



การพัฒนาไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคสเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่องในกระบวนการทางชีวภาพ



โดย
นางสาวทอฝัน พูลทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การพัฒนาไปโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มโคสเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่องในกระบวนการ
ทางชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

DEVELOPMENT CONTINUOUS LONG-TERM GLUCOSE MEASUREMENT
BIOSENSOR FOR BIOCONVERSION PROCESSES



By

MISS Thorfun POOLTHONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2022
Copyright of Silpakorn University

620920017 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : กลูโคสไบโอเซนเซอร์, ไบโอเซนเซอร์, การกวนอย่างต่อเนื่อง, เอนไซม์ PQQ-GDH, พอลิยูรีเทน, สภาวะไฮโดรไลซิส

นางสาว ทอฝัน พูลทอง: การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคสเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่องในกระบวนการทางชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. นาฎระพี แชนเชซ

ในกระบวนการทางชีวภาพการหาปริมาณกลูโคสถือเป็นสิ่งที่ต้องทำเป็นประจำ ซึ่งในปัจจุบันได้มีเทคนิคที่ใช้วัดความเข้มข้นของน้ำตาลหลายวิธีสำหรับทั้งทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และในห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่จะนิยมใช้เทคนิคการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ HPLC คือไม่สามารถวัดความเข้มข้นของกลูโคสได้ทันเวลาที่ในปฏิกิริยา ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ ไบโอเซนเซอร์จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจ ไม่เพียงแต่ให้ความเข้มข้นของกลูโคสที่เฉพาะเจาะจงและแม่นยำ แต่ยังสามารถแสดงข้อมูลแบบทันเวลาที่อีกด้วย แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่ใช้สำหรับกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการกวนตลอดเวลา ในถึงปฏิกรณ์ ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาการพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้สามารถใช้งานได้ ในกระบวนการทางชีวภาพที่มีการกวนตลอดเวลา โดยทำการพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยการนำมาเคลือบทับด้วยพอลิอะนิลีน (PANI) ที่เป็นตัวนำไฟฟ้าบนลวดทองคำ จากนั้นเคลือบทับด้วยสารละลายนาโนทองคำในคาร์ราจีแนน (Carr-AuCl_3) แล้วจึงนำไปจุ่มลงในเอนไซม์ Pyrroloquinoline Quinone Glucose Dehydrogenase (PQQ-GDH) ก่อนเคลือบชั้นสุดท้ายด้วยพอลิยูรีเทน (PU) เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์หลุดออกจากไบโอเซนเซอร์ ผลการทดลองพบว่ามี การตอบสนองของสัญญาณ $0.85 \mu\text{A}/\text{mg}/\text{ml}$ กลูโคส ด้วย R^2 เท่ากับ 0.9973 และสามารถวัดความเข้มข้นกลูโคสได้สูงสุด $69 \pm 4 \text{ mg}/\text{ml}$ หัววัดไบโอเซนเซอร์มีความเสถียรของสัญญาณหลังจากเก็บรักษาได้น้อย 4 วัน ในสภาวะที่มีการกวนที่ 150 รอบต่อนาที ไบโอเซนเซอร์ยังแสดงค่าสัญญาณไฟฟ้าที่คงที่ยาวนานอย่างน้อย 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง พบว่า ค่าความเข้มข้นของกลูโคสจากหัววัดไบโอเซนเซอร์มีความใกล้เคียงกับค่าน้ำตาลที่ได้จากวิธีการใช้ HPLC โดยสามารถได้ค่าน้ำตาลแบบทันเวลาที่ ดังนั้นงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่มีความแม่นยำและคงทนต่อสภาวะการกวน สำหรับใช้ในกระบวนการทางชีวภาพได้



620920017 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Glucose biosensor, Biosensor, PQQ-GDH enzyme, Polyurethane, Continuous monitoring, Agitated condition

MISS THORFUN POOLTHONG : DEVELOPMENT CONTINUOUS LONG-TERM GLUCOSE MEASUREMENT BIOSENSOR FOR BIOCONVERSION PROCESSES THESIS ADVISOR : NARDRAPEE SANCHEZ, Ph.D.

Quantifying glucose is an important routine in bioconversion processes. At present, there are many methods to measure glucose concentrations for medical applications, food industries and laboratories. The most sensitive method for glucose quantification is using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. However, HPLC is lack of ability to measure sugars in real-time in its native environment it requires intensive sample preparation which leads to time consuming and high-cost associated with the measurement. Biosensor is an interesting option. It does not only provide the specific and accurate glucose concentrations, but also displays data in real-time in its native environment. However, there is absence of study of applying glucose biosensor in agitative condition for long-time measurement in bioconversion processes (>72 hours) In this work, a glucose biosensor was developed to be accurate and robust for long period of measuring time in agitated conditions. The sensor probe was fabricated by electropolymerization of polymer polyaniline (PANI) nanofibers on a gold wire. Then the sensor was putting in gold nanoparticles (AuNPs) in carrageenan solution to make an PANI-carrageenan-AuNPs layer. Then the probe was soaked in PQQ-Glucose dehydrogenase (GDH) solution before coating with polyurethane (PU) to prevent the enzymes from leaching away from the sensor. The sensor probe showed a sensitivity of $0.85 \mu\text{A}/\text{mg}/\text{ml}$ of glucose with R^2 of 0.9973 and detection limit of biosensor probe in $69 \pm 4 \text{ mg}/\text{ml}$. The storage stability of the probe was up to 4 days with stable signal. In agitated conditions, steady signals from the sensor were still observed despite of being in 150 rpm for 72 hours. In sugarcane bagasse hydrolysis with 150 rpm for 72 hours, the biosensor continuously displayed glucose concentration in the hydrolysate similarly to the results from HPLC method in real-time. Therefore, the developed glucose biosensor performed accurate glucose measurement in bioconversion processes.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ ดร. นาฏระพี (กรุณา) แชนเซซ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.กัณฑ์พัฒน์ จันทร์แสนภักดิ์ ซึ่งเป็นผู้ทรงคุณวุฒิให้ความอนุเคราะห์ในการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ SEM ทั้งนี้ยังเป็นทีที่ปรึกษาในงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรัฏฐ์ เหมือนชู อาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งให้ความกรุณาในด้านพัฒนาเครื่องมือทางด้านไฟฟ้าที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ อีกทั้งยังให้คำปรึกษาเกี่ยวกับความรู้ทางด้านไฟฟ้าแก่ผู้วิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในทุก ๆ ด้านที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย จนสามารถทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบิดา มารดา รุ่นพี่ รุ่นน้อง เพื่อน ๆ ปริญญาโท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นางสาวพรทิพย์ ชูโชติ นายพิชญ์ เพิ่มขึ้นและนางสาวณัฐณิชา อัจฉริยะ ที่คอยสนับสนุน ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมองส่วนดีทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่าคุณอาจารย์ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิทยานิพนธ์เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้องสำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขออภัยผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

นางสาว ทอฝัน พูลทอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ไบโอบีโอดี.....	3
2.2 เอนไซม์ Pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase (PQQ-GDH).....	5
2.3 วิธีการตรึงเอนไซม์ (Immobilization).....	6
2.3.1 วิธีการยึดด้วยตัวนำ (Carrier-bound enzyme).....	8
2.3.1.1 วิธีการแบบดูดซับ (Adsorption Method).....	8
2.3.1.2 วิธีการเชื่อมโยงด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonding).....	8
2.3.2 การตรึงแบบเชื่อมโยง (Cross-linking).....	8
2.3.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มหรือทำแคปซูล (Entrapment and Encapsulation).....	9
2.4 วัสดุที่ใช้ในการทำหัววัดไบโอบีโอดี.....	9

2.4.1	คาราจีแนน.....	9
2.4.2	อนุภาคนาโนทองคำ.....	10
2.4.3	พอลิอะนิลีน (Polyaniline).....	13
2.4.4	พอลิยูรีเทน (Polyurethane).....	15
2.5	วิธีการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry).....	17
2.5.1	โวลแทมเมตรี (Voltammetry).....	17
2.5.2	การวัดอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโกปีเชิงเคมีไฟฟ้า (Electrochemical impedance spectroscopy).....	19
2.6	การตรวจสอบสัณฐานโดย Scanning Electron Microscopy (SEM) และ Energy dispersive X-ray Spectroscopy (EDS).....	22
2.7	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
บทที่ 3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	26
3.1	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	26
3.2	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	26
3.3	วิธีวิจัย.....	27
3.3.1	การสร้างหัววัดไบโอเซนเซอร์.....	27
3.3.2	การวิเคราะห์ผลการทดลองหัววัดอิเล็กทรอนิกส์ที่พัฒนาขึ้น.....	28
3.3.2.1	การศึกษาสัณฐานของหัววัดไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM) และศึกษาธาตุและองค์ประกอบของหัววัดไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS).....	28
3.3.2.2	การทดสอบการรับส่งอิเล็กตรอนของหัววัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ cyclic voltammetry.....	28
3.3.2.3	การทดสอบการรับส่งอิเล็กตรอนของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ electrochemical impendent spectroscopy (EIS).....	28
3.3.2.4	การทดสอบความเสถียรของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในสภาวะการกวนระดับต่าง ๆ.....	29

3.3.2.5 การทดสอบความเสถียรหลังจากเก็บรักษาหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นใน ระยะเวลาต่างๆ.....	30
3.3.2.6 การปรับสภาพกากชานอ้อย	30
3.3.2.7 การทดสอบความเสถียรของหัววัดอิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้น ในกระบวนการย่อย ชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	30
3.3.2.8 การทดสอบวัดน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยชีวมวลด้วยเอนไซม์ ด้วย HPLC	30
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	32
4.1 การพัฒนาหัววัดกลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้สามารถใช้งานได้ยาวนานขึ้นด้วยเอนไซม์ PQQ- dependent glucose hydrogenase (PQQ-GDH).....	32
4.2 การศึกษาสัญญาณของหัววัดไบโอเซนเซอร์โดย SEM	33
4.3 การศึกษาธาตุและองค์ประกอบของหัววัดไบโอเซนเซอร์โดยเทคนิค Energy Dispersive X- ray Spectroscopy (EDS).....	35
4.4 การทดสอบหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	36
4.3.1 การตอบสนองน้ำตาลกลูโคสของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	36
4.3.2 ความเร็วในการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	37
4.3.3 การทดสอบความเสถียรของการเก็บรักษาหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้น	38
4.4 ผลจากการทดสอบปฏิกิริยารีดอกซ์บนหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจาก Cyclic Voltammetry.....	39
4.5 การวัดความต้านทานไฟฟ้าของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดย Electrochemical impedance spectroscopy	40
4.6 การทดสอบความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาแล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้ความเร็ว รอบที่แตกต่างกัน	42
4.7 การทดสอบความเสถียรของหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาแล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะ ไฮโดรไลซิส.....	43
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	46

เอกสารอ้างอิง 47

ประวัติผู้เขียน 48

ภาคผนวก..... 53

ภาคผนวก ข 56



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	26
ตารางที่ 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	26



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การทำงานของไบโอเซนเซอร์ โดยประกอบไปด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือ ไบโอดีคตะลิสต์ (biocatalyst) และทรานสดิวเซอร์ (transducers).....	3
ภาพที่ 2 องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์: (a) เซนเซอร์ที่ติดตามจากสารชีวภาพจับกับสารวิเคราะห์โดยตรง และ (b) เซนเซอร์ที่ติดตามสารที่วิเคราะห์โดยตรวจวัดสัญญาณจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดปฏิกิริยาของสารชีวภาพ (อัญชลี สำเภา, 2554).....	5
ภาพที่ 3 รูปแบบของการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในระบบที่มีกลูโคส.....	6
ภาพที่ 4 การตรึงเอนไซม์วิธีการต่าง ๆ a) การตรึงเอนไซม์ด้วยการยึดด้วยตัวนำ (Carrier-bound enzyme) b) การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้ (Cross-linked enzyme) c) การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้ม (Enzyme inclusion) และ d) วิธีการทำแคปซูล (Microcapsule).....	7
ภาพที่ 5 โครงสร้างโคโตซาน.....	8
ภาพที่ 6 โครงสร้างของคาราจีแนน (Rassas et al., 2019).....	10
ภาพที่ 7 กลยุทธ์การวิเคราะห์บาร์โค้ดชีวภาพ โดยใช้อนุภาคนาโนทอง a) การแสดงแผนผังของโพรบ Prostate specific antigen (PSA) Au-NP และ b) ชุดวิเคราะห์ PSA (prostate specific antigen) bio-barcode (Yeh et al., 2012).....	12
ภาพที่ 8 การหดตัวและขยายตัวของพอลิไพโรล เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์จะเกิดการเข้าแทรกของไอออนระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์.....	14
ภาพที่ 9 พอลิอะนิลีนเตรียมโดยการออกซิเดชันของพอลิเมอร์.....	15
ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาทั่วไประหว่าง diols และ diisocyanates ในการสร้างพอลิยูรีเทน.....	15
ภาพที่ 11 โครงสร้างรูปพื้นฐานทั่วไปของหน่วยรีพีทของพอลิยูรีเทน a) โครงสร้างโมเลกุลของ หมู่อัลคิล และ b) แผนผังของส่วนที่แข็งและอ่อนนุ่มของพอลิยูรีเทน.....	16
ภาพที่ 12 เซลล์ไฟฟ้าเคมีแบบสามขั้ว (ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง, 2548).....	18
ภาพที่ 13 ค่าความต่างศักย์ที่ขั้วไฟฟ้า ณ เวลาต่าง ๆ (ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง, 2548).....	19
ภาพที่ 14 แสดงค่าต่างเฟสของศักย์ไฟฟ้า (V , E) และกระแส (I).....	21

ภาพที่ 15 ลักษณะของไนควิสต์พล็อตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอิมพีแดนซ์จินตภาพ (Imaginary Impedance) และอิมพีแดนซ์จริง (Real Impedance) (สมการที่ 5).....	22
ภาพที่ 16 เครื่องมือวิเคราะห์เทคนิคแอมเพอโรเมตรี a) เครื่องมือวิเคราะห์เทคนิคแอมเพอโรเมตรี และ b) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก (I) ขั้วไฟฟ้าทำงาน (II) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ (III) ขั้วไฟฟ้าช่วย.....	29
ภาพที่ 17 ภาพจำลองหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้น a) ลวดทองคำที่เคลือบด้วยพอลิอะนิลีน b) เคลือบทับด้วยอนุภาคทองคำ c) เคลือบทับด้วยเอนไซม์ PQQ-GDH และ 25% กลูตาโรลดีไฮด์ และ d) เคลือบทับชั้นสุดท้ายด้วยพอลิยูรีเทน	32
ภาพที่ 18 หัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นบนลวดทองคำซึ่งวงกลมแสดงการเคลือบบนเส้นลวดทองคำ	33
ภาพที่ 19 สัณฐานวิทยาของพอลิอะนิลีนที่เคลือบบนหัววัดน้ำตาล a) กระแสไฟฟ้า 0.05 mA/cm ² b) กระแสไฟฟ้า 0.1 mA/cm ² c) กระแสไฟฟ้า 0.2 mA/cm ² และ d) กระแสไฟฟ้า 0.4 mA/cm ²	34
ภาพที่ 20 สัณฐานวิทยาของ Carr-GNPs/NaBH ₄ ภายในและบนผิวของพอลิอะนิลีน	34
ภาพที่ 21 สัณฐานวิทยาของหัววัดไบโอเซนเซอร์หลังจากเคลือบ a) กลูตาโรลดีไฮด์ และ b) พอลิยูรีเทน (PU).....	35
ภาพที่ 22 การวิเคราะห์ EDS ของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่เคลือบด้วย carr-AuNPs/NaBH ₄	36
ภาพที่ 23 การตอบสนองของหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาได้บนลวดทองคำต่อน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย a) กราฟมาตรฐานกลูโคสที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคส (mg/ml) กับกระแสไฟฟ้า (μA) และ b) กราฟแสดงความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นต่อเวลาที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (วินาที) กับความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml) โดยทำการเติมกลูโคสความเข้มข้น 300 mg/ml ลงไปทุก ๆ 120 วินาที (→).....	37
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาได้บนลวดทองคำต่อเวลาในการตอบสนองกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	38
ภาพที่ 25 ผลการทดลองการทดสอบความเสถียรของการเก็บรักษาหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นหลังจากที่เก็บรักษาในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ในวันที่ 0, 4, 7, 10, และ 13 หลังจากวันที่สร้างหัววัดไบโอเซนเซอร์.....	39

ภาพที่ 26 โวลแทมโมแกรมที่อัตราการสแกนที่ 100 mVs-1 ของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดย I) ทดสอบใน NaOAc บัฟเฟอร์ และ II) ทดสอบใน NaOAc บัฟเฟอร์ที่มีกลูโคส 0.6 mg/ml..... 40

ภาพที่ 27 ไนควิสต์พล็อต (Nyquist plot) ของ EIS ลวดทองคำ (▲), Au/PANI (*), Au/AuNPs (◆), Au/AuNPs/PQQ-GDH (■) และ Au/AuNPs/PQQ-GDH/PU (●) 41

ภาพที่ 28 การทดสอบความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะการกวนที่ต่างกัน โดยที่ความเร็วรอบในการกวนที่ 0 รอบต่อนาที (×), 150 รอบต่อนาที (—) และ 500 รอบต่อนาที (Δ) โดยค่าความคลาดเคลื่อน (error bars) แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ 3 ซ้ำ... 42

ภาพที่ 29 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของชานอ้อยและเอนไซม์เซลลูเลสในขวดแก้วสองชั้น ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง..... 43

ภาพที่ 30 การทดสอบความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ทดสอบภายใต้สภาวะไฮโดรไลซิสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml) วิเคราะห์ด้วยหัววัดน้ำตาล (—) และด้วยเทคนิค HPLC (*) โดยค่าความคลาดเคลื่อน (error bars) แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ 3 ซ้ำ..... 45

ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานบางส่วนที่ยกมา ทำการทดสอบใน 0.5 mM NaOAc บัฟเฟอร์ ภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 56

ภาพที่ 32 ผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นต่อเวลาในการตอบสนองกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ ทำการทดสอบใน 0.5 mM NaOAc บัฟเฟอร์ ภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... 57

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลถูกใช้ในการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและห้องปฏิบัติการ เป็นส่วนใหญ่ ทางด้านการแพทย์เครื่องมือที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นของกลูโคสคือ Continuous blood glucose monitor ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่วัดความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้ Brix refractometer และในปฏิบัติการทั่วไปวัดความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) แต่อย่างไรก็ตามในการใช้ HPLC ก็ยังมีข้อเสียอยู่ มาก เช่น ไม่สามารถที่จะวัดความเข้มข้นของกลูโคสได้อย่างทันท่วงที (real-time) ในสภาวะนั้น ๆ ต้องใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณมาก ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ผล (วีระวรรณ, 2538) เนื่องจากข้อเสียที่กล่าวมาข้างต้น การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธีไบโอเซนเซอร์เป็นเทคนิคที่น่าสนใจ นอกจากสามารถวัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้อย่างแม่นยำแล้วยังสามารถรายงานผลได้อย่างทันท่วงที

แม้ว่าไบโอเซนเซอร์จะได้รับการพัฒนามาหลายทศวรรษ แต่ความสนใจในการพัฒนานั้นส่วนใหญ่มุ่งอยู่ที่การตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของผู้ป่วย (Scholten & Meng, 2018) หรือในอุตสาหกรรมอาหารที่เน้นให้ได้ผลแม่นยำ รวดเร็ว ใช้ในการวัดในช่วงเวลาสั้น ๆ (Stolarczyk, Rogalski, & Bilewicz, 2020) แต่ในกระบวนการทางชีวภาพ (กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ (hydrolysis) และกระบวนการหมัก (fermentation)) นั้นจะต้องมีการกวนต่อเนื่องและใช้เวลานาน (72-120 ชั่วโมง) นอกจากนี้ยังเป็นกระบวนการที่มีทั้งของแข็งและของเหลว (heterogenous reactions) และยังไม่มีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่ทนต่อแรงเฉือนจากการกวนได้เป็นระยะเวลาสั้นๆ เพื่อใช้ในการกระบวนการทางชีวภาพ

ดังนั้นงานวิจัยนี้ ดิฉันสนใจที่จะพัฒนา กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่เป็น Amperometric biosensors ซึ่งเป็น ทรานดิวเซอร์ที่อาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่เกิดขึ้นที่พื้นผิวของอิเล็กโทรดแล้วเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนขึ้น โดยมีตัวกลาง ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนให้เข้าสู่

อิเล็กโทรด (พัฒนา, 2536) โดยเอนไซม์ PQQ-glucose hydrogenase (PQQ-GDH) จะถูกนำมาตรึงเข้ากับหัววัด จากนั้นถูกเคลือบด้วยสารเพิ่มความแข็งแรงและถูกนำมาทดสอบ ภายใต้สภาวะการกวนตลอดเวลาอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาหัววัดกลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้สามารถใช้งานได้ยาวนานขึ้นด้วยเอนไซม์ PQQ-dependent glucose hydrogenase (PQQ-GDH)
2. เพื่อศึกษาสัญญาณวิทยาของหัววัดไบโอเซนเซอร์โดย SEM
3. เพื่อวิเคราะห์หัววัดทดสอบการรับส่งอิเล็กตรอนของหัววัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ cyclic voltammetry และ Electrochemical impedance spectroscopy
4. เพื่อทดสอบความเสถียรของหัววัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้นในกระบวนการย่อยชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

