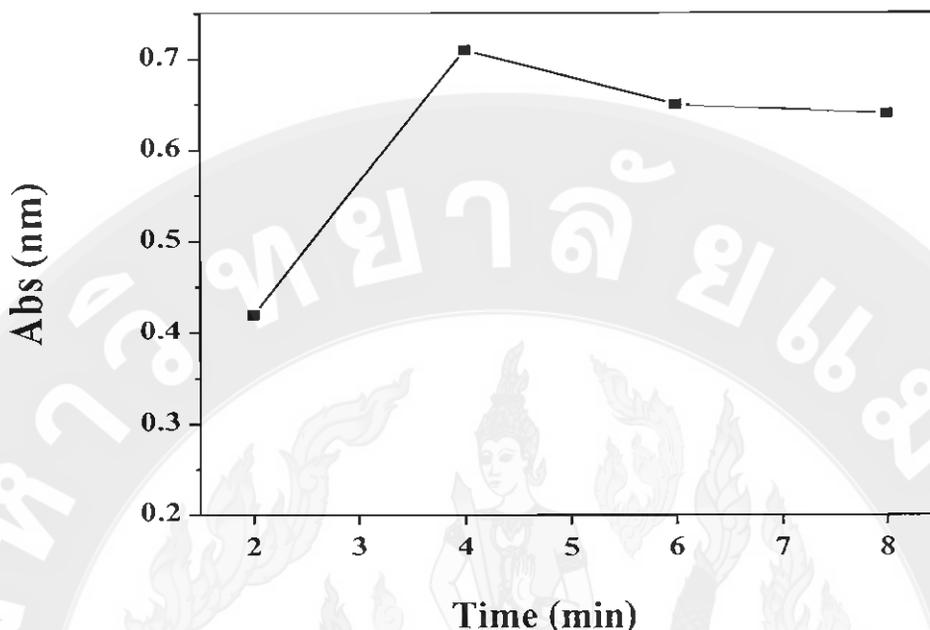


รูปที่ 18 ยูวีสเปกตรัมของทองขนาดนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตเป็น 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 8 นาที

การดูดกลืนแสง (Abs) กับเวลาในการสังเคราะห์ทองขนาดนาโนโดยใช้ทองคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตในอัตราส่วนโมล 1:10

การสังเคราะห์ทองที่ใช้อัตราส่วนของทองคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่อัตราส่วน โมลเป็น 1:10 ที่ให้ความร้อนในตอนสุดท้ายเป็นเวลา 4 นาที ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วน 1:1, 1:5, 1:15 และ 1:20 ในการทดลองต่อมาจึงได้นำทองขนาดนาโนที่ได้ในอัตราส่วน 1:10 มาทดลองต่อโดยเพิ่มเวลาของการให้ความร้อนจาก 2 นาที ถึง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นหาความสูงของพีคแล้วนำไปพลอตกราฟระหว่างเวลากับค่าความสูงของพีคที่ได้จะ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 19

จากการทดลองพบว่าเวลาต่ำสุดที่ 2 นาที ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่สมบูรณ์ (Abs=0.433) ส่วนที่เวลา 4 นาที ให้ค่าความสูงของพีคมากที่สุด (Abs=0.702) เนื่องจากที่เวลา 4 นาทีทำให้เกิดเป็นทองนาโนและมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดรวมทั้งเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ และที่เวลา 6 นาที และ 8 นาที มีค่าความสูงของพีคเริ่มลดลงเล็กน้อย เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วที่ 4 นาที ทำให้การเพิ่มเวลาให้ความร้อนมากขึ้นไม่ได้ทำให้จำนวนอนุภาคของทองนาโนมากขึ้น

