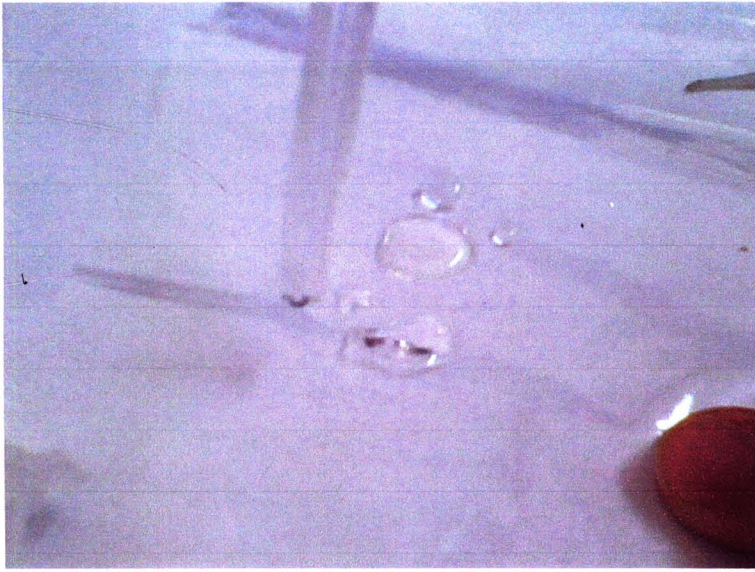


บรรณานุกรม

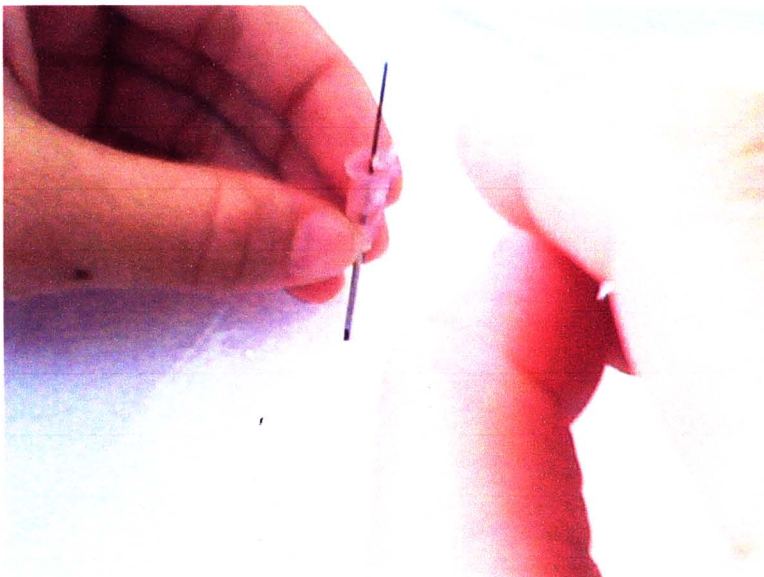
- เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ. เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.
- Aravamudhan, S., Kumar, A., Mohapatra, S., and Bhansali, S. (2007) Sensitive estimation of total cholesterol in blood using Au nanowires based micro-fluidic platform, *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2289-2294.
- Arya, S. K., Prusty, A. K., Singh, S. P., Solanki, P. R., Pandey, M. K., Datta, M., and Malhotra, B. D. (2007) Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer, *Analytical Biochemistry* 363, 210-218.
- Charpentier, L., and Murr, N. E. (1995) Amperometric determination of cholesterol in serum with use of a renewable surface peroxidase electrode, *Analytica Chimica Acta* 318, 89-93.
- Devadoss, A., Palencsar, M. S., Jiang, D., Honkonen, M. L., and Burgess, J. D. (2005) Enzyme Modification of Platinum Microelectrodes for Detection of Cholesterol in Vesicle Lipid Bilayer Membranes, *Analytical Chemistry* 77, 7393-7398.
- Li, J., Peng, T., and Peng, Y. (2003) A Cholesterol Biosensor Based on Entrapment of Cholesterol Oxidase in a Silicic Sol-Gel Matrix at a Prussian Blue Modified Electrode, *Electroanalysis* 15, 1031-1037.
- Nakaminami, T., Ito, S.-i., Kuwabata, S., and Yoneyama, H. (1999) Amperometric Determination of Total Cholesterol at Gold Electrodes Covalently Modified with Cholesterol Oxidase and Cholesterol Esterase with Use of Thionin as an Electron Mediator, *Analytical Chemistry* 71, 1068-1076.
- Nakaminami, T., Kuwabata, S., and Yoneyama, H. (1997) Electrochemical Oxidation of Cholesterol Catalyzed by Cholesterol Oxidase with Use of an Artificial Electron Mediator, *Analytical Chemistry* 69, 2367-2372.
- Ozer, B. C., Ozyoruk, H., Celebi, S. S., and Yildiz, A. (2007) Amperometric enzyme electrode for free cholesterol determination prepared with cholesterol oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, *Enzyme and Microbial Technology* 40, 262-265.

- Preechaworapun, A., Ivandini, T. A., Suzuki, A., Fujishima, A., Chailapakul, O., and Einaga, Y. (2008) The development of amperometric immunosensor using boron-doped diamond with poly (*o*-aminobenzoic acid), *Analytical Chemistry* 80, 2077-2083.
- Shen, J., and Liu, C.-C. (2007) Development of a screen-printed cholesterol biosensor: Comparing the performance of gold and platinum as the working electrode material and fabrication using a self-assembly approach, *Sensors and Actuators B* 120, 417-425.
- Shumyantseva, V. V., Carrara, S., Bavastrello, V., Riley, D. J., Bulko, T. V., Skryabin, K. G., Archakov, A. I., and Nicolini, C. (2005) Direct electron transfer between cytochrome P450scd and gold nanoparticles on screen-printed rhodium-graphite electrodes, *Biosensors and Bioelectronics* 21, 217-222.
- Song, M.-J., Yun, D.-H., Jin, J.-H., Min, N.-K., and Hong, S.-I. (2006) Comparison of Effective Working Electrode Areas on Planar and Porous Silicon Substrates for Cholesterol Biosensor, *Japanese Journal of Applied Physics* 45, 7197-7202.
- Vidal, J.-C., Espuelas, J., and Castillo, J.-R. (2004) Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor, *Analytical Biochemistry* 333, 88-98.
- Vidal, J.-C., Garcia, E., and Castillo, J.-R. (2002) Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system, *Analytical Sciences* 18, 537-542.
- Yao, T., and Takashima, K. (1998) Amperometric biosensor with a composite membrane of sol-gel derived enzyme film and electrochemically generated poly(1,2-diaminobenzene) film, *Biosensors and Bioelectronics* 13, 67-73.
- Zhou, N., Wang, J., Chen, T., Yu, Z., and Li, G. (2006) Enlargement of Gold Nanoparticles on the Surface of a Self-Assembled Monolayer Modified Electrode: A Mode in Biosensor Design, *Analytical Chemistry* 78, 5227-5230.