พัฒนาหัววัดไบโอเซนเซอร์โดยการตรึงเอนไซม์ PQQ-GDHs ในรูปแบบการตรึงรูปด้วยและการห่อหุ้ม (Entrapment และ Encapsulation) เพิ่มความทนทานในการใช้งาน และวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ เพื่อใช้ติดตามปริมาณกลูโคสในปฏิกิริยาการย่อย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

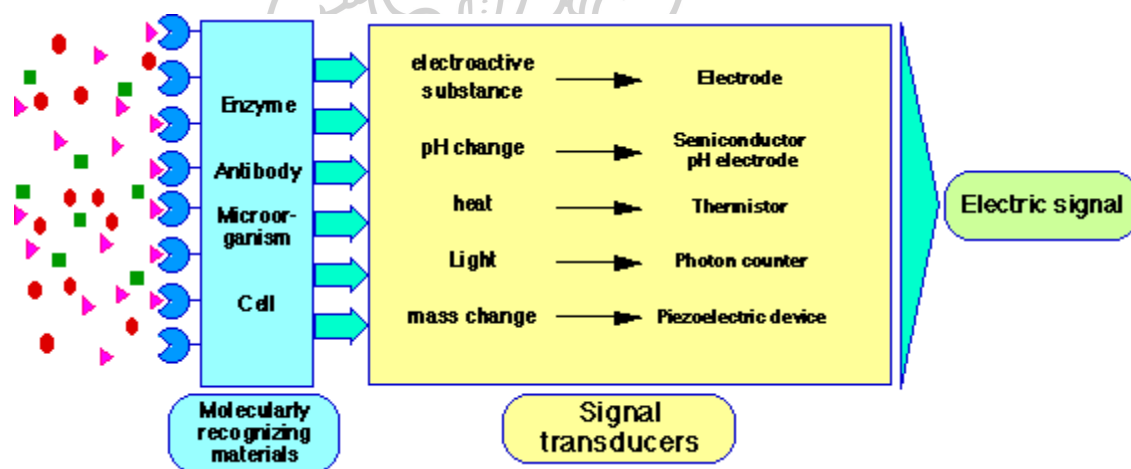
1. หัววัดไบโอเซนเซอร์มีความเสถียรและสามารถใช้งานได้ยาวนานขึ้น
2. หัววัดไบโอเซนเซอร์แสดงผลการวัดได้อย่างถูกต้องแม่นยำและต่อเนื่อง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอสเซนเซอร์

ไบโอสเซนเซอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารต่าง ๆ โดยวิธีไบโอสเซนเซอร์จะมีพื้นฐานจากการนำสารที่มีความไวทางชีวภาพ (Bioactive substance) หรือรีเซปเตอร์ (receptor) หรือไบโอคะตะลิสต์ (biocatalyst) มาใช้ร่วมกับเครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นทรานสดิวเซอร์ (transducer) ที่สามารถรับและแปลงสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ชีวเคมีหรือฟิสิกส์ ระหว่างไบโอคะตะลิสต์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าที่ถูกลำเลียงไปขยายเก็บและแสดงผลต่อไปได้ (ภาพที่ 1) สัญญาณไฟฟ้าที่แสดงออกมานี้จะมีความสัมพันธ์กับขนาดของสัญญาณที่เป็นผลของการเปลี่ยนแปลงและจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์



ภาพที่ 1 การทำงานของไบโอสเซนเซอร์ โดยประกอบไปด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือ ไบโอคะตะลิสต์ (biocatalyst) และทรานสดิวเซอร์ (transducers)

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/uploaded/biosensor.JPG>

โดยทั่ว ๆ ไปแล้วไบโอสเซนเซอร์จะประกอบไปด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือไบโอคะตะลิสต์ (biocatalyst) และ ทรานสดิวเซอร์ (transducers)

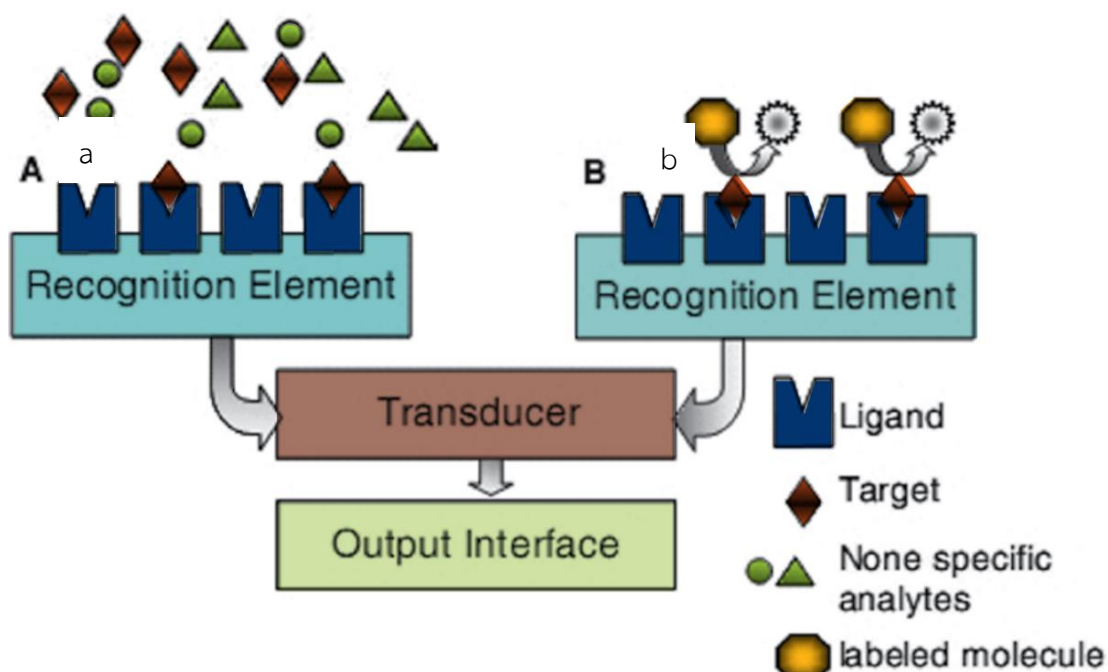
ไบโอคะตะลิสต์หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ที่นำมาใช้ในงานไบโอสเซนเซอร์มีทั้งเอนไซม์บริสุทธิ์ กลุ่มของเอนไซม์ เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์หรือเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งการที่จะเลือกใช้ไบโอคะตะ

ลิสต์ชนิดใดนั้น จะต้องเลือกใช้ให้จำเพาะเจาะจงและไวต่อสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์และให้สัญญาณทางเคมี หรือชีวเคมี โดยอาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตอน อีออนก๊าซ คุณสมบัติทางแสง หรืออิเล็กตรอนได้ อีกทั้งต้องมีความคงตัวสามารถเพาะเลี้ยงหรือขยายปริมาณได้ โดยจะต้องนำเอาไบโอคะตะลิสต์มาตรึงกับทรานส์ดิวเซอร์โดยไม่ให้สูญเสียกิจกรรมของไบโอคะตะลิสต์ไป

ทรานส์ดิวเซอร์ เป็นตัวรับและตัวแปลงสัญญาณที่เป็นผลมาจากกระบวนการทางชีวเคมี ระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์กับไบโอคะตะลิสต์ โดยจะให้สัญญาณไฟฟ้าที่สามารถนำไปขยายเก็บ และแสดงผลได้ สำหรับการเลือกหรือออกแบบทรานส์ดิวเซอร์มาใช้นั้น สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ความจำเพาะเจาะจงกับผลหรือสารที่เกิดจากปฏิกิริยาที่ใช้เป็นตัวชี้นำ (indicated species) การตอบสนองในช่วงของปริมาณหรือความเข้มข้นที่เหมาะสม การรับสัญญาณต่ำ ๆ ความสามารถในการตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว การชดเชย (compensation) เพื่อลดอิทธิพลของสัญญาณแทรกและสัญญาณเปลี่ยนรูปที่มาจากสิ่งแวดล้อม อีกทั้งต้องคำนึงถึงลักษณะชิ้นงานของทรานส์ดิวเซอร์ต้องเหมาะสมต่อการนำไบโอคะตะลิสต์มาตรึงติดได้

แอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ (Amperometric biosensors) เป็นทรานส์ดิวเซอร์ประเภทที่อาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่เกิดขึ้นที่ผิวหนึ่งของอิเล็กโทรดแล้วเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนขึ้น โดยมีตัวกลางหรือมีเดียเตอร์ (mediator) ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนให้เข้าสู่อิเล็กโทรด กระแสที่เกิดขึ้นจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ปฏิกิริยาและปริมาณกระแสที่เกิดขึ้นจะแปรผันไปตามความหนาและคุณสมบัติในการยอมให้สารผ่านได้มากน้อยของเมมเบรน (membrane) ที่ใช้ตัวกลาง (พัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2536)

ไบโอเซนเซอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้ ตามหลักการทำงาน 1) เซนเซอร์ที่สารชีวภาพจับกับสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์โดยตรง (direct recognition sensor) และวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงจากสาร ชีวภาพโดยตรงซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณสิ่งที่ติดตาม 2) เซนเซอร์ที่ติดตามปฏิกิริยาของสารชีวภาพทางอ้อม (indirect detection sensor) โดยติดตามจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ เมื่อทำการตรวจวัด สัญญาณของผลิตภัณฑ์สัญญาณที่ได้จะแปรตามปริมาณสารที่ติดตาม แสดงดังภาพที่ 2



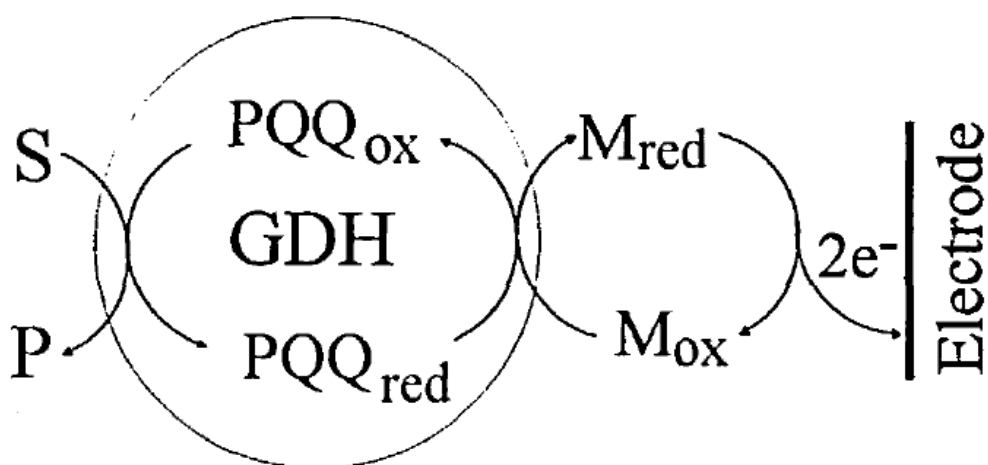
ภาพที่ 2 องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์: (a) เซนเซอร์ที่ติดตามจากสารชีวภาพจับกับสารวิเคราะห์โดยตรง และ (b) เซนเซอร์ที่ติดตามสารที่วิเคราะห์โดยตรงวัดสัญญาณจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดปฏิกิริยาของสารชีวภาพ (อัญชลี สำเภา, 2554)

2.2 เอนไซม์ Pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase (PQQ-GDH)

Pyrroloquinoline Quinone Glucose Dehydrogenase (PQQ-GDHs) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases กลุ่มใหม่ที่มีศักยภาพในด้านไบโอเซนเซอร์ ที่ได้รับการสนใจเมื่อไม่นานมานี้ เมื่อพบว่ามีประโยชน์ในด้านการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้โดยตรง (Direct electron transfer (DET)) จึงได้มีการนำมาออกแบบใช้เป็นขั้วไฟฟ้าประยุกต์เพราะ PQQ-GDH มีหลายเทคนิคที่สามารถใช้ในการตรึงเอนไซม์และพัฒนาการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Babanova, Matanovic, Chavez, & Atanassov, 2015)

รูปแบบการถ่ายเทอิเล็กตรอนในระบบที่มีกลูโคส โดยทั่วไปตัวรับอิเล็กตรอนใน PQQ dehydrogenases มักจะเป็นไซโตโครมหรือควิโนน ตัวรับอิเล็กตรอนโดยทั่วไปสามารถแทนที่ได้ด้วยตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์ เช่น เฟอร์โรซีนและอนุพันธ์ของมันพินาซีนเมทซัลเฟต (PMS) หรือพินาซีนเอโรซัลเฟลแต่ไม่ใช่ออกซิเจน เมื่อมีสารตั้งต้น (กลูโคส) ตัวเร่งปฏิกิริยาของ GDH จะถูกรีดิวซ์โดยสารตั้งต้นและอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนจากสารตั้งต้นไปยัง PQQ ที่ถูกผูกไว้ใน active center

ของเอนไซม์ โมเลกุลของเอนไซม์ที่ถูกรีดิวซ์จะแพร่กระจาย (ถ้าเอนไซม์อยู่ในสารละลาย) ไปที่พื้นผิวของอิเล็กโทรดและถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังโมเลกุลตัวกลางที่ตรึงอยู่บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดซึ่งจะลดลงอย่างทันที (ภาพที่ 3) (Laurinavicius et al., 1999).



ภาพที่ 3 รูปแบบของการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในระบบที่มีกลูโคส

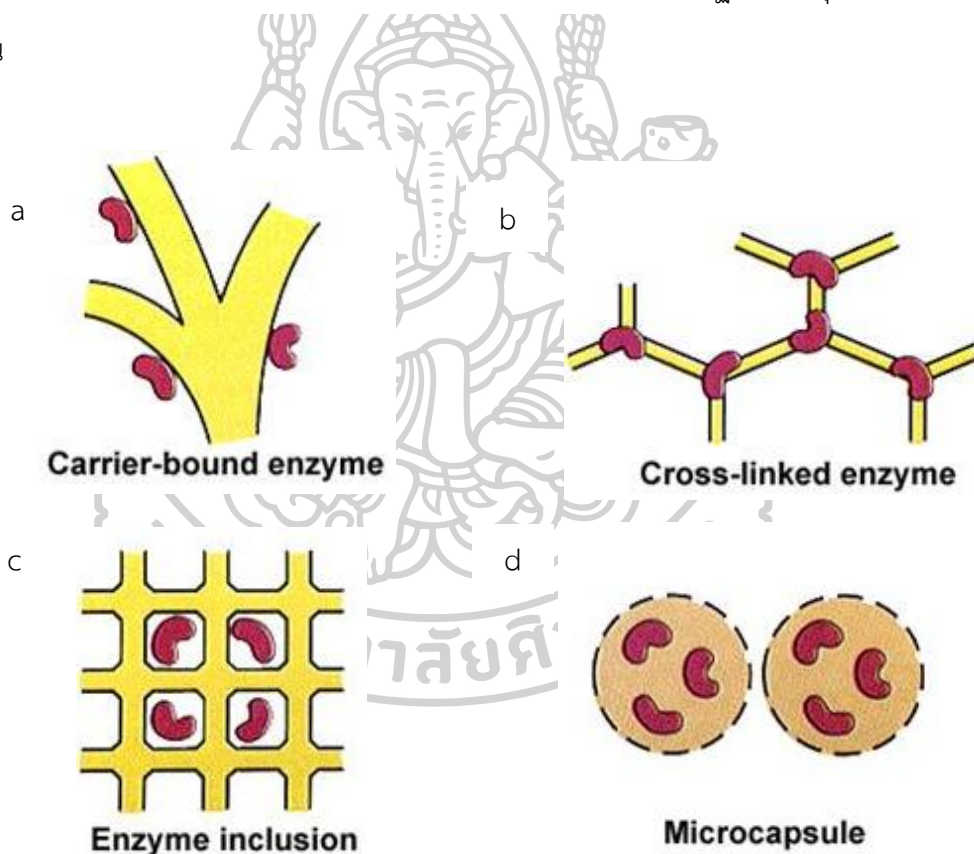
เอนไซม์ PQQ-GDH เป็นเอนไซม์ที่ไม่ไวต่อระดับออกซิเจนในตัวอย่างและมีฤทธิ์เร่งปฏิกิริยาทางกายภาพ ใน pH ที่สูง ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเอนไซม์ที่มีความน่าสนใจในงานด้านวิศวกรรมกลูโคสไบโอเซนเซอร์ เมื่อไม่นานมานี้ Sarauli และคณะ ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ copolymer ที่มี 2-methoxyaniline-5-sulfonic acid และอะนีนีลีนมอนอเมอร์ไม่เพียงแต่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ PQQ-GDH เท่านั้น แต่ยังทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์ที่ไม่ยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกกักไว้ PQQ-GDH เป็นเอนไซม์ที่เข้ากันได้กับสิ่งแวดล้อม สามารถทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์และสามารถเข้าไปจับกับพอลิเมอร์โดยไม่เกิดการสูญเสียการเกิดปฏิกิริยา ในด้านไฟฟ้าเมื่อเอนไซม์เข้าไปจับกับพอลิเมอร์จะไม่แสดงสัญญาณไฟฟ้าเคมีโดยตรงในกรณีที่ไม่มีการนำตาลกลูโคส (Sarauli, Xu, Dietzel, Schulz, & Lisdat, 2014)

2.3 วิธีการตรึงเอนไซม์ (Immobilization)

การตรึงเอนไซม์คือรูปแบบของเอนไซม์ที่ตรึงรูปที่พัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการแปรรูป โดยการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว ให้กลายเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายในน้ำ หรือละลายในได้น้อยมาก โดยการนำเอาเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดหรือจัดไว้หรือนำมาจับยึดไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายในน้ำ หรือทำให้โมเลกุลเอนไซม์

จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น ก่อนทำปฏิกิริยาเป็นของแข็ง ขณะทำปฏิกิริยาก็เป็นของแข็ง หลังทำปฏิกิริยาก็ยังคงสถานะเป็นของแข็งอยู่ (ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และศาสตราจารย์เกียรติคุณ. (2564). การตรึงเอนไซม์. <https://www.foodnetworksolution.com>)

เอนไซม์ตรึงรูปมีข้อดีคือ เมื่อใช้งานแล้วสามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้ง จนกว่าความสามารถในการเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ และสามารถใส่สถานะในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระดั้งเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การเลือกชนิดของตัวกลางที่ใช้จับยึด กับวิธีการตรึงรูป ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ กว้างขวางมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ ซึ่งจะต้องใช้สถานะการทำปฏิกิริยาที่จุดหนึ่งที่เหมาะสม เท่านั้น



ภาพที่ 4 การตรึงเอนไซม์วิธีการต่าง ๆ a) การตรึงเอนไซม์ด้วยการยึดด้วยตัวนำ (Carrier-bound enzyme) b) การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้ (Cross-linked enzyme) c) การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้ม (Enzyme inclusion) และ d) วิธีการทำแคปซูล (Microcapsule)

2.3.1 วิธีการยัดด้วยตัวนำ (Carrier-bound enzyme)

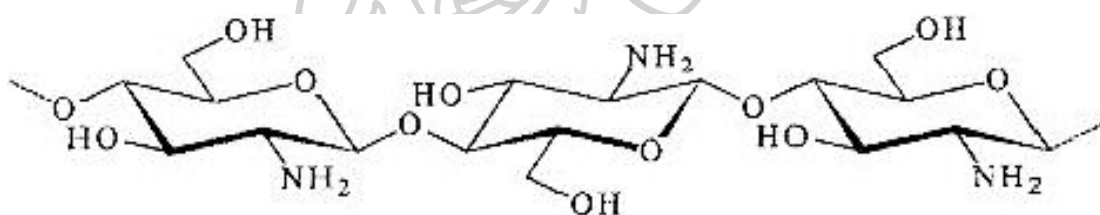
หมายถึงวิธีการตรึงโดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งอาจแบ่งย่อยได้ 2 วิธี

2.3.1.1 วิธีการแบบดูดซับ (Adsorption Method)

วิธีการแบบดูดซับ (ภาพที่ 4a) เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยการดูดซับเอนไซม์ไว้บนสารที่ไม่ละลายน้ำ โดยอาศัยแรงไฮโดรโฟบิกอิเล็กโทสแตติก (Hydrophobic electrostatic) หรือแรงยึดจับอื่น ๆ ที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ (Noncovalent affinity) เป็นการดูดซับทางกายภาพเท่านั้น ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงติดอย่างหลวม ๆ และไม่แข็งแรง

2.3.1.2 วิธีการเชื่อมไข้วด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonding)

ไคโตซานเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในรูปของ D-glucosamine (ภาพที่ 5) ไคโตซานมีหมู่เอมีนในสายโซ่และมีคุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อสารชีวภาพ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงได้นำไคโตซานมาประยุกต์สำหรับตรึงเอนไซม์ในเทคนิคไบโอเซนเซอร์



ภาพที่ 5 โครงสร้างไคโตซาน

2.3.2 การตรึงแบบเชื่อมไข้ว (Cross-linking)

การเชื่อมไข้วเป็นวิธีที่อาศัยสารชนิดไบฟังก์ชันนอล (Bifunctional) หรือมัลติฟังก์ชันนอล (Multifunctional) เพื่อทำหน้าที่เชื่อมสารชีวภาพให้ยึดติดกับตัวตรวจวัด