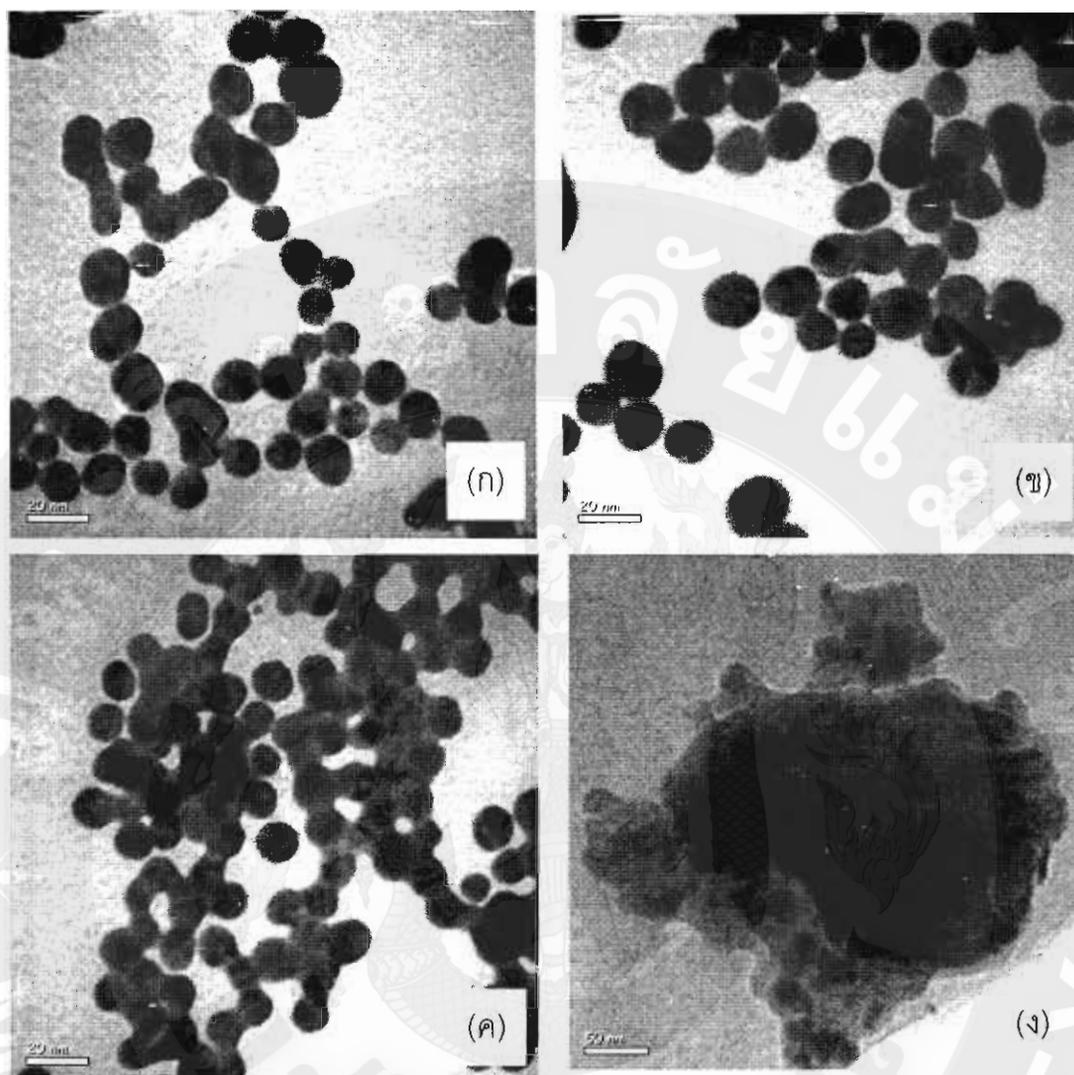


รูปที่ 19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคกับเวลาในการสังเคราะห์ทองคำขนาดนาโนโดยใช้ทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตในอัตราส่วน โมล 1:10

จากผลการทดลองทองคำขนาดนาโนทั้งหมดพบว่าทองคำขนาดนาโนที่ให้ความร้อนครั้งสุดท้ายที่เวลา 4 นาที ที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด และการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ 520 นาโนเมตร ซึ่งเป็นพีคเฉพาะของทองคำขนาดนาโนและสอดคล้องกับผลของ Tangkuaram [(Tangkuaram *et al.*, 2007)] และสารละลายทองคำขนาดนาโนที่ได้ก็เป็นสีแดงเชอร์รี่ ดังนั้นจึงเลือกมาปรับปรุงอิเล็กทรอนิกส์