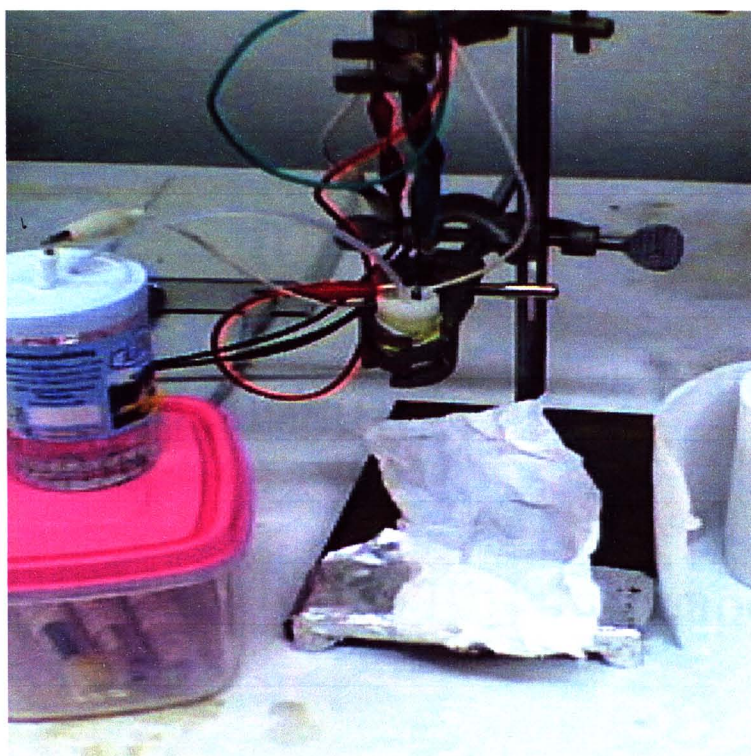
ภาคผนวก ก
รูปการทดลอง



รูปที่ ก.1 แสดงการผสมสารละลาย Epoxy A กับ B



รูปที่ ก.2 แสดงการสร้างขั้วไฟฟ้าใช้งานได้ดินสอ



รูปที่ ก.3 แสดงการตั้งเครื่อง Electrochemical Analyzer

ภาคผนวก ข

การเผยแพร่งานวิจัย

โปสเตอร์ RPUS และ full paper



การพัฒนาคอเลสเตรอลไบโอเซนเซอร์โดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

Development of cholesterol biosensor using electrochemical analysis

R52C01007

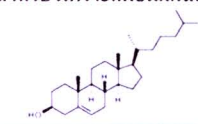
ชื่อสถานประกอบการ : -
สถานที่ตั้งผู้ประกอบการ : -

ข้อมูลทั่วไป

คอเลสเตรอลจัดได้ว่าเป็นปัญหาหลักทำให้เกิดโรคหัวใจและโรคของระบบหลอดเลือด จากสถิติพบว่าที่ผ่านมาในประเทศไทยมีผู้ป่วยหลอดเลือดสมองถึง 240,000 ราย คิดเป็นอัตราเฉลี่ย 27 รายทุก ๆ 1 ชั่วโมง ขณะที่สถิติทั่วโลกระบุว่าแต่ละปีมีผู้ป่วยหลอดเลือดสมองถึง 15 ล้านคน ในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิต 5 ล้านคน และกลายเป็นอัมพาตอีก 5 ล้านคน โดยปกติแล้วการตรวจหาปริมาณคอเลสเตรอลต้องไปตรวจที่สถานประกอบการพยาบาลโดยใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ยังไม่มีชุดทดสอบที่ขายในประเทศไทย และใช้เวลาในการทดสอบนาน

ปัญหาวิจัย

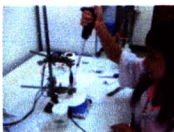
การตรวจวัดคอเลสเตรอลในซีรัมของเลือดจัดเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการวิจัยโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคหัวใจ หลอดเลือดสมองตีบ และหลอดเลือดแข็งตัว จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีกลุ่มของนักวิจัยหลายกลุ่มด้วยกันที่ได้ออกแบบ biosensor, surface plasmon resonance, phosphorescence sensor, และเคมีไฟฟ้าไบโอเซนเซอร์ (electrochemical biosensor) เนื่องจากการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเป็นวิธีที่ง่าย ให้ความไวสูง และประกอบกับราคาเครื่องมือที่ไม่แพงนัก ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้เลือกการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าสำหรับวิเคราะห์คอเลสเตรอล



โครงสร้างคอเลสเตรอล



การสร้างขั้วไฟฟ้าใช้งานสัตติส



การทำงานของนักศึกษา



เครื่อง Electrochemical Analyzer

แนวทางแก้ปัญหาวิจัย

1. เพื่อผลิตและพัฒนาคอเลสเตรอลไบโอเซนเซอร์
2. เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์ไปสู่การตรวจวัดในตัวอย่างจริง

วิธีทำ

1. เตรียมขั้วไฟฟ้าสำหรับเป็นฐานสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า
2. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตรอล
3. นำขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้ไปตรวจวัดคอเลสเตรอลในตัวอย่างจริง
4. เขียนและรวบรวมผลงานวิจัยเพื่อส่งไปยังวารสารที่จะตีพิมพ์ และจัดเผยแพร่ผลงานวิจัย

ผลลัพธ์ที่ได้

การพัฒนาคอเลสเตรอลไบโอเซนเซอร์โดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าได้ทำการเลือกขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ขั้วไฟฟ้าสัตติสที่ทำจากคาร์บอน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm ยี่ห้อ Staedler ชนิด 2B เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานเพราะให้สัญญาณทางเคมีไฟฟ้าสูงสุด และทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตรอล ได้ตัวกลางที่ช่วยเพิ่มสัญญาณของคอเลสเตรอล (mediator) คือ $K_3Fe(CN)_6$ วิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริกให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัดที่ -0.3 โวลต์ มีช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์ ความไวเท่ากับ 0.10294 ไมโครแอมป์ต่อมิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.1 ไมโครโมลาร์ ตัวอย่างนมที่วิเคราะห์ได้พบว่ามีความเข้มข้นของคอเลสเตรอลเท่ากับ 0.3332 มิลลิโมลาร์

ความคิดเห็นจากนักศึกษา

“ดีใจที่ได้เข้าร่วมโครงการ IRPUS ทำให้ได้รับทุนการศึกษาพร้อมทั้งได้ฝึกฝนและพัฒนาทักษะการทำงาน”

ผู้ดำเนินโครงการ

ดร.อัญชนา ปรียารักษ์

: anchanaph@yahoo.com

นางสาวธิดารัตน์ ปัญญาศรี

: Thidarat_pan@hotmail.com

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์นครราชสีมา โทรศัพท์ 055-267106



สนับสนุนทุนวิจัยโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จาก สำนักงานโครงการ IRPUS ประจำปี 2552



ชื่อโครงการ “การพัฒนาคอเลสเทอรอลไบโอเซนเซอร์โดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า”
Development of cholesterol biosensor using electrochemical analysis

ชิตารัตน์ ปัญญาศรี และ อัญชนา ปรีชาวรรณ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Email : anchanaaph@yahoo.com