การเชื่อมไข้วกับเอนไซม์ (ภาพที่ 4b) ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ทั้งเอนไซม์ชนิดเดียวกันหรือทำให้เกิดลักษณะการเชื่อมติดกันแบบร่างแหของโปรตีนที่แตกต่างกันมากกว่าหนึ่งชนิด โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ได้หลายชนิด

การตรึงเอนไซม์โดยวิธีเชื่อมไข้วพบว่ามียี่ห้อคือ เอนไซม์จะถูกยึดติดบนตัวตรวจวัดอย่างแข็งแรงเนื่องจากเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับสารเชื่อมไข้วทำให้เทคนิคไบโอเซนเซอร์มีความคงตัวสูงขึ้นเพราะพันธะโคเวเลนต์เป็นพันธะที่มีความแข็งแรง ตรึงง่ายและราคาถูก

2.3.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มหรือทำแคปซูล (Entrapment and Encapsulation)

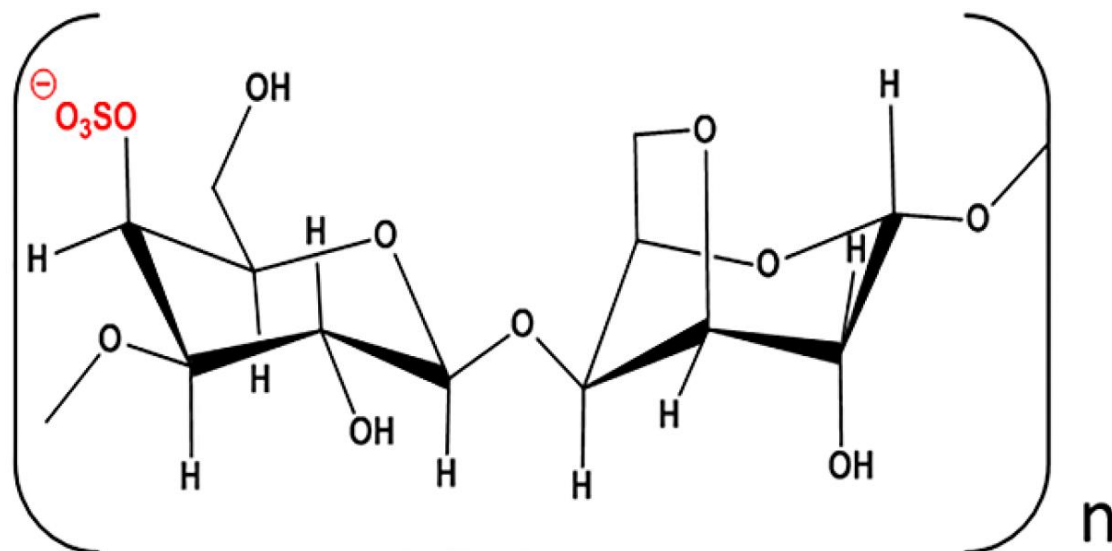
การทำให้เอนไซม์ไม่ละลายน้ำด้วยวิธีห่อหุ้มหรือการทำแคปซูล (microcapsule) โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มเอาไว้ด้วยเจลที่เป็นรูปร่าง (Lattice) หรือแคปซูล (Capsule) (ภาพที่ 4c และ 4d) สายโซ่พอลิเมอร์ที่ห่อหุ้มเอนไซม์จะต้องสามารถป้องกันการสูญเสียเอนไซม์ได้ และในขณะเดียวกันต้องยอมให้สารตั้งต้นเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ดี และผลิตภัณฑ์ที่ได้จะต้องซึมผ่านแคปซูลได้ง่ายด้วย

2.4 วัสดุที่ใช้ในการทำหัววัดไบโอเซนเซอร์

2.4.1 คาราจีแนน

คาราจีแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดงโดยเกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่าง D-galactose และ 3,6-anhydro-galactose (3,6 - AG) เชื่อมกันด้วยพันธะ α -1,3 และ β -1,4-glycosidic จึงได้เป็นคาราจีแนนออกมา คาราจีแนนเป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คาราจีแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่อกันเป็นสายยาว ประกอบด้วยไตรแซ็กคาไรด์ที่ทำซ้ำโดยมีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง 3-linked β -d-galactopyranose and 4-linked α -galactopyranose หรือ 3,6-anhydro- α - galactopyranose คาราจีแนนเป็นสารประเภทแอนไอออนพอลิแซ็กคาไรด์ มีประจุเป็นลบเนื่องจากมีหมู่ซัลเฟต (ภาพที่ 6) (Zhu, Nakamura, Zhu, Xu, & Matsuo, 2015)

เมื่อการาจีแนนซึ่งมีประจุลบทำงานร่วมกับเส้นใยพอลิอะนิลีนที่เป็นประจุบวก ทำให้สามารถทำงานร่วมกันได้อย่างดี เนื่องจากเส้นใยพอลิอะนิลีนมีความเป็นรูพรุนสูง คาราจีแนนจึงทำหน้าที่ปกปิดรูพรุนนั้นและยังสามารถเคลือบบนตัวเซนเซอร์ได้ดีอีกด้วย (Leppänen, 2013) ทั้งนี้คาราจีแนนยังเป็นสารทำให้โมโครแคปซูลมีความเสถียรและช่วยในการตรึงเอนไซม์ (Bener, Şen, Kaşgöz, & Apak, 2018)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของคาราจีแนน (Rassas et al., 2019)

2.4.2 อนุภาคนาโนทองคำ

อนุภาคนาโนทองคำนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพโดยอาศัยคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ อนุภาคนาโนทองคำมีพื้นที่ผิวที่หลากหลายซึ่งเหมาะสำหรับการใช้งานที่หลากหลายในการรวมกับ สารประกอบจำพวกชีวภาพนาโน (nanobiological composites), แอนติบอดีและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ ในงานทางด้านการวิเคราะห์ อนุภาคนาโนทองคำสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพได้ เช่น พื้นผิวพลาสมาเรโซแนนซ์ การนำไฟฟ้า และปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ทำให้เกิดสัญญาณที่ตรวจพบได้

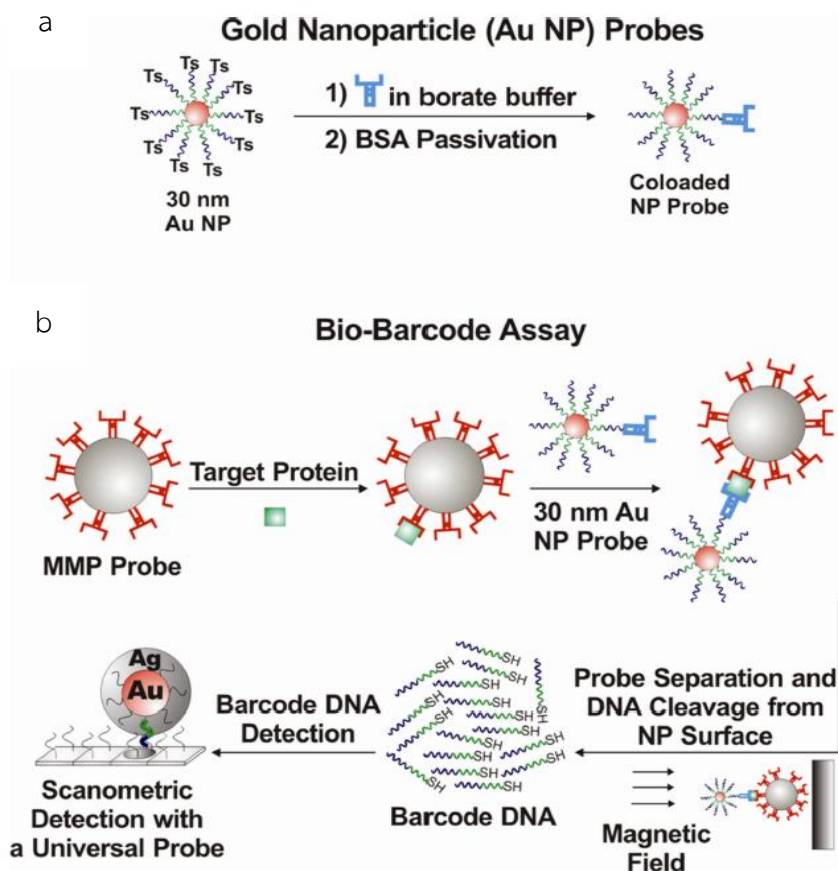
อนุภาคนาโนทองคำที่มีลักษณะเป็นทรงกลม มีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ เช่น ขนาดและรูปร่างที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติออปโตอิเล็กทรอนิกส์, อัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรขนาดใหญ่, ความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ยืดหยุ่นและความเป็นพิษต่ำ ซึ่งคุณสมบัติของอนุภาคนาโนทองคำเป็นสิ่งสำคัญอย่างมากในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Yeh, Creran, & Rotello, 2012)

การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนทองคำในทางเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านเซนเซอร์ อนุภาคนาโนทองคำนั้นมีประจุเป็นลบ (J. Jia et al., 2002) และเป็นอนุภาคนาโนโลหะที่เสถียรที่สุดจึงได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง (Chen, Wang, Wang, Dong, & Wang, 2006) เนื่องจากอนุภาคนาโนทองคำมีพื้นที่ผิวที่สามารถทำงานร่วมกับโมเลกุลชีวภาพ (Shaikh et al., 2017) จึงทำให้อนุภาคนาโนทองคำเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Feng et al., 2012) ข้อดีของอนุภาคนาโนทองคำคือมี

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง, เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี, ไม่มีความเป็นพิษและมีประโยชน์ในงานทางด้านวิเคราะห์ ซึ่งในงานทางด้านวิเคราะห์ก็นำมาสู่การพัฒนาอนุภาคนาโนทองคำให้เข้ากับอิเล็กทรอนิกส์หรือไบโอเซนเซอร์ เพราะอนุภาคนาโนทองคำสามารถทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางการนำไฟฟ้าขนาดเล็ก และสามารถอำนวยความสะดวกในการถ่ายโอนอิเล็กตรอน กลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของอนุภาคนาโนทองคำได้รับการตรวจสอบอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น Willner และคณะ., (2000) ได้ศึกษาระบบอิเล็กทรอนิกส์โฟโตอิเล็กทรอนิกส์และเซ็นเซอร์ซึ่งเกิดขึ้นจากการทำงานของพื้นผิวอิเล็กทรอนิกส์ที่มีโครงสร้างนาโนทองคำระดับนาโน โมเลกุลของสารชีวภาพยังคงมีอยู่อีกต่อไปเมื่อดูดซับบนอนุภาคนาโนทองคำมีงานหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์หลายตัวยังคงทำงานของเอนไซม์และเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าเมื่อถูกตรึงบนอนุภาคนาโนทองคำ (Jia et al., 2002)

อนุภาคนาโนทองคำที่มีขนาดเล็กสามารถที่จะบรรจุลงบนผิวของแข็งได้ และสามารถแบ่งตำแหน่ง binding site สำหรับการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยขนาดของอนุภาคนาโนทองคำมีความสำคัญอย่างมากสำหรับไบโอเซนเซอร์ จากงานวิจัยของ Yi และคณะ (2006) ได้รายงานว่ อนุภาคนาโนทองคำที่มีขนาดเล็กส่งผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ HRP (horseradish peroxidase) สูงกว่าการใช้อนุภาคนาโนทองคำขนาดใหญ่ ดังนั้นอนุภาคนาโนทองคำขนาดเล็กจึงเหมาะสำหรับใช้ในการดัดแปลงไบโอเซนเซอร์เพื่อเสริมประสิทธิภาพการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรงของโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็ก

อนุภาคนาโนทองคำมีความสามารถในการจำ เช่น แอนติบอดีหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับการตรวจหาสารชีวโมเลกุลเป้าหมาย ช่วยให้สามารถตรวจหาและวินิจฉัยโรคได้ ตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโนทองคำมีบทบาทสำคัญใน "การวิเคราะห์บาร์โค้ดชีวภาพ" ซึ่งเป็นวิธีการพิเศษสำหรับการตรวจจับโปรตีนเป้าหมายและกรดนิวคลีอิก หลักการของ "การวิเคราะห์บาร์โค้ดชีวภาพ" ใช้ประโยชน์จากอนุภาคนาโนทองคำที่ผันแปรทั้งบาร์โค้ด โอลิโกนิวคลีโอไทด์และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเป้าหมายและ magnetic microparticles (MMPs) องค์กรประกอบเหล่านี้สร้าง sandwich complex เมื่อตรวจจับโมเลกุลเป้าหมายที่ปล่อยบาร์โค้ดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์จำนวนมาก อนุภาคนาโนทองคำสามารถระบุและการวัดปริมาณของเป้าหมายได้ (Yeh et al., 2012) (ภาพที่ 7)



Scheme 4.
AuNP-based bio-barcode detection strategy. Reprinted with permission from Ref. 46.

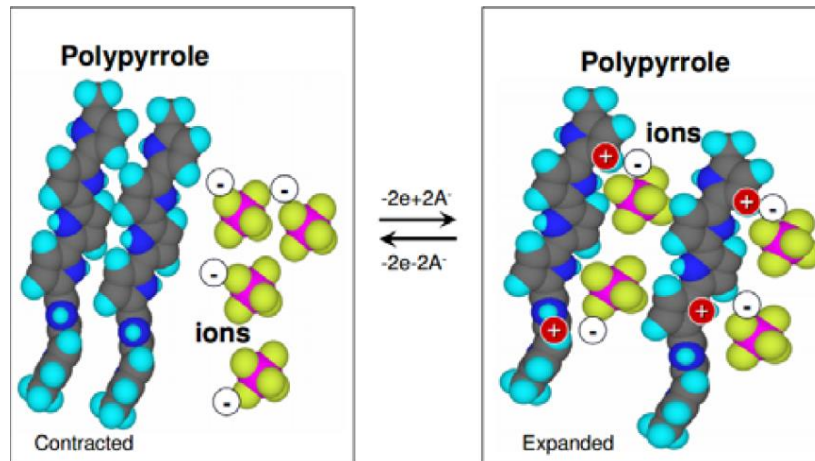
ภาพที่ 7 กลยุทธ์การวิเคราะห์บาร์โค้ดชีวภาพ โดยใช้อนุภาคนาโนทอง a) การแสดงแผนผังของโพรบ Prostate specific antigen (PSA) Au-NP และ b) ชุดวิเคราะห์ PSA (prostate specific antigen) bio-barcode (Yeh et al., 2012)

Au-NPs ใช้บาร์โค้ด DNA (30 nm) เชื่อมโยงกับแอนติบอดีจำเพาะ PSA ผ่านการดัดแปลงบาร์โค้ดด้วย tosyl (Ts) เพื่อสร้างโพรบ PSA Au-NP (ภาพที่ 7a) ในขั้นตอนที่สองโพรบ PSA Au-NP จะถูกส่งผ่านด้วย BSA (ภาพที่ 7b) การทดสอบ bio-barcode เป็น sandwich immunoassay ขั้นแรก พื้นผิว MMPs ทำหน้าที่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ PSA จับกับโพรตีนเป้าหมาย ถัดมาเพิ่มโพรบ PSA Au-NP เพื่อทำให้เกิด MMP-bound PSA อีกครั้งหลังจากการแยกแม่เหล็กและขั้นตอนการล้าง บาร์โค้ด DNA ที่จำเพาะกับ PSA จะถูกปล่อยออกมาในสารละลายและตรวจโดยใช้วิธีการสแกนแบบตรวจจับ (Thaxton et al., 2009)

2.4.3 พอลิอะนิลีน (Polyaniline)

พอลิอะนิลีน (Polyaniline) คือพอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่สังเคราะห์จากอะนิลีนมอนอเมอร์ซึ่งได้รับการตรวจสอบสำหรับการใช้งานที่หลากหลายรวมถึงเป็นวัสดุที่ใช้สำหรับการตรวจจับทางชีวภาพและทางเคมี (Blighe, Diamond, Coleman, & Lahiff, 2012) พอลิอะนิลีนถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเคลือบป้องกันการเกิดสนิมของแบตเตอรี่, ตัวเก็บประจุยิ่งยวด (supercapacitors) และเซ็นเซอร์ เนื่องจากสังเคราะห์ง่าย ต้นทุนต่ำและยังมีความสามารถในการนำไฟฟ้าดีเยี่ยม ซึ่งการประยุกต์ใช้พอลิอะนิลีนในวัสดุกักเก็บพลังงานมีแนวโน้มในทางที่ดี เมื่อเร็ว ๆ นี้มีงานวิจัยนำพอลิอะนิลีนมาใช้ปรับเปลี่ยนพื้นผิวสำหรับกักเก็บไฮโดรเจน เมื่อนำพอลิอะนิลีนไปตรวจวัดด้วยโวลแทมเมทรีแบบการถ่ายโอนประจุแสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ที่สามารถย้อนกลับได้บนพื้นผิวของพอลิอะนิลีน จึงทำให้เห็นว่าพอลิอะนิลีนมีประโยชน์ในการอำนวยความสะดวกในการแพร่กระจายของไฮโดรเจนและการถ่ายโอนประจุเนื่องจากมีลักษณะเป็นรูพรุน การเคลือบพอลิอะนิลีนบนวัสดุทำให้ประสิทธิภาพในการจัดเก็บไฮโดรเจนของโลหะเพิ่มขึ้น (Liu et al., 2020) และยังช่วยเพิ่มอัตราส่วนพื้นผิวต่อปริมาตรของวัสดุซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับเซ็นเซอร์ที่ใช้งาน เนื่องจากการเพิ่มอัตราส่วนพื้นผิวสามารถนำไปสู่การปรับปรุงความไวของเซ็นเซอร์และเวลาในการตอบสนอง (Blighe, Diamond, Coleman, & Lahiff, 2012)

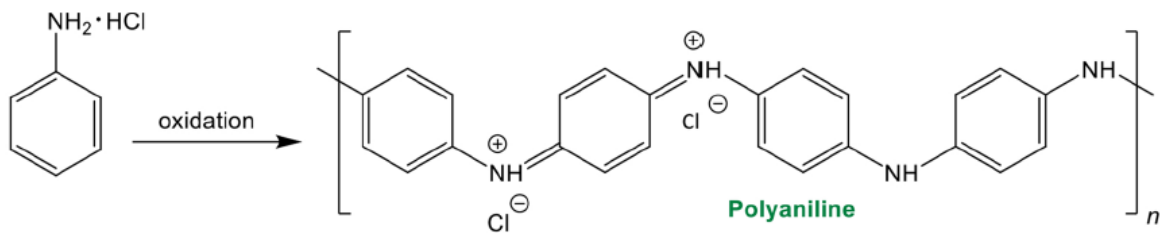
พอลิอะนิลีนเป็นตัวอย่างของพอลิเมอร์นำไฟฟ้า พอลิอะนิลีนสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างทางไฟฟ้าเคมีได้ ซึ่งสลับระหว่างสถานะรีดอกซ์ตั้งแต่สองสถานะขึ้นไปแต่ละสถานะมีลักษณะทางไฟฟ้าเคมีที่แตกต่างกัน การนำไฟฟ้าเกิดขึ้นในพอลิอะนิลีนที่ได้รับการกระตุ้นซึ่งโปรตอนจะยึดติดกับแกนหลักของพอลิอะนิลีนทำให้เกิดการสร้าง bipolaron และทำให้สามารถถ่ายโอนประจุไปยังพอลิเมอร์ได้ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การหดตัวและขยายตัวของพอลิไพร์โรล เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์จะเกิดการเข้าแทรกของไอออนระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์

โครงสร้างโมเลกุลของพอลิอะนิลีนขึ้นอยู่กับระบบ conjugated ของการพันธะเดี่ยวและพันธะคู่รวมถึงแหวนอะโรมาติกและด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดสีขึ้น โพลีเมอร์เหล่านี้เป็น polycations คุณสมบัติบางอย่างจะใช้ร่วมกับสีย้อมอินทรีย์ที่มีอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของ chromophores ตามระบบ conjugated ของพันธะคู่ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับไอออนประจุบวกหรือประจุลบเนื่องจากมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่มากและมีกลุ่มไอออนิกจึงมีลักษณะคล้ายกับสารลดแรงตึงผิว พอลิอะนิลีนถูกพบว่ามีปฏิกิริยากับสีย้อมอินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วการทำงานร่วมกันระหว่างไอออนบวกและไอออนลบทั้งสองอาจถูกนำไปใช้ประโยชน์ในทิศทางที่แตกต่างกันสำหรับการควบคุมสัญญาณวิทยาของพอลิเมอร์และการนำไฟฟ้า ถ้ามีสีย้อมอินทรีย์อยู่ในปฏิกิริยาที่ใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์นำไฟฟ้า พอลิอะนิลีนจะปล่อยโปรตอนออกมาอย่างรวดเร็วสลับไปยังรูปแบบที่ไม่เห็นยวนำไฟฟ้า โดยทั่วไปแล้วค่าการนำไฟฟ้าของพอลิอะนิลีนเสถียรในช่วงเวลานาน พอลิเมอร์นำไฟฟ้าเช่นพอลิอะนิลีนจึงกลายเป็นพอลิเมอร์ที่สำคัญเนื่องจากการผสมผสานทางอิเล็กทรอนิกส์และไอออนนำไฟฟ้า การตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอกและคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานต่าง ๆ