ผลการวัดขนาดอนุภาคนาโนทองคำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การนำทองคำขนาดนาโนที่สังเคราะห์ไปศึกษาขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน โดยนำอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ที่อัตราส่วน 1 : 10 ของทองคำคลอไรด์ต่อไตรโซเดียมซิเตรต โดยใช้เวลาการสังเคราะห์ตั้งแต่ 2 – 10 นาที พบว่าได้ผลจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ดังรูปที่ 20 ก-ง โดยพบว่า อนุภาคนาโนทองคำมีขนาดเป็นทรงกลม (รูปที่ 20 ก-ค) ส่วนที่เวลา 10 นาที ไม่สามารถหาขนาดได้ (รูปที่ 20 ง) ขนาดของอนุภาคทองคำขนาดนาโนมีขนาด 16 นาโนเมตร (รูปที่ 20 ข)

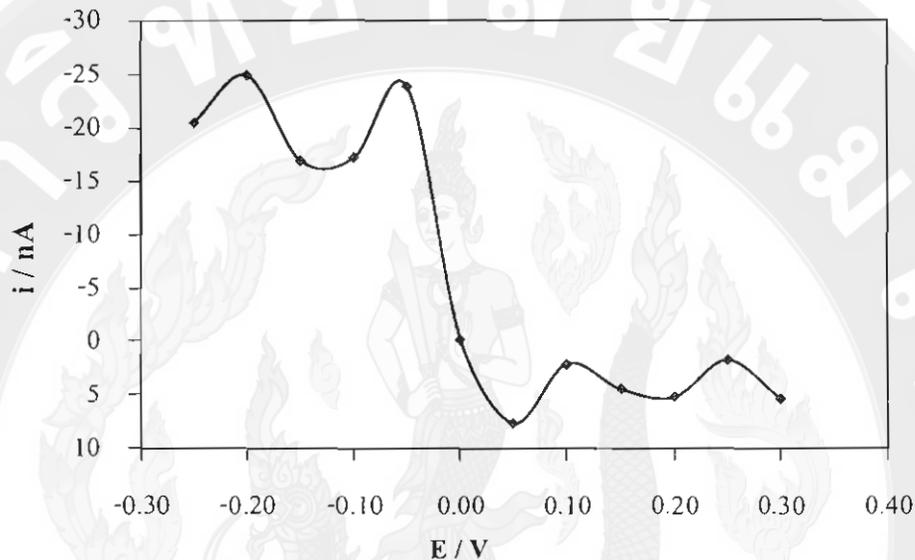


รูปที่ 20 อนุภาคนาโนทองคำจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ที่อัตราส่วนการสังเคราะห์ของคลอไรด์ต่อไตรโซเดียมไซเตรต 1 : 10 โดยทำที่สภาวะการให้ความร้อน (ก) 2 นาที (ข) 4 นาที (ค) 6 นาที และ (ง) 10 นาที กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ใช้กำลังไฟฟ้า 75 kV และกำลังขยาย 200,000 เท่า

ผลของศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมาประกอบตั้งบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ที่ตรึงด้วยสารตัวกลาง (mediator) คือ ปรัสเซียนบลู (prussian blue) และใช้โกลโคซานทำหน้าที่เป็นสารที่กักขังไว้ไม่ให้เอนไซม์หลุดออกไป และทำการศึกษาดัชนีประสิทธิผลต่อสัญญาณที่ได้คือผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในเกิดปฏิกิริยา (Operation applied potential) โดยทดสอบในสารละลายของกลูโคสเข้มข้น 10 mM ได้ผลดังรูปที่ 21 ซึ่งพบว่าศักย์ไฟฟ้าที่ -0.25 V จนกระทั่งถึงศักย์ไฟฟ้าที่ -0.05 V ให้กระแสไฟฟ้า