บทคัดย่อ

การพัฒนาคอเลสเทอรอลไบโอเซนเซอร์ โดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ทำการสร้างขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า คือขั้วไฟฟ้าใส่ดินสอที่ทำจากคาร์บอน มีคอเลสเทอรอลออกซิเดส ตรึงบนสารเคลือบให้ $K_4Fe(CN)_6$ เป็นตัวช่วยเพิ่มสัญญาณ ตรวจสอบขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคไซคลิกโวลต์แอมเพอเมทริก สำหรับการตรวจวัดคอเลสเทอรอล พบว่ามีความไวเท่ากับ $0.10294 \mu A/mM$ ขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ $0.1 \mu M$ ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง $0.1 \mu M$ ถึง $1.5 mM$ และค่าความสัมพันธ์ $R^2 = 0.9786$ ตัวอย่างเมทริกซ์วิเคราะห์ได้พบว่าไม่มีปริมาณความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล เท่ากับ $0.3332 mM$

Keywords: cholesterol; electrochemical biosensor; health

1. บทนำ

คอเลสเทอรอลจัดได้ว่าเป็นปัญหาหลักที่ทำให้เกิดโรคหัวใจ และโรคของระบบหลอดเลือด จากสถิติพบว่าที่ผ่านมานั้นประเทศไทยมีผู้ป่วยหลอดเลือดสมองถึง 240,000 ราย คิดเป็นอัตราเฉลี่ย 27 รายทุกๆ 1 ชั่วโมง ขณะที่สถิติทั่วโลกระบุว่าแต่ละปีมีผู้ป่วยหลอดเลือดสมองถึง 15 ล้านคน ในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิต 5 ล้านคน และกลายเป็นอัมพาตอีก 5 ล้านคน พบว่าไม่เฉพาะคนอ้วนเท่านั้นที่อยู่ในภาวะเสี่ยงคนผอมก็เช่นเดียวกันสามารถเกิดภาวะคอเลสเทอรอลในเลือดสูงได้ ดังนั้นการตรวจสุขภาพเพื่อหาคอเลสเทอรอลเป็นประจำจึงเป็นสิ่งที่ควรกระทำเป็นอย่างยิ่ง โดยปกติแล้วการตรวจหาปริมาณคอเลสเทอรอลต้องไปตรวจที่สถานประกอบการขนาดใหญ่ใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ยังไม่มีชุดทดสอบที่ขายในประเทศไทย แต่ใช้เวลาในการทดสอบนาน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดคอเลสเทอรอลด้วยไบโอเซนเซอร์โดยใช้เทคนิคการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าที่มีการวิเคราะห์ที่ง่าย มีความไวสูง ราคาไม่แพง และใช้เวลาในการตรวจวัดไม่นาน

นอกจากนี้ในอนาคตยังสามารถพัฒนาไปเชิงพาณิชย์ได้

จากการสืบค้นขั้วไฟฟ้าที่ใช้สำหรับเป็นฐานตรึงเอนไซม์คอเลสเทอรอลออกซิเดสมีหลากหลายชนิดด้วยกัน เช่น platinum electrode (Vidal และคณะ, 2002; Ozer และคณะ, 2007; Devadoss และคณะ, 2005) glassy carbon paste electrode (Nakaminani และคณะ, 1997) screen-printed rhodium-graphite electrode (Shumyantseva และคณะ, 2005) screen-printed gold electrode (Shen และคณะ, 2007) silicon substrate electrode (Song และคณะ, 2006) indium tin oxide electrode (Arya และคณะ, 2007) และ gold electrode (Nakaminani และคณะ, 1999; Aravanthian และคณะ, 2007) จากขั้วไฟฟ้าที่ได้กล่าวข้างต้นเป็นขั้วไฟฟ้าที่มีราคาแพง ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ประยุกต์นำใส่ดินสอคาร์บอนซึ่งหาง่ายเพื่อลดต้นทุนในการซื้อขั้วไฟฟ้า โดยคณะผู้วิจัยจะคัดเลือกขั้วไฟฟ้าจากชนิด HB และ 2B หลากหลายยี่ห้อที่วางขายตามท้องตลาดเพื่อหาขั้วไฟฟ้าที่ให้สัญญาณการตรวจวัดที่ดีที่สุดสำหรับเครื่องตรวจวัดทาง

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมขั้วไฟฟ้า สำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

ในงานวิจัยได้เลือกจากการใช้ขั้วไฟฟ้าสแตนเลสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm ยึดด้วยขั้วชนิด HB และ 2B มาสร้างเป็นขั้วไฟฟ้าทำงานใน micro-pipette tip ทดสอบด้วยสารละลาย 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ / $K_3Fe(CN)_6$ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เทคนิคโวลต์ไซคลิกโวลแทมเมตริก โดยใช้เครื่อง CHI1230A Electrochemical Analyzer มี Pt wire เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ตั้งพารามิเตอร์ดังนี้ อัตราการสแกน 0.1 V/s และช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่สแกนระหว่าง -0.2 ถึง 0.7 V

2.2 พาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเทอรอล โดยการสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย

2.2.1 เลือก mediator ระหว่าง $K_4Fe(CN)_6$ และ $K_3Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อ H_2O_2 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่เติมดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการเติมสารละลายเพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีของ $K_4Fe(CN)_6$ และ $K_3Fe(CN)_6$ mediator

สารที่เติม	ขวดที่				
	A	B	C	D	E
0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ หรือ $K_3Fe(CN)_6$ (mL)	1	1	1	1	1
1 M H_2O_2 (mL)	0	1	2	3	4
H_2O (mL)	4	3	2	1	0

2.2.2 ศึกษา $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อคอเลสเทอรอลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่เติมดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณการเติมสารละลายเพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อคอเลสเทอรอล

สารที่เติม	Tube ที่			
	A	B	C	D
10 mM คอเลสเทอรอล (μL)	0	50	100	200
0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ (μL)	40	40	40	40
10% Triton-X 100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 (μL)	250	200	150	50
3.1279 Unit ChOx (μL)	10	10	10	10

2.3 ศึกษาคุณสมบัติของขั้วไฟฟ้าของ $K_3Fe(CN)_6$ ด้วยเทคนิคโวลต์ไซคลิกโวลแทมเมตริก

การตรวจวัด 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของ 10% Triton-X 100 ที่อัตราสแกน 0.1 V/s ด้วยขั้วไฟฟ้าทำงานสแตนเลสที่เลือกจากข้อ 2.1 มี Pt wire เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย และ Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่สแกนจาก -0.2 ถึง 0.8 V

2.4 การวิเคราะห์คอเลสเทอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก

ตรวจวัดคอเลสเทอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของ 10% Triton-X 100 โดยตั้งศักย์ไฟฟ้าคงที่ -0.7 V พร้อมทั้งกวนตลอดการตรวจวัดด้วยแท่งแม่เหล็กจน baseline คงที่จึงเติมคอเลสเทอรอล และเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าเป็น -0.6, -0.5, -0.4, -0.3, -0.2, -0.1 และ 0 โวลต์ ตามลำดับ

2.5 การวิเคราะห์หาคอเลสเดอรอลร่วมกับ
คอเลสเดอรอลออกซิเดส ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โร
เมตริก

ตรวจวัดคอเลสเดอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โร
เมตริก ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของ 10% Triton-X 100
และเติมคอเลสเดอรอลออกซิเดสลงในสารละลาย ตั้ง
ศักย์ไฟฟ้าคงที่ -0.7 V พร้อมทั้งกวนหลอดการตรวจวัด
ด้วยแท่งแม่เหล็กจน baseline คงที่จึงเติม
คอเลสเดอรอล และเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าเป็น -0.6, -0.5, -
0.4, -0.3,-0.2,-0.1 และ 0 V ตามลำดับ