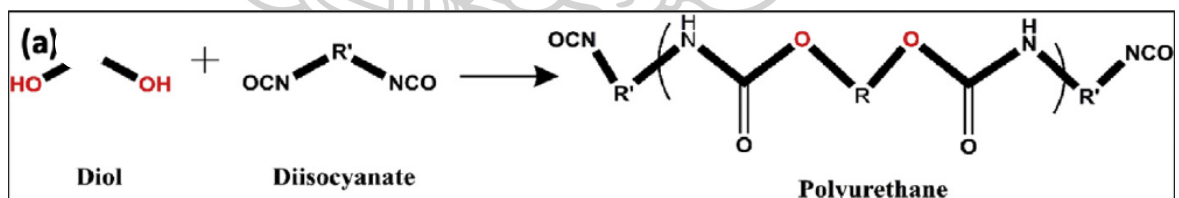
พอลิอะนิลีนมีสัญญาณวิทยาเป็นทรงกลมสันนิษฐานว่าโอลิโกเมอร์ที่ผลิตในช่วงแรกของการเกิดออกซิเดชันเรียกว่านิวเคลียส ซึ่งจะไม่ละลายในตัวกลางที่รวมกับอนุภาคนาโนและกระตุ้นการเจริญเติบโตของพอลิเมอร์โซ่ที่สร้างจากทรงกลม (ภาพที่ 9) (Stejskal & Prokeš, 2020)



ภาพที่ 9 พอลิอะนิลีนเตรียมโดยการออกซิเดชันของพอลิเมอร์

2.4.4 พอลิยูรีเทน (Polyurethane)

พอลิยูรีเทน (Polyurethane: PU) มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่เหมาะสมสำหรับการประดิษฐ์เซนเซอร์ ในช่วงไม่กี่ทศวรรษที่ผ่านมาพอลิยูรีเทนได้รับความสนใจในฐานะตัวกลางที่มีคุณค่าสำหรับการสร้างเครื่องมือวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพพร้อมกับการยกระดับความสามารถในการตรวจจับและการเลือกสรรของเซนเซอร์ ดังนั้นโครงสร้างของพอลิยูรีเทน และโครงสร้างทางเคมีจึงแสดงให้เห็นว่ามีผลต่อประสิทธิภาพของเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นโดยมีพอลิยูรีเทนจะใช้เป็นส่วนประกอบหลักในการตรวจจับ ในปัจจุบันมีการสำรวจการใช้พอลิยูรีเทนกับการผลิตไบโอเซนเซอร์ชนิดต่าง ๆ พอลิยูรีเทนเป็นการสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง diols (หรือ polyols) และ diisocyanate นำไปสู่การก่อให้เกิดพอลิยูรีเทน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาทั่วไประหว่าง diols และ diisocyanates ในการสร้างพอลิยูรีเทน

โดยทั่วไปแล้วคุณสมบัติของพอลิยูรีเทน จะเปลี่ยนไปโดยการเลือก diols ที่แตกต่างกันซึ่งมีจำนวน diisocyanates อยู่อย่างจำกัด

จากโครงสร้างรูปพื้นฐานทั่วไปของหน่วยรีพีท (Repeating unit) จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนนิ่ม (soft segment) และส่วนแข็ง (hard segment) (ภาพที่ 11) ส่วนนิ่มจะเป็นส่วนในกลุ่ม Diol สำหรับส่วนแข็งจะเป็นส่วนที่อยู่ในกลุ่ม Diisocyanate การที่พอลิยูรีเทนสามารถแสดงลักษณะพฤติกรรมได้เช่นนี้ เป็นเพราะ -C-O-C- ที่อยู่ในส่วน Diol ที่ความยืดหยุ่นได้ส่วน -NH-CO- จาก Diisocyanate มีความแข็งแรงที่สูงกว่า นอกจากมุมพันธะที่มีความยืดหยุ่นต่ำกว่า ยังมีผลจาก

2.5 วิธีการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemistry)

2.5.1 โวลแทมเมตรี (Voltammetry)

การวิเคราะห์ด้วยหลักการโวลแทมเมตรี อาศัยการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากับวงจรเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วทำการวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา การจัดเซลล์เคมีไฟฟ้าจะจัดแบบอเล็กโทรไลติกเซลล์ (Electrolytic cells) เซลล์ไฟฟ้าจะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งขั้วไฟฟ้าในการทำโวลแทมเมตรีจะประกอบไปด้วย ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode) ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode) และขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode) อุปกรณ์และเครื่องมือของเทคนิคโวลแทมเมตรีประกอบด้วย 2 ส่วนคือ เซลล์เคมีไฟฟ้าและเครื่องโพเทนชิโอสแตต

เซลล์เคมีไฟฟ้าจะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ในส่วนของขั้วไฟฟ้าประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วคือ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าทำงาน (ภาพที่ 12)

1. ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode)

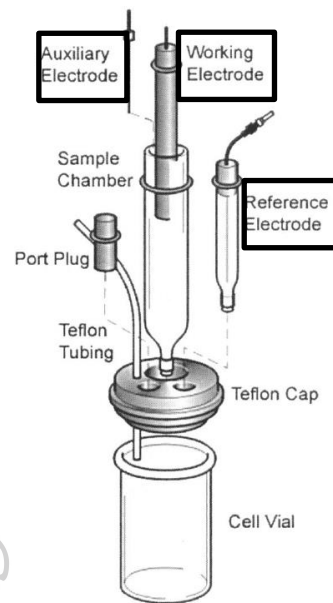
ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงจะเป็นขั้วไฟฟ้าที่มีค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ตลอดการทดลอง โดยทำหน้าที่ควบคุมค่าศักย์ของขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่นิยมใช้ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าเงิน-เงินคลอไรด์ (Silver-silver chloride electrode; Ag/AgCl)

2. ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode)

ขั้วไฟฟ้าช่วยเป็นขั้วไฟฟ้าที่รับค่ากระแสไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าอ้างอิงส่งผ่านสารละลายอิเล็กโทรไลต์ไปยังขั้วไฟฟ้าทำงาน ทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี เพื่อให้สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เกิดปฏิกิริยาเคมี โดยขั้วไฟฟ้าช่วยที่ดีในขณะเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างจะต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น

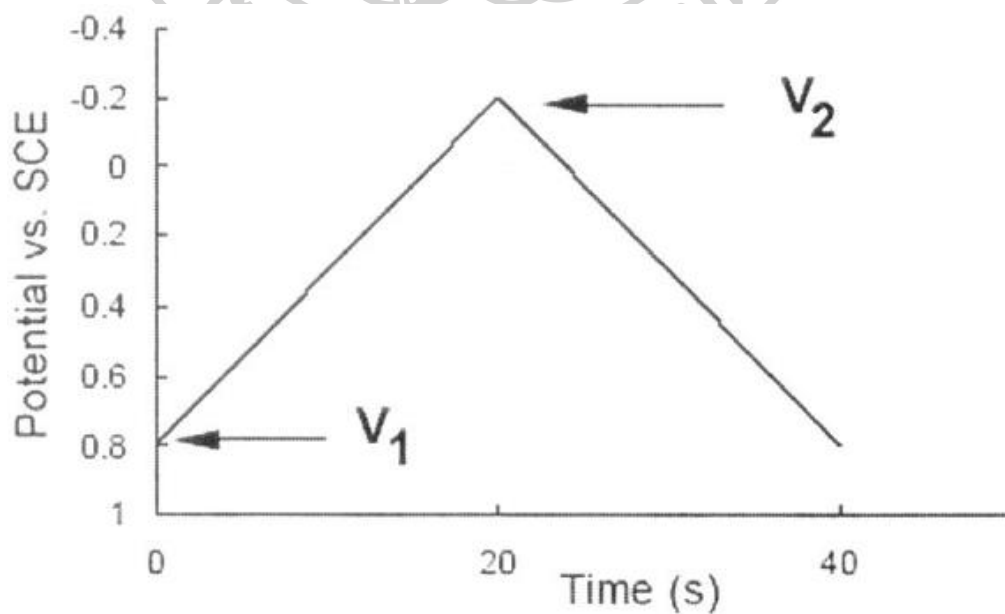
3. ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode)

ขั้วไฟฟ้าทำงาน มีหน้าที่ให้ความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้า เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า ผลจากการเกิดปฏิกิริยาขั้วไฟฟ้าทำงานจะทำหน้าที่ส่งความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้าไปยังตัวตรวจวัด และตัวแปลงสัญญาณต่อไป เพื่อให้ได้สัญญาณทางไฟฟ้า

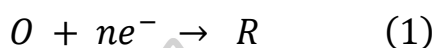


ภาพที่ 12 เซลล์ไฟฟ้าเคมีแบบสามขั้ว (ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง, 2548)

หลักการทำงานของเทคนิคนี้ คือโพเทนชิโอสแตตจะให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าไปที่ขั้วไฟฟ้า โดยควบคุมให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเปลี่ยนแปลงในลักษณะเส้นตรงจากความต่างศักย์ค่าหนึ่งไปอีกค่าหนึ่ง เช่น V_1 ไปยังอีกค่าหนึ่ง เช่น V_2 เรียกค่าความต่างศักย์สองค่านี้ว่า สวิตชิงโพเทนเชียล ความสัมพันธ์ของความต่างศักย์กับเวลาในการวิเคราะห์สามารถแสดงได้ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ค่าความต่างศักย์ที่ขั้วไฟฟ้า ณ เวลาต่าง ๆ (ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง, 2548)
เมื่อเริ่มการวิเคราะห์ ความต่างศักย์จะอยู่ที่ค่า V_1 และค่อย ๆ เปลี่ยนไปในทางลบมากขึ้นไปสู่ค่า V_2 การเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้เป็นการป้อนอิเล็กตรอนให้กับสารที่ต้องการวิเคราะห์บริเวณขั้วไฟฟ้าทำงาน ถ้าสารที่ทำการวิเคราะห์สามารถเกิดปฏิกิริยาในช่วงนี้จะเป็นปฏิกิริยารีดักชันดังสมการที่ (1) การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ส่งผลทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น และเรียกระแสไฟฟ้านี้ว่ากระแสแคโทด (Cathodic current)



เมื่อค่าความต่างศักย์ได้เปลี่ยนจนถึงค่าสวิตชิงโพเทนเชียลที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นโพเทนเชียลจะเปลี่ยนทิศทางของความต่างศักย์ในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือจะเปลี่ยนในทางบวกมากขึ้น จากตำแหน่ง V_2 กลับไปสู่ V_1 และถ้าสารที่ทำการวิเคราะห์สามารถเกิดปฏิกิริยาในช่วงที่สองนี้จะเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังสมการที่ (2) และการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวนี้จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้นเช่นกันและเรียกระแสไฟฟ้าในช่วงนี้ว่ากระแสแอโนด (Anodic current)

ผลของการวิเคราะห์โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตตรีจะแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความต่างศักย์ที่ป้อนให้ขั้วไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น หรือเรียกว่าไซคลิกโวลแทมโมแกรม ดังรูป โวลแทมโมแกรมของสารประกอบสามารถเกิดได้ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน โดยความต่างศักย์ตรงตำแหน่งที่กราฟสูงสุดเป็น ค่าความต่างศักย์ของปฏิกิริยารีดักชัน (Cathodic peak potential, E_{pc}) และตำแหน่งที่ต่ำที่สุดเป็นค่าความต่างศักย์ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Anodic peak potential, E_{pa}) สำหรับปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าแบบย้อนกลับ (Electrochemically reversible reaction) นิยมรายงานเป็นค่าความต่างศักย์มาตรฐานของปฏิกิริยารีดักชัน (Formal electrode potential, E^0) (ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง, 2548)

2.5.2 การวัดอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโกปีเชิงเคมีไฟฟ้า (Electrochemical impedance spectroscopy)

อิมพีแดนซ์สเปกโตรสโกปีเชิงเคมีไฟฟ้า หรือ เรียกว่าอิเล็กโตรเคมีคอลอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโกปี (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) มีชื่อย่อเรียกว่าเทคนิค AC

Impedance เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์อย่างมาก ในการวิเคราะห์ลักษณะของระบบเซลล์เคมีไฟฟ้า ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานด้านวัสดุศาสตร์ เช่น ในการศึกษาลักษณะ การเคลือบแบตเตอรี่ หรือเซลล์เชื้อเพลิง รวมไปถึงการวิเคราะห์การแพร่ของไอออนผ่านเยื่อและการศึกษารอยต่อของสารกึ่งตัวนำ

หลักการของ AC Impedance คือ การให้ทางกระแสไฟฟ้าสลับในรูปฟังก์ชันไซน์ (Sine wave) โดยการควบคุมศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าแอมพลิจูดของศักย์ไฟฟ้า (Amplitude) ต่ำในระดับ 10 - 50 มิลลิโวลต์ และปรับเปลี่ยนความถี่ได้ในช่วงระหว่าง 10^{-3} - 10^5 เฮิรตซ์ เมื่อกำหนดศักย์ไฟฟ้าคงที่ค่าหนึ่งแล้วเพิ่มศักย์ไฟฟ้าในรูปกระแสสลับ บ่อนให้แก่ระบบแล้ววัดค่ากระแส จากค่ากระแสที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์ค่าอิมพีแดนซ์ของระบบเซลล์เคมีไฟฟ้านั้น ๆ ซึ่งค่าอิมพีแดนซ์สามารถใช้บ่งบอกคุณลักษณะการตอบสนองของกระแสไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้า หรือสัญญาณอื่น ๆ ทางไฟฟ้าของวัสดุที่สนใจได้

โดยทั่วไปการทดลองอิมพีแดนซ์ของระบบไฟฟ้าจะประกอบด้วย

- ก. เครื่องวัดศักย์ไฟฟ้า (Potentiostat) หรือเครื่องวัดกระแส (Galvanostat)
- ข. เครื่องวิเคราะห์การตอบสนองค่าความถี่ (Frequency Response Analyzer, FRA)
- ค. เซลล์เคมีไฟฟ้า โดยเซลล์เคมีไฟฟ้า ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าพื้นฐาน แบบ 3 ขั้ว คือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working Electrode, WE) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference Electrode, RE) และขั้วไฟฟ้าช่วย หรือขั้วไฟฟ้าบ่อนศักย์ไฟฟ้า (Counter Electrode, CE)

อิมพีแดนซ์ (Impedance) คือ ความต้านทานของไฟฟ้ากระแสสลับ (Alternating Current, AC) ซึ่งสามารถแสดงค่าอิมพีแดนซ์ได้โดยอาศัยกฎของโอห์ม (Ohm law) ตามสมการที่ (3)

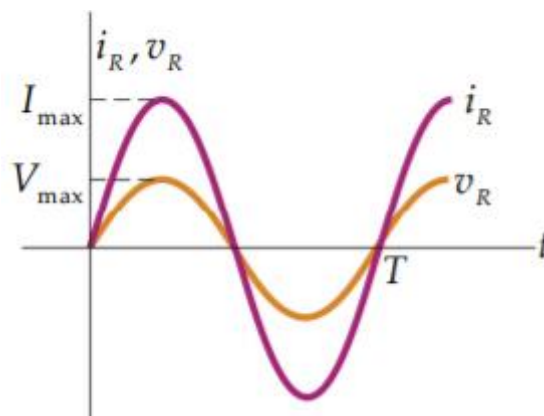
$$E = IZ \quad (3)$$

เมื่อ E คือ ค่าศักย์ไฟฟ้า

I คือ กระแสไฟฟ้า

Z คือ อิมพีแดนซ์ หรือ ความต้านทานในรูปของกระแสสลับ

ค่าอิมพีแดนซ์จะเท่ากับความต้านทาน (Resistance, R) เมื่อค่าต่างเฟส (Phase shift) ของ ศักย์ไฟฟ้า (E) และกระแส (I) มีค่าเท่ากับศูนย์ ซึ่งในไฟฟ้ากระแสสลับจะมีค่าต่างเฟสของศักย์ไฟฟ้า และกระแส (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงค่าต่างเฟสของศักย์ไฟฟ้า (V, E) และกระแส (I)
(ที่มา: การเหนี่ยวนำไฟฟ้าและวงจรไฟฟ้ากระแสสลับ : ออนไลน์)

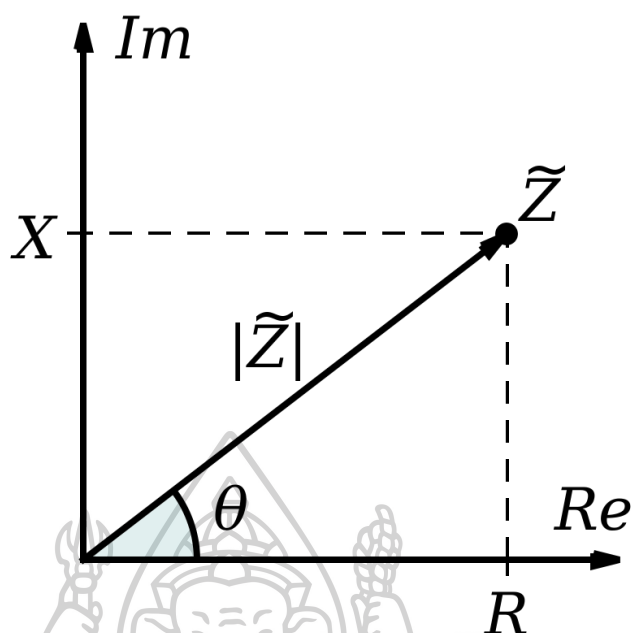
ดังนั้น ในรูปของกระแสสลับ ขนาดอิมพีแดนซ์หาได้จากความสัมพันธ์ตามสมการที่ (4)

$$Z = \frac{E_0 \sin \omega t}{I_0 \sin(\omega t + \theta t)} \quad (4)$$

เมื่อ ω คือ ความถี่เชิงมุมต่อวินาที มีค่าเท่ากับ $2\pi f$ เมื่อ f คือ ความถี่มีหน่วยเป็นเฮิร์ต (Hertz)

θ คือ ความต่างเฟสมีหน่วยเป็นเรเดียน (Radian)

ขนาดอิมพีแดนซ์ประกอบด้วยอิมพีแดนซ์ส่วนจริง (Real Impedance) และอิมพีแดนซ์ส่วนจินตภาพ (Imaginary Impedance) โดยอิมพีแดนซ์ส่วนจริง หมายถึงค่าศักย์ไฟฟ้า (E) และกระแส (I) จะอยู่เฟสเดียวกับกระแส (In phase) ในทางตรงข้ามอิมพีแดนซ์จินตภาพค่าศักย์ไฟฟ้า (E) และกระแส (I) จะอยู่ต่างเฟสกับกระแส (Out of phase) เมื่อนำค่าอิมพีแดนซ์ทั้งสองมาสร้างกราฟโดยให้ค่าอิมพีแดนซ์จินตภาพ (Imaginary Impedance) บนแกน Y และอิมพีแดนซ์จริง (Real Impedance) บนแกน X จะได้กราฟที่มีลักษณะเฉพาะ เรียกว่าการพล็อตว่า ไนควิสต์พล็อต (Nyquist plot) ที่มีลักษณะแตกต่างกัน



ภาพที่ 15 ลักษณะของโนควิสต์พล็อตที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอิมพีแดนซ์จินตภาพ (Imaginary Impedance) และอิมพีแดนซ์จริง (Real Impedance) (สมการที่ 5) จะได้ว่า

$$Z = Z' + Z'' \quad (5)$$

เมื่อ Z คือ ผลรวมอิมพีแดนซ์ของทั้งส่วนจริง (Z') และส่วนจินตภาพ (Z'') และ $\tan \theta = \frac{Z''}{Z'}$ (วรพรรณ พรหมศิลา, 2556)

2.6 การตรวจสอบสัณฐานโดย Scanning Electron Microscopy (SEM) และ Energy dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)

เทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนนิ่ง (Scanning Electron Microscopy (SEM)) ใช้ศึกษาวัสดุโดยใช้การกวาดลำอิเล็กตรอนบนผิววัสดุนั้น แล้วนำสัญญาณที่ได้ เช่น สัญญาณอิเล็กตรอนทุติยภูมิและสัญญาณอิเล็กตรอนกระเจิงกลับไปสร้างเป็นภาพ ภาพที่ได้จากกล้อง SEM เป็นภาพที่มีกำลังขยายสูง และสามารถแยกแยะรายละเอียดของภาพได้ถึง 100 นาโนเมตร และมีลักษณะเหมือน 3 มิติที่มีระยะชัดลึกสูง ทำให้สามารถระบุลักษณะของพื้นผิวของชิ้นงานได้อย่างชัดเจน

Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยสเปกโตรเมตรีรังสีเอกซ์แบบกระจายพลังงานที่ใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยหลักการของ EDS เมื่อตัวอย่างที่ต้องการศึกษาถูกชนด้วยอิเล็กตรอนทำให้สามารถเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization) ด้วยการปลักให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างให้หลุดออกจากอะตอม ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษาเสถียรภาพ อิเล็กตรอนที่อยู่วงโคจรชั้นถัดไปจะลงเข้ามาแทนที่และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปรังสีเอกซ์ (X-ray) ซึ่งเรียกรังสีเอกซ์แบบแคแรกเทอริสติก (Characteristic X-ray) โดยพลังงานของรังสีเอกซ์ชนิดนี้มีค่าเฉพาะตามชนิดของธาตุ จากนั้นเมื่อรังสีเอกซ์เข้าสู่หัววัดชนิด Silicon drift detectors (SSD) หัววัดจะสร้างสัญญาณไฟฟ้าซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับพลังงานของรังสีที่ตกกระทบและจะนำสัญญาณที่ได้มาวิเคราะห์หาความสูงของสัญญาณส่งไปยังระบบคอมพิวเตอร์เพื่อประเมินและรายงานผลเป็นค่าสเปกตรัมรังสีเอกซ์ต่อไป