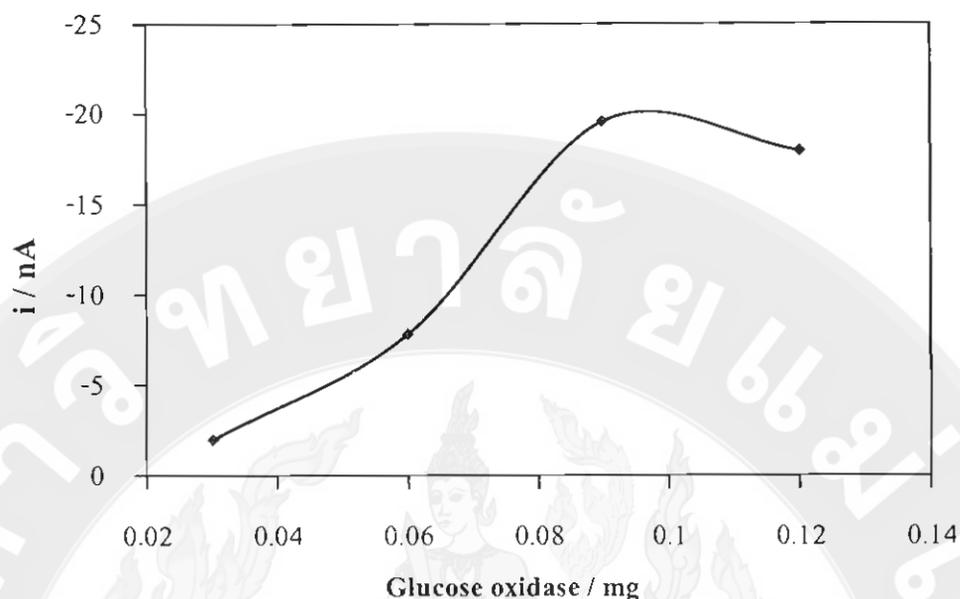
คงที่ ที่ประมาณ -23 nA หลังจากนั้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็น 0.0 V พบว่ากระแสลดลงอย่างรวดเร็วจนคงที่ (คิดเฉพาะ amplitude) ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.05 V ได้กระแสไฟฟ้า $+8 \text{ nA}$ และกระแสคงที่ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มศักย์ไฟฟ้าขึ้นอีกก็ไม่ทำให้ได้กระแสที่สูงขึ้นเนื่องจากถึงสภาวะคงที่ (steady state) ของการเร่งปฏิกิริยาของปรอทเขียนบลูต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Karyakin [2] ดังนั้นจึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ -0.05 V เป็นศักย์ไฟฟ้าที่ใช้งานต่อไป



รูปที่ 21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสไบโอเซนเซอร์กับปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

หาศึกษาตัวแปรปริมาณของกลูโคสออกซิเดส

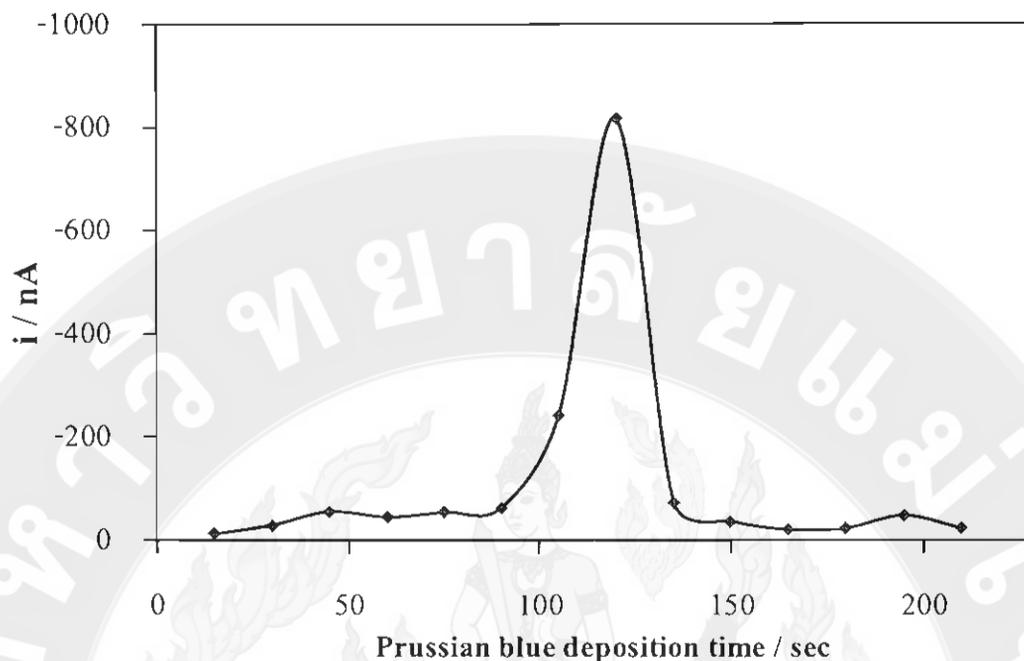
ทำการศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยนำเอนไซม์ดังกล่าวไปตรึงบนกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่ปริมาณต่างๆ กันคือ 0.03 mg , 0.06 mg , 0.09 mg และ 0.12 mg และนำไปวัดปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 mM หลังจากนั้นจึงนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับความเข้มข้นได้ผลดังรูปที่ 22 ซึ่งพบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.03 mg พบว่า ให้กระแสเพียง 2 nA หลังจากเพิ่มปริมาณของกลูโคสออกซิเดสมากขึ้น จะ ได้กระแสมากขึ้น จนกระทั่งได้กระแสสูงที่สุดเมื่อใช้เอนไซม์ 0.09 mg หลังจากนั้นกระแสเริ่มคงที่ ในการเลือกใช้เอนไซม์ จึงเลือกใช้ 0.09 mg ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V