2.6 การวิเคราะห์หาคอเลสเดอรอลร่วมกับ
คอเลสเดอรอลออกซิเดส และมี $K_4Fe(CN)_6$ เป็น
mediator ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก

ตรวจวัดคอเลสเดอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โร
เมตริก ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของ 10% Triton-X 100
เติมคอเลสเดอรอลออกซิเดส และ $K_4Fe(CN)_6$ mediator
ลงในสารละลาย ตั้งศักย์ไฟฟ้าคงที่ -0.7 V พร้อมทั้ง
กวนหลอดการตรวจวัดด้วยแท่งแม่เหล็กจน baseline
คงที่จึงเติมคอเลสเดอรอล และเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าเป็น -
0.6, -0.5, -0.4, -0.3,-0.2,-0.1 และ 0 V ตามลำดับ

2.7 หาค่าความเข้มข้นของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่
เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเดอรอล

ทำตามข้อ 2.6 ตั้งศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ -0.3 V และ
เติม $K_4Fe(CN)_6$ mediator ให้มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้
0.25, 0.50, 1, 1.5, และ 2 mM ตามลำดับ

2.8 หาค่าความสัมพันธ์ของช่วงที่เป็นเส้นตรง

ตรวจวัดช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของ
คอเลสเดอรอลด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก ใน
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ของ 10% Triton-X 100 เติม
คอเลสเดอรอลออกซิเดส และ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ลง
ในสารละลาย ตั้งศักย์ไฟฟ้าคงที่ -0.3 V พร้อมทั้งกวน
หลอดการตรวจวัดด้วยแท่งแม่เหล็กจน baseline คงที่
จึงเติมคอเลสเดอรอลให้มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้
0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2,
2.5, และ 3 mM ตามลำดับ

2.9 การวิเคราะห์หาคอเลสเดอรอล ในตัวอย่างนม

เตรียมตัวอย่างนมโดยปั่นแยกไขมันลงโหลอด
ทดลอง เติมน้ำทันทัน แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง
เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวใสขึ้นบน
ยาระเหยให้แห้ง ทำการปรับปริมาตร 5 mL ด้วย
10%TritonX-100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำไป
วิเคราะห์ด้วยเคมีไฟฟ้าด้วยสภาวะที่เหมาะสมด้วย
เทคนิค Standard addition เติมน้ำสารมาตรฐานลงใน
ตัวอย่างความเข้มข้นดังนี้ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 mM
ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V

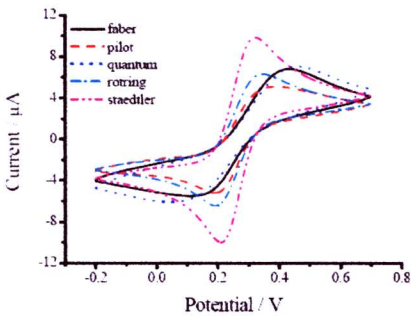
3. ผลการทดลอง และอภิปรายผล

3.1 การเตรียมขั้วไฟฟ้า สำหรับการตรวจวัดทาง
เคมีไฟฟ้า

คณะผู้วิจัยได้เลือกที่จะใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนจากไส้
ดินสอด่ เนื่องจากมีขนาดเล็ก ราคาถูก และสามารถหา
ซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด พร้อมทั้งสามารถนำมา
ประยุกต์สำหรับเป็นขั้วทดสอบขนาดเล็กได้ ดังนั้นจึง
นำไส้ดินสอด่มาต่อเป็นขั้วไฟฟ้า และใช้เทคนิคไฮดรอลิก
โวลแทมเมตริกตรวจสอบคุณสมบัติของไส้ดินสอด่ชนิด
2B และ HB ยี่ห้อต่างกัน 5 ยี่ห้อ คือ Rotring Pilot
Faber-Castell Staedler และ QuanTum ในสารละลาย
ผสมของ 10 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ จากผลการ
ทดลองสามารถได้สรุปค่าเฉลี่ยของกระแสออกซิเดชัน
(i_a) และกระแสรีดักชัน (i_c) ค่าเฉลี่ยของศักย์ไฟฟ้าของ
ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (E_{pa}) และปฏิกิริยารีดักชัน (E_{pc})
และค่าความต่างของศักย์ไฟฟ้า ΔE_p ($E_{pa}-E_{pc}$) ดัง
ตารางที่ 3.1 จากตารางพบวาระหว่างขั้วไฟฟ้าไส้ดิน
สอด่ชนิด 2B ให้ปริมาณกระแสออกซิเดชัน และรีดักชันสูง
กว่าขั้วไฟฟ้าชนิด HB ซึ่งน่าจะสนับสนุนได้ว่าปริมาณ
คาร์บอนของไส้ดินสอด่ชนิด 2B มีสูงกว่าชนิด HB จึงทำ
ให้การนำไฟฟ้าที่ดีกว่า ดังแสดงไฮดรอลิกโวลแทมโมแกรม
ของขั้วไฟฟ้าไส้ดินสอด่ชนิด 2B ได้ดังรูปที่ 3.1 และผล
ของกระแสออกซิเดชัน และรีดักชันสูงสุดในขั้วไฟฟ้า
ชนิด 2B คือไส้ดินสอด่ยี่ห้อ Staedler และยังให้ค่า ΔE
ต่ำสุด นั่นหมายความว่าขั้วไฟฟ้าง่ายกว่าให้การส่งผ่าน
ของอิเล็กตรอนที่ดี ดังนั้นจึงนำไปใช้สำหรับตรวจวัด
คอเลสเดอรอลต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการทดลองที่ได้จากโวลต์แอมป์โนแกรม

ขั้วไฟฟ้า	ชนิดขั้วไฟฟ้า	ออกซิเดชัน		รีดักชัน		ΔE_p (V)
		E_{pa} (V)	I_p (μA)	E_{pc} (V)	I_c (μA)	
Rotring	HB	0.312	1.17	0.226	-1.24	0.086
	2B	0.302	5.94	0.184	-5.92	0.178
Pilot	HB	0.381	5.06	0.196	-5.07	0.185
	2B	0.342	7.21	0.202	-7.25	0.140
Faber-Castell	HB	0.428	6.01	0.130	-5.34	0.298
	2B	0.433	6.05	0.150	-5.03	0.283
Staedtler	HB	0.361	5.72	0.102	-5.08	0.160
	2B	0.332	7.44	0.202	-7.57	0.130
Quantum	HB	0.346	3.04	0.104	-2.41	0.242
	2B	0.443	5.73	0.181	-5.14	0.202



รูปที่ 3.1 โวลต์แอมป์โนแกรมของ 10 mM $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ ที่ตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าโวลต์แอมป์โนแกรมชนิด 2B ของยี่ห้อต่างๆ (Rotring Pilot Faber-Castrell Staedtler และ Quantum) ที่อัตราการสแกน 0.1 V/s

3.2 ทาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตรอล โดยการสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย

3.2.1 เลือก mediator ระหว่าง $K_4Fe(CN)_6$ และ $K_3Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อ H_2O_2 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