2.7 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fang และคณะ (2017) ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาโกลโคสไปโอเซนเซอร์ที่สามารถติดตามความเข้มข้นของโกลโคสได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้วัสดุพอลิเมอร์ระดับนาโนที่นำไฟฟ้าได้ คือ Polyaniline (PANI) ในการตรึงเอนไซม์โกลโคสออกซิเดสและเคลือบด้วย Polyurethane (PU) และ Epoxy-enhanced polyurethane (E-PU) สำหรับป้องกันการหลุดออกไปของเอนไซม์ พบว่า เมื่อทำการทดสอบในสารละลายโกลโคสใน PBS และใน bovine serum โกลโคสเซนเซอร์มีความไวในการตอบสนองเท่ากับ 63 nA/mM ภายใน 30 วินาทีและมีการตอบสนองเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของโกลโคส 0-20 mM ด้วย $r^2 = 0.9997$ เมื่อเก็บหัววัดที่ 37 °C ใน bovine serum ใน 13 วันแรกพบว่าความไวในการตอบสนองของโกลโคสเซนเซอร์เพิ่มขึ้น 30% ของความไวในการวัดเริ่มต้น และยังคงรักษาความเสถียรได้ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง (53 วัน) เมื่อทดลองโดยการฝังหัววัดในหนู พบว่า หัววัดสามารถตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลโกลโคสที่หลากหลายในเลือดของหนู ด้วยสัญญาณที่ล่าช้าไปประมาณ 8 นาที เมื่อทำการวัดอย่างต่อเนื่อง พบว่าใน 12 วันแรก โกลโคสเซนเซอร์มีค่าการตอบสนองเพิ่มขึ้น และเข้าสู่ภาวะเสถียรในวันที่ 14 ของการทดลอง การตอบสนองใน *in vivo* ที่คงที่นี้ บ่งบอกว่า หัววัดที่ได้พัฒนาขึ้น มีศักยภาพในการใช้ฝังสำหรับติดตามความเข้มข้นของโกลโคสในกระแสเลือดได้ (Lu Fang et al., 2017)

Çakiroğlu, B., และ Özacar, M. (2017) ได้สร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์แบบใหม่ผ่านการตรึง กลูโคสออกซิเดส (GOx) บนอนุภาคทองคำ (Au NPs) และแกร์ฟีนออกไซด์ที่ถูกรีดิวซ์ด้วยสารเคมี (rGO) ในการสังเคราะห์กรดแทนนิก (TA) ถูกนำมาใช้เพื่อทำปฏิกิริยารีดักชันเพื่อเปลี่ยน graphene oxide และ Au³⁺ เป็น rGO และ Au NPs ตามลำดับ รวมถึงการควบคุมปฏิกิริยา π - π ระหว่าง graphene oxide และ TA และปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับกรดแทนนิก สารประกอบนาโนใหม่เพื่อ การผลิตไบโอเซนเซอร์เจนเนอเรชันที่ 3 ถูกสร้างขึ้นอย่างสำเร็จ เมื่อปฏิกิริยา oxidation ของ TA เป็นquinone ซึ่งสามารถทำได้ง่ายโดยให้กระแสที่อยู่ในช่วงติดลบ เป็นการเพิ่มการถ่ายโอน อิเล็กตรอน ผลของการวัดการถ่ายโอนอิเล็กตรอน โดยวงจรโวลแทมเมทรี (CV) แสดงให้เห็นถึง คู่ของ redox peaks ที่แยกอย่างเห็นได้ชัดและแสดงการย้อนกลับได้ของอิเล็กตรอนที่ active site ของ GOx ไบโอเซนเซอร์แสดงการตอบสนองเชิงเส้นต่อความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 2 ถึง 10 mM ด้วยความไว 18.73 mAmm⁻¹cm⁻² ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้น ถูกใช้เพื่อหาความเข้มข้น ของกลูโคสในเครื่องดื่ม (Çakiroğlu & Özacar, 2017)

Fang และคณะ (2014) ได้รายงานว่าการยืดอายุการใช้งานของกลูโคสเซนเซอร์ที่ถูกสร้างขึ้น และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลียนแบบสภาวะในร่างกายสิ่งมีชีวิต พอลิอะนิลีนนาโนไฟเบอร์ถูกใช้งานบนอิเล็กโทรด สำหรับการตรึงเอนไซม์รวมถึงการยืดอายุการใช้งานของเซนเซอร์ ความไวต่อการตอบสนองของเซนเซอร์ที่เก็บใน bovine serum อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีความเสถียร เป็นเวลา 20 วันโดยไม่มีการลดลงและคงที่ 45% ของค่าเริ่มต้นหลังจาก 44 วัน ในงานวิจัยนี้ยืดอายุ การใช้งานของเซนเซอร์โดยใช้ poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) มาเคลือบเป็นชั้นนอกสุดของ กลูโคสเซนเซอร์ ผลลัพธ์ที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลูโคสเซนเซอร์ที่เคลือบด้วย PLGA มีการไวต่อการ ตอบสนอง 80% ของความไวต่อการตอบสนองเริ่มต้นหลังจากเก็บไว้ 44 วันใน bovine serum ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (L. Fang et al., 2014)

Wang และคณะ (2013) ได้วิจัยเรื่องกลูโคสไบโอเซนเซอร์แบบฝังที่เคลือบด้วยพอลิยูรีเทน กล่าวหาว่าความหนาที่เพิ่มขึ้นและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยทำให้ความไวของกลูโคส ไบโอเซนเซอร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ linearity ของเซนเซอร์สำหรับช่วงตรวจกลูโคสอยู่ที่ 2-30 mM สรุปได้ว่าการเคลือบอิเล็กโทรดสปีนที่โครงสร้างของไฟเบอร์มีรูพรุนและหนา กลูโคสไบโอเซนเซอร์ แสดงให้เห็นว่ามีผลกระทบต่อความไวที่น้อยที่สุด (Wang et al., 2013)

Yu และคณะ (2006) ได้ทำการวิจัยเรื่องกลูโคสไปโอเซนเซอร์ที่สามารถฝังตัวในระยะยาวได้แบบยึดหยุ่นโดยใช้ epoxy-enhance polyurethane membrane (E-PU) กล่าวว่า E-PU จะเป็นรูปทรงและมีความทนทานสูง เซนเซอร์ที่มีเมมเบรนจะแสดงความเสถียรในระยะยาวที่ยอดเยี่ยมและใช้งานได้นาน 4 ถึง 8 เดือนในสารละลายที่อุณหภูมิห้อง ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเซนเซอร์ที่ฝังในหนูทั้งสามตัวแต่ละตัวฝังเซนเซอร์สามอัน เซนเซอร์แปดตัวทำงานได้ดีเป็นเวลา 10-56 วัน เซนเซอร์ตัวที่เก้าเสียหายระหว่างการฝัง (Yu, Long, Moussy, & Moussy, 2006)



บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท/ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
Aniline	Fluka, Switzerland
Carrageenan	Sigma-aldrich
Gold (III) chloride	Sigma-aldrich, USA
Dimethylformamide (DMF)	Sigma-aldrich
Polyurethane	Sigma-aldrich, USA
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma-aldrich
Sodium borohydride (NaBH ₄)	Sigma-aldrich
Brij® L4	Sigma-aldrich, USA
Epoxy kits	Sigma-aldrich, USA
Glutaraldehyde solution	Fluka, Switzerland
Pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase (PQQ-GDH)	Toyoba, Japan

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท/ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
ปีกเกอร์ (Beaker)	Pyrex, Germany
เครื่องกวนสาร (Stirrer)	SCI LOGEX รุ่น MS7-H550-S, USA
เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น Magnum Serirs	BONITA, China
Auto pipette	SCI LOGEX, USA และ DLAB, USA

Intelligent Digital Multimeter, UNI-T รุ่น UT71E	UNI-T, China
---	--------------

3.3 วิธีวิจัย

3.3.1 การสร้างหัววัดไบโอเซนเซอร์

1. นำลวดทองคำที่มีความยาว 7.5 เซนติเมตร มาทำ electropolymerization ในสารละลาย 0.4 M Aniline/ 0.1 M HCl เป็นเวลา 10 นาที โดยเปลี่ยนการให้กระแสไฟฟ้าที่ 0.05 mA/cm^2 , 0.1 mA/cm^2 , 0.2 mA/cm^2 และ 0.4 mA/cm^2

2. นำลวดทองคำที่ผ่านการ electropolymerization มาจุ่มลงในสารละลาย carrageenan-GNPs โดยเตรียม 0.1% (w/v) คาราจีแนนก่อนนำไปกวนเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม 0.1 mM โกลด์ (III) คลอไรด์ จากนั้นเติมลงไป 0.1% (w/v) คาราจีแนนและทำการกวนต่ออีก 5 นาที ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นเติม 0.1 M NaBH_4 โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

3 นำลวดทองคำมาจุ่มลงในเอนไซม์ PQQ-GDH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4 จากนั้นนำมาจุ่มใน 25% glutaraldehyde เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์เข้าไปในพอลิอะนิลีน

5 จากนั้นปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที

6 เมื่อแห้งแล้วนำมาจุ่มลงในสารละลาย 3% in 98% THF/2% DMF 2-3 ครั้ง โดยผ่านขดลวดที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 มิลลิเมตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองห้วงวัดอิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้น

3.3.2.1 การศึกษาพื้นฐานของห้วงวัดไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM) และศึกษาธาตุและองค์ประกอบของห้วงวัดไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)

ทำการวิเคราะห์ SEM และ EDS ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (นาโนเทค) โดยนำไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นวางบนฐานวางตัวอย่าง (sample holder) และปิดทับด้วยเทปคาร์บอน (carbon tape) ก่อนนำไปวิเคราะห์ โดยเครื่องที่ใช้วิเคราะห์คือ SU-8030 Field-Emission Scanning Electron Microscope (Hitachi).

3.3.2.2 การทดสอบการรับส่งอิเล็กตรอนของห้วงวัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ cyclic voltammetry

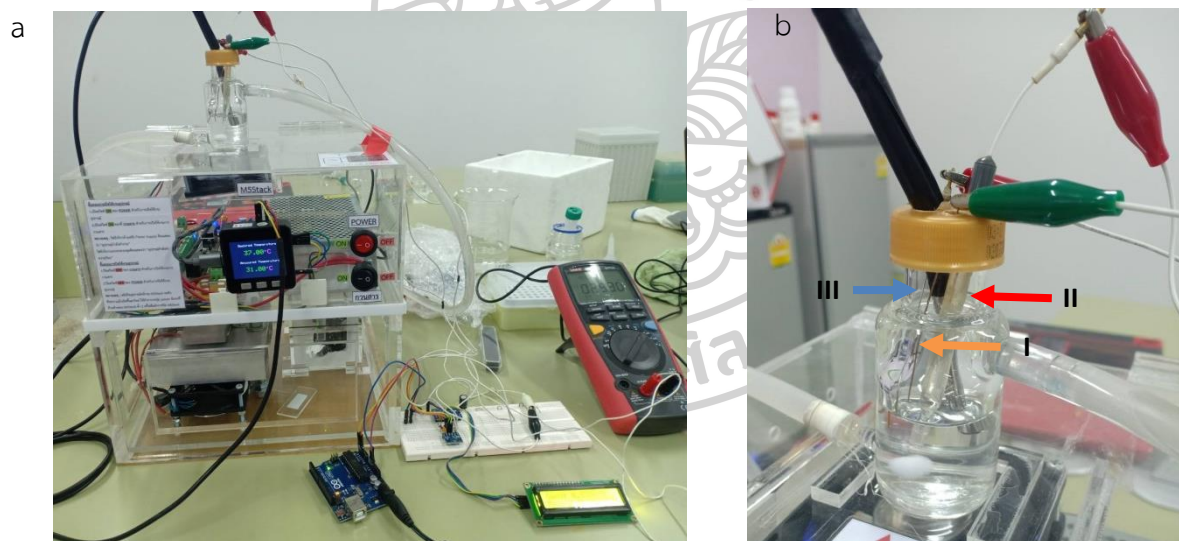
การวิเคราะห์การรับส่งอิเล็กตรอนของห้วงวัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ cyclic voltammetry ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยเครื่อง potentiostat Auto lab 240 and NOVA 2.14 program โดยที่ระบบเคมีไฟฟ้าประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ส่วน โดยจะจุ่มกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไว้ในสารละลาย NaOAc pH 5 โดยตรวจวัดความเข้มข้นกลูโคส ใช้อัตราการสแกน 100 mVs^{-1} ด้วยเทคนิคไซคลิก ให้ศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ -0.2 จนถึง 0.8 mV ความเข้มข้นของกลูโคส 18 mg/ml เมื่อเติมกลูโคสจะเกิดค่ากระแสไฟฟ้าแคโทดิกขึ้น ซึ่งค่ากระแสไฟฟ้าจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของกลูโคส

3.3.2.3 การทดสอบการรับส่งอิเล็กตรอนของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ electrochemical impendent spectroscopy (EIS)

การวิเคราะห์การรับส่งอิเล็กตรอนของห้วงวัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ electrochemical impendent spectroscopy ที่ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อศึกษาความต้านทานไฟฟ้า โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้า 5 มิลลิโวลต์ ความถี่ 10 Hz ถึง 10 MHz โดยใช้เครื่อง Potentiostat Autolab model PGSTAT302N ในสารละลาย 5 mM โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) ใน 0.1 M โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โดยต่อวงจรแบบ Warburg.

3.3.2.4 การทดสอบความเสถียรของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในสภาวะการกวนระดับต่าง ๆ

นำหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบโดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมตริก (amperometric measurement) โดยใช้เครื่องคุมอุณหภูมิที่ผลิตโดยนักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในการทดลองจะใช้ขวดแก้ว 2 ชั้น เพื่อให้ น้ำที่มีอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ไหลผ่านชั้นนอก (ภาพที่ 16a) กำหนดให้ขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) คือหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) คือซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าช่วยคือลวดแพลทินัม (Platinum wire) จากนั้นทำการจุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในขวดแก้วสองชั้นที่มีโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตรโดยที่มีแท่งแม่เหล็กอยู่ข้างใน (ภาพที่ 16b) จากนั้นเติมกลูโคสลงไปให้มีความเข้มข้น 25.6 mg/ml แล้วทำการปรับความเร็วรอบในการกวนเป็น 0, 150, และ 500 รอบต่อนาที โดยทำความเร็วรอบละ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 เครื่องมือวิเคราะห์เทคนิคแอมเพอโรเมตริก a) เครื่องมือวิเคราะห์เทคนิคแอมเพอโรเมตริก และ b) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก (I) ขั้วไฟฟ้าทำงาน (II) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ (III) ขั้วไฟฟ้าช่วย

3.3.2.5 การทดสอบความเสถียรหลังจากเก็บรักษาหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในระยะเวลาต่างๆ

นำหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นทำการทดสอบวัดความเข้มข้นของกลูโคสในความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มีกวน 150 รอบต่อนาที โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์เทคนิคแอมเพอโรเมตรี (ภาพที่ 16b) จากนั้นแช่ในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์และนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นวันที่ 4 นำออกมาทดสอบความสามารถในการวัดความเข้มข้นของกลูโคสในความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นก็นำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสดังเดิม ทำซ้ำแบบนี้ในวันที่ 7, 10 และ 13 นับจากวันที่สร้างหัววัดไบโอเซนเซอร์ ซึ่งสามารถหา Signal stability ได้จากสมการที่ (6)

$$\text{Signal stability} = \frac{S_{\text{test}}}{S_{\text{initial}}} \times 100 \quad (6)$$

3.3.2.6 การปรับสภาพกากขานอ้อย

นำกากขานอ้อย (10% solid loadings) มาปรับสภาพด้วย 7.5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาหยุดปฏิกิริยาทันทีในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมากรองปรับ pH ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ pH 5-6 โดยที่ทำการเติม 0.02% โซเดียมเอไซด์ลงไปเล็กน้อยเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นเก็บส่วนของแข็งที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2.7 การทดสอบความเสถียรของหัววัดอิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้น ในกระบวนการย่อยชีวมวลด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ทำการทดสอบหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมตริก โดยภายในขวดแก้วสองชั้นประกอบไปด้วยขานอ้อย 5%, เอนไซม์เซลลูโลส 20 FPU/g cellulose, เอนไซม์ β -glucosidase 1 U/g cellulose, 0.02% sodium azide และอะซิเตรทบัฟเฟอร์ จากนั้นนำขั้วไฟฟ้าทั้งสามจุ่มลงไป โดยมีความเร็วรอบในการกวน 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3.2.8 การทดสอบวัดน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยชีวมวลด้วยเอนไซม์ด้วย HPLC

การทดสอบวัดน้ำตาลกลูโคสในกากขานอ้อย โดยการนำขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 5% loadings มาเติมเอนไซม์เซลลูโลส 20 FPU/g cellulose และเอนไซม์ β -glucosidase 1 U/ml ในหลอดปั่นเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าความเร็วรอบ

150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 โดยแต่ละตัวอย่างที่เก็บมาในแต่ละชั่วโมง นำมาแช่ในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นทำการแยกของแข็งและของเหลวด้วยการกรอง นำของเหลวที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้ HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) โดยใช้คอลัมน์ Rezex™ RPM-Monosaccharide Pb⁺² (8%) และ guard cartridges (Phenomenex Inc, Torrance, CA) ด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยเครื่องตรวจจับดัชนีการหักเหของแสง (refractive index detector) ในส่วนของกลูโคสมาตรฐานจาก Sigma-Aldrich (USA)

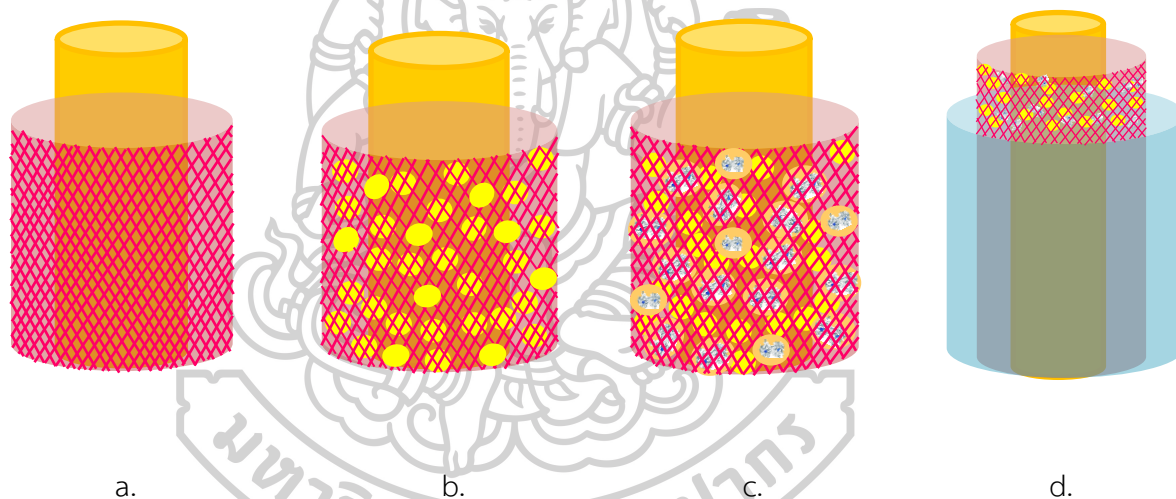


บทที่ 4

ผลการทดลอง

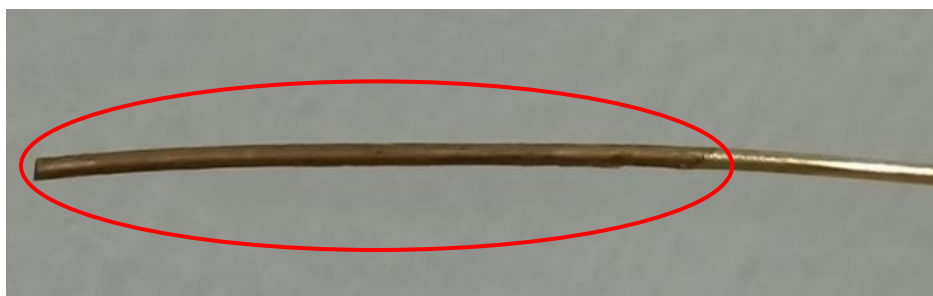
4.1 การพัฒนาหัววัดกลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้สามารถใช้งานได้นานขึ้นด้วยเอนไซม์ PQQ-dependent glucose hydrogenase (PQQ-GDH)

ในการที่ประดิษฐ์หัววัดน้ำตาลนั้น บนลวดทองคำนั้นการเคลือบโดยพอลิอะนิลีน ตามด้วยอนุภาคนาโนทองคำและคาร์บอน จากนั้นหัววัดจะถูกนำไปแช่ในสารละลายเอนไซม์ PQQ-GDH เพื่อให้เอนไซม์เข้าไปอยู่ในรูปร่างของพอลิอะนิลีน จากนั้นเอนไซม์จะถูกตรึงกับร่างแหด้วยกลูตารอลดีไฮด์ ต่อมาหัววัดจะถูกนำไปเคลือบด้วยพอลิยูรีเทน (PU) เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการใช้งาน (ภาพที่ 17) และหลังจากเสร็จกระบวนการ จะเห็นลวดทองคำถูกเคลือบอย่างชัดเจน (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 ภาพจำลองหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้น a) ลวดทองคำที่เคลือบด้วยพอลิอะนิลีน b) เคลือบทับด้วยอนุภาคทองคำ c) เคลือบทับด้วยเอนไซม์ PQQ-GDH และ 25% กลูตารอลดีไฮด์ และ d) เคลือบทับชั้นสุดท้ายด้วยพอลิยูรีเทน