ศึกษาผลของเวลาในการตรึงปรุสเซียนบลู

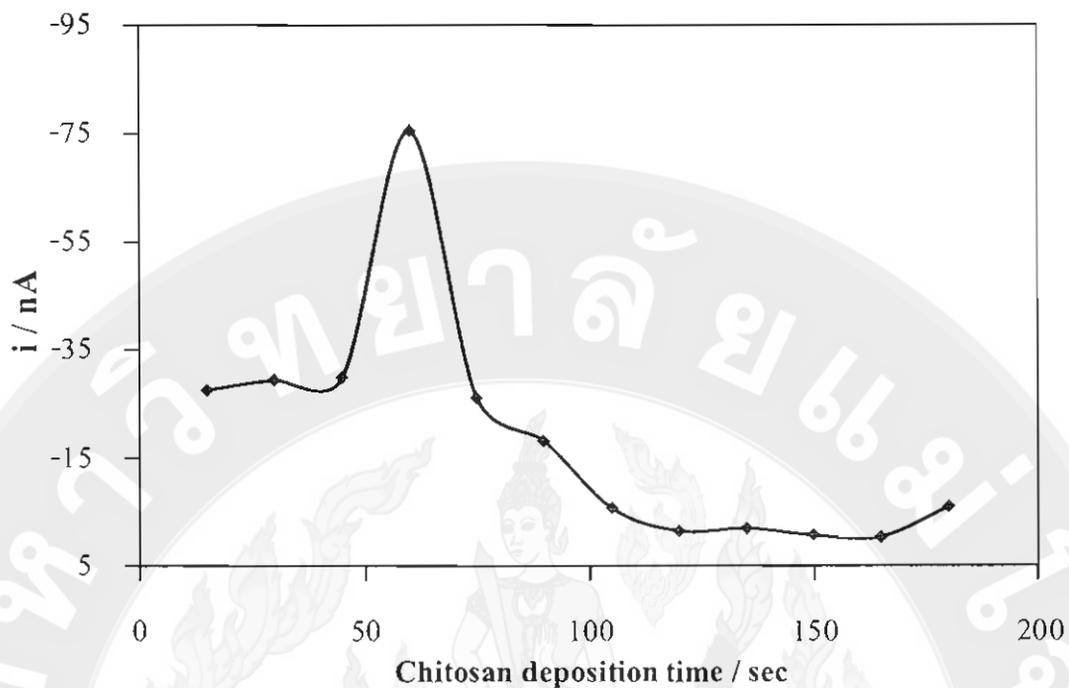
การนำปรุสเซียนบลู (Prussian blue) เพื่อตรึงร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยทำการตรึงด้วยวิธีการเกาะติดด้วยไฟฟ้า โดยใช้เวลาของการเกาะติดต่างๆ กัน ตั้งแต่ 10 ถึง 210 วินาที เมื่อนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับเวลาที่ใช้ในการเกาะติด ได้ผลดังรูปที่ 23 จากรูปพบว่าที่เวลาของการเกาะติด 10 ถึง 100 วินาที ได้กระแสเพียง 10-50 nA แต่เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 115 วินาที ได้กระแสสูงขึ้นเป็น 200 nA หลังจากนั้นกระแสจะค่อยๆ ลดลง สำหรับสาเหตุที่ทำให้กระแสลดลงเป็นเพราะฟิล์มปรุสเซียนบลูเมื่อมีความหนาแน่นมากขึ้นความต้านทานไฟฟ้าจะมากขึ้น ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนจากขั้วไฟฟ้าไปยังสารละลายทำได้ยากขึ้น กระแสไฟฟ้าจึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาของการตรึงฟิล์มปรุสเซียนบลูเป็น 115 วินาที



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการตรึงฟิล์มปรัสเซียนบลูกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม

ศึกษาผลของเวลาในการตรึงไคโตซาน

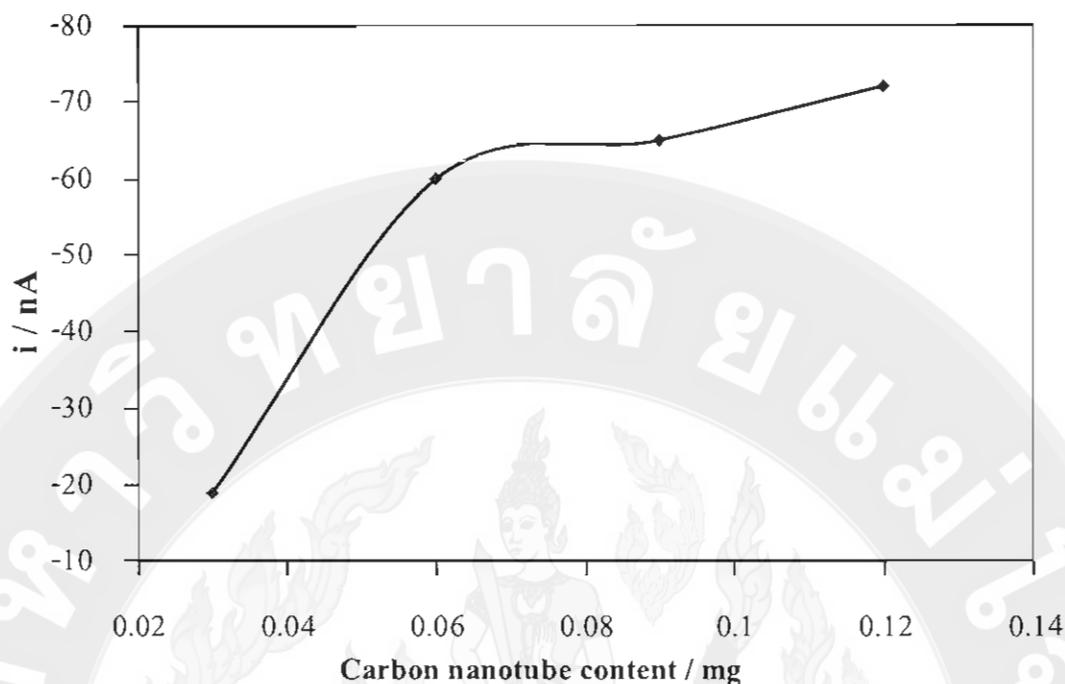
การใช้ไคโตซาน (Chitosan) เพื่อตรึงร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและปรัสเซียนบลู โดยทำการตรึงไคโตซานด้วยวิธีการเกาะติดด้วยไฟฟ้า โดยกำหนดเวลาตั้งแต่ 15 ถึง 180 วินาที โดยกำหนดช่วงห่าง 15 วินาที นำขั้วไปทดสอบในสารละลายกลูโคสแล้วนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับเวลาที่ใช้ในการเกาะติด ได้ผลดังรูปที่ 24 จากรูปพบว่าที่เวลาที่ใช้ในการเกาะติดตั้ง 15 ถึง 45 วินาที ได้กระแสเพียงเล็กน้อยเพียงประมาณ 30 nA แต่เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 วินาที ได้กระแสสูงขึ้นเป็น 75 nA หลังจากนั้นเมื่อเวลาของการเกาะติดไคโตซานมากขึ้น กลับได้กระแสดำลง กระแสที่ต่ำลงเป็นเพราะฟิล์มไคโตซานมีสภาพไม่นำไฟฟ้าและการที่ฟิล์มหนาขึ้นทำให้เอนไซม์อยู่ห่างจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้ามากขึ้น กระแสจึงต่ำลง ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาของการตรึงไคโตซานที่ 60 วินาที



รูปที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการตรึงฟิล์มไคโตซานกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงปรีสเซียนบลู 115 วินาที

ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์

การใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotube) เพื่อตรึงร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส/ปรีสเซียนบลู/ไคโตซาน โดยใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ปริมาณ 0.03, 0.06, 0.09 และ 0.12 mg นำขั้วไปทดสอบในสารละลายกลูโคส แล้วนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับเวลาที่ใช้ในการเกาะติด ได้ผลดังรูปที่ 25



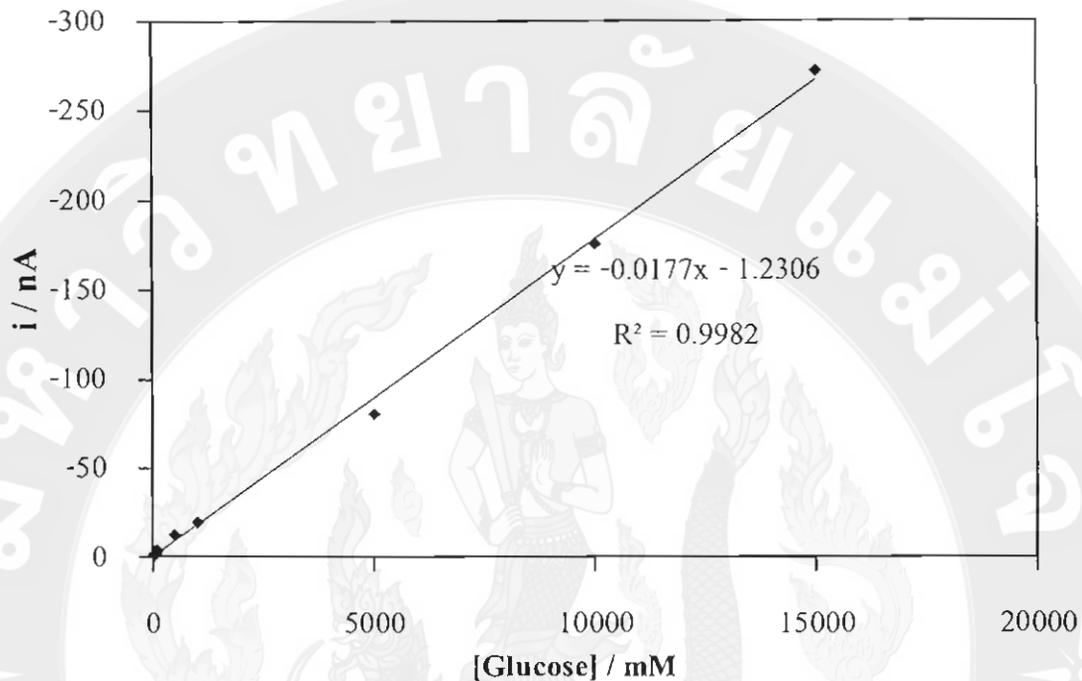
รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวกับกระแสไฟฟ้าที่ได้โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงโปรตีนบนขั้ว 115 วินาที เวลาของการตรึงโคโคซาน 60 วินาที

จากรูปพบว่าปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวที่ 0.03 มิลลิกรัมได้กระแสเพียง 18 nA เมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวขึ้นเป็น 0.06 มิลลิกรัมได้กระแสสูงขึ้นเป็น 60 มิลลิแอมแปร์ หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวอีกเป็น 0.09 และ 0.12 มิลลิกรัม กระแสที่ได้สูงขึ้นอีกเพียง 5 – 11 มิลลิแอมแปร์ ซึ่งแสดงถึงจุดอิ่มตัวของการใช้คาร์บอนนาโนทิวที่เมื่อใช้คาร์บอนนาโนทิวมากขึ้น ค่าการนำไฟฟ้าจะต่ำลง ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนยากขึ้น จึงได้กระแสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้คาร์บอนนาโนทิวที่ 0.09 มิลลิกรัม ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การหาช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดการตรวจวัดและค่าการทำซ้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.05 V พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ลดลงไป การหาลักษณะเฉพาะของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น คือช่วงที่เป็นเส้นตรงได้ผลดังรูปที่ 26 ซึ่งพบว่ามีช่วงที่เป็นเส้นตรงในช่วง 20 ไมโครโมลาร์ ถึง 15 มิลลิโมลาร์

($y = -0.0177 \text{ nA mM}^{-1} - 1.2309$, $R^2 = 0.9973$) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดกลูโคสอยู่ที่ 15.56 ไมโครโมลาร์ (S/N = 3) เซนเซอร์นี้มีค่าการทำซ้ำที่ 3.5% RSD



รูปที่ 26 กราฟเทียบมาตรฐานระหว่างกระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx โดยใช้สภาวะของเครื่องมือดังนี้ $E_{\text{applied}} = -0.05$ โวลต์, 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.4, CNT = 0.009 มิลลิกรัม, เวลาของการตรึงโคโดซาน 60 วินาที, เวลาของการตรึงปรตเซียนบลู 105 วินาที, และปริมาณของกลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม

การทดสอบหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้ง

นำกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) ไปทดสอบในตัวอย่างน้ำผึ้ง 6 ชนิด ตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 6 ชนิดดังกล่าวไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่าง และแต่ละยี่ห้อใช้น้ำผึ้งปริมาณน้อยเพียงยี่ห้อละ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละตัวอย่างใช้เวลาในการทดสอบตัวอย่างละ 1 นาที ผลการทดสอบพบว่ามีกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้งอยู่ในช่วง 54 – 4053 ไมโครเมตร ดังตารางที่ 6 จากตารางแสดงให้เห็นว่า SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปทดสอบกลูโคสในน้ำผึ้งได้จริง

ตารางที่ 6 ตัวอย่างน้ำผึ้งยี่ห้อต่างๆ และความเข้มข้นที่ตรวจพบโดยใช้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

ยี่ห้อ	ความเข้มข้นของกลูโคสที่ตรวจวัดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ / ไมโครโมลาร์
Vejpong	54.47
Ambrosia	467.37
Songpung	295.43
Erawan	769.33
Chula	273.32
Sabsau	4053.33

สรุปผลการวิจัย

การสร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์ ด้วยกลูโคสออกซิเดส-คาร์บอนนาโนทิวบ์คอมโพสิตกับปรีสเซียนบลู-ไลโคซาน-ทองนาโน บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) นาโนทิวบ์ เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลทเมตรี พบว่ากลูโคสไบโอเซนเซอร์ SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx ให้สัญญาณสูงที่สุดในกาตรวจวัดกลูโคสเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (E_{applied}) ที่ -0.05 V ใช้ปริมาณของกลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงไลโคซาน 60 วินาที เวลาของการตรึงปรีสเซียนบลู 105 วินาที กลูโคสไบโอเซนเซอร์นี้มีช่วงเป็นเส้นตรงในช่วง 20 ไมโครโมลาร์ ถึง 15 มิลลิโมลาร์ มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดกลูโคสที่ 15.56 ไมโครโมลาร์ ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจวัดปริมาณกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ โดยพบว่าในตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มมาจากท้องตลาด 6 ชนิด มีปริมาณกลูโคสอยู่ในช่วง $54 - 4053$ ไมโครโมลาร์