ในงานวิจัยได้เลือกใช้ไอออนของ Fe เป็นตัวกลางสำหรับการเพิ่มสัญญาณทางเคมีไฟฟ้า และเป็นสารที่มีสีทำให้ง่ายต่อการสังเกตด้วยตา ดังนั้นจึงเริ่มจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายดังรูปที่ 3.2 โดยที่สารละลายของ $K_4Fe(CN)_6$ เป็นสารละลายสีไม่มีสี และ สารละลายของ $K_3Fe(CN)_6$ จะมีสีเหลือง



รูปที่ 3.2 สีของสารละลาย 0.1 M $K_4Fe(CN)_6$ (A)และ 0.1 M $K_3Fe(CN)_6$ (B)



รูปที่ 3.3 ทดสอบสีของสารละลาย $K_4Fe(CN)_6$ mediator จากการเติมสารละลายตามตารางที่ 2.1 หลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

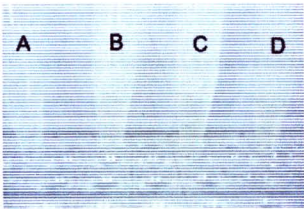


รูปที่ 3.4 ทดสอบสีของสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ mediator จากการเติมสารละลายตามตารางที่ 2.1 หลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

ผลของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีต่อ H_2O_2 พบว่าจากการเติมสารละลายตามตารางที่ 2.1 สีของสารละลาย $K_4Fe(CN)_6$ จากสีใส (ดังขวด A) เมื่อเติม H_2O_2 สีของสารละลายได้เปลี่ยนเป็นสีเหลืองดังขวดที่ B ถึง E ตามรูปที่ 3.3 ในส่วนของ $K_3Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อ H_2O_2 ได้ผลดังรูปที่ 3.4 สีของสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ เริ่มต้นเป็นสีเหลือง (ดังขวด A) และเปลี่ยนเป็นสีส้มเมื่อเติม H_2O_2 ในขวด B ถึง E จากผลการทดลองในรูปที่ 3.3 และ 3.4 พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีของ $K_4Fe(CN)_6$ จากไม่มีสีเป็นสีเหลืองสามารถสังเกตได้ง่ายกว่า การเปลี่ยนแปลงสีของ $K_3Fe(CN)_6$ ดังนั้นในการวิจัยจึงเลือก $K_4Fe(CN)_6$ เป็น mediator

3.2.2 ศึกษา $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่มีผลต่อ
คอแลสเตอรอลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ
สารละลาย

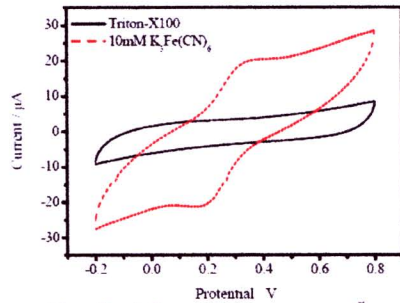
สังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่เติมตามตารางที่ 2.2 จากรูปที่ 3.5 tube A ถึง D พบว่าเมื่อมีการเติมคอแลสเตอรอลที่ความเข้มข้นต่างกันโดยเริ่มจาก 0, 1.6, 3.3 และ 6.6 mM ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสีของสารละลายจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่อมีปริมาณคอแลสเตอรอลเพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลเหมือนดังผลของการศึกษา $K_4Fe(CN)_6$ mediator กับ H_2O_2 ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาของคอแลสเตอรอลกับเอนไซม์คอแลสเตอรอลออกซิเดส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น H_2O_2 และ H_2O_2 เกิดการออกซิไดซ์กับ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ได้ผลิตภัณฑ์เป็น $K_3Fe(CN)_6$ ซึ่งมีสีเหลืองดังปรากฏในรูปที่ 3.5 ดังนั้น $K_4Fe(CN)_6$ mediator สามารถใช้เป็น mediator สำหรับตรวจวัดคอแลสเตอรอลได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 3.5 การเปลี่ยนแปลงของสี $K_4Fe(CN)_6$ ที่มีผลต่อการเติมคอแลสเตอรอลที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3.3 ศึกษาคุณลักษณะทางเคมีไฟฟ้าของ $K_3Fe(CN)_6$
ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

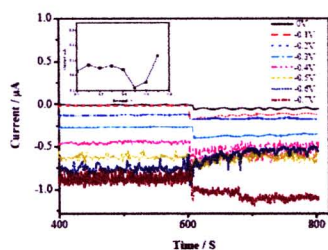
เนื่องจากผลการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ได้ผลิตภัณฑ์เป็น $K_3Fe(CN)_6$ ดังนั้นจึงต้องศึกษาคุณลักษณะทางเคมีไฟฟ้าของ $K_3Fe(CN)_6$ โดยการตรวจวัด 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ใน 10% Triton-X 100 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ที่อัตราสแกน 0.1 V/s ช่วงศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง 0.8 V ได้ผลดังรูปที่ 3.6 เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ 0.3 V และรีดักชันที่ 0.2 V



รูปที่ 3.6 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของกระแสรีดักชัน (10%Triton-X 100) และ 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ ที่อัตราสแกนที่ 0.1 V/s

3.4 การวิเคราะห์คอแลสเตอรอลด้วยเทคนิคแอม
เปอร์โรเมตริก

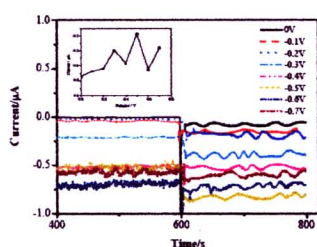
จากรูปที่ 3.7 พบว่าคอแลสเตอรอลสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้โดยตรงแก่กระแสที่ได้ต่ำมากส่งผลให้ความไวในการตรวจวัดต่ำ ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะตรวจวัดคอแลสเตอรอลโดยตรง



รูปที่ 3.7 แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัดคอเลสเทอรอล ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V รูปแทรกเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของคอเลสเทอรอล ($n=3$) และศักย์ไฟฟ้า

3.5 การวิเคราะห์คอเลสเทอรอลร่วมกับคอเลสเทอรอลออกซิเดส ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก

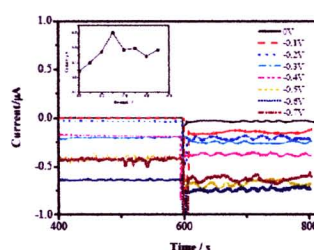
ผลแอมเปอร์โรแกรมแสดงดังรูปที่ 3.8 พบว่า ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดที่กระแสสูงสุดอยู่ที่ -0.5 V



รูปที่ 3.8 แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัดคอเลสเทอรอลร่วมกับคอเลสเทอรอลออกซิเดส ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V และรูปแทรกเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ย ($n=3$) ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

3.6 การวิเคราะห์คอเลสเทอรอลร่วมกับคอเลสเทอรอลออกซิเดส และมี $K_4Fe(CN)_6$ เป็น mediator ด้วยเทคนิคแอมเปอร์โรเมตริก

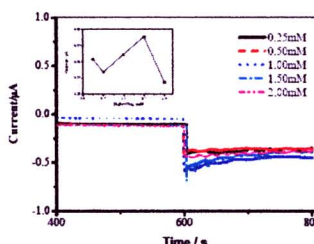
จากแอมเปอร์โรแกรมที่ได้จากรูปที่ 3.9 เป็นผลที่ได้จากการเติม $K_4Fe(CN)_6$ mediator เป็นตัวช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาโดยเกิดผ่าน mediator พบว่ากระแสที่สูงที่สุดของการตรวจวัดคอเลสเทอรอลอยู่ที่ -0.3 V ซึ่งต่ำกว่าการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ไม่ได้ใช้ mediator ถึง 0.2 V ดังนั้นศักย์ไฟฟ้าที่ -0.3 V จะใช้สำหรับการหาปริมาณคอเลสเทอรอลต่อไป



รูปที่ 3.9 แอมเปอร์โรแกรมของการตรวจวัดคอเลสเทอรอลร่วมกับคอเลสเทอรอลออกซิเดสโดยมี $K_4Fe(CN)_6$ เป็น mediator ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ ตั้งแต่ -0.7 ถึง 0.0 V และรูปแทรกเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ย ($n=3$) ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

3.7 หาคความเข้มข้นของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดคอเลสเทอรอล

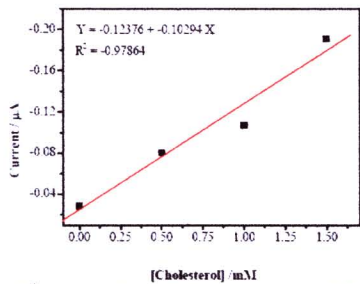
จากแอมเปอร์โรแกรมรูปที่ 3.10 พบว่าปริมาณของ mediator ที่เหมาะสมอยู่ที่ 1.5 mM เพราะให้กระแสในการตรวจวัดคอเลสเทอรอลสูงสุด ดังนั้นในการหาปริมาณคอเลสเทอรอล จะเติม mediator ที่ความเข้มข้น 1.5 mM



รูปที่ 3.10 แอมเพอร์โรแกรมของการตรวจวัด $K_4Fe(CN)_6$ mediator ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V ที่ความเข้มข้นของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ต่างๆ ตั้งแต่ 0.25, 0.50, 1, 1.5, 2 mM และรูปแทรกแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ย ที่ความเข้มข้นของ $K_4Fe(CN)_6$ mediator ต่างๆ

3.8 หาค่าความสัมพันธ์ของช่วงที่เป็นเส้นตรง

จากสัญญาณแอมเพอร์โรเมตริก ได้แสดงผลโดยพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับกระแสที่ได้ พบว่าช่วงของความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.1 μM ถึง 1.5 mM ดังรูปที่ 3.11 เป็นช่วงความสัมพันธ์ที่กว้าง ให้ความไวในการตรวจวัดอยู่ที่ 0.10294 $\mu A/mM$ และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.1 μM

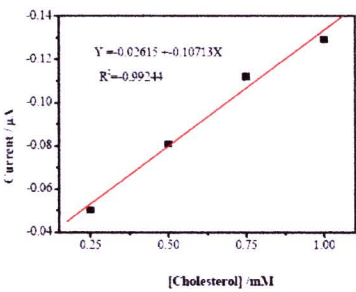


รูปที่ 3.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล (0.0001, 0.5, 1.0, และ 1.5 mM) กับกระแสรีดักชันเฉลี่ย (n=3) จากเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V

3.9 การวิเคราะห์คอเลสเตอรอล ในตัวอย่าง

วิเคราะห์หาคอเลสเตอรอลในตัวอย่างนม ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก ผลกระแสแอมเพอร์โรแกรมได้เามาพลอตความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลจะได้ดังรูปที่ 3.12 จากตัวอย่างเมที่วิเคราะห์ได้พบว่ามีความไวและความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล เท่ากับ 0.3332 mM จากการ

เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ได้จากรูปที่ 3.11 และ 3.12 จะเห็นได้ว่ามีความเข้มข้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าวิธีการวิเคราะห์คอเลสเตอรอล ที่ได้พัฒนามาใช้กระแสรีดักชันน้อยมาก จึงเหมาะสำหรับการนำไปวิเคราะห์ให้ได้อย่างจริงจังต่อไป



รูปที่ 3.12 กราฟ Standard addition แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสรีดักชันเฉลี่ยของคอเลสเตอรอล (n=3) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก ในตัวอย่างนม ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.3 V

4. สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาคอเลสเตอรอลไบโอเซนเซอร์ โดยใช้การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าได้ทำการเลือกขั้วไฟฟ้าทำงานสำหรับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ขั้วไฟฟ้าสแตนเลสที่หาลงจากคาร์บอน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม ยี่ห้อ Staedler ชนิด 2B เป็นขั้วไฟฟ้าทำงานเพราะให้สัญญาณทางเคมีไฟฟ้าสูงที่สุดและทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คอเลสเตอรอลได้ตัวกลางที่ช่วยเพิ่มสัญญาณของคอเลสเตอรอล (mediator) คือ $K_4Fe(CN)_6$ วิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริกให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัดที่ -0.3 V มีช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง 0.1 μM ถึง 1.5 mM ความไวเท่ากับ 0.10294 $\mu A/mM$ และขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.1 μM ตัวอย่างเมที่วิเคราะห์ได้พบว่า

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้ขอขอบพระคุณทุกท่านที่อุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการ IRPUS ประจำปี 2552 ที่ได้ให้การสนับสนุนค่าตอบแทนของนักศึกษาและค่าลงทะเบียน ขอขอบพระคุณทุกท่านที่ช่วยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่จาก สกว.

๔

เอกสารอ้างอิง

- Arya, S. K.; Prusty, A. K.; Singh, S. P.; Solanki, P. R.; Pandey, M. K.; Datta, M. and Malhotra, B. D. Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer. *Analytical Biochemistry* 2007. 363, 210-218.
- Nakaminami, T.; Ito, S.-I.; Kuwabata, S. and Yoneyama, H. Amperometric Determination of Total Cholesterol at Gold Electrodes Covalently Modified with Cholesterol Oxidase and Cholesterol Esterase with Use of Thionin as an Electron Mediator. *Anal. Chem.* 1999. 71, 1068-1076.
- Vidal, J.-C.; Garcia, E. and Castillo, J.-R. Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system. *Analytical Sciences* 2002. 18, 537-542.
- Ozer, B. C.; Ozyoruk, H.; Celebi, S. S. and Yildiz, A. Amperometric enzyme electrode for free cholesterol determination prepared with cholesterol oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film. *Enzyme and Microbial Technology* 2007. 40, 262-265.
- Devadoss, A.; Palencsar, M. S.; Jlang, D.; Honkonen, M. L. and Burgess, J. D. Enzyme Modification of Platinum Microelectrodes for Detection of Cholesterol in Vesicle Lipid Bilayer Membranes. *Anal. Chem.* 2005. 77, 7393-7398.
- Nakaminami, T.; Kuwabata, S. and Yoneyama, H. Electrochemical Oxidation of Cholesterol Catalyzed by Cholesterol Oxidase with Use of an Artificial Electron Mediator. *Anal. Chem.* 1997. 69, 2367-2372.
- Shumyantseva, V. V.; Carrara, S.; Bavastrello, V.; Riley, D. J.; Bulko, T. V.; Skryabin, K. G.; Archakov, A. I. and Nicolini, C. Direct electron transfer between cytochrome P450scc and gold nanoparticles on screen-printed rhodium-graphite electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 2005. 21, 217-222.
- Shen, J. and Liu, C.-C. Development of a screen-printed cholesterol biosensor: Comparing the performance of gold and platinum as the working electrode material and fabrication using a self-assembly approach. *Sensors and Actuators B* 2007. 120, 417-425.
- Song, M.-J.; Yun, D.-H.; Jin, J.-H.; Min, N.-K. and Hong, S.-I. Comparison of Effective Working Electrode Areas on Planar and Porous Silicon Substrates for Cholesterol Biosensor. *Japanese Journal of Applied Physics* 2006. 45, 7197-7202.
- Aravamudhan, S.; Kumar, A.; Mohapatra, S. and Bhansali, S. Sensitive estimation of total cholesterol in blood using Au nanowires based micro-fluidic platform. *Biosensors and Bioelectronics* 2007. 22, 2289-2294.

ภาคผนวก ค

การเผยแพร่งานวิจัย

งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

REMSEA 2010

- Abstract
- Poster



The Second Regional Electrochemistry Meeting of South-East Asia

16-19 November 2010

Maha Chulalongkorn Building, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

BOOK OF ABSTRACTS REMSEA 2010

Hosted by:



PB-03: Development of $K_4Fe(CN)_6$ Mediator Cholesterol Biosensor using Electrochemical Analysis

Thidarat Panyasri¹, Anurak Chitbuengphrao¹, Tanin Tangkuaram², Anchana Preechaworapun^{1*}

¹Chemistry and Applied chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000 Thailand.

²Sensor Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

*E-mail: anchanaph@yahoo.com, Tel: +66-55-267106



Anchana Preechaworapun
anchanaph@yahoo.com
Bioelectrochemistry

Amperometric cholesterol biosensor was developed by a low cost of pencil carbon working electrode with cholesterol oxidase (ChOx) and $K_4Fe(CN)_6$ mediator. The pencil carbon electrodes were characterized with cyclic voltammetric in $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ solution. The cholesterol oxidase and $K_4Fe(CN)_6$ mediator were modified in solution, which the present of $K_4Fe(CN)_6$ mediator enhances the sensitivity and selectivity of biosensor. The system of analysis shows a sensitivity of $0.10294 \mu A mM^{-1}$, detection limit $0.1 \mu M$, wide linear range from $0.1 \mu M$ to $1.5 mM$ and correlation coefficient of $R = 0.9786$. This system was applied for investigated cholesterol in milk that found cholesterol of $0.3332 mM$.

Keywords cholesterol • electrochemical biosensor • milk • $K_4Fe(CN)_6$ mediator



DEVELOPMENT OF $K_3Fe(CN)_6$ MEDIATOR CHOLESTEROL BIOSENSOR USING ELECTROCHEMICAL ANALYSIS



Thidarat Panyasri¹, Amurak Chitbuengphrao¹, Tanin Tangkuaram², Anchana Preechaworapuni^{1*}

*E-mail: anchanaaph@yahoo.com, Tel: +66-55-267106

¹Chemistry and Applied chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000 Thailand.

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

Abstract:

A low cost amperometric cholesterol biosensor was developed using a pencil carbon working electrode with cholesterol oxidase (ChOx) and a $K_3Fe(CN)_6$ mediator. The pencil carbon electrodes were characterized with cyclic voltammetry in an $Fe(CN)_6^{3-4}$ solution. The cholesterol oxidase and the $K_3Fe(CN)_6$ mediator were modified in solution, where the presence of the $K_3Fe(CN)_6$ mediator enhanced the sensitivity and selectivity of biosensor. An analysis of the system showed a sensitivity of $0.10294 \mu A mM^{-1}$, a detection limit of $0.1 \mu M$, a wide linear range from $0.1 \mu M$ to $1.5 mM$, and a correlation coefficient of $R = 0.9786$. This system was applied to investigate cholesterol in milk, measuring a cholesterol level of $0.3332 mM$.

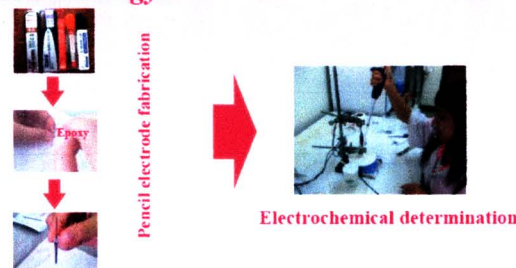
Keywords cholesterol • electrochemical biosensor • milk • $K_3Fe(CN)_6$ mediator

Introduction:

The development of a cholesterol biosensor is important due to the prevalence of atherosclerosis or heart attacks and coronary heart disease as a major health threat around the world. Thus, estimation of cholesterol in blood is very important for the treatment of heart disease. Cholesterol oxidase is a common and important enzyme used for the estimation of cholesterol concentration.

In this research, a low cost cholesterol biosensor was fabricated and electrochemical techniques were used to assess the sensor response to cholesterol.

Methodology:



Results and Discussion:

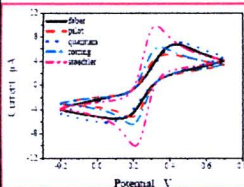


Fig. 1 Cyclic voltammogram of $10 mM Fe(CN)_6^{3-4}$ on various type of 2B pencil electrodes (Rotring Pilot, Faber-Castell, Staedler and QuanTum) at a scan rate $0.1 V/s$

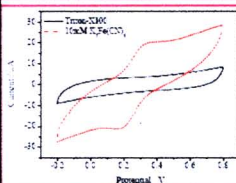


Fig. 2 Cyclic voltammogram of (a) $10 mM K_3Fe(CN)_6$ and (b) $0 mM K_3Fe(CN)_6$ in $10 \% Triton-X$ in $0.05 M PBS$ buffer (pH 7.5) at scan rate $0.1 V/s$

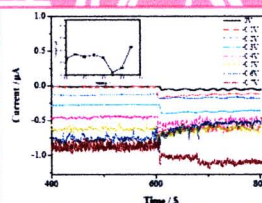


Fig. 3 Amperogram of cholesterol determination at potential -0.7 to $0.0 V$ and inset graph shows relative of average reduction current and potential

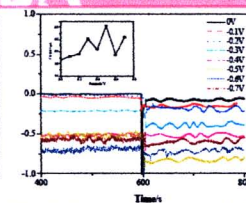


Fig. 4 Amperogram of cholesterol determination with cholesterol oxidase at potential -0.7 to $0.0 V$ and inset graph shows relative of average reduction current and potential

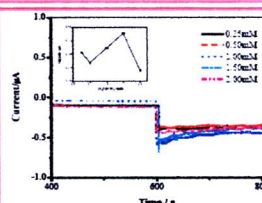


Fig. 5 Amperogram of $1mM$ Cholesterol in various 0.25 , 0.50 , 1 , 1.5 , and $2 mM K_3Fe(CN)_6$ mediator and inset graph shows the relative of average reduction current and various concentration of $K_3Fe(CN)_6$ mediator

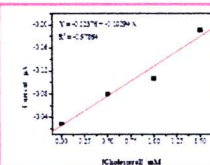


Fig. 6 Relative of cholesterol concentration (0.0001 , 0.5 , 1.0 , and $1.5 mM$) with average reduction current by amperometric at the potential $-0.3 V$

Conclusions:

An analysis of the system showed a sensitivity of $0.10294 \mu A mM^{-1}$, a detection limit of $0.1 \mu M$, a linear range from $0.1 \mu M$ to $1.5 mM$, and a correlation coefficient of $R = 0.9786$. This system was applied to investigate cholesterol in milk, measuring a cholesterol level of $0.3332 mM$.

Acknowledgments:

This research is supported by the Thailand research fund, Improvement and Development of Research in RSRU.

ประวัติผู้วิจัย

นักวิจัยหลัก

1. ชื่อ-สกุล อาจารย์ ดร. อัญชนา ปรีชาวรพันธ์
Dr. Anchana Preechaworapun
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 6500 00538 12 8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์สาขาวิชาเคมี
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Tel/Fax: 055-267106, 085-5011192
E-mail: anchanaph@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

วท.บ.(เคมี)	มหาวิทยาลัยนเรศวร	พ.ศ. 2541
วท.ม.(เคมี)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	พ.ศ. 2545
วท.ค.(เคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2550
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์, เคมีไฟฟ้า, ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor), อิมมูโนเซนเซอร์ (immunosensor)
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัย

ปี(ระยะเวลา)	ตำแหน่ง	สถานที่
2549 (7 เดือน)	นักวิจัย	Prof. Joseph Wang, Department of Chemical and Material Engineering, Chemistry and Biochemistry, Biodesign Institute, Tempe, AZ 85287-5801, United States.

2550 (6 เดือน) นักวิจัย Assoc. Prof. Yasuaki Einaga, Ph.D. Laboratory, Diamond group, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Yokohama 223-8522, Japan.

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. **Preechaworapun, A.**, Ivandini, T. A., Suzuki, A., Fujishima, A., Chailapakul, O., and Einaga, Y. Development of Amperometric Immunosensor Using Boron-Doped Diamond with Poly(o-aminobenzoic acid). *Anal. Chem.* 2008; **80**, 2077 - 2083. มี impact factor 5.287
2. **Preechaworapun, A.**, Dai, Z., Xiang, Y., Chailapakul, O., and Wang, J. Investigation of the enzyme hydrolysis products of the substrates of alkaline phosphatase in electrochemical immunosensing. *Talanta* 2008; **76**: 424-431. มี impact factor 3.374
3. **Preechaworapun, A.**, Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Grudpan, K., Motomizu, S., and Chailapakul, O. Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode. *Talanta* 2006; **68**: 1726-1731. มี impact factor 3.374
4. Treetepvijit, S., **Preechaworapun, A.**, Praphairaksit, N., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., and Chailapakul, O. Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines *Talanta* 2006; **68**, 1329-1335. มี impact factor 3.374

นักวิจัยร่วม

1. ชื่อ-สกุล

นายพิทักษ์ อยู่มี

Mr. Pitak Youmee

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3 6599 00691 11 2

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

Tel/Fax: 055-267106

E-mail: pitakyoume@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

วท.บ.(เคมี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2534

วท.ม.(เคมี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2539

วท.ด.(เคมี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีเชิงฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัย

Experience : Assistant Dean for Academic Affairs, 2003-2004

Associate Dean for Academic Affairs, 2005-2007

Publications in International Journal

Youmee, P., Phanichaphant, S., Ananta, S. and Heimann, R. B., Novel oxalate route to high quality iron niobate fine powders. *Ceram. Forum Int. / DKG*, 2001, **78**, E48-E51.

Phanichaphant, S., **Youmee, P.**, Kleeberg, R., Ullrich, B., Phase transformation of iron niobate powders and ceramics synthesized by oxalate route *Interceram*, 2003, 52(2), 84-88.

Youmee, P., Phanichaphant, S., Ananta, S. and Heimann, R. B., Synthesis and properties of lead iron niobate (PFN). *Ceram. Forum Int. / DKG*, 2004, **81**(11), E35-E41.

Publications in National Journal

Youmee, P., Tunkasiri, T., Rujijanagul, G. and Phanichaphant, S., Synthesis of barium titanate powders by sol-gel method. *J. Sci. Fac.CMU.*, 2000, **27**(1) 14-23.

Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Microstructure of lead iron niobate powders synthesized by partial oxalate *J. E. M. S. T.*, 2002, **16**, 125-126.

Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., SEM and XRD investigations of effect of sintering time on phase and morphology of iron niobate ceramic. *J. E. M. S. T.*, 2001, **15**, 93-94.

Youmee, P. and Phanichaphant, S., Characterization of perovskite lead iron niobate powders synthesized by partial oxalate. *J. Sci. Fac.CMU.*, 2005, **32**(1) 71-76.

Proceedings from international conferences

Youmee, P., Rujijanagul, G., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Phase and morphology investigation of BaTiO₃ powders prepared by a sol-gel route. *7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Singapore*, 26-30 June 2000.

Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Microstructure of lead iron niobate powder synthesized by partial oxalate. *3rd ASEAN Microscopy Conference and 19th Annual Conference of Electron Microscopy Society of Thailand*, 30-1 February 2002.

Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Characterization of perovskite lead iron niobate powders synthesized by partial oxalate method. *The 8th International Conferences on Ceramic Processing Science, Germany*, 2-5 September 2002.

Youmee, P., and Phanichaphant, S., XRD and SEM studies of fine powders lead iron niobate synthesized by partial sol gel route. *Smart Material 04 of Thailand*, 1-3 December 2004.

Proceedings from conferences in Thailand

Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Novel oxalate route to iron niobate fine powders. *26th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok*, 2000, 107.



Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Partial oxalate route to lead iron niobate powders. 27th Congress on Science and Technology of Thailand, SongKha, 2001, 135.

Youmee, P., Ananta, S. and Phanichaphant, S., Lead iron niobate powders synthesized by oxalate route. 28th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, 2002,

Youmee, P., Caungton, G. and Phanichaphant, S., Sol gel route to iron niobate fine powders. 30th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, 2004,

Youmee, P. and Phanichaphant, S., Synthesis and characterization of iron niobate nanopowders by sol gel method. 31th Congress on Science and Technology of Thailand, Nakhon Ratchasima, 2005.

Visiting Research/Training/Academic Collaboration

Training on Teaching Chemistry, during March 10 - May 15, 2003 at University of Technology, Sydney (UTS), Australia, sponsored by Pibulsongkram Rajabhat University.

Books

“Physical Chemistry 1” , Pitak Youmee (223 pages), Faculty of Science and Technology, PSRU, 2004 [in Thai].

“Physical Chemistry Laboratory” , Pitak Youmee (60 pages), Faculty of Science and Technology, PSRU, 2005 [in Thai].

“Kinetic Chemistry” , Pitak Youmee (75 pages), Faculty of Science and Technology, PSRU, 2006 [in Thai].

Grants Awarded

1. Preparation of high purity SiO_2 from rice husk in Phitsanulok, grant awarded from Pibulsongkram Rajabhat University (PSRU)
2. Synthesis and characterization of lead iron niobate nanopowders by partial oxalate method, awarded from Pibulsongkram Rajabhat University (PSRU)