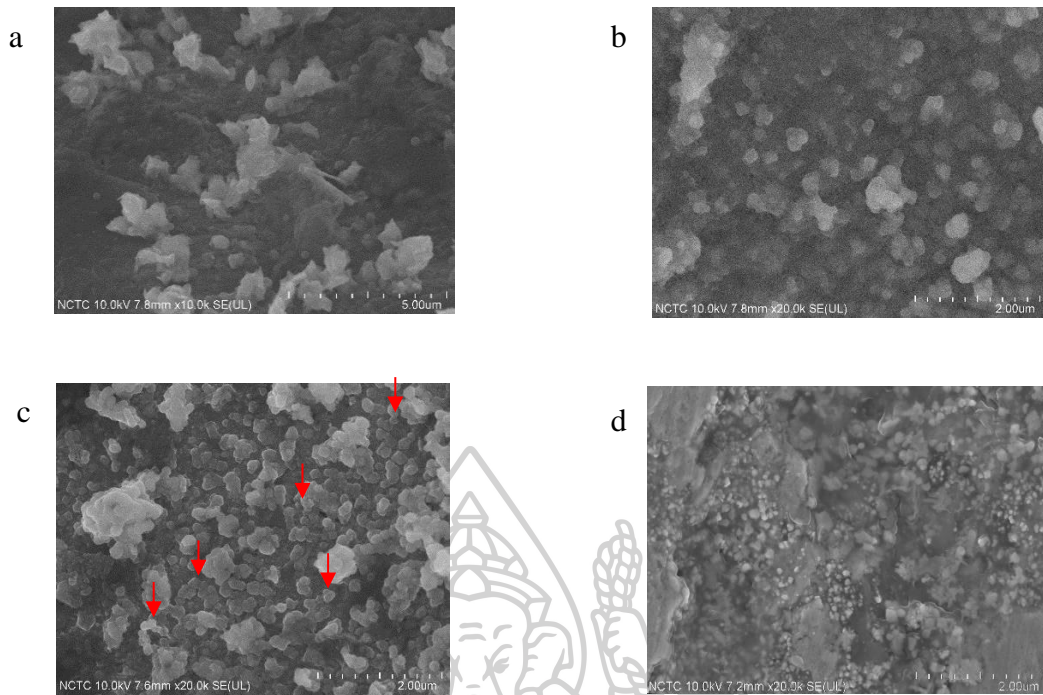
- ลวดทองคำ
- เส้นใยพอลิอะนิลีน
- อนุภาคนาโนทองคำและคาร์บอน
- ★ PQQ-GDHs enzyme
- 25 % กลูตารอลดีไฮด์
- พอลิยูรีเทน



ภาพที่ 18 หัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นบนลวดทองคำซึ่งวงกลมแสดงการเคลือบบนเส้นลวดทองคำ

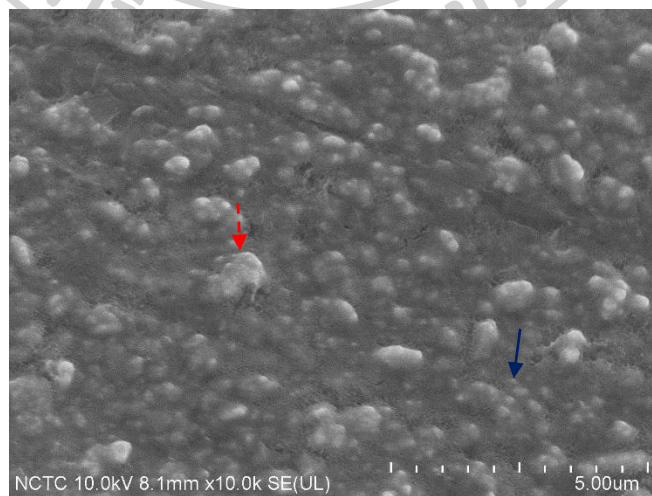
4.2 การศึกษาพื้นฐานของหัววัดไบโอเซนเซอร์โดย SEM

รูปร่างพื้นฐานของเส้นใยพอลิอะนิลีนที่เคลือบอยู่บนหัววัดทองคำ โครงสร้างของอนุภาค PANI มีหลากหลายรูปแบบ ประกอบไปด้วยรูปแบบเม็ด (granules) รูปแบบเส้นใย (nanofibers) รูปแบบฟิล์ม (thin-films) เป็นต้น (Stejskal et al. 2010) ซึ่งในงานวิจัยนี้อนุภาค PANI ที่ใช้มีรูปร่างแบบเม็ด โดยในการทดลองได้ทำการให้กระแสไฟฟ้าในขั้นตอนการทำ electropolymerization ที่แตกต่างกัน คือ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 mA/cm^2 ตามลำดับ (ภาพที่ 19) โดยภาพที่ 19a ไม่มีลักษณะของอนุภาคเม็ดพอลิอะนิลีนปรากฏ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับงานวิจัยของ Rajesh ที่ทำการทดลองโดยการนำแผ่นฟิล์มแช่ลงในสารละลายพอลิอะนิลีนโดยไม่ใช้กระแสไฟฟ้า (Rajesh A, 2016) ดังนั้นที่กระแสไฟฟ้า 0.05 mA/cm^2 ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอนุภาคเม็ดพอลิอะนิลีนได้ ภาพที่ 19b จะเห็นว่ามีความลักษณะของอนุภาคเม็ดพอลิอะนิลีนปรากฏอยู่ ภาพที่ 19c จะเห็นได้ว่าที่กระแสไฟฟ้า 0.2 mA/cm^2 พอลิอะนิลีนมีลักษณะเป็นอนุภาคเม็ด ซึ่งลักษณะที่เห็นคล้ายกับงานวิจัยของ Jia และคณะ (B. Jia & Zhang, 2016) และภาพที่ 19d เส้นใยมีลักษณะเป็นวงกลมเล็ก ๆ อยู่บนผิวอิเล็กโทรดซึ่งเกิดจากการสะสมของพอลิอะนิลีนหลายชั้นมากขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการคายประจุลดลงจึงทำให้มีความสามารถในการสร้างเส้นใยได้น้อยลง (Hassan et al., 2020) ดังนั้นที่กระแสไฟฟ้า 0.2 mA/cm^2 จึงเป็นกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมในการทำ electropolymerization ในงานทดลองนี้



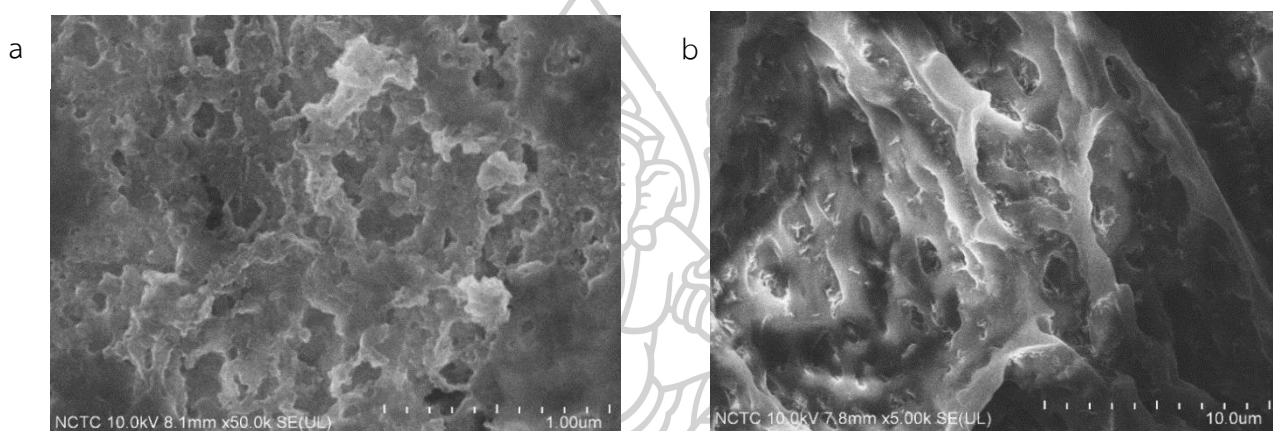
ภาพที่ 19 สัณฐานวิทยาของพอลิอะนินที่เคลือบบนหัววัดน้ำตาล a) กระแสไฟฟ้า 0.05 mA/cm^2 b) กระแสไฟฟ้า 0.1 mA/cm^2 c) กระแสไฟฟ้า 0.2 mA/cm^2 และ d) กระแสไฟฟ้า 0.4 mA/cm^2

เมื่อทำการเคลือบชั้น Carr-AuNPs/NaBH₄ หัววัดทองคำที่มีพอลิอะนินแล้วนั้น จะสังเกตเห็นได้ว่ามีการเจริญมีลักษณะเป็นพื้นผิวและมีอนุภาคเล็ก ๆ อยู่บริเวณทั่ว (ลูกศรทึบสีน้ำเงิน) และอนุภาคนาโนทองคำมีลักษณะเป็นอนุภาคขนาดใหญ่อยู่กระจายไปทั่วคาร์บอนที่เคลือบอยู่บนหัววัด (ลูกศรประสีแดง) (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 สัณฐานวิทยาของ Carr-GNPs/NaBH₄ ภายในและบนผิวของพอลิอะนิน

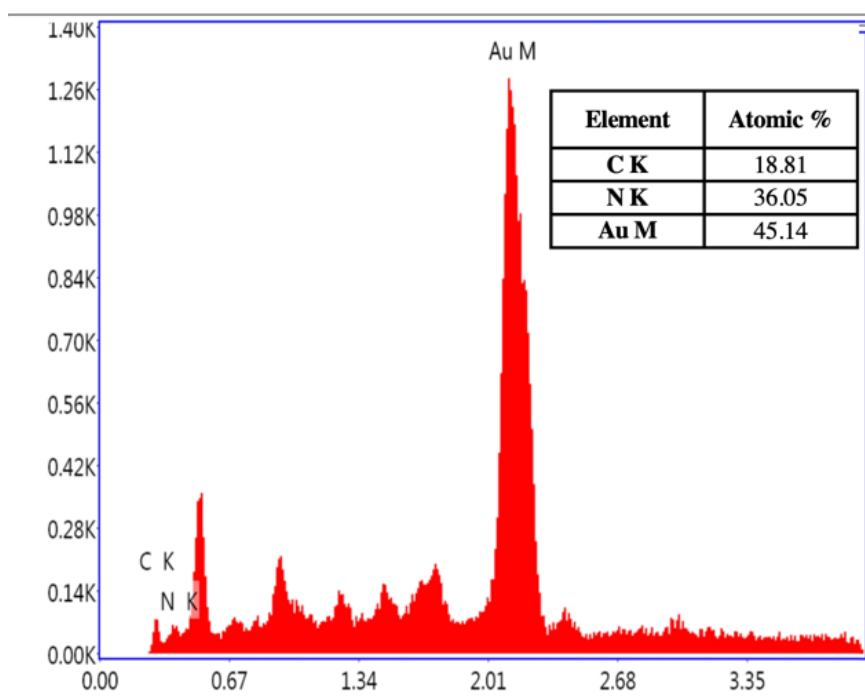
หลังจากที่หัววัดถูกนำไปแช่ในสารละลายเอนไซม์ PQQ-GDH และตรึงด้วย 25% กลูตารอลดีไฮด์ จะเห็นว่าอนุภาคนาโนทองคำถูกเคลือบกลบ จนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ (ภาพที่ 21a) และเมื่อเคลือบชั้นสุดท้ายด้วยพอลิยูรีเทน (PU) ซึ่งจะสังเกตว่าผิวหัววัดมีความเรียบขึ้น (ภาพที่ 21b) และรูพรุนของ PU เกิดจากการทำแห้ง มีขนาด 1-10 นาโนเมตร การที่มีรูพรุนนั้นช่วยให้กลูโคส ซึ่งมีขนาด 1 นาโนเมตร ยังเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในไบโอเซนเซอร์ได้ นอกจากนี้ PU ยังป้องกันไม่ให้เอนไซม์ออกจากไบโอเซนเซอร์ได้เพราะเอนไซม์ PQQ-GDH มีขนาดตั้งแต่ 90 ถึง 130 kDa (Satake, 2015)



ภาพที่ 21 สัณฐานวิทยาของหัววัดไบโอเซนเซอร์หลังจากเคลือบ a) กลูตารอลดีไฮด์ และ b) พอลิยูรีเทน (PU)

4.3 การศึกษาธาตุและองค์ประกอบของหัววัดไบโอเซนเซอร์โดยเทคนิค Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)

ทำการวิเคราะห์ธาตุและองค์ประกอบของหัววัดไบโอเซนเซอร์ โดยนำหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่เคลือบด้วยพอลิอะนิลีนและสารละลาย carr-AuNPs มาทำการวิเคราะห์ EDS จากแรงระหว่างอะตอม จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อเคลือบหัววัดไบโอเซนเซอร์ Au/PANI/Carr-AuNPs แล้วมีส่วนประกอบของอนุภาคทองคำอยู่ที่ 45.14 % (รูปที่ 22)

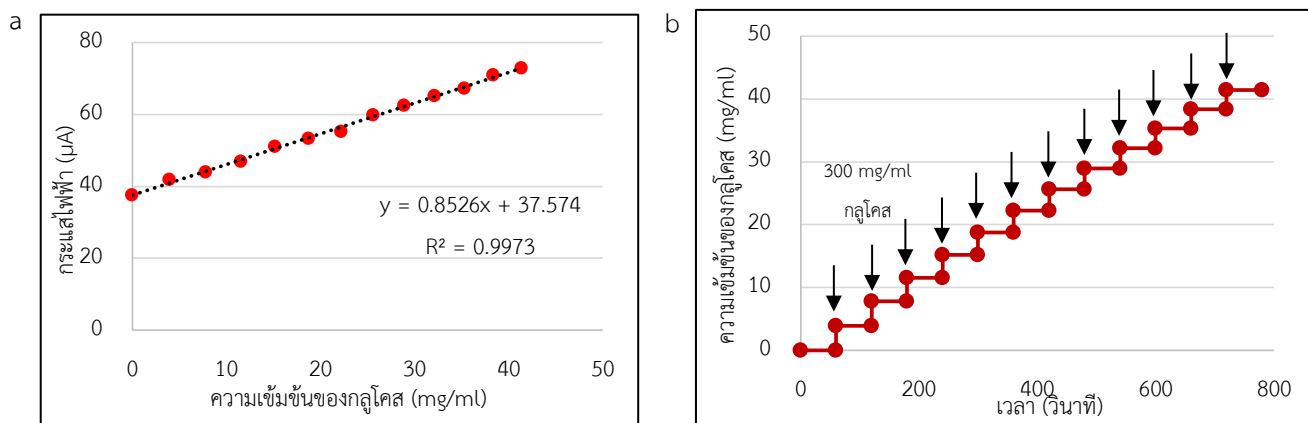


ภาพที่ 22 การวิเคราะห์ EDS ของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่เคลือบด้วย carr-AuNPs/NaBH₄.

4.4 การทดสอบหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

4.3.1 การตอบสนองน้ำตาลกลูโคสของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

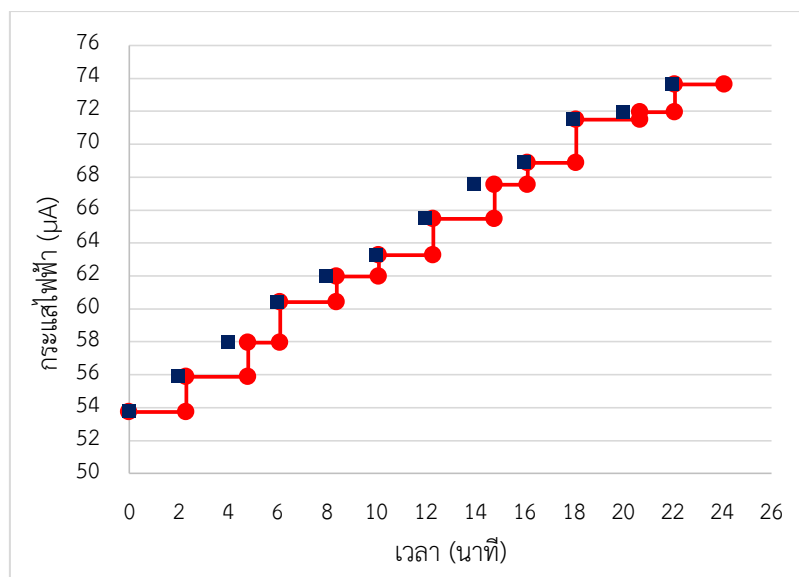
จากผลการทดสอบหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาได้บนลวดทองคำ ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำตาล (mg/ml) กับกระแสไฟฟ้า (μA) ทดสอบใน 50 mM โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ในความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0-40 mg/ml ทดสอบโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นบนลวดทองคำ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลได้จริง และเห็นได้ว่าหัววัดที่พัฒนาบนลวดทองคำมีความไวในการตอบสนอง $0.8526 \mu\text{A}/(\text{mg}/\text{ml})$ และ $R^2 = 0.9973$ (ภาพที่ 23a) และ ภาพที่ 23b แสดงการตอบสนองของสัญญาณไฟฟ้าเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส แล้วกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองเพิ่มขึ้นทันที จึงเป็นสิ่งที่ยืนยันได้ว่าหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้งานได้จริงในสภาวะที่มีการกวนที่ 150 รอบต่อนาทีตลอดเวลา นอกจากนี้หัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวัดความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงสุด $69 \pm 4 \text{ mg}/\text{ml}$



ภาพที่ 23 การตอบสนองของหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาได้บนลวดทองคำต่อน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย a) กราฟมาตรฐานกลูโคสที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคส (mg/ml) กับกระแสไฟฟ้า (µA) และ b) กราฟแสดงความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นต่อเวลาที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (วินาที) กับความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml) โดยทำการเติมกลูโคสความเข้มข้น 300 mg/ml ลงไปทุก ๆ 120 วินาที (→)

4.3.2 ความเร็วในการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

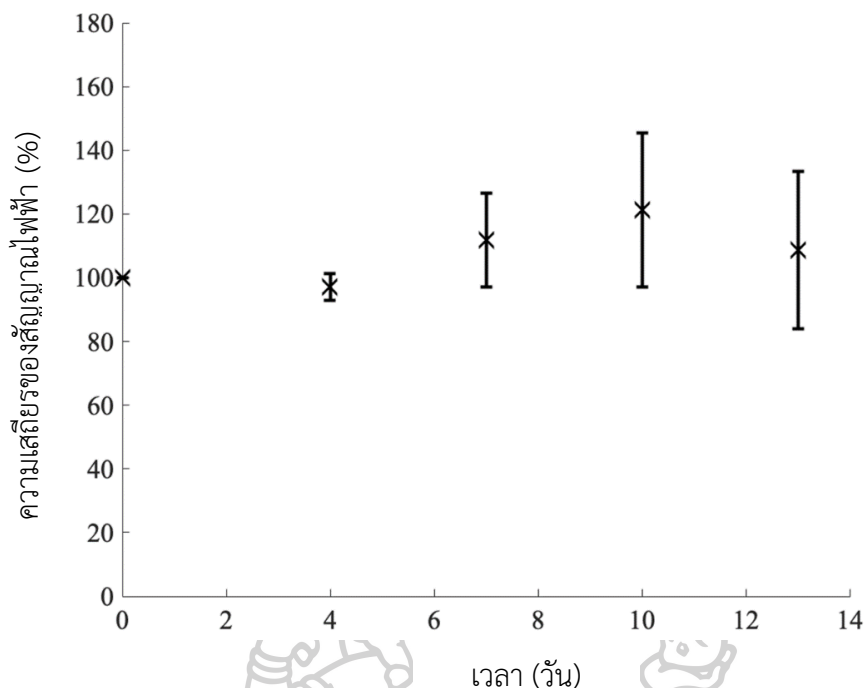
ผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นบนลวดทองคำต่อเวลาในการตอบสนองกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาทีก) และกระแสไฟฟ้า (µA) ซึ่งในการทดลองทำการเติมน้ำตาลกลูโคส 300 mg/ml ลงในอะซิเตรดับฟเฟอร์ทุก 120 วินาที จากกราฟจะสังเกตเห็นว่าเวลาในการเติมน้ำตาล (■) กับเวลาที่ไบโอเซนเซอร์ตอบสนองกับน้ำตาล (●) มีค่าต่างกัน แต่อยู่ในช่วงไม่เกิน 10 วินาที ดังนั้นไบโอเซนเซอร์จึงมีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลที่เปลี่ยนไปได้อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาได้บนลวดทองคำต่อเวลาในการตอบสนองกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.3.3 การทดสอบความเสถียรของการเก็บรักษาหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้น

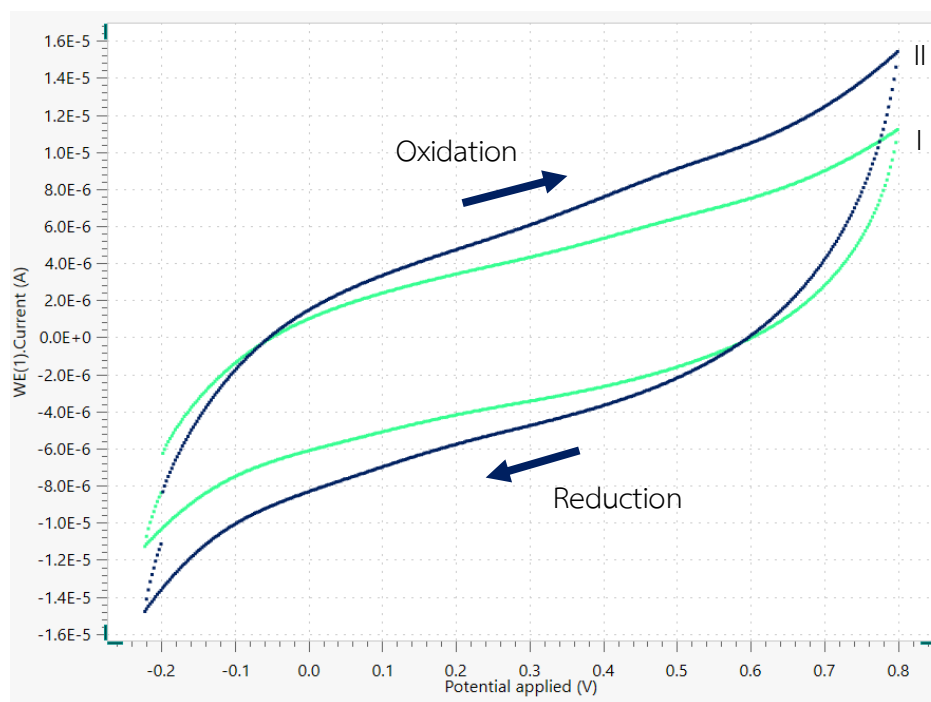
ผลการทดสอบความเสถียรของการเก็บรักษาหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0, 4, 7, 10 และ 13 นับจากวันที่สร้างหัววัดไบโอเซนเซอร์ (ภาพที่ 25) พบว่าวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 หัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นตอบสนองในการวัดน้ำตาลได้คงที่ ในวันที่ 4 ถึงวันที่ 10 หัววัดไบโอเซนเซอร์มีการตอบสนองต่อน้ำตาลเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะรูพรุนของพอลิยูรีเทนมีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำตาลจึงเข้าไปยังรูพรุนของพอลิอะนิลีนได้มากขึ้น จึงทำให้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้มากขึ้น (Fang et al., 2017) และหลังจากวันที่ 10 ความสามารถในการตอบสนองของหัววัดน้ำตาลลดลง อาจเนื่องมาจากการที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานน้อยลงหรือเอนไซม์หลุดออกมาจากตัวหัววัดน้ำตาล เนื่องจากความพอลิยูรีเทนที่เคลือบนั้นเกิดการเสื่อมสภาพ



ภาพที่ 25 ผลการทดลองการทดสอบความเสถียรของการเก็บรักษาหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นหลังจากที่เก็บรักษาในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ในวันที่ 0, 4, 7, 10, และ 13 หลังจากวันที่สร้างหัววัดไบโอเซนเซอร์

4.4 ผลจากการทดสอบปฏิกิริยารีดอกซ์บนหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นจาก Cyclic Voltammetry

ผลจากการทดสอบไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic Voltammetry) ทำการวิเคราะห์เพื่อทดสอบความสามารถในการรับส่งอิเล็กตรอนของขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) ซึ่งทดสอบในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ (ภาพที่ 26I) และในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ที่มีกลูโคส 18 mg/ml (ภาพที่ 26II) พบว่าไซคลิกโวลแทมโแกรมทั้งสองคล้ายกัน คือการแสดงถึงการเกิด oxidation-reduction ของหัววัดแบบย้อนกลับและเมื่อมีกลูโคสอยู่ในบัฟเฟอร์ การตอบสนองของกระแสไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาของเอนไซม์ PQQ-GDH จากไบโอเซนเซอร์กับน้ำตาลกลูโคส (Jiaojiao et al., 2022, Gamella, 2019) และจะสังเกตเห็นพีคบริเวณ 0.5 V จึงเลือกที่จะทำการทดลองที่ 0.5 V vs Ag/AgCl ในการวัดน้ำตาลจากหัววัดไบโอเซนเซอร์ตลอดการทดลอง

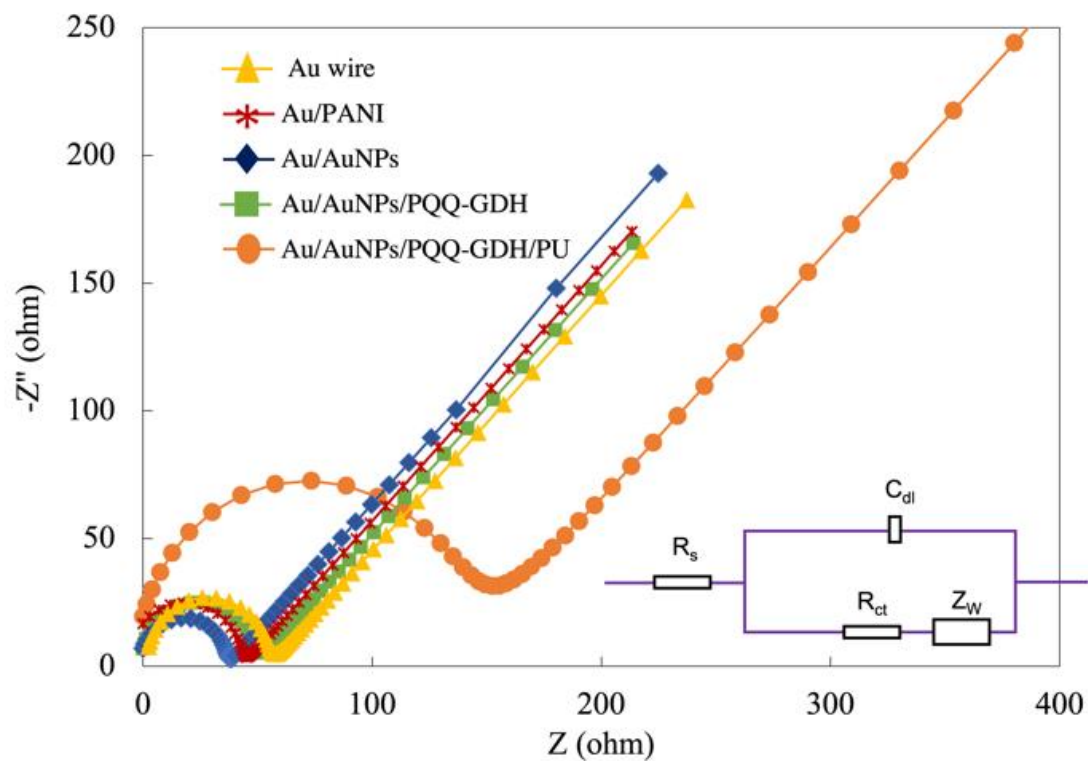


ภาพที่ 26 โวลแทมโมแกรมที่อัตราการสแกนที่ 100 mVs^{-1} ของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดย I) ทดสอบใน NaOAc บัฟเฟอร์ และ II) ทดสอบใน NaOAc บัฟเฟอร์ที่มีกลูโคส 0.6 mg/ml

4.5 การวัดความต้านทานไฟฟ้าของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดย Electrochemical impedance spectroscopy

ความต้านทานไฟฟ้าเนื่องจากการไหลผ่านของอิเล็กตรอน (The electron transfer resistance (R_{ct})) (รูปที่ 27) ที่พื้นผิวของอิเล็กโทรด โดย R_{ct} เป็นการวิเคราะห์ Potentiostat Autolab รุ่น PGSTAT302N ใน $5 \text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ใน 0.1 M KCl ที่ $10^{-1} \times 10^7 \text{ Hz}$ และ 5 mV . (ภาพที่ 26) ค่า R_{ct} ของลวดทองคำ (\blacktriangle) คือ 57.903 โอห์ม เมื่อเคลือบลวดทองคำด้วยพอลิอะนิลีน ($*$) ค่า R_{ct} ลดลงเป็น 44.984 โอห์ม เนื่องจากมีพอลิอะนิลีนซึ่งนำไฟฟ้าได้ ลวดทองคำที่เคลือบด้วยพอลิอะนิลีนและอนุภาคนาโนคลอไรด์ (\blacklozenge) ค่า R_{ct} ลดลงเป็น 39.169 โอห์ม เมื่อเปรียบเทียบกับ Au/AuNPs/PQQ-GDH (\blacksquare) มีค่า R_{ct} เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเคลือบเอนไซม์ PQQ-GDH ที่ไม่นำไฟฟ้า ทำให้ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับลวดทองคำเปล่า และค่า R_{ct} ของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (\bullet) นั้นมากกว่าค่า R_{ct} ของทั้งหมด เนื่องจากพอลิยูรีเทนไม่นำไฟฟ้า (Bekir, 2017) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีความต้านทานเพิ่มมากขึ้น แต่ค่าต้านทานของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นก็อยู่ในช่วงเดียวกับหัววัดที่พัฒนาขึ้นโดยงานวิจัยของ Sarauli และคณะ (2014) ได้ทำการสร้างอิเล็กโทรด (Au/(Poly(2-

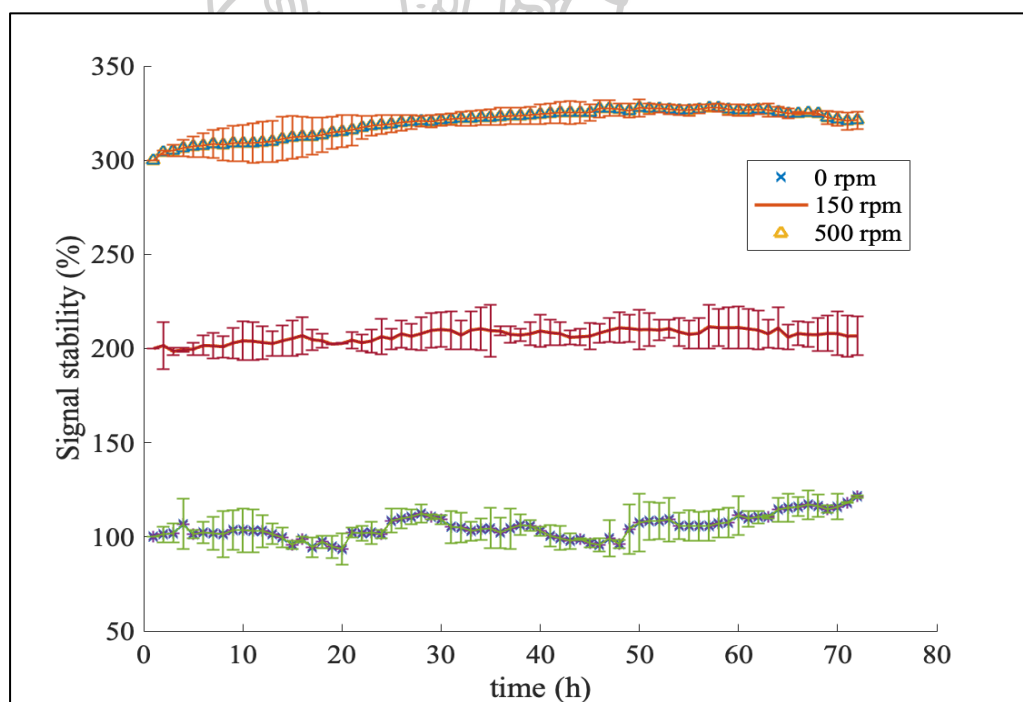
methoxyaniline-5-sulfonic acid)-co-aniline polymer (PMSA1):PQQ-GDH)/(Poly(3-aminobenzoic acid-co-2-methoxyaniline-5-sulfonic acid) (PABMSA1)-PMSA1:PQQ-GDH) พบว่าเมื่อทำการเมื่อทำการเคลือบ PABMSA1-PMSA1:PQQ-GDH ค่า R_{ct} มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากความหนาที่เพิ่มขึ้นของพอลิเมอร์และเอนไซม์ซึ่งเป็นอุปสรรคสำหรับการถ่ายโอนประจุของพื้นผิวของอิเล็กโทรด (Sarauli et al., 2014) และงานวิจัยของ Yang และคณะ (2021) โดยทำการสร้างอิเล็กโทรด (Graphite oxide (GO)/Cobalt hydroxide (GCC)/Glucose oxidase (GOx)/chitosan) พบว่าเมื่อมีเอนไซม์ GOx บนอิเล็กโทรด ค่า R_{ct} เพิ่มขึ้นมาก เนื่องจากพันธะโพลีเปปไทด์ไม่นำไฟฟ้า ทำให้มีค่าการต้านไฟฟ้าสูงขึ้น (Yang et al., 2021)



ภาพที่ 27 ไนควิสต์พล็อต (Nyquist plot) ของ EIS ลวดทองคำ (\blacktriangle), Au/PANI ($*$), Au/AuNPs (\blacklozenge), Au/AuNPs/PQQ-GDH (\blacksquare) และ Au/AuNPs/PQQ-GDH/PU (\bullet)

4.6 การทดสอบความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาแล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้ความเร็วรอบที่แตกต่างกัน

การทดสอบความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะที่มีการกวนที่ 0, 150, และ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลองโดยจุ่มไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในอะซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 25 mg/ml โดยจะเห็นว่าไบโอเซนเซอร์แสดงกระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในประมาณ 4 ชั่วโมงแรก อาจจะเป็นเพราะเมมเบรนของพอลิยูรีเทนได้รับความเสียหายจากการกวน ทำให้กลูโคสสามารถเข้าไปได้มากขึ้น (Fang et al., 2017) หลังจากชั่วโมงที่ 4 หัววัดไบโอเซนเซอร์สามารถวัดค่าน้ำตาลได้คงที่ได้ตลอด 72 ชั่วโมงทั้งสามความเร็วรอบ ซึ่งถือว่าเป็นระยะคงที่ (stationary phase) (Fang et al., 2014) และเมื่อมีความเร็วรอบสูงขึ้น กระแสไฟฟ้าที่วัดได้สูงขึ้นด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 28) อาจเป็นเพราะความเร็วรอบสูงขึ้น ชั้นของพอลิยูรีเทนที่เคลือบไว้ อาจได้รับความเสียหายมากขึ้น ทำให้กลูโคสเข้าไปทำปฏิกิริยากับไบโอเซนเซอร์ได้มากขึ้น



ภาพที่ 28 การทดสอบความเสถียรของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะการกวนที่ต่างกัน โดยที่ความเร็วรอบในการกวนที่ 0 รอบต่อนาที (×), 150 รอบต่อนาที (—) และ 500 รอบต่อนาที (△) โดยค่าความคลาดเคลื่อน (error bars) แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

4.7 การทดสอบความเสถียรของหัววัดน้ำตาลที่พัฒนาแล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะไฮโดรไลซิส

การทดสอบความเสถียรของหัววัดน้ำตาลในสภาวะไฮโดรไลซิสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้ศักย์ไฟฟ้า 0.50 โวลต์ เทียบกับ Ag/AgCl โดยสภาวะไฮโดรไลซิสทำในขวดแก้วสองชั้น ที่มีชานอ้อย 5%, เอนไซม์เซลลูโลส 20 FPU/g cellulose, เอนไซม์ β -glucosidase 1 U/g cellulose และ 0.02% โซเดียมเอไซด์ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์



0 ชั่วโมง

24 ชั่วโมง

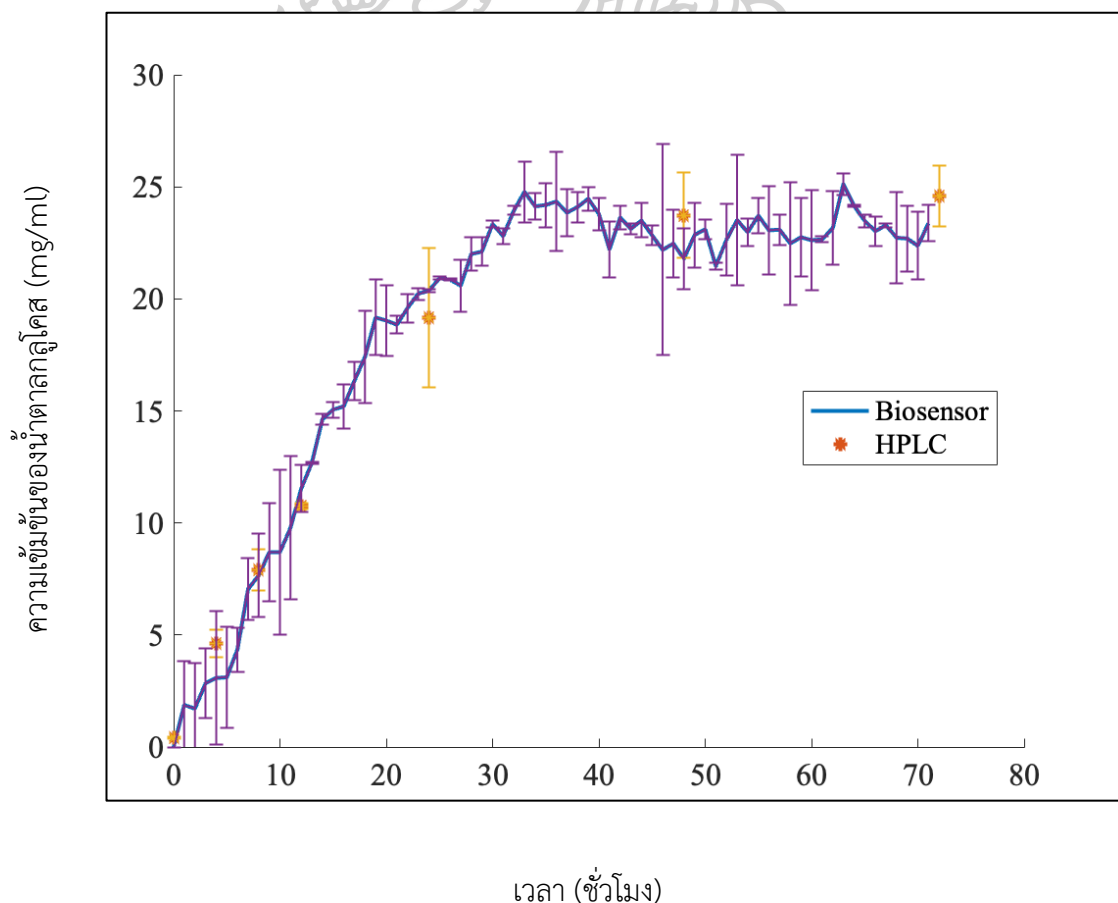
48 ชั่วโมง

72 ชั่วโมง

ภาพที่ 29 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของชานอ้อยและเอนไซม์เซลลูโลสในขวดแก้วสองชั้น ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

จากภาพที่ 29 หัววัดน้ำตาลถูกจุ่มในสภาวะไฮโดรไลซิส ที่สภาวะเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ชานอ้อยไม่มีการฟุ้งกระจายเนื่องจากยังไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ หลังจากชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 72 จะสังเกตเห็นการฟุ้งกระจายของชานอ้อยทั่ว ขวดแก้วสองชั้น เพราะเอนไซม์ทำการย่อยชานอ้อยจึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเมื่ออ่านกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึง 5 หัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถอ่านค่ากระแสไฟฟ้าได้ อาจเนื่องมาจากกลูโคสที่เกิดมีปริมาณที่น้อยเกินกว่าความสามารถของไบโอเซนเซอร์จะวัดได้ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 5 หัววัดไบโอเซนเซอร์เริ่มมีการตอบสนองต่อกลูโคสที่เกิดขึ้นได้และแสดงค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเกิดการย่อยชานอ้อยได้เพิ่มมากขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 41 จะสังเกตเห็นความไม่เสถียรของกระแสไฟฟ้าที่วัด (ภาพที่ 30) อาจเนื่องจากการทำไฮโดรไลซิสที่มีการกวนตลอดเวลาทำให้ชานอ้อยฟุ้งกระจายเสียดสีกับไบโอเซนเซอร์ แล้วไปทำลายชั้นพอลิยูรีเทนที่เคลือบนอกสุด ทำให้เกิดความเสียหายและรบกวน

การทำงานของไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น อย่างไรก็ตามค่าน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้จากหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความใกล้เคียงกับค่าน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้จากการใช้เทคนิค HPLC แสดงว่าหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้งานได้จริงในสถานะไฮโดรซิสที่มีการกวนตลอดเวลาและสามารถรายงานผลน้ำตาลได้อย่างทันท่วงที (real-time) จากขบวนการโดยที่ค่า ซึ่งเทคนิค HPLC ไม่สามารถรายงานผลได้ทันท่วงทีได้ ซึ่งนอกจากจะเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวัดน้ำตาลจาก HPLC และยังประหยัดเวลาที่ใช้ทั้งหมดในการวิเคราะห์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในกระบวนการชีวภาพได้อีกด้วย เพราะในการใช้ไบโอเซนเซอร์สามารถเห็นปฏิกิริยาเริ่มคงที่ในชั่วโมงใด จึงสามารถหยุดปฏิกิริยาได้ทันที ไม่ต้องรอรอบ 72 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้ HPLC จะไม่สามารถทราบว่ปฏิกิริยาเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่เท่าไร ทำให้ต้องทำให้ครบปฏิกิริยาตลอด 72 ชั่วโมงก่อนถึงจะสามารถหยุดปฏิกิริยาได้ และจากการวิเคราะห์ข้อมูลแบบปกติโดยใช้สถิติแบบ Pair t-test ของ 7 ตัวอย่าง พบว่าค่า *P-value* มีค่าเท่ากับ 0.003 มีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติ 0.05 แปรผลได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่วัดโดยหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับ HPLC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 30 การทดสอบความเสถียรของไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ทดสอบภายใต้สภาวะไฮโดรไลซิสที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml) วิเคราะห์ด้วยหัววัดน้ำตาล (—) และด้วยเทคนิค HPLC (*) โดยค่าความคลาดเคลื่อน (error bars) แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ 3 ซ้ำ



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาไกลูโคสไปโอเซนเซอร์ (Au/AuNPs/PQQ-GDH/PU) จากลวดทองคำ (Au) และเคลือบด้วยชั้นนาโนทองคำ (AuNPs), เอนไซม์ (PQQ-GDH), และการป้องกันชั้นนอกสุดด้วยพอลิยูรีเทน (PU) ที่สามารถใช้งานได้นานถึงอย่างน้อย 72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา สามารถวัดความเข้มข้นของไกลูโคสได้สูงสุด 69 ± 4 mg/ml ทั้งนี้เอนไซม์ที่ใช้ยังคงคุณสมบัติการรับส่งอิเล็กตรอนแบบรีดอกซ์ (redox) และแม้ว่าเกิดการเพิ่มขึ้นของความต้านทานไฟฟ้าเมื่อเคลือบห้วัดมากขึ้น แต่ก็ยังอยู่ในช่วงที่ยังสามารถส่งผ่านกระแสไฟฟ้าได้ เมื่อทดสอบความเสถียรหลังจากการเก็บรักษา พบว่าห้วัดไปโอเซนเซอร์มีความเสถียรได้อย่างน้อย 4 วัน เมื่อเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ในสภาวะการกวนระดับต่าง ๆ ห้วัดไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถทำงานได้อย่างเสถียรยาวนานอย่างน้อย 72 ชั่วโมง แม้จะอยู่ในสภาวะการกวนที่เร็วถึง 500 รอบต่อนาทีและเมื่อทดสอบห้วัดไปโอเซนเซอร์ในสภาวะการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างของแข็งกับของเหลว (heterogeneous phase) ค่าความเข้มข้นของไกลูโคสของห้วัดไปโอเซนเซอร์มีความใกล้เคียงกับค่าน้ำตาลที่ตรวจสอบได้จากวิธีการใช้ HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไป แต่ใช้เวลาในการวัดที่น้อยกว่าและได้ผลที่ทันทางที่ ดังนั้นห้วัดไปโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพ (efficiency), คงทน (Robust) และแม่นยำ (accurate) ที่เหมาะกับการนำมาใช้วัดน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีการกวนต่อเนื่องในกระบวนการทางชีวภาพได้

เอกสารอ้างอิง



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทอฝัน พูลทอง
วัน เดือน ปี เกิด	8 กันยายน 2539
สถานที่เกิด	พระนครศรีอยุธยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 77 หมู่ 5 ตำบลบางนางร้า อำเภอบางปะหัน จังหวัด พระนครศรีอยุธยา

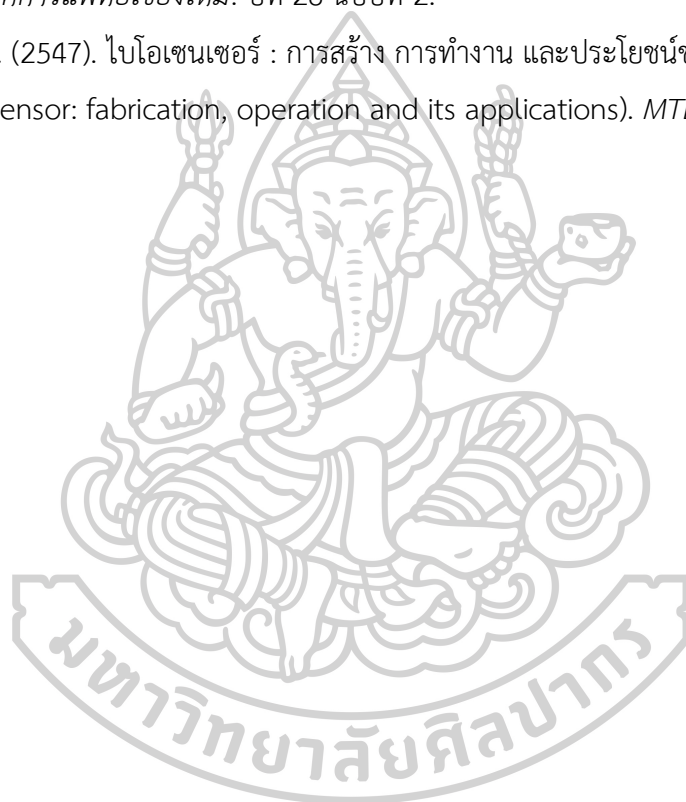


- Babanova, S., Matanovic, I., Chavez, M. S., & Atanassov, P. (2015). Role of Quinones in Electron Transfer of PQQ–Glucose Dehydrogenase Anodes—Mediation or Orientation Effect. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(24), 7754-7762. doi:10.1021/jacs.5b03053
- Bener, M., Şen, F. B., Kaşgöz, A., & Apak, R. (2018). Carrageenan-based colorimetric sensor for total antioxidant capacity measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *273*, 439-447. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.061>
- Blighe, F. M., Diamond, D., Coleman, J. N., & Lahiff, E. (2012). Increased response/recovery lifetimes and reinforcement of polyaniline nanofiber films using carbon nanotubes. *Carbon*, *50*(4), 1447-1454. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.10.022>
- Çakıroğlu, B., & Özacar, M. (2017). Tannic Acid Modified Electrochemical Biosensor for Glucose Sensing Based on Direct Electrochemistry. *Electroanalysis*, *29*(12), 2719-2726. doi:<https://doi.org/10.1002/elan.201700420>
- Chen, H., Wang, Y., Wang, Y., Dong, S., & Wang, E. (2006). One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles. *Polymer*, *47*(2), 763-766. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.11.034>
- Fang, L., Liang, B., Yang, G., Hu, Y., Zhu, Q., & Ye, X. (2014). Study of glucose biosensor lifetime improvement in 37°C serum based on PANI enzyme immobilization and PLGA biodegradable membrane. *Biosens Bioelectron*, *56*, 91-96. doi:10.1016/j.bios.2014.01.017
- Fang, L., Liang, B., Yang, G., Hu, Y., Zhu, Q., & Ye, X. (2017). A needle-type glucose biosensor based on PANI nanofibers and PU/E-PU membrane for long-term invasive continuous monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, *97*, 196-202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.043>
- Feng, Q., Liu, K., Fu, J., Zhang, Y., Zheng, Z., Wang, C., . . . Ye, W. (2012). Direct electrochemistry of hemoglobin based on nano-composite film of gold nanoparticles and poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene. *Electrochimica Acta*, *60*, 304-308. doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.11.048>

- Jia, B., & Zhang, W. (2016). Preparation and Application of Electrodes in Capacitive Deionization (CDI): a State-of-Art Review. *Nanoscale Research Letters*, *11*(1), 64. doi:10.1186/s11671-016-1284-1
- Jia, J., Wang, B., Wu, A., Cheng, G., Li, Z., & Dong, S. (2002). A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel Network. *Analytical Chemistry*, *74*(9), 2217-2223. doi:10.1021/ac011116w
- Laurinavicius, V., Kurtinaitiene, B., Liauksminas, V., Ramanavicius, A., Meskys, R., Rudomanskis, R., . . . Boguslavsky, L. (1999). Oxygen Insensitive Glucose Biosensor Based on POQ-Dependent Glucose Dehydrogenase. *Analytical Letters*, *32*(2), 299-316. doi:10.1080/00032719908542822
- Liu, H., Liu, W., Sun, Y., Chen, P., Zhao, J., Guo, X., & Su, Z. (2020). Preparation and electrochemical hydrogen storage properties of Ti₄₉Zr₂₆Ni₂₅ alloy covered with porous polyaniline. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(20), 11675-11685. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.115>
- Rassas, I., Braiek, M., Bonhomme, A., Bessueille, F., Rafin, G., Majdoub, H., & Jaffrezic-Renault, N. (2019). Voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulation in a chitosan-kappa-carrageenan polyelectrolyte complex. *Materials Science and Engineering: C*, *95*, 152-159. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.078>
- Sarauli, D., Xu, C., Dietzel, B., Schulz, B., & Lisdat, F. (2014). A multilayered sulfonated polyaniline network with entrapped pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase: tunable direct bioelectrocatalysis. *Journal of Materials Chemistry B*, *2*(21), 3196-3203. doi:10.1039/C4TB00336E
- Scholten, K., & Meng, E. (2018). A review of implantable biosensors for closed-loop glucose control and other drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *544*(2), 319-334. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.022>
- Shaikh, T., Pandey, A., Sirajuddin, Talpur, F. N., Kaushik, A., & Niazi, J. H. (2017). Gold nanoparticles based sensor for in vitro analysis of drug-drug interactions using imipramine and isoniazid drugs: A proof of concept approach. *Sensors and*

- Actuators B: Chemical*, 252, 1055-1062.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.083>
- Stejskal, J., & Prokeš, J. (2020). Conductivity and morphology of polyaniline and polypyrrole prepared in the presence of organic dyes. *Synthetic Metals*, 264, 116373. doi:<https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2020.116373>
- Stolarczyk, K., Rogalski, J., & Bilewicz, R. (2020). NAD(P)-dependent glucose dehydrogenase: Applications for biosensors, bioelectrodes, and biofuel cells. *Bioelectrochemistry*, 135, 107574. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107574>
- Thaxton, C. S., Elghanian, R., Thomas Audrey, D., Stoeva Savka, I., Lee, J.-S., Smith Norm, D., . . . Mirkin Chad, A. (2009). Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18437-18442. doi:10.1073/pnas.0904719106
- Wang, N., Burugapalli, K., Song, W., Halls, J., Moussy, F., Zheng, Y., . . . Li, K. (2013). Tailored fibro-porous structure of electrospun polyurethane membranes, their size-dependent properties and trans-membrane glucose diffusion. *Journal of Membrane Science*, 427, 207-217. doi:<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.052>
- Yeh, Y.-C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871-1880. doi:10.1039/C1NR11188D
- Yu, B., Long, N., Moussy, Y., & Moussy, F. (2006). A long-term flexible minimally-invasive implantable glucose biosensor based on an epoxy-enhanced polyurethane membrane. *Biosens Bioelectron*, 21(12), 2275-2282. doi:10.1016/j.bios.2005.11.002
- Zhu, D., Nakamura, H., Zhu, H., Xu, C., & Matsuo, M. (2015). Microfibers from interpolymer complexation of K-carrageenan and oligomers of polyaniline for glucose detection. *Synthetic Metals*, 202, 133-139. doi:<https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2015.01.026>

- ดร.ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง. (2548). การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีไฟฟ้าโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic Voltammetry). *Materials characterization*.
- พัฒนา เหล่าไพฑูรย์. (2536). ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor). *KKU Engineering Journal*, 20 (1), 39-47.
- วรพรรณ พรหมศิลา. (2556). การศึกษาอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโคปีเชิงเคมีไฟฟ้าของตัวตรวจวัดพอลิอะนิลีนสำหรับการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
- วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ. (2538). การตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยวิธีโครมาโตกราฟี. *วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่*. ปีที่ 28 ฉบับที่ 2.
- อัญชลี สำเภา. (2547). ไบโอสเซนเซอร์ : การสร้าง การทำงาน และประโยชน์ของไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor: fabrication, operation and its applications). *MTEC*, 13-18





ภาคผนวก ก.

สารเคมีและการเตรียม

1. 50 mM Sodium acetate buffer pH.5
 - 1.1) ชั่ง Sodium acetate trihydrate 6.804 กรัม
 - 1.2) ละลายในน้ำปราศจากไอออน 0.8 ลิตร
 - 1.3) ปรับ pH ด้วย acetic acid
 - 1.4) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
2. ขั้นตอนการทำ electropolymerization
 - 2.1) เตรียม 0.4 M aniline และ 0.1 M HCl ในอัตราส่วน 1:1
 - 2.2) ทำการให้กระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 mA/cm² เป็นเวลา 10 นาที ทั้งนี้การให้กระแสไฟฟ้าขึ้นกับขนาดของลวดทองคำ
3. สารละลาย Carrageenan-GNPs
 - 3.1) เตรียม คาราจีแนน 0.1% (w/v) จากนั้นนำไปกวนเป็นเวลา 10 นาที
 - 3.2) เตรียมสารละลาย 0.1 mM AuCl₃ โดยสารละลายในข้อ 3.1) และ 3.2) อัตราส่วนเป็น 1:1
 - 3.3) หลังจากขั้นตอนที่ 3.1) ครบ 10 นาทีแล้ว ทำการเติมสารละลายในข้อ 3.2) ลงไปแล้วกวนต่ออีก 5 นาที
 - 3.4) ได้สารละลาย Carrageenan-GNPs
 - 3.5) จากนั้นเติม 0.1 M NaBH₄ ลงในสารละลาย Carrageenan-GNPs ในอัตราส่วน 1:1
4. สารละลาย 3% (w/v) PU ใน 98% THF/ 2% DMF (v/v)
 - 4.1) เตรียมสารละลาย 98% THF/ 2% DMF (v/v)

4.2) เตรียม 3% พอลิยูรีเทน (w/v) จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 160-170 องศาเซลเซียสจนพอลิยูรีเทนเกิดความยืดหยุ่น

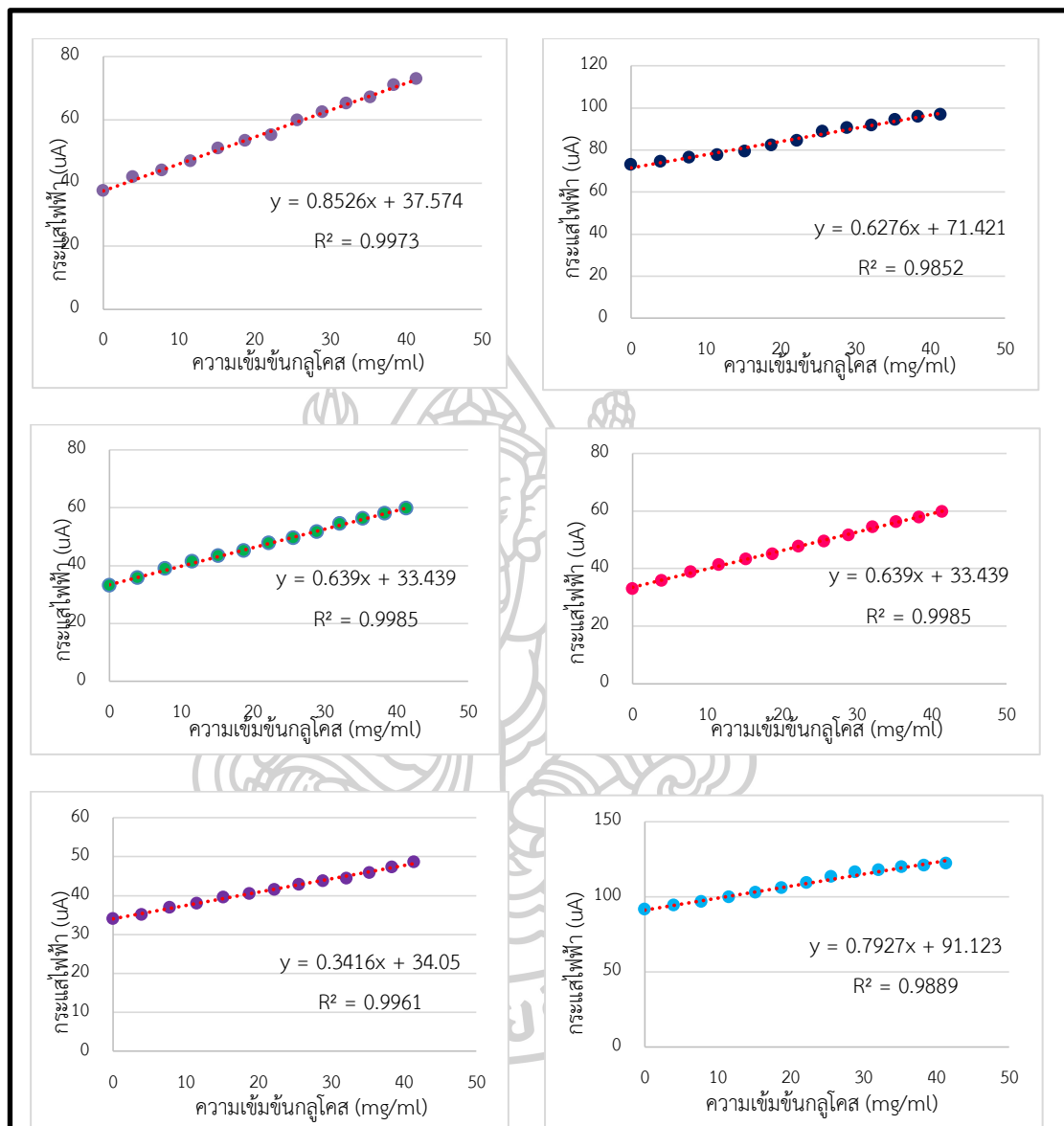
4.3) หลังจากนั้นเติมสารละลายในข้อ 4.1) ลงไป

4.4) ทำการกวนโดยใช้แท่งกวนสาร กวนจนกว่าสารจะละลายหรือมีความหนืดเพิ่มขึ้น



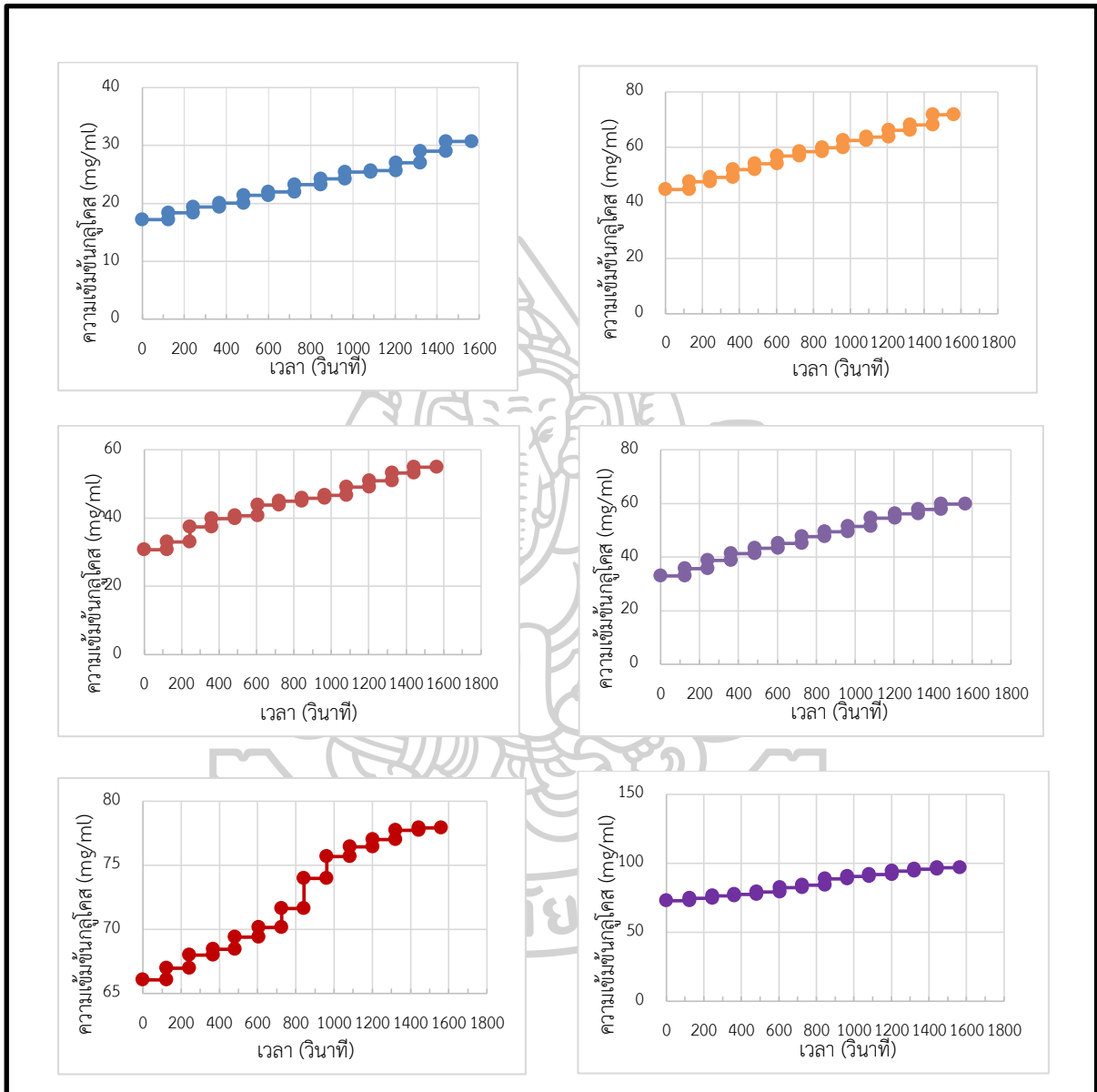
ภาคผนวก ข.

1. ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของหัววัดไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ที่ยกมาแสดงบางส่วน



ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานบางส่วนที่ยกมา ทำการทดสอบใน 0.5 mM NaOAc บัฟเฟอร์ ภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. ตัวอย่างผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาได้บนลวดทองคำต่อเวลาในการตอบสนองกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 32 ผลการทดสอบไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นต่อเวลาในการตอบสนองกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดสอบใน 0.5 mM NaOAc บัฟเฟอร์ ภายใต้สภาวะที่มีการกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส