



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ แอปพลิเคชันพอลิเมอร์เจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส

โดย ดร. จงดี ธรรมเขต และ คณะ

กุมภาพันธ์ 2554 เสร็จโครงการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ แอปพลิเคชันพอลิเมอร์เจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส

- | | |
|---|---|
| 1. ดร. จงดี ธรรมเขต | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 2. รองศาสตราจารย์ ดร. เจริญพิชญ์ คณาธารณา | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 3. รองศาสตราจารย์ ดร. ปณต ถาวรังกูร | ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “แอปพลิเคชันพอลิเมอร์เจลสำหรับตรวจวัดกลูโคส” สามารถดำเนินการได้สำเร็จจุลวง ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ต่อโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปรตพิชญ์ คณาธารณา ภาควิชาเคมี และ รองศาสตราจารย์ ดร. ปณต ถาวรวัชร ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ตั้งแต่เริ่มต้นทำงานวิจัยจนกระทั่งเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์

ขอขอบคุณสถานวิจัยการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซนเซอร์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาให้การสนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำหรับตัวอย่างปัสสาวะและข้อมูลผลวิเคราะห์เพื่อใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์พรณี อัครวัชรรัตนกุล สำหรับตัวอย่างน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เพื่อการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ดร. วรากร ลิ้มบุตร สำหรับความอนุเคราะห์อนุญาตของแดง เพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงผิวหน้าแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และสมาชิกในสถานวิจัยการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซนเซอร์ รวมถึงทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามที่อำนวยความสะดวกและให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

จงดี ธรรมเขต

1. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

รหัสโครงการ: MRG5180106

ชื่อโครงการ: แอปพลิเคชันสำหรับตรวจสอบการกัดกร่อนของโลหะ

ชื่อนักวิจัย: จงดี ธรรมเขต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail address: chongdee.t@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึง 14 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

งานวิจัยส่วนแรกเป็นการพัฒนาเทคนิคการวัดการกัดกร่อนของโลหะด้วยแอปพลิเคชันสำหรับตรวจสอบการกัดกร่อนของโลหะ ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณการกัดกร่อนของโลหะโดยไม่ใช้เอนไซม์ ที่อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของหมู่กรดฟีนอลโบโรนิกกับหมู่ ซิส-ไดไฮดรอกซีของโลหะ โดยทำการเคลือบโคบอลต์ของ กรด 3-อะคริลามิ โดฟีนโบโรนิกอะคริลามิ (สสารพอลิเมอร์เจล) ในท่อคาปิลลารีที่มีความยาว 5 เซนติเมตร สสารพอลิเมอร์เจลดังกล่าวจะเกิดการบวมตัวเมื่อจับกับโลหะ และเจลจะมีลักษณะใสขึ้นตามความเข้มข้นของโลหะ ทำให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงด้วยยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร หลังจากนำท่อที่เคลือบด้วยสสารพอลิเมอร์เจลต่อกับระบบโพลีเอทิลีนแล้วศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อ่อนคอลลอยด์แอปพลิเคชันสำหรับพอลิเมอร์เจลกลุโคสเซนเซอร์ ให้การตอบสนองที่เป็นเส้นตรงในช่วง 0.5–16.0 มิลลิโมลาร์ ขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 6 นาที มีความเสถียรในการใช้งานดี สามารถวิเคราะห์กลุโคสอย่างต่อเนื่องได้ถึง 250 ครั้ง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เพียง 5% และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างกลุโคสที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ 10 ตัวอย่าง กับวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) พบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองเทคนิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) นอกจากนี้เมื่อนำเทคนิคอณคอลลอยด์แอปพลิเคชันสำหรับพอลิเมอร์เจลกลุโคสเซนเซอร์วิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะ 3 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับ strip test เทคนิค พบว่า ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมีความสอดคล้องกัน โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเป็น $88\pm 2\%$ ถึง $103\pm 4\%$

สำหรับงานวิจัยในส่วนที่สองเป็นการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์กลุโคสให้มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น ทำได้โดยการสังเคราะห์มอนออลิโทคอลลิมนที่มีกรดฟีนโบโรนิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์มอนออลิโทคอลลิมนในท่อคาปิลลารีได้ แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลของมอนออลิโทคอลลิมนที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าค่ารีเทนชันไทม์ของทั้งกลุโคสและซูโครสมีค่าใกล้เคียงกันมาก ไม่สามารถแยกน้ำตาลทั้งสองชนิดออกจากกันได้ จึงเน้นการพัฒนาในส่วนของการตรวจวัดกลุโคสด้วยระบบโพลีเอทิลีนเซนเซอร์โพลีเอทิลีนที่ใช้การปรับปรุงผิวหน้าแกลสซีคาร์บอน อิเล็กโทรดด้วยอนุภาคทองแดง เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลุโคสให้เกิดได้ดีขึ้นที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำลง

พบว่าให้ผลการทดลองที่น่าพอใจ การปรับปรุงผิวหน้าอิเล็กทรอนิกส์โดยวิธีดังกล่าวสามารถทำได้ง่าย มีความเสถียรในการใช้งานสูงมากโดยสามารถวิเคราะห์กลุโคสซ้ำได้อย่างน้อย 350 ครั้ง (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 2.5%) และค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลงเพียง 0.0018% ต่อการฉีดแต่ละครั้ง นอกจากนี้ยังให้ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงกว้าง คือ 0.0010–10.00 มิลลิโมลาร์ และให้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำถึง 0.0050 มิลลิโมลาร์ หรือ 5.0 ไมโครโมลาร์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กลุโคสได้

คำหลัก: แอปฟิनीตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล กลุโคสเซนเซอร์ กรดฟีนอลโบโรนิก มอนอลิเทคอลลัมน์
ปรับปรุงผิวหน้าอิเล็กทรอนิกส์โดยอนุภาคทองแดง

Project code: MRG5180106
 Project title: Affinity Smart Polymer Gel for Glucose Detection
 Investigator: Chongdee Thammakhet, Prince of Songkla University
 E-mail address: chongdee.t@psu.ac.th
 Project period: May 15, 2008 to May 14, 2010

The first part of this research is the development of a simple non-enzymatic glucose sensor named "on-column affinity smart polymer gel glucose sensor". Copolymer of 3-acrylamidophenylboronic acid and acrylamide (smart polymer gel) was synthesized in a 5 cm long capillary tube with a detection window to provide an on-column light absorption measurement at 500 nm. The smartpolymer gel swell when it binds with glucose and the optical density of this gel decreased with the increase of glucose concentration. After the coated capillary was incorporated into a flow injection system and under the optimum conditions, the linearity and the limit of detection of this sensor was 0.5–16.0 mM and 0.5 mM, respectively. The analysis time was 6 minutes with a very good operational stability (250 consecutive injections with RSD only 5%). In order to evaluate the performance of the on-column affinity smart polymer gel sensor, 10 unknown glucose samples prepared in distilled water were analyzed with the conventional DNS (dinitrosalicylic acid) and the proposed methods. It was found that the results obtained from both methods agreed well ($P > 0.05$). For a real sample analysis, three urine samples with known glucose levels were analyzed with the developed method. The results showed that the on-column affinity smart polymer gel glucose sensor provided the comparable results to those from the normal strip test technique. An acceptable range of recoveries, 88 ± 2 to 103 ± 4 %, was also obtained.

The second part aims to improve the selectivity of the glucose sensor by coupling a separation column in front of the detection part. A monolith column was synthesized using phenylboronic acid as a monomer and act as a function group to retain different sugar. It was found that the monolith column could be successfully synthesized but it could not separate glucose from sucrose. Glucose and sucrose were eluted from the momolith column with almost the same retention time. Therefore, the focus is shifted to the development of a flow injection amperometry for better detection sensitivity by using copper particles modified glassy carbon electrode. Copper particle modified glassy carbon electrode provided good calalytic acitivity for glucose oxidation. The method

used to modify electrode in this work is very simple. The operational stability was also good, at least 350 times of injection can be performed on a single modified electrode (2.5% RSD). The reduction of %response was only 0.0018 per injection. Under the optimum conditions, the copper particle modified electrode coupled with the flow injection amperometry provided wide linear dynamic range, 0.0010–10.00 mM, with low limit of detection, 0.0050 mM or 5.0 μ M.

Keywords: Affinity smart polymer gel, glucose sensor, phenylboronic acid, monolith column, copper particle modified electrode

2. Executive summary

ปริมาณกลูโคสในซีรัมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการบ่งชี้ภาวะการเป็นโรคเบาหวาน ซึ่งความเข้มข้นเฉลี่ยของกลูโคสในซีรัมของคนปกติจะอยู่ระหว่าง 4 ถึง 7 มิลลิโมลาร์ (Park *et al.*, 2006) โดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานไว้ว่าขณะนี้ประชากรทั่วโลกจำนวนไม่น้อยกว่า 220 ล้านคนที่ป่วยด้วยโรคเบาหวาน และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในช่วงปี 2548–2573 (WHO, 2011) ดังนั้นเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัยโรคของแพทย์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสมีความสำคัญต่องานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและการควบคุมกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากในกระบวนการหมักหรือการเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะใช้กลูโคสเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจวัดปริมาณกลูโคสให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อหรือเซลล์ที่ต้องการ (Blake and McLean, 1989)

เทคนิคที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ส่วนใหญ่จะอาศัยการวัดผลจากปฏิกิริยาระหว่างกลูโคส (ซับสเตรท) กับเอนไซม์ซึ่งใช้เป็นวัสดุชีวภาพ และเนื่องจากเอนไซม์จะจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงกับซับสเตรทที่เข้าคู่กันเท่านั้น จึงทำให้เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์เหมาะสำหรับการตรวจวัดกลูโคสแม้ว่าในตัวอย่างนั้นจะมีองค์ประกอบที่ค่อนข้างซับซ้อน อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ยังมีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน ความเสถียรของเอนไซม์ซึ่งเป็นวัสดุชีวภาพเป็นปัญหาหลักที่เกิดขึ้นเพราะเอนไซม์เป็นวัสดุชีวภาพซึ่งจะมีการเสื่อมสภาพตามเวลา และแม้ว่าเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งนิยมใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสจะเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ก็ตาม แต่ก็ยังมีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสเพราะความร้อนทำให้เกิดการสูญเสียประสิทธิภาพอย่างรวดเร็ว (Park *et al.*, 2006) ทำให้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์กลูโคสในกระบวนการหมักหรือการตรวจวัดที่ต้องมีการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง (sterilization) (Park *et al.*, 2006) นอกจากนี้ปัญหาเรื่องปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) เป็นอีกปัญหาหนึ่งที่พบได้บ่อย เนื่องจากเอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสแล้วส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นไปยังออกซิเจนที่มีอยู่ในสารละลาย (Wu *et al.*, 2004) ดังนั้นปริมาณออกซิเจนละลายที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์จึงมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสและความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ ทำให้ต้องควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้มีค่าคงที่ (Park *et al.*, 2006)

ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณกลูโคสแบบไม่ใช้เอนไซม์ขึ้น โดยสารตัวหนึ่งที่นิยมใช้ คือ กรดฟีนิลโบโรนิกซึ่งเป็นแอฟฟินิตีลิแกนด์ (affinity ligand) ที่สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์แบบผันกลับได้ (reversible covalent bond) อย่างจำเพาะเจาะจงกับหมู่ไดออลของกลูโคส

ที่มีการจัดวางตำแหน่งแบบซิส (*cis*-configuration) (Lorand and Edwards, 1959) และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสมาร์ท พอลิเมอร์เจล (smart polymer gel) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีเมื่อมีการเร้าจากปัจจัยภายนอก (Annaka and Tanaka, 1992; Ivanov *et al.*, 2005; Kataoka *et al.*, 1998; Suzuki and Tanaka, 1990) ทำให้สามารถพัฒนาเป็นสมาร์ทพอลิเมอร์เจล ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสได้ (Alexeev *et al.*, 2003; Gabai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2004a; Matsumoto *et al.*, 2004b)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาการทำพอลิเมอร์เจลให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดตลอดจนการตรวจวัดผลที่เกิดขึ้น ส่วนใหญ่ใช้เทคนิคที่ค่อนข้างยุ่งยาก เช่น การตรวจวัดความถี่ของการสั่นที่เปลี่ยนแปลงไป (ควอซคริสตัล ไมโครบาลานซ์) การเปลี่ยนแปลงของมุมสะท้อน (เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์) การเปลี่ยนแปลงของค่าอิมพีแดนซ์ (อิมพีดิเมตรี) (Gabai *et al.*, 2001) หรือการใช้กล้อง CCD (CCD camera) สำหรับถ่ายภาพเพื่อสังเกตการบวมตัวของเจล (Matsumoto *et al.*, 2004a) นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนานอีกด้วย เช่น ในการวิเคราะห์กลูโคสที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ใช้เวลาประมาณ 40 นาทีต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่าง (Gabai *et al.*, 2001) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาและพัฒนาสมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการวิเคราะห์กลูโคสที่สามารถใช้งานได้ง่าย มีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยากและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น โดยมีแนวคิดในการนำเทคนิคคาปิลลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (capillary electrochromatography) มาประยุกต์ใช้

เนื่องจากกรดฟีนิลโบโรนิกสามารถเกิดพันธะกับสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่จัดวางตัวในตำแหน่งซิสได้ทุกชนิด จึงสามารถจับกับน้ำตาลได้หลายชนิด ดังนั้นเพื่อพัฒนาระบบการตรวจวัดกลูโคสมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น จึงเพิ่มส่วนของคอลัมน์ในการแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันก่อนที่จะเข้าสู่ระบบของการตรวจวัด จากการค้นข้อมูลเกี่ยวกับค่าคงที่ในการเกิดพันธะระหว่างกรดฟีนิลโบโรนิกกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่ามีค่าแตกต่างกัน (Lorand and Edwards, 1959; Springsteen and Wang, 2002) ดังนั้นจึงมีความต้องการที่จะสังเคราะห์มอนอลิโทคอลัมน์ที่มีกรดฟีนิลโบโรนิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน เพื่อใช้ในการแยกน้ำตาลแต่ละชนิดก่อนการตรวจวัด ส่งผลได้ระบบการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจวัดกลูโคสมากยิ่งขึ้น

3. วัตถุประสงค์

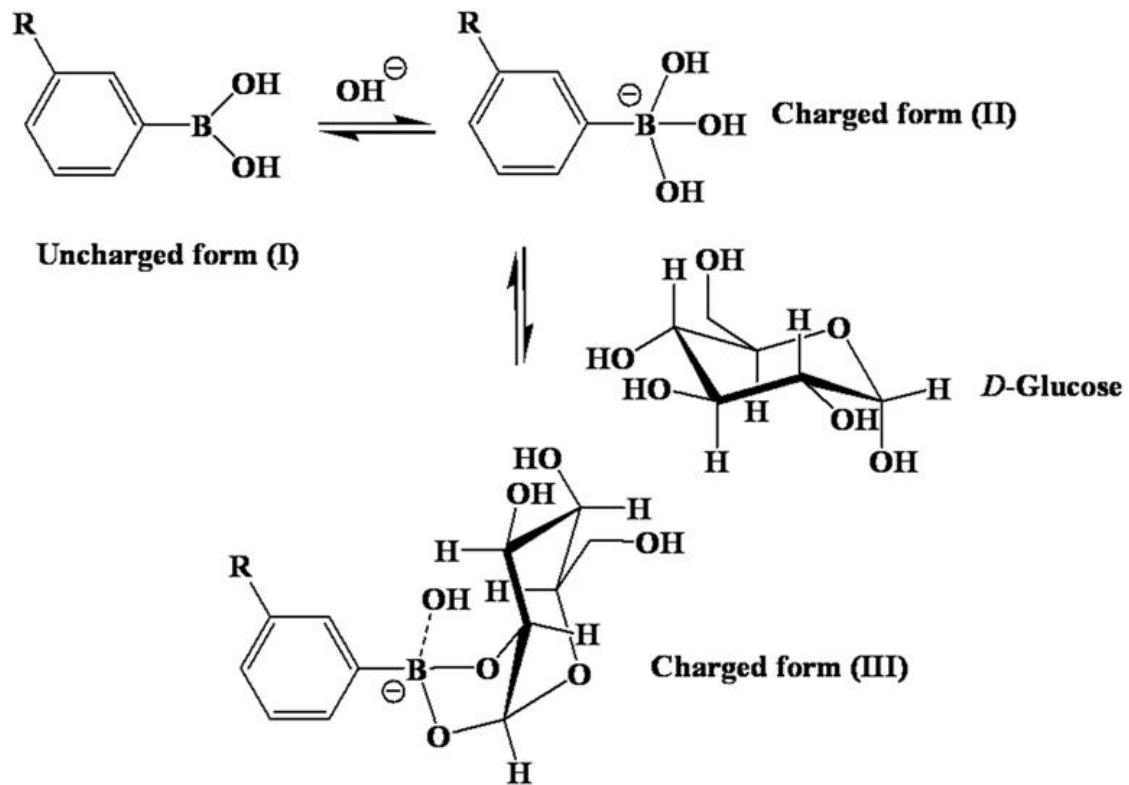
พัฒนาเทคนิคแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล สำหรับการตรวจวัดกลูโคสที่สามารถใช้งานได้ง่าย และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น รวมทั้งศึกษาวิธีการที่ทำให้การตรวจวัดมีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคส และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างจริง

4. วิธีทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกคือการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์กลูโคสอย่างง่ายที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนที่สองจะเป็นการพัฒนากระบวนการที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส เพื่อใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่อาจมีน้ำตาลอื่นที่ไม่ใช่กลูโคสรวมอยู่ด้วย จึงขอแบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

4.1 ศึกษาและพัฒนาแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการตรวจวัดกลูโคสอย่างง่าย

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



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

4.1.1 การสังเคราะห์แอฟฟิनिติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี

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

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

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

4.1.1.3 นำสารละลายทั้งสองส่วนข้างต้น คือ สารละลายส่วนผสมของมอนอเมอร์ และสารละลายที่เป็นตัวริเริ่มปฏิกิริยา ผสมกันในอัตราส่วน 2:1 จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันได้ ผลิตภัณฑ์เป็นแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่มีลักษณะขาวขุ่น

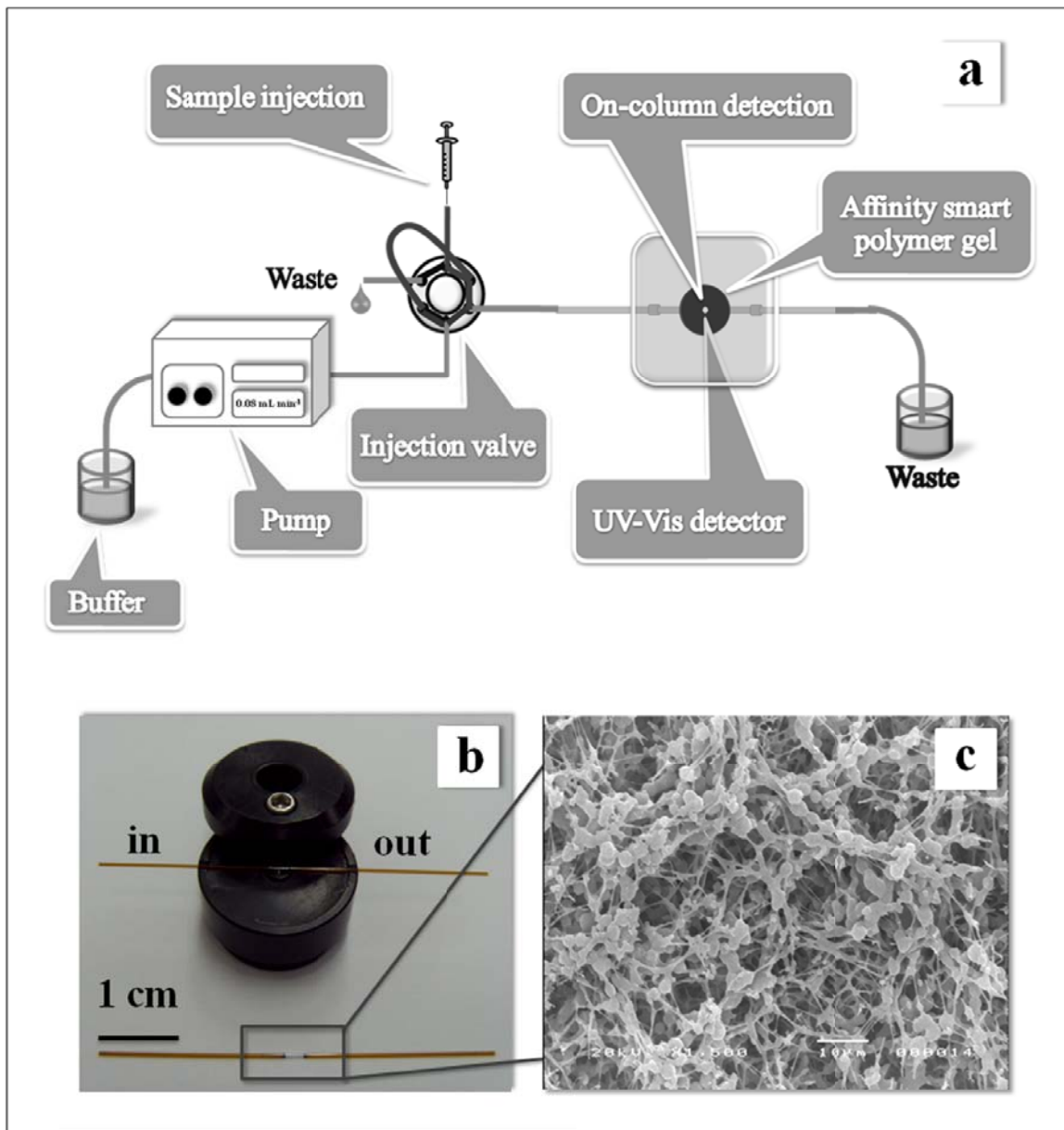
4.1.1.4 เตรียมท่อคาปิลลารี โดยตัดท่อให้มีความยาว 5 เซนติเมตร โดยใช้ท่อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.32 มิลลิเมตร เพื่อการทดสอบในเบื้องต้นก่อน เมื่อได้ท่อที่มีความยาวที่ต้องการแล้ว ก็นำท่อที่ได้สอดเข้าไปในอุปกรณ์สำหรับเผาชั้นของพอลิเอมิด (polyimide) ออก ทำให้ได้ส่วนที่มีลักษณะใสบริเวณตอนกลางของท่อคาปิลลารี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

4.1.1.5 นำท่อที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.2.4 จุ่มลงในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.2.3 ทันทีหลังผสมสารตั้งต้นทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ในขั้นตอนนี้อาจจะใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวช่วยทำให้สารละลายไหลผ่านท่อคาปิลลารีได้ดีขึ้น หรือ อาจจะทำให้สารละลายไหลผ่านท่อด้วยแรงคาปิลลารีก็ได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาว่าวิธีการใดจะมีความเหมาะสมมากที่สุด

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

4.1.2 สภาวะที่เหมาะสมของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ ที่ต่อกับระบบโฟลอิเจคชัน

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



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

ในการเซพระบบโพลีอินเจคชันนั้น ส่วนใสของท่อคาปิลลารีที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์เจลจะมีตำแหน่งตรงกับช่องที่ให้แสงเดินทางผ่านของเซลล์สำหรับการตรวจวัดแบบออนคอลัมน์ (on-column detection cell) ดังแสดงในรูปที่ 2b ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่มีการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของ แอฟฟิनिตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล หลังจากหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่ซิล-ไดออกไซด์ ของ น้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

หลังจากเซพระบบโพลีอินเจคชันเรียบร้อยแล้ว จึงทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ และทำการศึกษาที่ละปัจจัย หรือถ้ามีปัจจัยใดที่ส่งผลต่อกันก็จะทำการศึกษาในลักษณะที่เป็น แพคทอเรียล โดยใช้สารละลายมาตรฐานของกลูโคสความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ในการทดสอบ เพื่อให้เห็นสัญญาณการตอบสนองที่ชัดเจน ในการพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกจากสภาวะที่ให้ค่าสัญญาณในการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อน้ำตาลกลูโคสสูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย มีปัจจัยและช่วงของการศึกษาสรุปได้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแอฟฟิनिตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์ ที่ต่อกับระบบโพลีอินเจคชัน

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

4.1.3 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารีที่มีต่อความไว

วิเคราะห์ของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์

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

4.1.4 ประสิทธิภาพและพิสูจน์การใช้ได้ของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจล กลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

4.1.4.1 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด

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

4.1.4.2 ความเที่ยงของแอฟฟิไนต์สเมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และระหว่างวัน (inter-day precision)

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

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

4.1.4.3 ความเสถียรในการใช้งานของแอปฟิโนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคส

เซนเซอร์

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

4.1.4.4 ความสามารถในการทำซ้ำได้ของการสังเคราะห์แอปฟิโนติสมาร์ท

พอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ในท่อคาปิลลารี

ทำการศึกษาโดยการสังเคราะห์และเคลือบท่อคาปิลลารีด้วยแอปฟิโนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจล ทั้งหมด 6 ท่อ (ใช้สารละลายมอนอเมอร์และสารละลายยรีเริ่มปฏิกิริยาที่เตรียมครั้งเดียวกัน) จากนั้นนำแต่ละท่อ (ทำการทดลองครั้งละ 1 ท่อ) มาต่อเข้ากับระบบโฟลอินเจคชัน แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 16.0 มิลลิโมลาร์ นำสัญญาณการตอบสนองที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน แล้วเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ (ความชันของกราฟมาตรฐาน) ที่ได้จากท่อแต่ละอัน

4.1.4.5 ความจำเพาะเจาะจงของแอปฟิโนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจล

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

4.1.4.6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีมาตรฐาน

เพื่อเป็นการพิสูจน์การใช้ได้ของวิธี จึงต้องมีการเปรียบเทียบผล ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน ทำการศึกษาโดยวิเคราะห์ตัวอย่างกลูโคสที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเตรียมให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 5.0–

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

4.1.4.7 วิเคราะห์ตัวอย่างจริง

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

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

จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงด้วย แอฟฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์ เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น กับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันด้วย strip test (ARKRAY AUTIONTM Sticks, ARKRAY, Inc. Kyoto, Japan) ที่ได้จากโรงพยาบาลสงขลา นครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์ที่เทียบเท่ากับวิธีที่ใช้จริงในโรงพยาบาล

4.2 ศึกษาและพัฒนาแอฟฟิनिตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส

วิธีทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยเดิม

เนื่องจากกรดพีนิกโบโรนิกสามารถเกิดพันธะกับสารที่มีหมู่ซีส-ไดออลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีอยู่ในน้ำตาลเกือบทุกชนิด แอฟฟิनिตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่พัฒนาขึ้นในช่วงปีแรกจึงไม่จำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงต้องการศึกษาและพัฒนาต่อยอดจากเทคนิคเดิมให้สามารถแยกตรวจวัดกลูโคสจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่สามารถจับตัวกับสมาร์ทพอลิเมอร์เจลได้ โดยการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารีตลอดช่วงความยาวที่เหมาะสม เพื่อให้เป็นทั้งเฟสอยู่กับที่เพื่อแยกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และใช้เป็นบริเวณสำหรับการตรวจวัดด้วยวิธี วิลิเบิล โดยมีปัจจัยที่ต้องศึกษาดังนี้

4.2.1 ความยาวของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์ที่เหมาะสม

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

4.2.2 ความสามารถในการทำซ้ำได้ของการสังเคราะห์และการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจล

ศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์และการเคลือบซ้ำได้ โดยพิจารณาจากสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากระบบการตรวจวัดและค่าสัมประสิทธิ์การแยก (separation factor) จากโครมาโทแกรมที่ได้

4.2.3 สภาพที่เหมาะสมสำหรับการแยกน้ำตาลแต่ละชนิด

ปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษา คือ อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์มีประสิทธิภาพในการแยกสูงที่สุด นั่นคือ เพื่อให้แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์สามารถแยกกลูโคสออกจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ได้

4.2.4 ประสิทธิภาพการทำงานของทั้งระบบ

ปัจจัยที่จำเป็นต้องศึกษา เช่น การตอบสนองเชิงเส้นของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่มีต่อน้ำตาลแต่ละชนิด (ศึกษาจากค่าสัมประสิทธิ์การตรวจวัด >0.99) ขีดจำกัดการตรวจวัดของ

น้ำตาลแต่ละชนิด ($\text{signal/noise} \geq 3$) เสถียรภาพของแอฟฟิไนต์สแมร์ทพอลิเมอร์เจล โดยดูจากผลการวิเคราะห์ซ้ำ และอายุการใช้งาน (ศึกษาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงของสัญญาณการตอบสนอง) เป็นต้น

4.2.5 ผลรบกวนที่เกิดจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ

โดยศึกษาทั้งในเชิงคุณภาพ (ประสิทธิภาพในการแยก) และเชิงปริมาณ (สัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้)

4.2.6 ประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

นำเทคนิคการแยกและการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) หรือ ซีรัม โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับเทคนิคมาตรฐาน

วิธีทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่

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

สำหรับแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่ ผู้วิจัยจึงได้สังเคราะห์มอนอลิธคอลัมน์ที่มีกรดฟีนิลโบโรนิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน เนื่องจากหมู่กรดฟีนิลโบโรนิกสามารถเกิดอันตรกิริยาดัวยอัตราที่แตกต่างกันระหว่างน้ำตาลแต่ละชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะนำคอลัมน์มอนอลิธที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในการแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันได้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเทคนิคการสังเคราะห์ ตลอดจนสารเคมีที่ต้องใช้เพื่อการสังเคราะห์มอนอลิธคอลัมน์ที่มีกรดฟีนิลโบโรนิกเป็นหมู่ฟังก์ชัน และค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับเทคนิคการตรวจวัดน้ำตาล จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจคือการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคทางไฟฟ้าเคมี เพราะน้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีสถานะเป็นเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าสามารถใช้มอนอลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นในการแยกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน และตรวจวัดโดยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี โดยมีการปรับปรุงผิวหน้าของอิเล็กโทรดด้วยอนุภาคทองแดง น่าจะทำให้ได้เทคนิคการตรวจวัดน้ำตาลที่สามารถวิเคราะห์น้ำตาลได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยได้ศึกษาทั้งในส่วนของการสังเคราะห์มอนอลิธคอลัมน์และระบบของการตรวจวัดไปพร้อม ๆ กัน ดังนี้

4.2.7 ศึกษาการสังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์และศึกษาการแยกน้ำตาลแต่ละชนิด

4.2.7.1 เตรียมท่อคาปิลลารีสำหรับการสังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์

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

4.2.7.2 สังเคราะห์มอนอลิทคอลัมน์

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

4.2.7.3 ทดสอบการแยกน้ำตาลด้วยมอนอลิทคอลัมน์

ทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดสำหรับวัดค่าดัชนีหักเห เนื่องจากเป็นตัวตรวจวัดที่สามารถวิเคราะห์น้ำตาลได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำอนุพันธ์ เพื่อทดสอบก่อนว่าคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถแยกน้ำตาลได้หรือไม่ ก่อนที่จะนำคอลัมน์ดังกล่าวไปต่อเข้ากับระบบตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์มอนออลิทคอลลัมน์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นกรดฟีนิลโบโรนิกสำหรับการแยกน้ำตาล

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

4.2.8 ศึกษาการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี

4.2.8.1 การปรับปรุงผิวหน้าของแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรด (glassy carbon electrode) ด้วยอนุภาคทองแดง

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

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

4.2.8.2 ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

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

4.2.8.3 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในระบบโพลีเมอร์เจตชันแอมเพอโรเมทรี

เมื่อได้ศักย์ไฟฟ้าที่กลูโคสเริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ผิวหน้าอิเล็กโทรด แล้วจึงทำการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสในระบบโพลีเมอร์เจตชันด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีที่ 0.20 0.30 0.40 0.45 0.50 0.55 และ 0.60 โวลต์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร และใช้อัตราไหลของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2.8.4 อัตราไหลและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

ในการศึกษานี้ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากจากกลูโคสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส และเพื่อให้ได้สัญญาณการตอบสนองที่สูงที่สุดจึงทำการศึกษารัตราไหลของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ตั้งแต่ 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 0.01 0.05 0.10 0.25 และ 0.50 โมลาร์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษา

4.2.8.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอนุภาคทองแดง

เตรียมอนุภาคทองแดงในสารละลาย 0.5% Nafion ในเอทานอล ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 2.5 5.0 และ 10% (มวลต่อปริมาตร) โดยใช้ปริมาตรของสารละลายดังกล่าว 5.0 ไมโครลิตรในการหยดลงบนผิวหน้าของแกสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ใช้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน วางทิ้งไว้ให้แห้งในที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน หลังจากนั้นจึงนำอิเล็กโทรดที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้ามาล้างด้วยน้ำกลั่น และต่อเข้ากับระบบโพลีเมอร์เจตชันแอมเพอโรเมทรีเพื่อทำการตรวจวัดกลูโคส โดยแต่ละความเข้มข้นของอนุภาคทองแดง จะทำการฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.01–1.0 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำความไววิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับ เพื่อหาความเข้มข้นของอนุภาคทองแดงที่เหมาะสมที่สุด

4.2.8.6 ความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้าที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง

ฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ สลับกันเป็นช่วง ๆ เข้าไปในระบบโพลีเมอร์เจตชันแอมเพอโรเมทรีที่มีอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยให้สัญญาณที่ได้จากการฉีดครั้งแรกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงเขียนกราฟระหว่างจำนวนครั้งที่ฉีดกับเปอร์เซ็นต์ของสัญญาณที่ได้ แล้วหาค่าเฉลี่ยรวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำที่ได้

4.2.8.7 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด

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

4.2.9 มอนอลิทคอลัมน์ควบคู่กับระบบโพลินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

หลังจากที่แยกศึกษาทั้งในส่วนของการแยกและส่วนของการตรวจวัดเรียบร้อยแล้ว นำมอนอลิทคอลัมน์ที่สังเคราะห์มาต่อเข้ากับระบบโพลินเจคชันแอมเพอโรเมทรีที่สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกัน เพื่อให้เทคนิคการตรวจวัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองแบ่งออกเป็นสองส่วนเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง โดยผลการทดลองส่วนแรกจะเป็นของการพัฒนาเทคนิควิเคราะห์กลูโคสอย่างง่ายที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนที่สองจะเป็นผลของการพัฒนาระบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส เพื่อใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่อาจมีน้ำตาลอื่นที่ไม่ใช่กลูโคสรวมอยู่ด้วย จึงขอแบ่งผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองออกเป็นสองส่วนดังนี้

5.1 ผลการศึกษาและพัฒนาแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการตรวจวัดกลูโคสอย่างง่าย

5.1.1 ทดสอบเทคนิคการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี

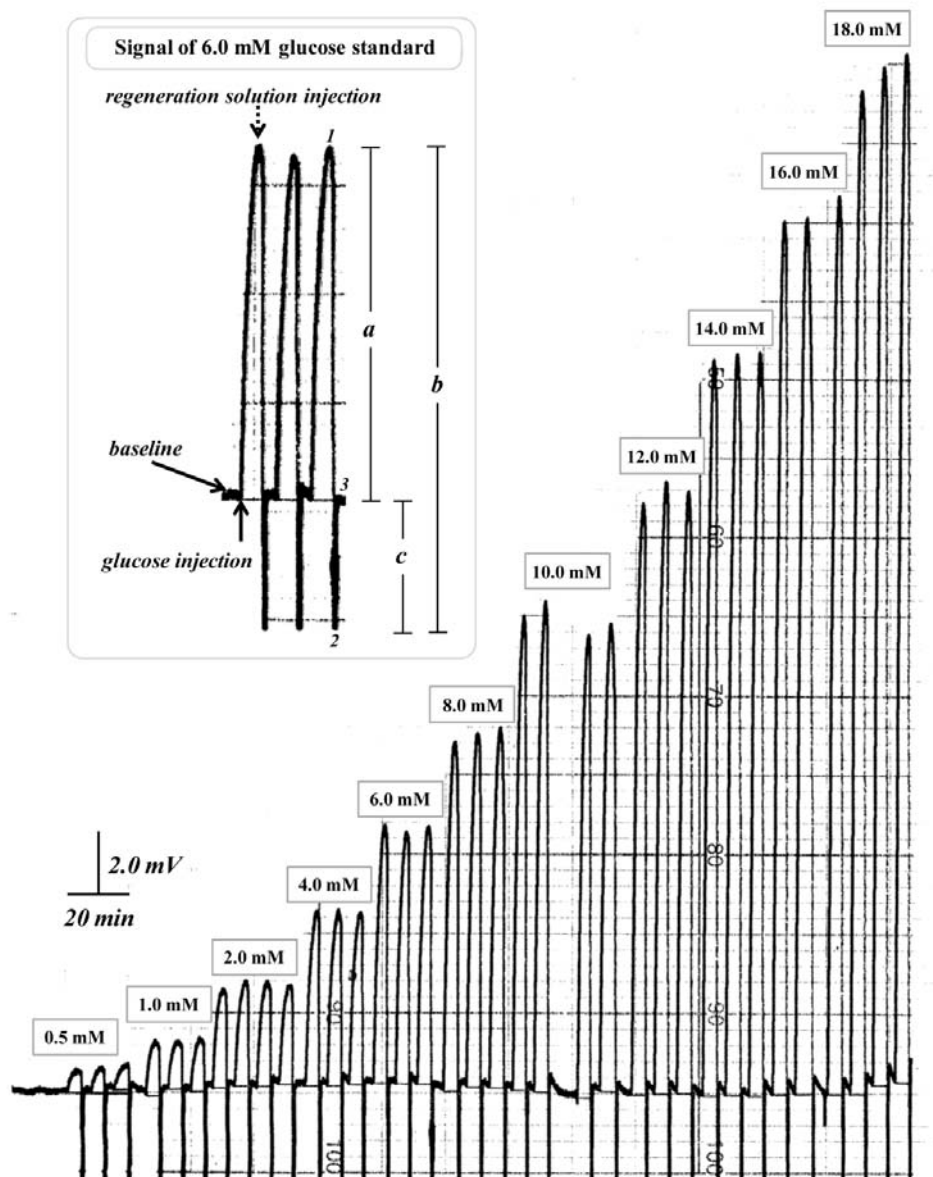
ทดสอบการเคลือบแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลภายในท่อคาปิลลารี 2 แบบ คือแบบที่ใช้แก๊สไนโตรเจนและแบบที่ใช้แรงคาปิลลารี (capillary force) ในการขับเคลื่อนสารละลายผสมของแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลไหลผ่านท่อคาปิลลารี จากการทดสอบพบว่า การเคลือบโดยใช้แรงคาปิลลารีสามารถทำได้ง่ายกว่า และควบคุมการไหลของสารละลายผสมได้ดีกว่า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

เมอร์เจลสามารถยึดติดกับผิวภายในของท่อคาปิลลารีได้โดยที่ไม่หลุดออกมากับสารละลายตัวพา ทั้งนี้เนื่องจากความเป็นโครงข่ายพอลิเมอร์ที่มีรูพรุนของเจลที่สังเคราะห์ได้ทำให้สารละลายสามารถไหลผ่านเจลได้ดีขึ้น โดยสังเกตได้จากภาพที่ได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM 5200 Microscope, JEOL, USA) ที่กำลังขยาย 1500 เท่า (รูป 2c)

5.1.2 สภาพที่เหมาะสมของแอฟฟิโนสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่ต่อกับระบบโฟลอิเจคชัน

5.1.2.1 ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้สลายพันธะ

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



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

5.1.2.2 ความเข้มข้นและ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

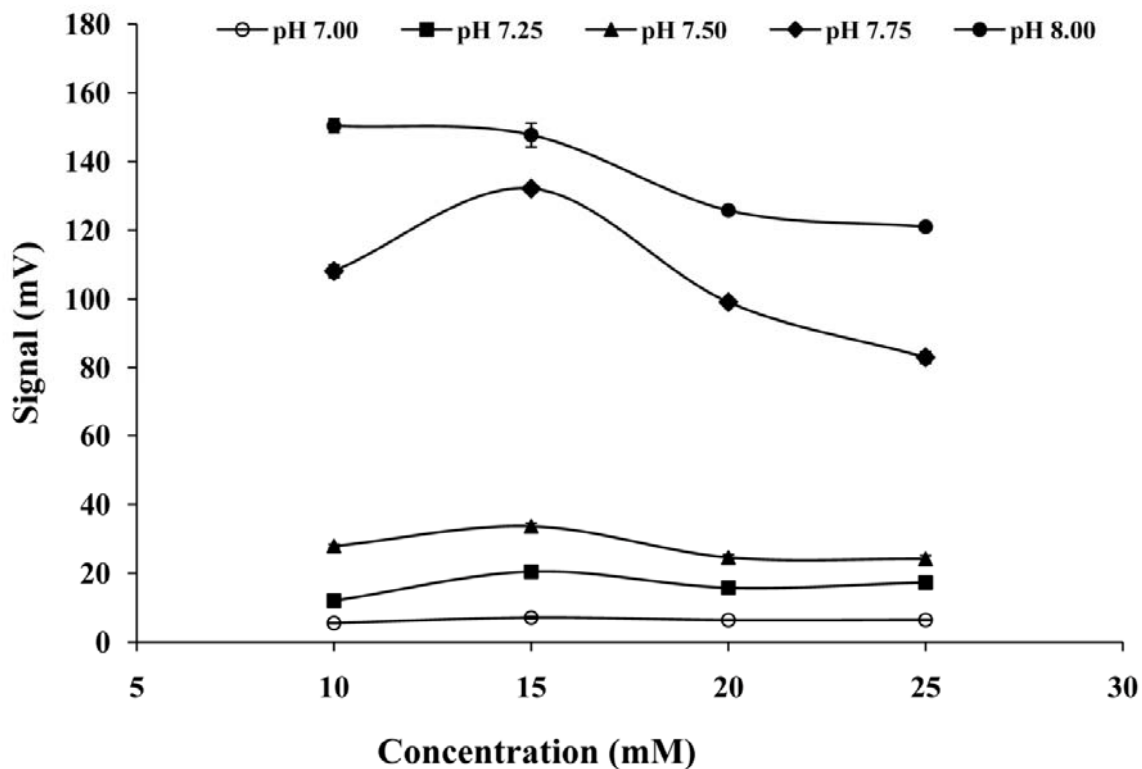
ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีต่อ สัญญาณการตอบสนองที่ 10 15 20 และ 25 มิลลิโมลาร์ โดยที่แต่ละความเข้มข้นศึกษาที่ทุก pH ดังนี้ 7.00 7.25 7.50 7.75 และ 8.00 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 15 มิลลิโมลาร์ สำหรับทุกค่า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

5.1.2.3 ปริมาตรสารตัวอย่างและอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่

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

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

สภาวะที่เหมาะสมของฮอนคอลลัมน์แอฟฟิเนตีสมาทพอลิเมอ์เจลกลูโคส เซนเซอร์ควบคุมกับระบบโพลีอินเจคชัน สรุปลไว้ในตารางที่ 3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะสามารถวิเคราะห์กลูโคสได้ภายในระยะเวลา 6 นาที



รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นและ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีต่อสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ในการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 8.0 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหล่ของเฟสเคลื่อนที่ 0.05 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมของออนคอล์มน์แอฟฟิโนดีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ควบคู่กับระบบโพลีอินเจคชัน

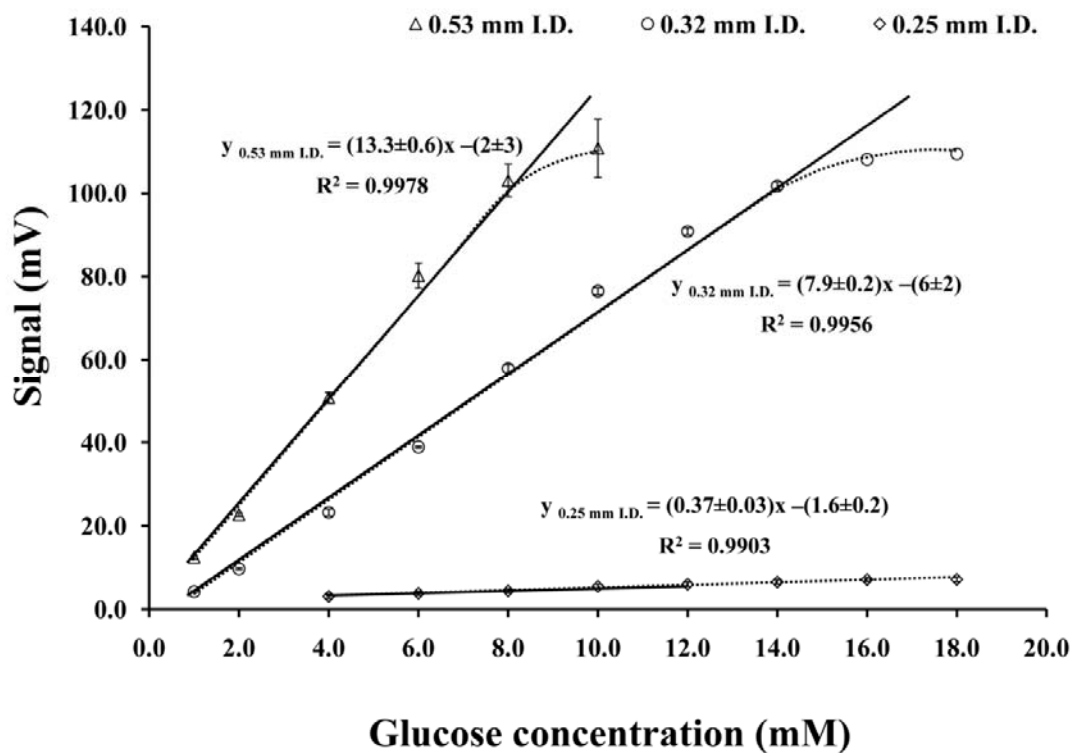
ปัจจัยที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่	
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	15.0
pH	7.75
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นสารละลายสลายพันธะ	
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	20.0
pH	5.50
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	300
อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.08

5.1.3 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของท่อคาปิลลารีที่มีต่อความไว

วิเคราะห์ของแอฟฟิโนดีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์

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

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



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

5.1.4 ประสิทธิภาพและการพิสูจน์การใช้ได้ของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจล กลูโคสเซนเซอร์

5.1.4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection)

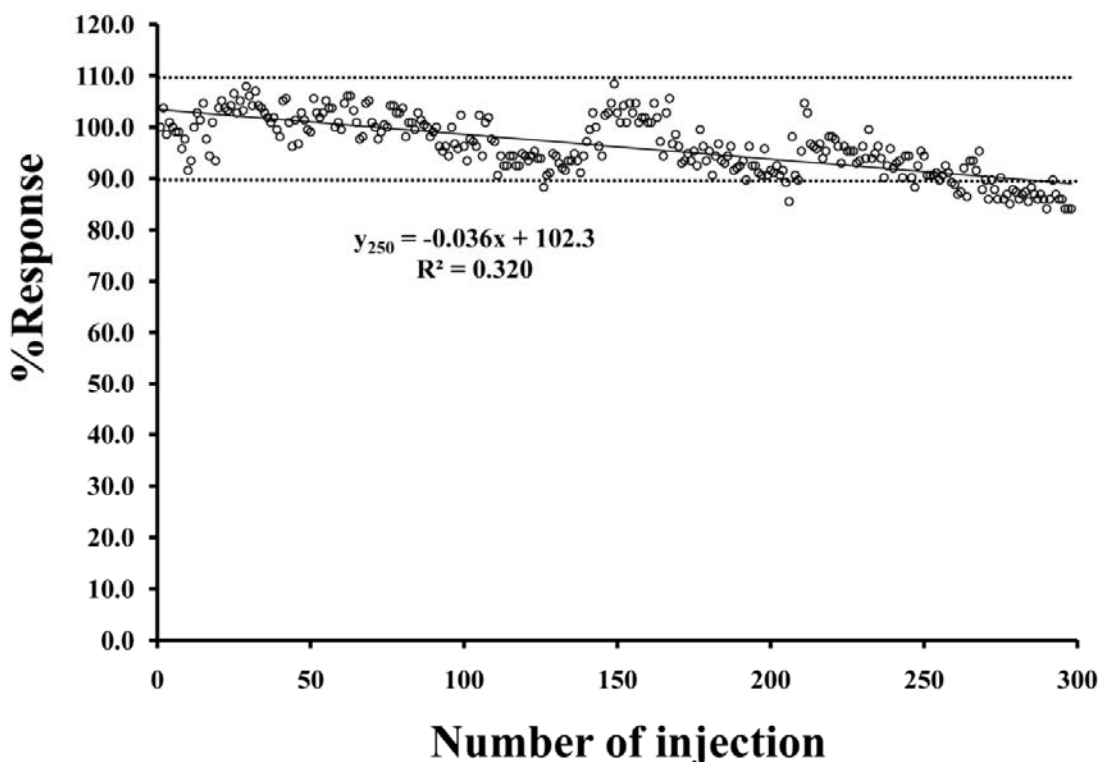
ทำการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3 โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.5–18.0 มิลลิโมลาร์ ได้สัญญาณการตอบสนองดังรูปที่ 3 เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณการตอบสนองที่ได้ พบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น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

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

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

5.4.1.3 ความเสถียรของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์

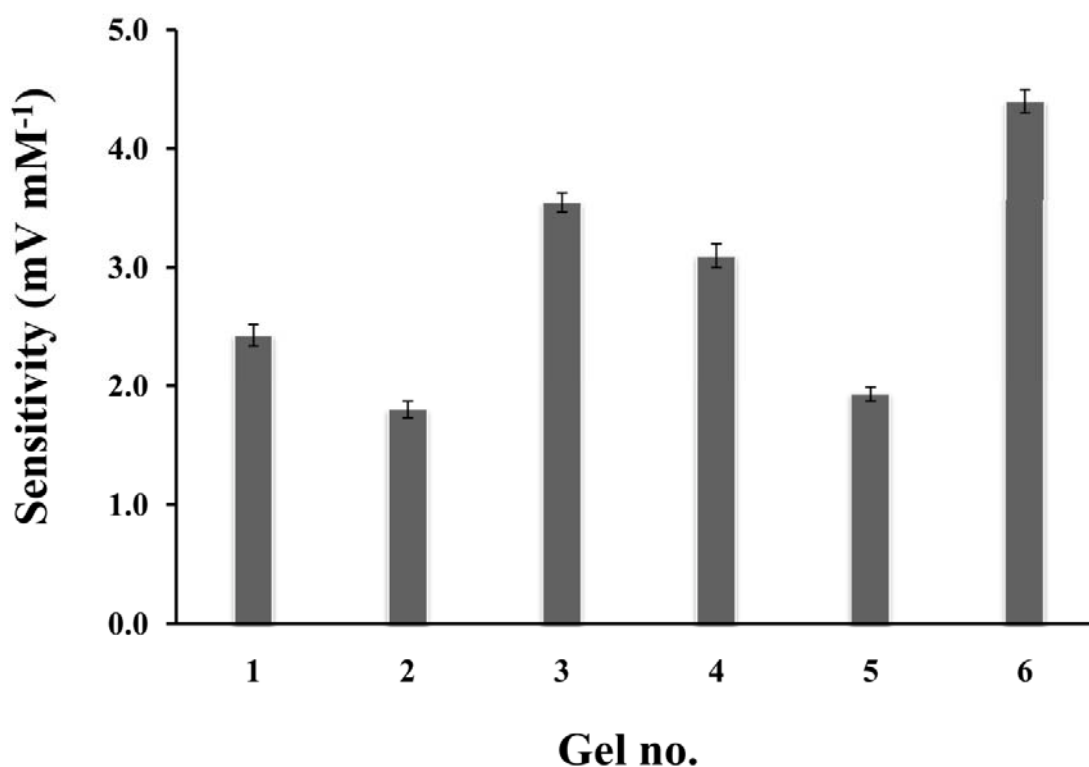
เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้ จึงศึกษาความเสถียรในการใช้งานของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่เคลือบอยู่ในท่อคาปิลลารี จากการศึกษาพบว่าแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์สามารถใช้งานซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ถึง 250 ครั้ง (รูปที่ 6) โดยที่ค่าเฉลี่ยของ %สัญญาณการตอบสนองอยู่ที่ $98 \pm 5\%$ และด้วยจำนวนซ้ำของการฉีดถึง 250 ครั้ง สัญญาณการตอบสนองที่ได้ยังอยู่ในช่วง $\pm 10\%$ (t_{L10}) (Taverniers et al., 2004) ของสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการฉีดครั้งแรก การลดลงของสัญญาณจากการฉีดแต่ละครั้งมีค่าเพียง 0.036% เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออคัลมันแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรในการใช้งานสูง และให้ค่าการทำซ้ำที่ดี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 5%)



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

5.4.1.3 ความสามารถในการทำซ้ำได้ของการเคลือบแอฟฟินีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลในท่อคาปิลลารี

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



รูปที่ 7 ความไววิเคราะห์ที่ได้จากการเคลือบแอฟฟิनिติส്മาร์ทพอลิเมอร์เจลในท่อคาปิลลารี 6 ท่อด้วยสารละลายมอนอเมอร์และสารละลายริเริ่มปฏิกิริยาที่เตรียมขึ้นครั้งเดียวกัน สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหล่ของเฟสเคลื่อนที่ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

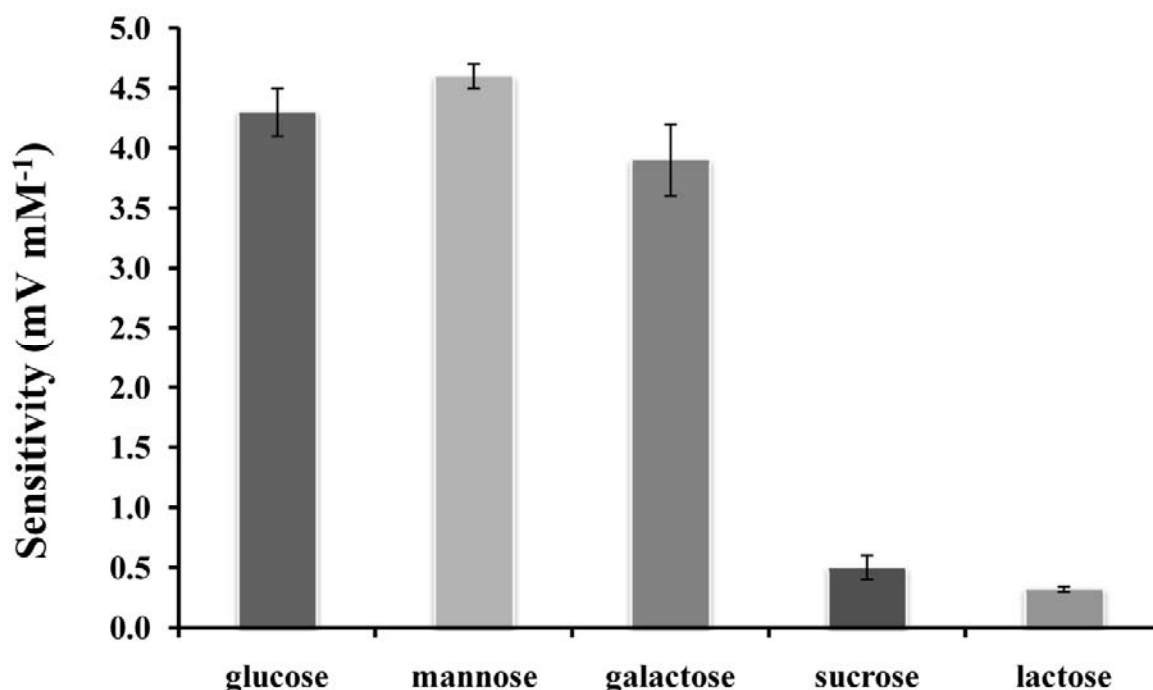
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความไววิเคราะห์ที่ได้จากแต่ละท่อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากการเคลือบเจลภายในท่ออาศัยการเกาะติดทางกายภาพของเจลบนพื้นผิวภายในของท่อคาปิลลารีเท่านั้น ซึ่งหลังจากเคลือบเสร็จเรียบร้อยแล้วจะนำท่อมาต่อเข้ากับระบบโฟลวอินเจกชัน แล้วให้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไหลผ่านเจลที่เคลือบไว้ในท่อ เพื่อล้างเอาสารละลายส่วนเกินออก ในขั้นตอนนี้จะมีเจลบางส่วนที่ไม่ได้ถูกยึดเกาะไว้ที่ผิวของท่อคาปิลลารีหลุดออกมาด้วย ทำให้ปริมาณเจลที่เหลืออยู่ในท่อแต่ละอันไม่เท่ากัน ส่งผลให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากแต่ละท่อมีค่าไม่เท่ากัน นั่นคือความสามารถในการทำซ้ำได้ของการเคลือบแอฟฟิनिติส്മาร์ทพอลิเมอร์เจลใน

ทอคาปิลลารีมีค่าไม่ติดนั่นเอง อย่างไรก็ตามเนื่องจากแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่เคลือบไว้ในแต่ละทอมีความเสถียรในงานใช้งานสูง แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องเปลี่ยน การทำกราฟมาตรฐานสามารถทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ข้อด้อยในเรื่องดังกล่าวจึงไม่เป็นอุปสรรคในการที่จะนำเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กลูโคส สำหรับงานวิจัยในอนาคตถ้ามีความต้องการเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำได้ของการเคลือบแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลในทอคาปิลลารี อาจจะสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเคลือบที่อาศัยการเกิดพันธะทางเคมีเข้ามาช่วยทั้งระหว่างเจลกับพื้นผิวคาปิลลารีผ่านกระบวนการ silanisation และทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ภายในพอลิเมอร์เจลเองโดยอาศัยสารเชื่อมไขว้ (cross-linking agent) (Kuzimenkova *et al.*, 2008)

5.4.1.3 ความจำเพาะเจาะจงต่อกลูโคสของแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจล

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

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าแอฟฟินิติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส โดยความไววิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์แมนโนสและกาแลคโตส มีค่าใกล้เคียงกับค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคส ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในขณะที่ค่าดังกล่าวสำหรับซูโครสและแลคโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ต่ำกว่าค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ศึกษาถึง 9 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลโมเลกุลคู่มีพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) เป็นพันธะพื้นฐานที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้มีหมู่ซิลไดออกไซด์เหลือสำหรับการเกิดพันธะกับกรดฟีนิลโบโรนิกน้อย (Lee *et al.*, 2004) นอกจากนี้ น้ำตาลโมเลกุลคู่อาจจะมีผลจากความเกะกะ (steric effect) จึงทำให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำกว่ากรณีของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยในอนาคต อาจมีเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของกรดฟีนิลโบโรนิกที่ใช้เป็นลิแกนด์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อตำแหน่งและการจัดวางตัวของหมู่ฟังก์ชันดังกล่าว อาจช่วยทำให้มีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคสมากขึ้น เช่น การใช้หมู่อะมิโน tertiary amine ในการสังเคราะห์ polyacrylamide hydrogel ที่มีหมู่ 3-กรดอะคริลามิโดฟีนิลโบโรนิกอยู่จะช่วยให้ความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์กลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Dean *et al.*, 2006)

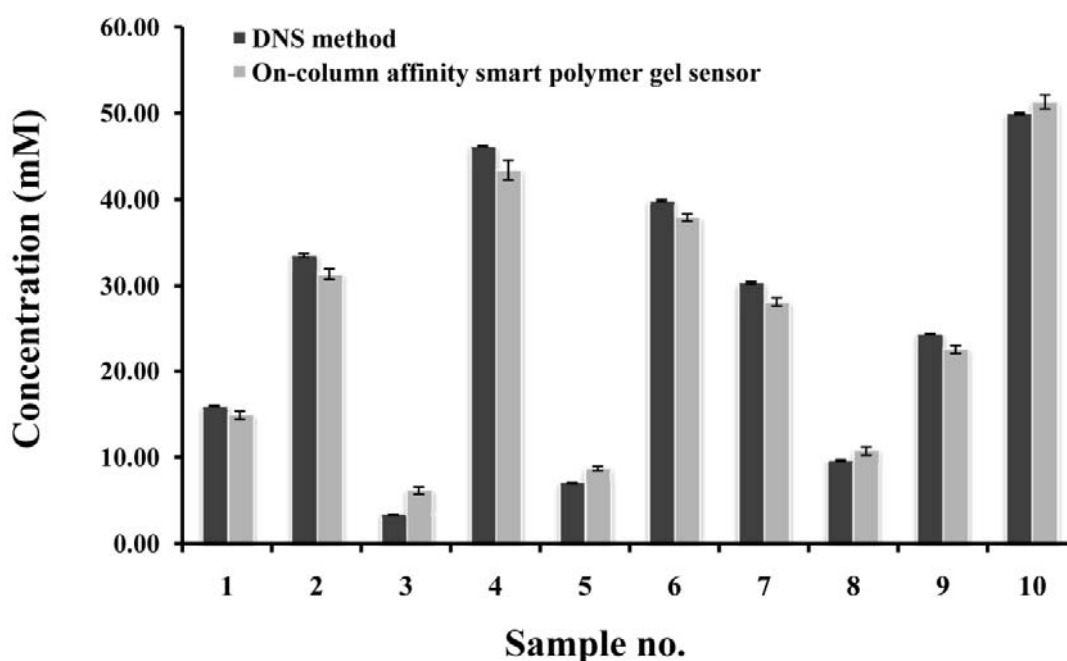


รูปที่ 8 ความไววิเคราะห์ของออนคอลลัมน์แอฟฟิनिติสเมาร์ทพอลิเมอร์เจลสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลหลายชนิด โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้: สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.50 เป็นสารละลายสลายพันธะ อัตราไหล่ของเฟสเคลื่อนที่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

5.4.1.4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธี dinitrosalicylic acid (DNS)

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

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



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

5.4.1.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

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

จากผลการศึกษาผลรอบกวนขององค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบค่าความชันที่ได้จาก matrix matched calibration curve กับกราฟมาตรฐานที่เตรียม สารละลายมาตรฐานกลูโคสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าความชันที่ได้

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

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

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

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

โดย A คือ ความเข้มข้นที่ได้จากตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

B คือ ความเข้มข้นที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เติมลงไปในตัวอย่าง

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมของออนคอลัมน์แอฟฟิไนต์สเมิร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ควบคู่กับระบบโพลินิเจนเจชัน

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

^a ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง

^b ความเข้มข้นของกลูโคสน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 2.8 มิลลิโมลาร์

5.2 ผลการศึกษาและพัฒนาแอฟฟิไนต์สเมิร์ทพอลิเมอร์เจลให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดกลูโคส

ผลการทดลองตามแผนดำเนินงานวิจัยเดิม

5.2.1 ความยาวของแอฟฟิไนต์สเมิร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์ที่เหมาะสม

จากการใช้ความยาวของท่อคาปิลลารีที่ 15 เซนติเมตร พบว่าสามารถสังเคราะห์แอฟฟิไนต์สเมิร์ทพอลิเมอร์ให้เกิดขึ้นตลอดทั้งความยาวของท่อได้ และเมื่อนำคอลัมน์ดังกล่าวมาต่อเข้ากับระบบของ μ -HPLC เฟสเคลื่อนที่สามารถไหลผ่านคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้ แต่พบปัญหาหลายอย่างคือ

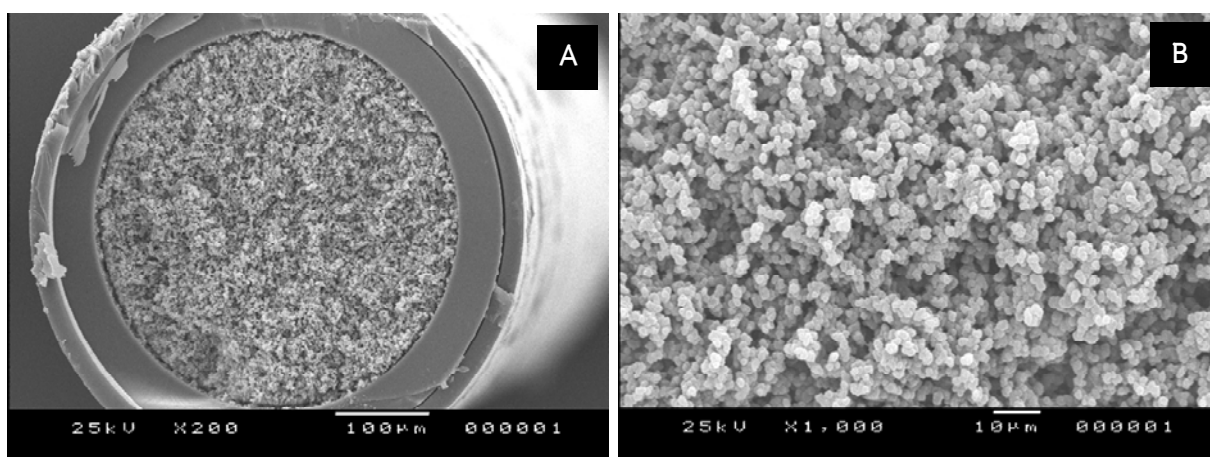
- เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสผ่านแอฟฟิไนต์สเมิร์ทพอลิเมอร์เจลคอลัมน์แล้ว มีเจลบางส่วนหลุดออกจากท่อคาปิลลารีในขณะที่สารละลายไหลผ่าน
- ในส่วนของระบบการตรวจวัดก็ใช้เจเลนิตเดียวกัน ซึ่งอัตราการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดฟีนิลโบโรนิกกับกลูโคสค่อนข้างช้า และจากการทดลองในส่วนแรกพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 6 นาที ยิ่งเมื่อสารละลายต้องมีการไหลผ่านคอลัมน์จะทำให้ใช้เวลาในการเคลื่อนที่นานขึ้น

สัญญาณการตอบสนองที่ได้มีลักษณะเป็นพีคกว้าง จึงมีความเป็นไปได้น้อยมากที่จะแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกัน ซึ่งเมื่อทำการทดสอบโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกลูโคสและซูโครสพบว่าไม่สามารถระบุได้ว่ามีน้ำตาลชนิดใดผสมกันอยู่ เพราะได้สัญญาณที่เป็นพีคกว้างเพียงพีคเดียว ดังนั้นในส่วนของการทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยเดิมจึงสามารถรายงานผลได้เพียงหัวข้อเดียว และมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนแผนการดำเนินงานวิจัยโดยมีผลการทดลองตามแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่ดังนี้

ผลการทดลองตามแผนดำเนินงานวิจัยใหม่

5.2.2 การสังเคราะห์มอนอลิธคอลัมน์

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



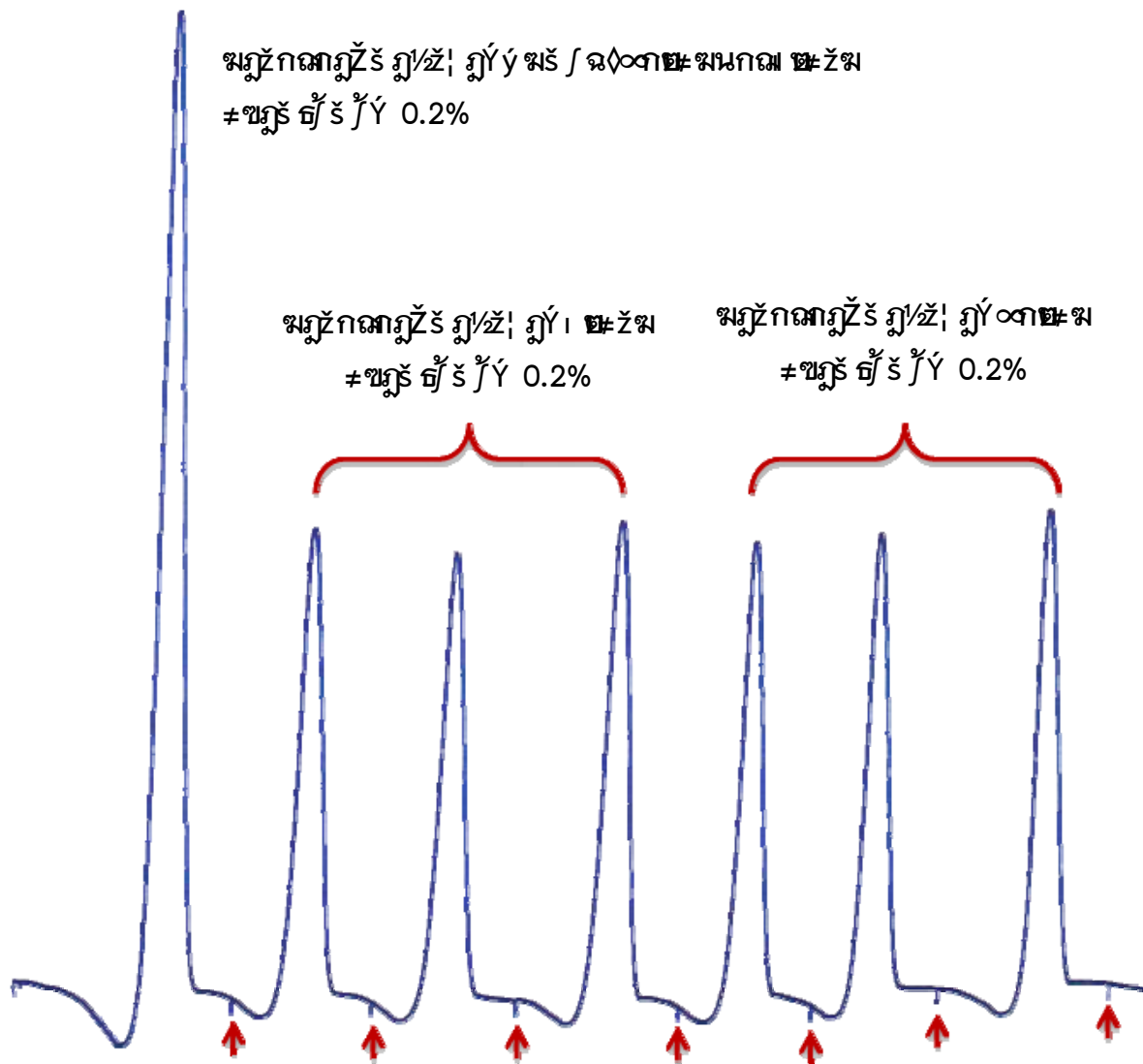
รูปที่ 10 ภาพหน้าตัดของท่อคาปิลลารีที่มีมอนอลิธพอลิเมอร์ภายในท่อจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า (A) และ 1000 เท่า (B)

5.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการแยกน้ำตาลของมอนอลิธคอลัมน์

นำมอนอลิธคอลัมน์ที่ได้ไปต่อเข้ากับเครื่อง HPLC ที่มีตัวตรวจวัดค่าดัชนีหักเห เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นก่อนที่จะนำคอลัมน์ไปต่อเข้ากับระบบตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี โดยใช้สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (อ้างอิงจากผลการทดลองในงานวิจัยส่วนแรก) และอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ในเบื้องต้นเป็น 0.03 มิลลิลิตรต่อนาที และเนื่องจากตัวตรวจวัดชนิดนี้มีความไวในการวิเคราะห์ที่ไม่สูงนัก จึงจำเป็นต้องทดสอบประสิทธิภาพในการแยกเบื้องต้นโดยใช้ สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง หลังจากฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.2% (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าสามารถตรวจวัดพีคหรือโครมาโทแกรมของกลูโคสได้ที่เวลาประมาณ 2.5 นาที (ฉีดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง) ความสูงของพีคและค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จากการทำซ้ำทั้ง 3 ครั้งมีค่าใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นทำการฉีดสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าทั้งความสูงของพีคและค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซูโครสมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคสมาก จากการทดสอบเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันได้ ต่อจากนั้นจึงลดอัตราการไหลเหลือ 0.01 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการทดลองฉีดสารละลายมาตรฐานของกลูโคสและซูโครสทีละตัว ก็พบว่าค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้ยังมีค่าใกล้เคียงกันมาก ซึ่งถ้าวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมก็จะไม่สามารถแยกน้ำตาลทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ดังนั้นจึงทำการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่าง ๆ ที่ละปัจจัยดังนี้

- ปรับเปลี่ยนสภาพหัวของเฟสเคลื่อนที่ โดยมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ คือ อะซิโตไนไตรล์เพิ่มลงไปในเฟสเคลื่อนที่เดิม เพื่อลดสภาพหัวของเฟสเคลื่อนที่ โดยศึกษาที่ 70:30 60:40 และ 50:50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

- เพิ่มความยาวของคอลัมน์จาก 20 เซนติเมตรเป็น 30 เซนติเมตร เพื่อเพิ่มปริมาณหมู่กรดฟีนอลโบโรนิกและเพิ่มเวลาในการหน่วงสารให้อยู่ในคอลัมน์นานขึ้น



รูปที่ 11 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้มอนอลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นคอลัมน์ในการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดค่าดัชนีหักเห ภายใต้สภาวะการทดลองดังนี้: ความยาวคอลัมน์ 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 50:50 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรของอะซิโตนไตรล์: สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.75 ที่อัตราไหล 0.01 มิลลิลิตรต่อนาที ลูกศรชี้ขึ้นหมายถึง ตำแหน่งของการฉีดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและซูโครส

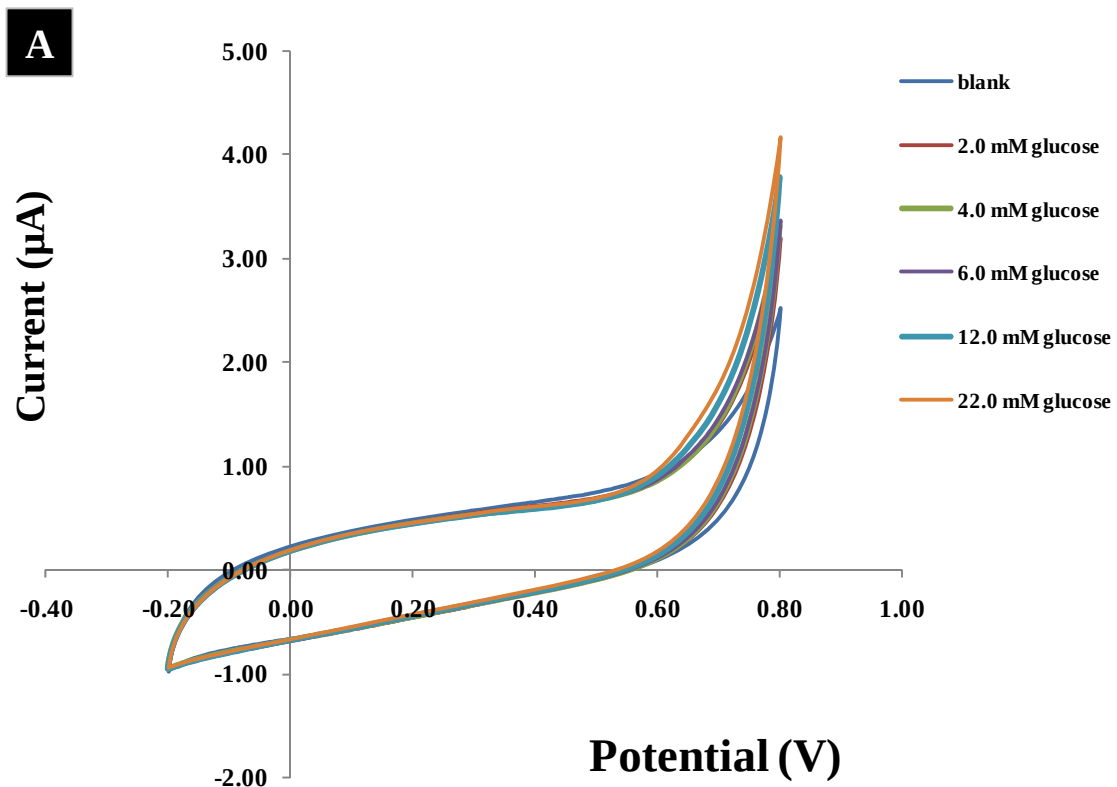
จากการปรับเปลี่ยนปัจจัยที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ก็ยังไม่สามารถแยกน้ำตาลที่เลือก มาทดสอบเพียงสองชนิดนี้ออกจากกันได้ โดยที่ค่ารีเทนชันไทม์ของกลูโคสและซูโครสยังมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อทดลองฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของน้ำตาล 2 ชนิด สิ่งที่เปลี่ยนแปลงไปมีเพียงความสูงของ

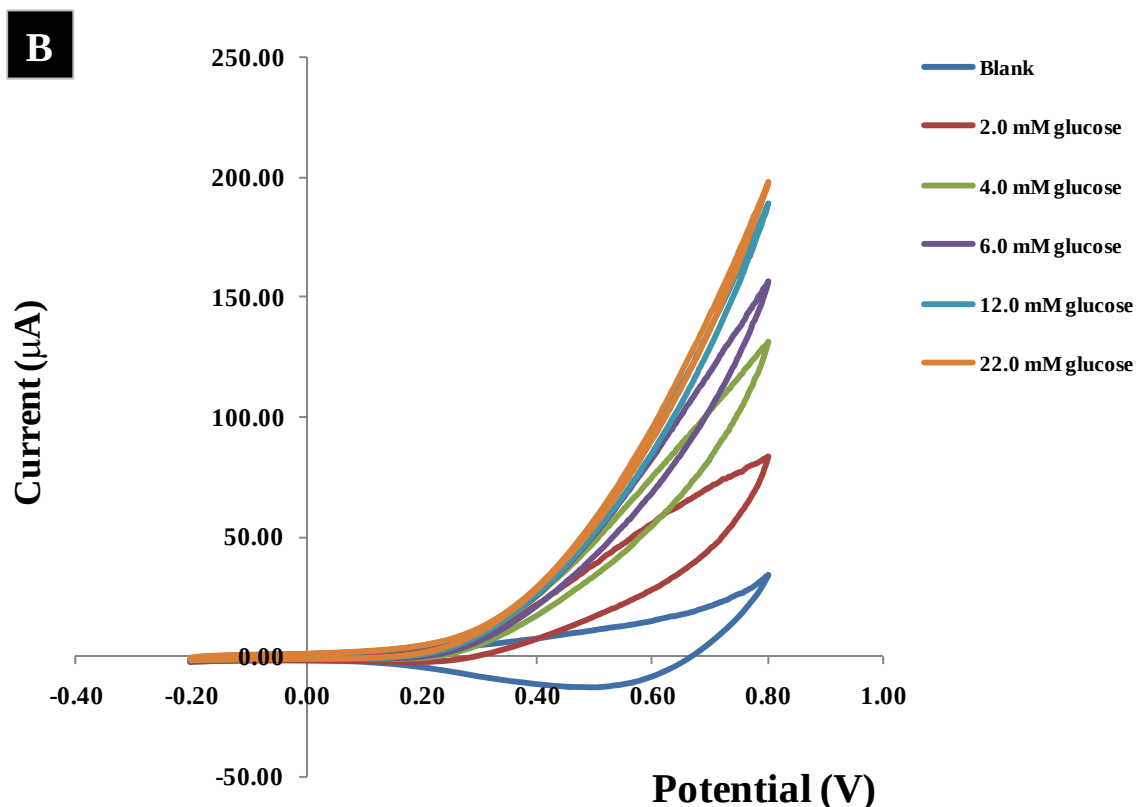
พีคที่เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า โดยที่โครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมมีเพียงพีคเดียว ดังแสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นจึงสรุปว่ามอนอลิโทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่สามารถนำมาใช้ในการแยกน้ำตาลเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์กลูโคสได้

5.2.4 การตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี

5.2.4.1 ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

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





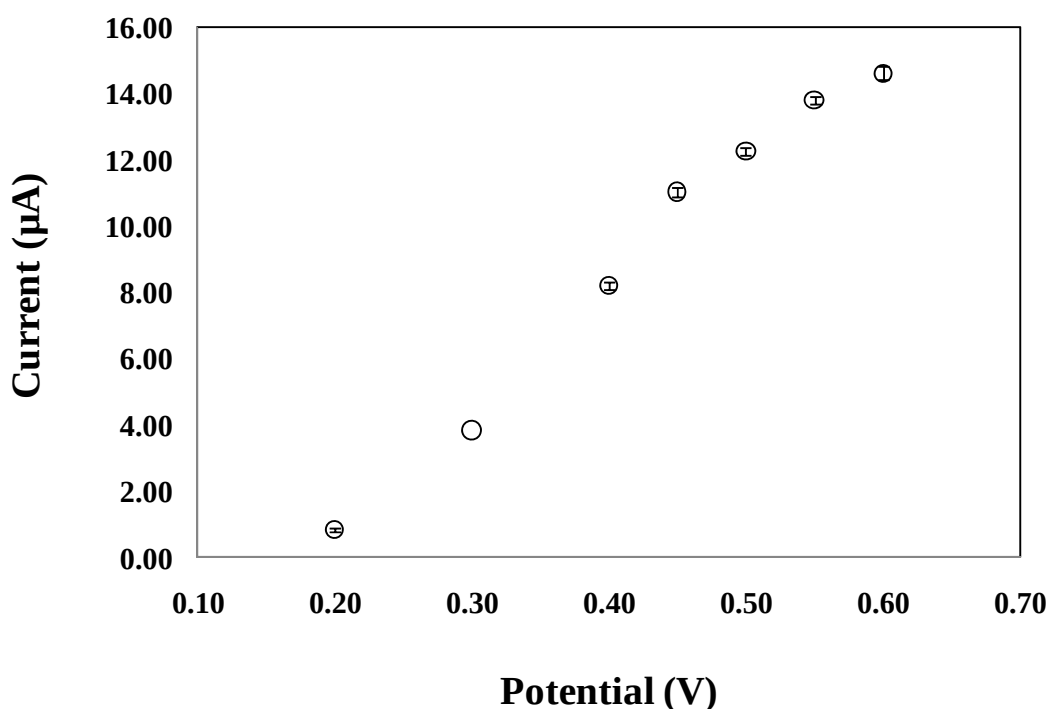
รูปที่ 12 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการสแกนศักย์ไฟฟ้าช่วง -0.2 โวลต์ถึง 0.8 โวลต์ โดยมีกลูโคสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการปรับปรุงผิวหน้า (รูปที่ 12A) และกลูโคสคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง (รูปที่ 12B) เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์

จากไชคคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้ พบว่าในกรณีที่ใช้กลูโคสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการปรับปรุงผิวหน้า กลูโคสจะเริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.6 โวลต์ (รูปที่ 12A) ในขณะที่ถ้าใช้กลูโคสคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง ศักย์ไฟฟ้าที่เริ่มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสจะลดลง โดยจะเริ่มเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 0.25 โวลต์ (รูปที่ 12B) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองแดงช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ทำให้กลูโคสสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำลง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากอิเล็กโทรดทั้งสองแบบจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคส (2.0 – 22.0 มิลลิโมลาร์) แต่กลูโคสคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงจะให้ค่า

กระแสไฟฟ้าที่สูงกว่า ดังนั้นการศึกษาในลำดับต่อไปจะใช้เพียงแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเท่านั้น

5.2.4.2 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

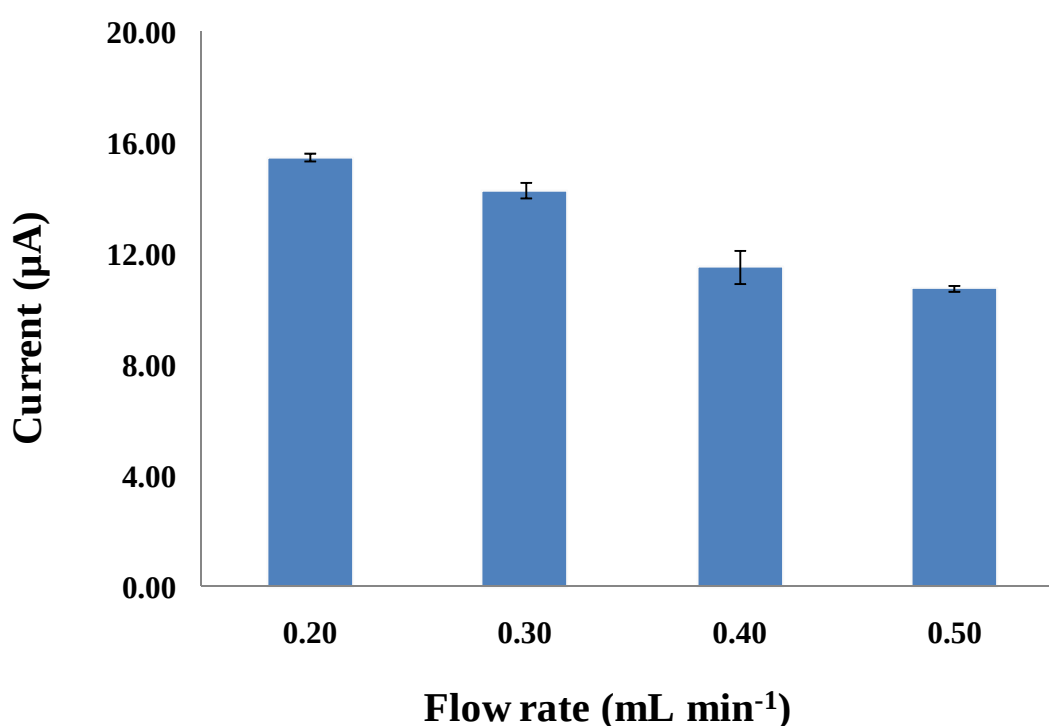
จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากข้อ 5.2.4.1 จึงเลือกศักย์ไฟฟ้าช่วง 0.2–0.6 โวลต์ในการศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบโพลีอินเจคชันด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าเมื่อศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ค่าสัญญาณการตอบสนอง (ความสูงของพีค) เพิ่มขึ้น แต่ถ้าใช้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปก็ทำให้ตัวรบกวนอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ชั่วไฟฟ้าได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลการรบกวนและยังคงค่าสัญญาณการตอบสนองที่สูง จึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ 0.45 โวลต์ ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 13 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดง โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที

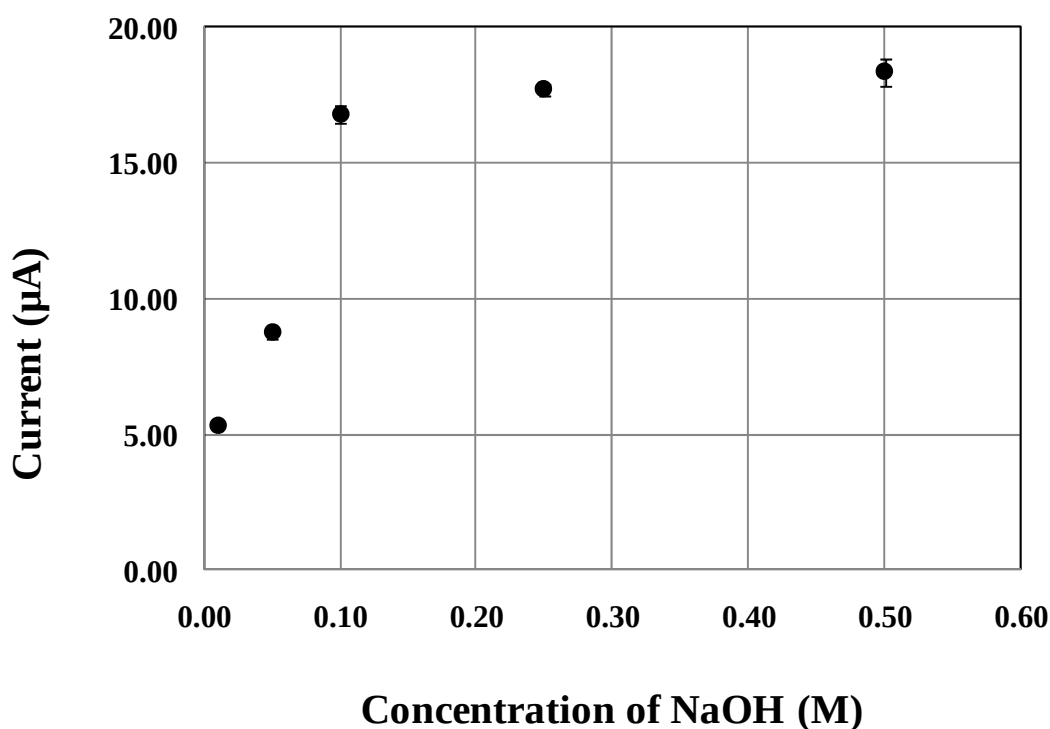
5.2.4.3 อัตราไหลและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

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



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

จากนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อัตราไหลดังกล่าวพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น สัญญาณการตอบสนองก็สูงขึ้นตามไปด้วย และจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ (รูปที่ 15) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาต่อไป

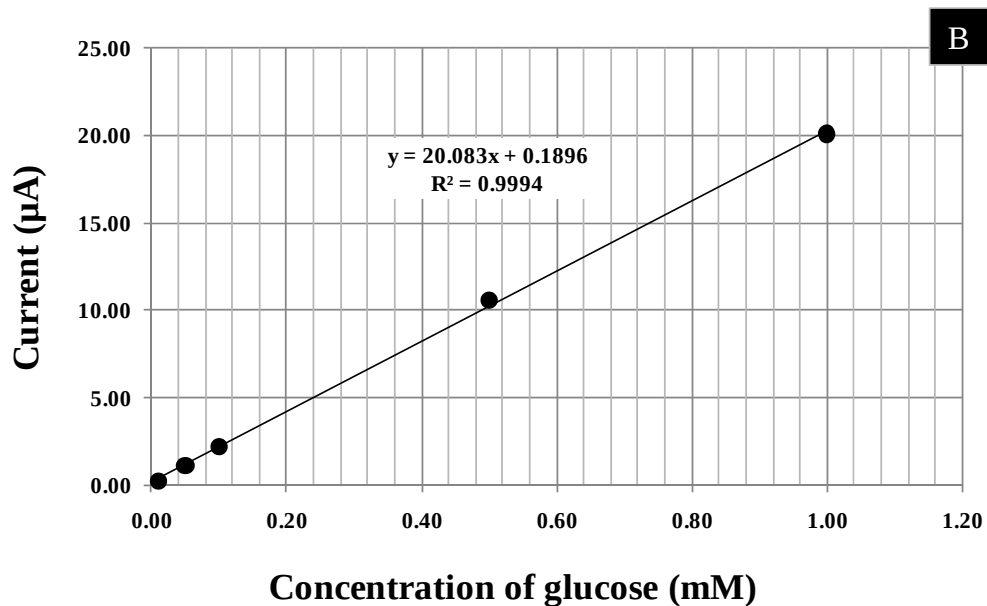
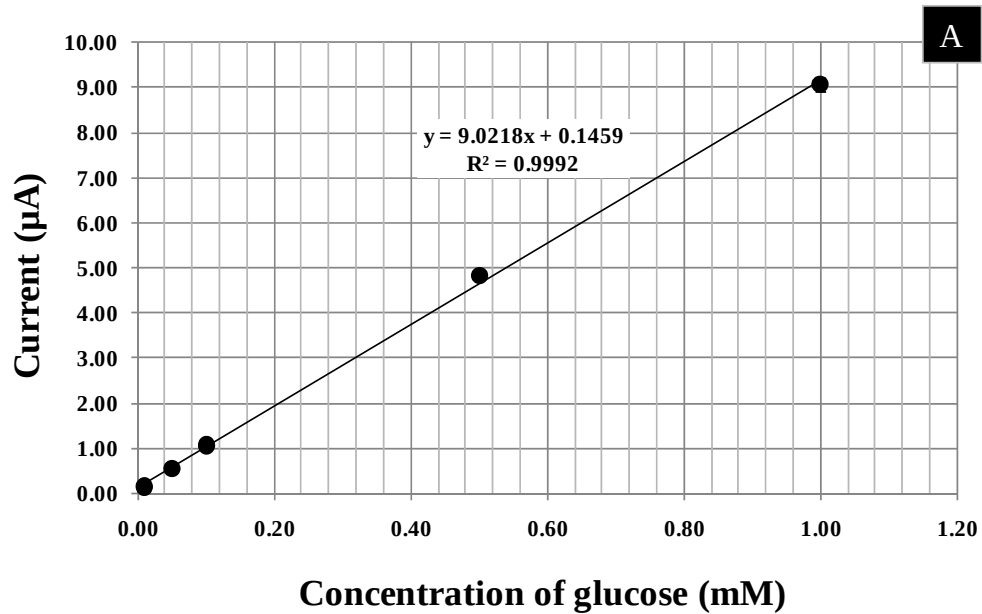


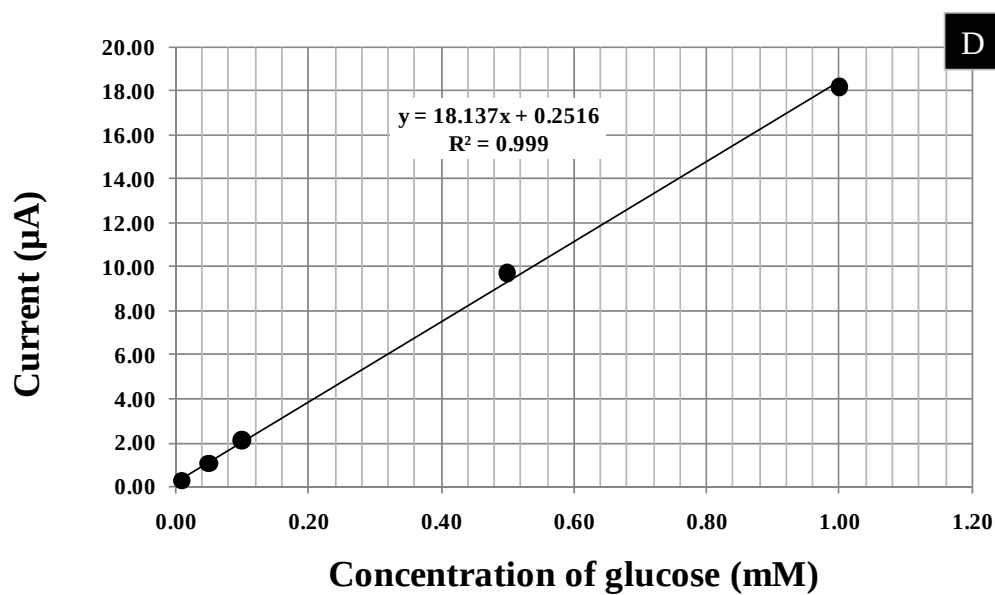
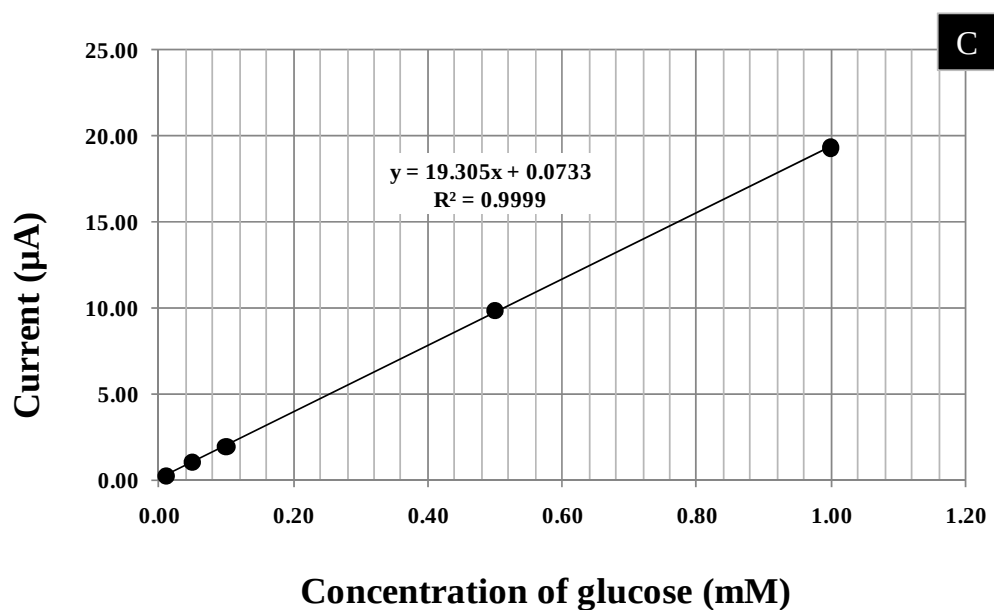
รูปที่ 15 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในระบบโพลินิเจคชันแอมเพโรเมทรี โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น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

5.2.4.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอนุภาคทองแดง

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

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



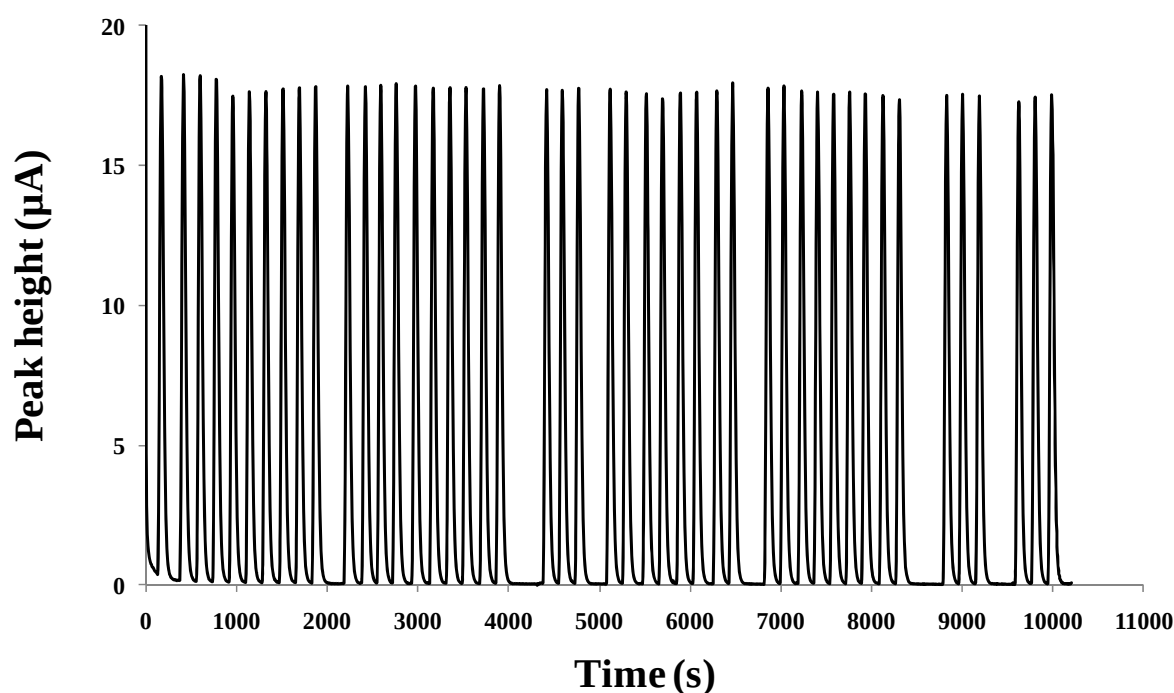


รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์กลูโคสด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงที่มีความเข้มข้น 1% (A) 2.5% (B) 5.0% (C) และ 10% (D) โดยมีสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

5.2.4.5 ความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้าที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วย

อนุภาคทองแดง

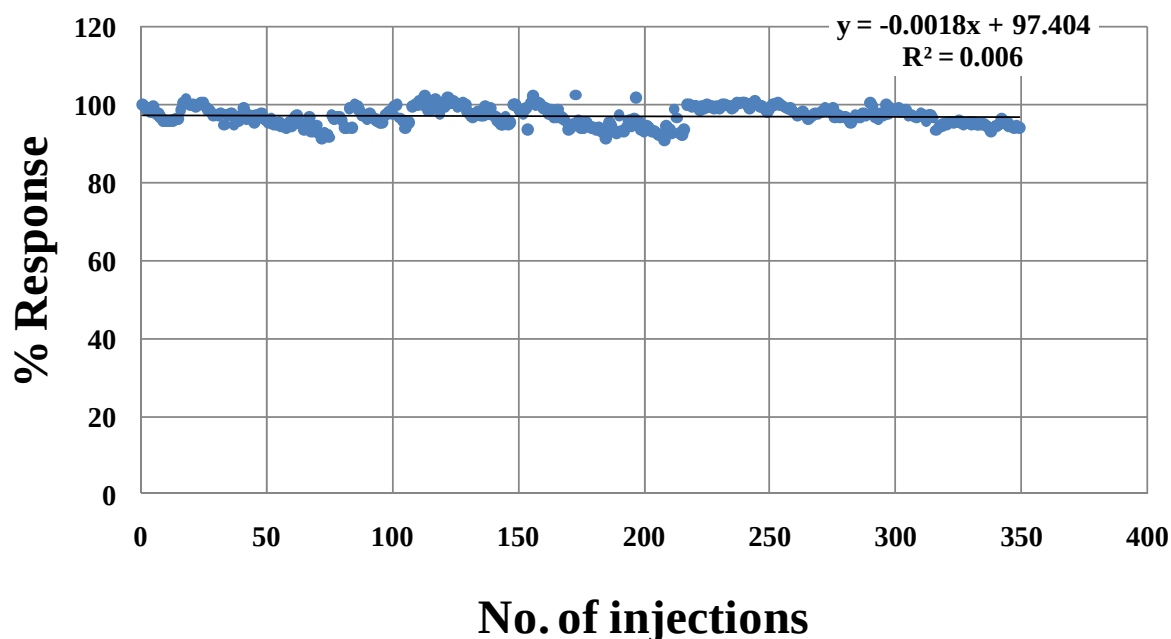
จากการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสอย่างต่อเนื่อง โดยฉีดสลับกัน ระหว่างสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ตัวอย่างของค่า สัญญาณการตอบสนองที่ได้ แสดงในรูปที่ 17



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

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

สัมพัทธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าเพียง 2.5% โดยมีค่าเฉลี่ยของ %สัญญาณการตอบสนองอยู่ที่ $98 \pm 2\%$ แสดงให้เห็นว่าแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงมีความเสถียรในการทำงานในสภาวะที่ศึกษาสูงมาก โดยสามารถใช้การวิเคราะห์กัลวานอสแตติกได้อย่างน้อย 350 ครั้ง และค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลงเพียง 0.0018% ต่อการฉีดแต่ละครั้ง

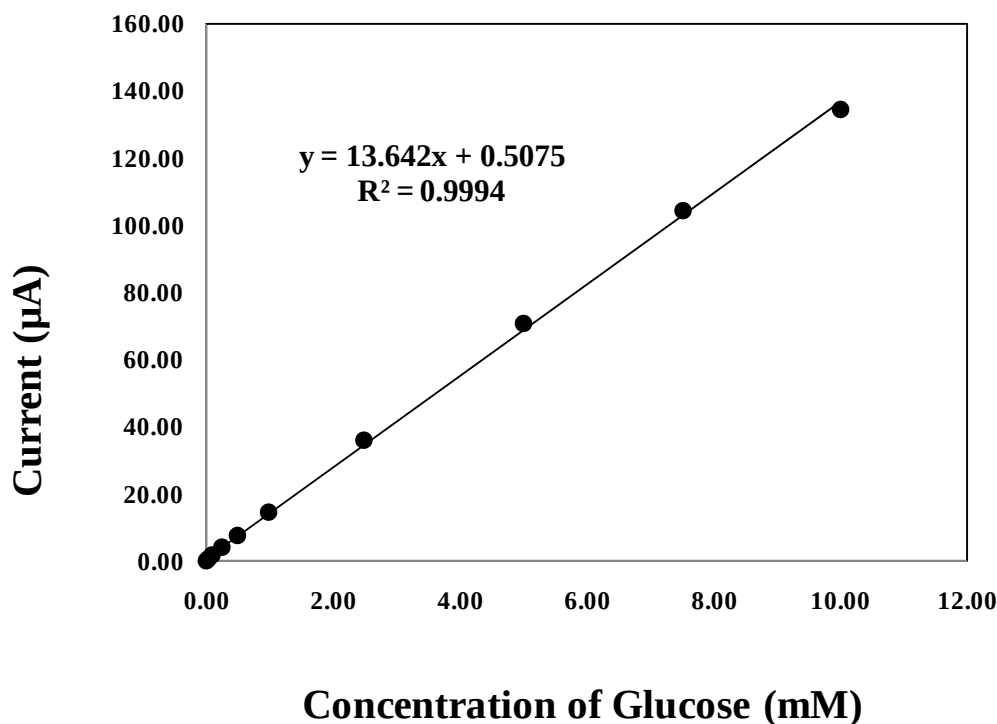


รูปที่ 18 ความเสถียรในการทำงานของแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงในการวิเคราะห์กัลวานอสแตติกความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์อย่างต่อเนื่องในระบบโพลีเอทิลีนออกไซด์/เอมเพอร์เมทรี โดยมีสภาวะในการทดลองดังนี้: แกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ท่อสแตนเลสสตีลเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย สารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์

5.2.4.6 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมของการทดลองในระบบโพลีเอทิลีนออกไซด์/เอมเพอร์เมทรีแล้ว จึงใช้สภาวะดังกล่าวในการศึกษาช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0010 – 30.00 มิลลิโมลาร์ โดยทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากผลการทดลองพบว่าระบบโพลีเอทิลีนออกไซด์/เอมเพอร์เมทรีที่มีแกลสซีคาร์บอนที่มีการปรับปรุงผิวหน้าด้วยอนุภาคทองแดงเป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ให้ช่วงการตอบสนองที่เป็น

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



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

5.2.4.7 มอนอลิทคอลัมน์ควบคู่กับระบบโพลีอินเจคชันแอมเพโรเมทรี

ในส่วนนี้จะไม่มีการทดลอง เนื่องจากผลการทดสอบมอนอลิทคอลัมน์ที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่สามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดออกจากกันได้ จึงไม่ได้ทำการทดลองในส่วนที่นำมอนอลิทคอลัมน์มาต่อควบคู่กับระบบโพลีอินเจคชันแอมเพโรเมทรี

6. สรุปผลการทดลอง ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษารูปได้ว่าเทคนิคออสโมซิสแอพฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจวัดกลูโคสอย่างง่าย สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์กลูโคสในตัวอย่างได้ โดยมีความเสถียรในการใช้งานดี สามารถวิเคราะห์กลูโคสอย่างต่อเนื่องได้ถึง 250 ครั้ง โดยที่เปอร์เซ็นต์การลดลงของการฉีดแต่ละครั้งมีค่าเพียง 0.036% ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ไม่นานนัก (6 นาที) ให้ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0.5–16.0 มิลลิโมลาร์ ชัดจำกัดการตรวจวัดที่ได้จากเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (0.5 มิลลิโมลาร์) มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น ปัสสาวะ ชีวรั่ว หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ได้ต่ำกว่าขีดจำกัดการตรวจวัดของเทคนิค strip test (2.8 มิลลิโมลาร์) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในปัสสาวะที่ใช้กันทั่วไปในโรงพยาบาลถึง 5.6 เท่า ถึงแม้ว่าความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคออสโมซิสแอพฟิไนติสมาร์ทพอลิเมอร์เจลในการวิเคราะห์กลูโคสยังไม่ดีนัก แต่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในตัวอย่างที่ทราบแน่นอนว่ามีกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลักได้

สำหรับการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์กลูโคสให้มีความจำเพาะเจาะจงนั้น เนื่องจากไม่สามารถทำตามแผนดำเนินงานวิจัยได้ ทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนแผนการดำเนินงานวิจัยใหม่ แต่ยังคงพบปัญหาที่ทำให้ผลการวิจัยไม่เป็นไปตามที่วางแผนไว้ นั่นคือมอนอลิธคอลัมน์ที่สังเคราะห์ได้ไม่สามารถแยกน้ำตาลกลูโคสออกจากน้ำตาลซโครสได้ ทำให้ไม่สามารถใช้คอลัมน์ในการแยกเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดกลูโคสได้ อย่างไรก็ตามในส่วนของการพัฒนาระบบตรวจวัด โดยการปรับปรุงผิวหน้าแกลสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยอนุภาคทองแดง จะเห็นได้ว่าเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย มีความเสถียรในการใช้งานสูงมาก สามารถวิเคราะห์กลูโคสซ้ำได้ 350 ครั้งเป็นอย่างน้อย โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เพียง 2.5% และค่าสัญญาณการตอบสนองที่ได้ลดลงเพียง 0.0018% ต่อการฉีดแต่ละครั้ง นอกจากนี้ยังให้ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงกว้าง คือ 0.0010–10.00 มิลลิโมลาร์ และให้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำถึง 0.0050 มิลลิโมลาร์ หรือ 5.0 ไมโครโมลาร์ โดยระบบตรวจวัดกลูโคสที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์กลูโคสในตัวอย่างจริง

6.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

พัฒนาแอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดกลูโคสมากขึ้น โดยอาจเปลี่ยนโครงสร้างของกรดพีนิกโบริกที่นำมาใช้เป็นมอนอเมอร์ในการสังเคราะห์แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลเซนเซอร์ นอกจากนี้ยังอาจจะสามารถพัฒนาให้แอฟฟินิตีสมาร์ทพอลิเมอร์เจลกลูโคสเซนเซอร์ให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากต่อหน่วยเวลา (high throughput) จะทำให้เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ในการวิเคราะห์กลูโคสในตัวอย่างได้หลากหลายขึ้น ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน และมีความเสถียรในการใช้งานสูง

7. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Thammakhet, C.^{*}, Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Development of an On-column Affinity Smart Polymer Gel Glucose Sensor. *Analytica Chimica Acta*, (2011)
Accepted manuscript.

7.2 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

7.2.1 นำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย

Thammakhet, C., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., “On-column Affinity Smart Polymer Gel for Glucose Sensor” การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 9 วันที่ 15–17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ

7.2.2 นำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์

Thammakhet, C., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., “On-column Affinity Smart Polymer Gel Glucose Sensor” การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 วันที่ 14–16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ

Thammakhet, C., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., “On-column Affinity Smart Polymer Gel Glucose Sensor” The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), December 15–20, 2010. Honolulu, Hawaii, USA.

8. เอกสารอ้างอิง

- Alexeev, V. L., Sharma, A. C., Goponenko, A. V., Das, S., Lednev, I. K., Wilcox, C. S., Finegold, D. N. and Asher, S. A., *Analytical Chemistry*. 75 (2003) 2316–2323.
- Annaka, M. and Tanaka, T., *Nature* 355 (1992) 430–432.
- AOAC International, Method Validation Programs (OMA/PVM Department), including Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis, 2000. <http://www.aoac.org/vmeth/devmethno.htm>.
- Blake, D. A. and McLean, N. V. 1989. A Colorimetric Assay for the Measurement of D-Glucose Consumption by Cultured Cells.
- Choodum, A. Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Smith, N.W., *Chromatographia*. 69 (2009)^a 481–488.
- Choodum, A. Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Smith, N.W., *Analytical Sciences* 25 (2009)^b 517–522.
- Dean, K.E.S., Horgan, A.M., Marshall, A.J., Kaliban, S., Pritchard, J., *Chemical Communications*. (2006) 3507–3509.
- Gabai, R., Sallacan, N., Chegel, V., Bourenko, T., Katz, E. and Willner, I., *Journal of Physical Chemistry Part B* 105 (2001) 8196–8202.
- Guide EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998. <http://www.eurachem.org>.
- Hoare, T., Pelton, R., *Macromolecules*. 40 (2007) 670–678.
- Ivanov, A. E., Galaev, I. Y. and Mattiasson, B., *Macromolecular Bioscience*. 5 (2005) 795–800.
- Ivanov, A.E., Thammakhet, C., Kuzimenkova, M.V., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Mikhlovskaya, L.I., Mikhlovsky, S.V., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., *Journal of Molecular Recognition*. 21 (2008) 89–95.
- Kataoka, K., Miyazaki, H., Bunya, M., Okano, T. and Sakurai, Y., *Journal of American Chemical Society*. 120 (1998) 12694–12695.
- Kuzimenkova, M.V., Ivanov, A.E., Thammakhet, C., Mikhlovskaya, L.I., Galaev, I.Y., Thavarungkul, P., Kanatharana, P. Mattiasson, B. *Polymer*. 49 (2008) 1444–1454.

- Lee, M.C., Kabilan, S., Hussain, A., Yang, X., Blyth, J., Lowe, C.R., *Analytical Chemistry*. 76 (2004) 748–5755.
- Lorand, J.P., Edwards, J.O., *Journal of Organic Chemistry*. 24 (1959) 769–774.
- Matsumoto, A., Kurata, T., Shiino, D. and Kataoka, K., *Macromolecules*. 37 (2004)^a 1502–1510.
- Matsumoto, A., Yoshida, R. and Kataoka, K., *Biomacromolecules*. 5 (2004)^b 1038–1045.
- Miller, G.L., *Analytical Chemistry*. 31 (1959) 426–428.
- Park, S., Boo, H., Chung, T. D., *Analytica Chimica Acta*. 556 (2006) 46–57.
- Position Statement–Urine Glucose Monitoring, International Diabetes Federation.
retrieved on July 4, 2010. http://www.idf.org/Position_statementsurine_monitoring.
- R Development Core Team, R: A language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006.
- Ren, L., Liu, Z., Dong, M., Ye, M., Zou, H., *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 4768–4774.
- Springsteen, G. and Wang, B. A., *Tetrahedron* 58 (2002) 5291–5300.
- Suzuki, A. and Tanaka, T., *Nature* 346 (1990) 345–347.
- Taverniers, I., Loose, M.D., Bockstaele, E.V. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*. 23 (2004) 535–552.
- Urine test AUTIONTM Sticks. Retrieved on September 10, 2010. <http://www.arkray.co.jp/english/products/urinalysis.html>.
- Wang, W., Gao, X., Wang, B., *Current Organic Chemistry*. 6 (2002) 1285–1317.
- WHO. (2011). "Diabetes" Retrieved Feb 8, 2011, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>
- Wu, B., Zhang, G., Shuang, S., Choi, M. M. F., *Talanta*. 64 (2004) 546–553.
- .

ภาคผนวก

View Letter

[Close](#)

Date: Apr 04, 2011
To: "Chongdee Thammakhet" tchongdee@gmail.com
From: "Analytica Chimica Acta, Editorial" aca@elsevier.com
Subject: ACA-11-137R1: Final Decision

Ms. No.: ACA-11-137R1

Dear Dr. Thammakhet,

On behalf of the editor handling your manuscript, I am pleased to inform you about the acceptance of the manuscript entitled:

"Development of an On-column Affinity Smart Polymer Gel Glucose Sensor"
by Panote Thavarungkul, D.Phil; Proespichaya Kanatharana, Ph.D.

The publisher will send a transfer of copyright form and galley proofs to you in due course. For questions with regard to proofs, publication date or reprints of your article, please contact our Author Support Department (fax: +353 61-709100; e-mail: authorsupport@elsevier.com).

Yours sincerely,

Tanya Devanny
Journal Manager
Analytica Chimica Acta
E-mail: aca@elsevier.com

[Close](#)

Development of an On-column Affinity Smart Polymer Gel Glucose Sensor

Chongdee Thammakhet^{a,b,c,*}, Panote Thavarungkul^{a,b,d}, Proespichaya Kanatharana^{a,b,c}

^a*Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand*

^b*Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand*

^c*Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand*

^d*Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand*

* Corresponding author: Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand. Tel.: +66 7428 8429; Fax: +66 7455 8841

E-mail address: chongdee.t@psu.ac.th (C. Thammakhet)

Abstract

An on-column affinity smart polymer gel glucose sensor was developed as a non-enzymatic glucose sensor. A copolymer of 3-acrylamidophenylboronic acid and acrylamide, the so called “smart polymer”, was synthesized *in situ* in a 5 cm long capillary tube with a detection window to provide the on-column detection. The optical density of this semitransparent affinity smart polymer gel, coated inside the tube, decreased with increasing glucose concentration and was detected using a UV-Vis detector at 500 nm. The capillary tube was incorporated into a flow injection system. Under optimum conditions, a linear dynamic range of 0.5-16.0 mM with a limit of detection of 0.5 mM ($S/N \geq 3$) was obtained. A single coated affinity smart polymer gel had good stability for up to 250 consecutive injections with relative standard deviation of less than 5%. The analysis time for each injection was 6 minutes. Ten glucose samples prepared in distilled water were analyzed by the developed method and the results compared well with those obtained from the conventional dinitrosalicylic acid (DNS) method ($P > 0.05$). Real urine samples with known glucose levels were analyzed and the developed sensor provided comparable results to those

from the normal strip test technique. Acceptable percentage recoveries, ranging from $88\pm 2\%$ to $103\pm 4\%$ from the spiked urine sample, were obtained.

Keywords: non-enzymatic glucose sensor, on-column detection, phenylboronic acid, affinity smart polymer gel

1. Introduction

The determination of glucose is very important in various processes, for example, the monitoring of glucose level in either blood or urine for the treatment of diabetes or the monitoring of cell growth in biotechnology and food industries where glucose is the primary carbon source in most fermentation processes [1, 2]. The most commonly used method is by an enzyme based sensor [3] because of its high selectivity to glucose. However, one of the major problems is the low stability of the test enzymes. Their activities can be easily affected by temperature, pH, humidity and toxic chemicals [1, 4-6]. Moreover, immobilization of an enzyme on the electrode surface is needed and this may also decrease enzyme activity [6]. In addition, the amount of dissolved oxygen in the sample can affect the accuracy of the results and needs to be controlled [1, 4, 7]. For these reasons, a non-enzymatic glucose sensor has been considered to overcome the previously mentioned drawbacks [6, 8]. One interesting approach is the use of a smart polymeric material containing a glucose selective ligand, such as phenylboronic acid [9, 10] because the smart polymer can reversibly change its physico-chemical property according to the change in glucose concentration [11-14].

A number of phenylboronic acid based smart polymeric glucose sensors have been studied in the past few years. Kabilan and co-workers constructed a holographic sensor that showed a wavelength shift after binding with glucose [11]. This sensor worked well at pH 9.0. In the same year, the same group improved their holographic sensor to be able to operate

52 at under pH 7.4 by changing the monomer from 4-vinylphenylboronic acid to 3-
53 aminophenylboronic acid [12]. This supported a former finding that incorporation of an
54 amino group into a phenylboronate polymer protected the borate-diol complex from
55 hydrolysis under physiological conditions of pH [2, 15]. In our earlier work, we also
56 presented an optical polymeric gel glucose sensor by detecting the optical density change (at
57 500 nm) of the copolymer of 3-acrylamido phenylboronic acid and acrylamide coated on a
58 glass slide in the presence of glucose. However, the response time of the sensor, 40-60
59 minutes, was too slow for practical use [13, 14].

60 In this article, we have proposed a capillary microfluidic flow injection system to
61 overcome such a limitation. The concept is based on the advantages of the microliter flow
62 detection system employed in both micro-high performance liquid chromatography (μ -
63 HPLC) and capillary electrochromatography (CEC) because such a system uses a small
64 column, a minimal amount of mobile phase, a small sample volume and on-column detection.
65 This was applied in combination with the convenient detection of the change in optical
66 density of the affinity smart polymer gel in the presence of glucose. This was done by
67 incorporating a small capillary, with an inside coating of the smart polymeric gel network,
68 into a flow injection system. Glucose was then passed through the polymeric network of the
69 smart polymer gel coated inside the capillary instead of only on the polymer surface as in the
70 earlier work [13, 14]. It was expected that the analysis time would be improved and the shape
71 of the signal would be easier to handle. To obtain the highest sensitivity of the sensor, the
72 affecting parameters were first optimized and the analytical performances of the sensor were
73 then evaluated. The developed sensor was then applied for the analysis of glucose in real
74 samples, *i.e.*, glucose in urine samples.

75

76

2. Experimental

2.1 Materials

3-Aminophenylboronic acid monohydrate (98% purity), *D*-galactose, *D*-mannose, sucrose and lactose were from Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acrylamide ($\geq 99\%$ purity), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) (99% purity), ammonium persulphate ($\geq 98\%$ purity) were the products of Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acryloyl chloride ($\geq 96\%$ purity) and *D*-(+)-glucose anhydrous were obtained from Fluka (Stienheim, France). Sodium hydroxide and hydrochloric acid were from LAB-SCAN Analytical Science, (Labscan Asia Co., Ltd., Bangkok, Thailand). Sodium dihydrogen orthophosphate and disodium hydrogen orthophosphate were products of APS Finechem (NSW, Australia). *N*-acryloyl-*m*-aminophenylboronic acid (NAAPBA) was prepared as described elsewhere [16]. Fused silica capillary tubings with various internal diameters (I.D.) were from Polymicro Technology (Arizona, USA)

2.2 Instrumentation

The flow injection system (Fig. 1a) consisted of a pump (400 Solvent Delivery System, Applied Biosystem, USA) to drive the carrier buffer, an injection valve (6 port valve, Valco Instruments Co. Inc., USA) where the sample and regeneration solutions were introduced and a UV-Vis detector (757 Absorbance Detector, Applied Biosystem, USA) for on-column detection. The detection window in the middle of the coated capillary was positioned at the level of the detection cell (Fig. 1b). The on-column detection was based on the optical density change caused by the swelling and shrinking of the gel, observed at 500 nm [13-14].

2.3 Procedures

2.3.1 *In situ synthesis of the on-column affinity smart polymer gel*

To obtain the affinity smart polymer gel of a 3-acrylamidophenylboronic acid acrylamide copolymer (NAAPBA-co-AA), 9.6 mg of NAAPBA and 30.6 mg of acrylamide were dissolved in 0.5 mL of ultrapure water at 60°C. The mixture was gently agitated by manual shaking for dissolution. Two microliters of TEMED was added and gently agitated by manual shaking for 1 minute for the solution to be completely mixed. The solution was then degassed by purging with nitrogen. This solution was the “monomer mixture”. The “initiator solution” was prepared by dissolving 19.9 mg of ammonium persulphate in 0.5 mL of ultrapure water.

A fused silica capillary tube, 5 cm long with an I.D. of 0.32 mm, was first used to optimize the affecting parameters. A detection window was made in the middle of the tube by heating the capillary with a custom-made heating coil. In this process, an approximately 2 mm length of the polyimide layer was removed from the tubes outer surface leaving a clear portion of the capillary for the on-column UV detection window.

Twenty microliters of the monomer mixture was mixed with 10 µL of the initiator solution. One end of the capillary tube, with its detection window, was immediately dipped into the solution and the solution was drawn into the tube by capillary action. This amount of solution could prepare 3 tubes. After a few minutes the semitransparent affinity smart polymer gel was formed inside the capillary without further treatment, ready to be set into the flow injection system. Phosphate buffer which was used as the carrier buffer in the flow injection system was run through the three serially connected coated tubes for 30 minutes to stabilize the coated gel and to flush any remaining excess monomer mixture out of the tubes. The tubes can be stored at room temperature before use.

2.3.2 Detection principle of the sensor

In principle, the functional groups of the phenylboronic acid affinity smart polymer gel exist in equilibrium between the neutral trigonal planar and tetrahedral anionic forms. Glucose favors binding to the charged form. Therefore, when the concentration of glucose increases, the equilibrium shifts increasingly towards the direction of the charged borate. The concentration difference between ions in the gels and those in the surrounding solution induces the Donnan potential and results in the swelling of the affinity smart polymer gel [14]. The level of swelling is reflected by the decrease in the measured optical density. Since the binding of boronic acid with glucose is by a reversible covalent bond, when glucose is released from the affinity smart polymer gel, the gel shrinks and the optical density returns to the original signal prior to the binding.

With this principle, the carrier buffer was initially passed through the affinity smart polymer gel to obtain the absorbance baseline (Fig. 2 inset). When the standard solution of glucose was injected, the binding of glucose and phenylboronic acid in the affinity smart polymer gel caused the gel to swell. At this moment the observed optical density decreased. The chart recorder (BBC Goerz Metrawatt, Australia) was connected in such a way that the measured signal (mV) will rise when the optical density decreases, (signal “a” in Fig. 2 inset). Since the binding between glucose and phenylboronic acid is favored by a basic solution, an acidic solution (phosphate buffer with an acidic pH) was employed to speed up the release of glucose from the gel and to allow the gel to be reused. This regeneration solution was introduced into the system *via* the injection valve; the dissociation between glucose and phenylboronic acid caused the gel to shrink. This could be observed by the rapid decrease of the signal (signal “b” in Fig. 2 inset). After the flow of the carrier buffer the pH was quickly adjusted and the optical density returned to the original baseline within a few seconds (signal “c” in Fig. 2 inset) and the next analysis can be immediately performed.

To obtain the best performance of the sensor, affecting parameters such as the concentration and pH of the carrier buffer and regeneration solutions, carrier flow rate and sample volume were optimized (Table 1) by varying a single parameter and keeping others constant. The highest signal with the shortest analysis time was used as the criteria to select the optimum conditions. Under optimum conditions, performances of the sensor, for example, linearity, limit of detection, accuracy, and precision were evaluated.

2.3.3 Methods comparison

In order to compare the performance of the on-column affinity smart polymer gel sensor with the conventional method, 10 glucose samples, prepared in distilled water so that any matrix effect was minimal were first tested. Each sample was analyzed with the developed sensor and the conventional dinitrosalicylic acid (DNS) method [17] based on the oxidation of the aldehyde functional group present in glucose and the reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid in an alkaline solution. The absorbance of the red-brown color compound of 3-amino, 5-nitrosalicylic acid was measured at 575 nm with a spectrophotometer. The results analyzed by both methods were statistically tested with the Wilcoxon Signed Rank technique.

2.3.4 Real sample analysis

Three urine samples from Songklanagarind Hospital, Hat Yai, Thailand were analyzed. The samples were first passed through a filter paper (Whatman[®] grade 1, pore size 11 μm , Whatman International Ltd., Maidstone, England) to remove any particulates. Urine samples spiked with a series of standard solutions of glucose were prepared to produce a matrix matched calibration curve to investigate the matrix effect [18]. A standard curve was also prepared using standard glucose solution. The slopes of the two curves (standard and

matrix matched curves) were compared. If there is a significant difference between the slopes, the matrix matched calibration curve will be used for the analysis of glucose in real samples. The obtained concentrations of glucose in the urine samples as analyzed by the affinity smart polymer gel sensor were then compared with the values obtained from the hospital, analyzed using the strip test (ARKRAY AUTION™ Sticks, ARKRAY, Inc. Kyoto, Japan), and the recoveries were calculated followed the EURACHEM guideline [18].

3. Results and discussion

3.1 Affinity smart polymer gel morphology

The morphology of the affinity smart polymer gel as observed by scanning electron microscopy (SEM) (JSM 5200 microscope, JEOL, USA) showed a porous three dimensional network (Fig. 1c). This connected network of pores and channels allows fluid to flow through the gel inside the capillary tube. This porous network also provides a high surface area for the binding between glucose and phenylboronic acid.

3.2 Optimization of the on-column affinity smart polymer gel sensor

3.2.1 Flow injection system

To obtain the best performance, parameters affecting the binding between the gel and glucose in the flow injection system were optimized as follows.

3.2.1.1 Concentration and pH of regeneration solution

Since glucose prefers to bind with borate in the charged form rather than with its neutral form, in the acidic pH range a reversible reaction will occur and glucose will be rapidly released from the binding. To obtain the quickest dissociation of the binding between glucose and phenylboronic acid, the regeneration solution was optimized. The concentrations of phosphate buffer used for the regeneration were investigated at 15, 20, 25 and 30 mM,

each with pH values of 5.00, 5.50, 6.00, 6.50 and 7.00. The initial conditions were: carrier buffer 10 mM phosphate buffer at pH 7.30, sample volume 200 μL and sample flow rate 0.05 mL min^{-1} .

Neither the concentration nor the pH had a significant effect on the peak height but had some effect on the analysis time. When the pH was decreased from 7.00 to 5.00, the dissociation time (time from point “1” to “2” of signal *b* in Fig. 2 inset) between glucose and phenylboronic acid decreased from a few minutes to a few seconds while the return to the baseline time increased. In the case of the concentration, the higher the concentration the shorter was the time to return to baseline. For example, at 15 mM pH 5.50, the return to baseline time (time from point “2” to “3” of signal *c* in Fig. 2 inset) is 10 minutes, whereas it only took 5 minutes for the 20 mM to 30 mM buffer. Therefore, a 20 mM regeneration phosphate buffer at pH 5.50 was used for further optimization since it provided a relatively fast dissociation time (15 seconds) and a short time to return to the baseline (5 minutes).

3.2.1.2 Concentration and pH of carrier buffer

The concentrations of carrier phosphate buffer were investigated at 10, 15, 20 and 25 mM each with pH ranges from 7.00 to 8.00, at 0.25 intervals of pH. The optical density change increased with buffer concentration from 10 mM to 15 mM for all studied pHs then leveled off for higher concentrations, whereas the optical density change increased with pH for all concentrations (Fig. 3). This is because in the basic range phenylboronic acid is mostly in the charged form favoring glucose binding. For all concentrations, when the pH was increased from 7.50 to 7.75, the optical density increased by 3.8 ± 0.3 times while the increase of pH from 7.75 to 8.00 increased the optical density change by only 1.3 ± 0.1 times. Therefore, 15 mM phosphate buffer pH 7.75 was chosen for further experiments.

3.2.1.3 Sample volume and carrier flow rate

Sample volumes of 100, 200, 300 and 400 μL and a carrier buffer flow rate of 0.02 to 0.10 mL min^{-1} (0.02 mL min^{-1} interval) were then simultaneously optimized. For all sample volumes, the smaller the flow rate the higher and broader was the peak. The analysis time was also longer. For example, the signal from a 100 μL volume at 0.02 mL min^{-1} was 15.5 ± 0.2 mV with an analysis time of 11 minutes whereas for 0.10 mL min^{-1} the signal was only 6.5 ± 0.3 mV with a 2 minute analysis time. This is because at a slower flow rate, glucose has a longer time to be retained and to interact with the phenylboronic acid. For a larger sample volume, the signal was higher with a longer analysis time. For example, at a 0.10 mL min^{-1} flow rate, when the sample volume was increased from 100 μL to 400 μL , the signal increased from 6.5 ± 0.3 mV (2 minutes) to 14.9 ± 0.7 mV (5 minutes), respectively. Creating the right balance between a high signal and a short analysis time, a sample volume of 300 μL and a flow rate of 0.08 mL min^{-1} were selected for further use.

All optimized parameters and their optimum values are summarized in Table 1. With these conditions the analysis of glucose can be complete within 6 minutes and a signal of 15.6 ± 0.3 mV from a glucose concentration of 10.0 mM was obtained.

3.2.2 Internal diameter of the on-column affinity smart polymer gel sensor

The effect of the I.D. of the capillary tube (0.25 mm, 0.32 mm and 0.53 mm) on the sensitivity (slope of the calibration curve) of the on-column affinity smart polymer gel glucose sensor is shown in Fig. 4. The wider capillary tube provided a higher sensitivity. This was because the larger tube can accommodate more affinity smart polymer gel that can interact with glucose and result in a higher optical density change. In addition, the wider tube also provided a longer path length for the light resulting in an increase in the sensitivity according to Beer's law.

However, when the glucose standard solution higher than 8.0 mM was injected into the 0.53 mm capillary tube, the signal leveled off from the linear range at a rather low glucose concentration (10.0 mM) (Fig. 4). During this time, some gel was observed to be emerging from the tube at the outlet of the flow injection system. This might be because the affinity smart polymer was only maintained inside the tube by physical adsorption without any cross-linking agent, and the polymeric network of the gel formed inside the capillary tube is physical cross-linked during polymerization [13, 19]. Therefore, with a wider tube, it is likely that the gel in the middle could be removed from the capillary tube during the swelling especially at higher concentration of glucose when there is more swelling. After some of the coated gel was removed, the optical density change did not increase with glucose concentration resulting in a narrower linearity and higher RSDs. Even though the 0.53 mm I.D. provided the highest sensitivity, in order to maintain the repeatability of the signal at the higher concentration, the 0.32 mm I.D. capillary was selected for further investigations.

3.3 Analytical performance and method validation

3.3.1 Linearity and limit of detection

Using the optimum conditions (Table 1), the linearity of the on-column affinity smart polymer gel sensor was evaluated by injecting glucose standard solutions from 0.5 mM to 18 mM (Fig. 2). The optical density changes were plotted against the concentrations of glucose (data not shown). The linear dynamic range was found to be between 0.5 and 16.0 mM [$y(\text{mV}) = (7.1 \pm 0.2) x(\text{mM}) - (4 \pm 2)$, $R^2 = 0.994$] with a limit of detection of 0.5 mM ($S/N \geq 3$). These detection range and detection limit are comparable to some recent glucose sensors based on phenylboronic acid [20-22]. However, the method proposed in this work is easy; the detection of glucose is simple and possible to be carried out automatically.

3.3.2 Intra- and inter-day precisions

The sensor precision was evaluated within a single day (intraday precision) and on three consecutive days (interday precision). On each day, 15 repetitive injections of an 8.0 mM standard glucose solution (midpoint of the linear dynamic range) were performed with the same coated gel. For the intra-day precision, the relative standard deviations were 3.7%, 1.5% and 2.5% for the first, second and third days, respectively. The inter-day precision was then calculated based on the same data as the intra-day precision and the relative standard deviation of 2.8% was obtained [23]. Both sets of these values indicated that the on-column affinity smart polymer gel sensor provided acceptable precision as recommended by AOAC (RSD of 3.7% at the concentration of 8.0 mM glucose) [24].

3.3.3 Operational stability of the smart polymer gel sensor

The operational stability was studied for the number of injections that a single coated affinity smart polymer gel could be used. The standard solution of glucose (8.0 mM, the middle point of the linearity) was consecutively injected into the flow system. Peak heights obtained from each injection were converted into a percentage response based on the 100% response of the first injection. The plot between percentage responses against the number of injection (Fig. 5) showed that for the affinity smart polymer gel the average response for 250 injections was $98 \pm 5\%$. With this injection numbers, the responses are within $\pm 10\%$ (t_{L10}) of the signal from the first injection [23]. The reduction of the signal was only 0.036% for each injection showing a very good repeatability with a relative standard deviation of 5%. This 250-times-injection was therefore considered to allow for enough use for each sensor and to finish at least one set of experiments. In addition, the proposed sensor does not need to be stored at 4°C as is always the case for an enzyme based sensor. As reported in the previous

work, a freshly prepared affinity smart polymer gel can be used every day for at least one month without changing its sensitivity [14].

3.3.4 Tube-to-tube coating reproducibility

The tube-to-tube coating reproducibility of the affinity smart polymer gel was studied. Six capillary tubes were coated with the same monomer mixture and initiator solution and tested in the flow injection system using 1.0-16.0 mM standard solutions of glucose. The sensitivity (slope of the calibration curve) obtained from each tube was compared. The results in Fig. 6 showed that the sensitivities of each gel are significantly different. This might be because the coating of the gel inside the capillary tube merely relies on the physical adsorption on the capillary wall surface. When the capillary tube was set into the flow injection system and the carrier buffer was initially passed through the gel, some parts of the gel that were not directly attached to the surface might be lost with the buffer resulting in a different amount of gel inside the tube leading to the different sensitivities. However, with the operational stability of 250 times (reported in section 3.3.3) the different sensitivity from the different coating tube will not cause any problem since at least one set of experiment can be finished with the use of a single coated affinity smart polymer gel. In the case where fabrication reproducibility is required, chemically attachment of the polymer gel to the surface might be employed. For example the capillary surface could be silanised and then cross-linked with the polymer gel. Additional cross-linking agent could also be added to provide the chemical cross-linked within the polymer gel [13]. With this procedure, the coating reproducibility might be improved.

3.3.5 Selectivity of affinity smart polymer gel

It is well known that phenylboronic acid is a ligand that can form a reversible covalent bond to a variety of *cis*-diol containing compounds [12, 25-26]. Therefore, any sensor system utilizing boronic acid ligands could be susceptible to interference from competing *cis*-diol containing compounds in the sensing environment. The degree of cross-reactivity of the on-column affinity smart polymer gel to other saccharides was then studied. Mannose and galactose were two monosaccharides selected for this test since they have similar structures to glucose. Sucrose and lactose were the two disaccharides that were also used in this investigation.

A calibration curve was prepared for each sugar in the concentration range of 1.0 to 16.0 mM. Only the response to glucose provided the linear relationship from 1.0 mM to 16.0 mM whereas the linear dynamic ranges obtained from mannose, galactose, sucrose and lactose were 4.0-16.0, 1.0-8.0, 2.0-8.0 mM and 4.0-16.0 mM, respectively. The sensitivities of the on-column affinity smart polymer gel are shown in Fig. 7.

As can be seen the affinity smart polymer gel sensor was not selective for glucose, and this agreed well with previous work [14, 26]. This sensor responded to mannose and galactose with almost similar sensitivity whereas the sensitivities to sucrose and lactose were very poor (almost 9 times lower). This is probably because of the steric effect caused by the presence of a glycosidic bond and the fact that certain diol groups were no longer available for binding [12]. Therefore, the benefit of this newly developed sensor is to be used as a glucose, mannose or galactose sensor where it is known *prior* to the test that either of these sugars are the only monosaccharide present, or it could be used as a monosaccharide screening sensor. For example, it can be used for on-line monitoring of glucose in a bioprocess or fermentation process. To improve the selectivity future work might include the

investigation of the different structure of phenylboronic acid receptor. The change of the positions and orientations of boronic acid may favor one saccharide over the other [27].

3.3.6 Comparison with dinitrosalicylic acid (DNS) method

In order to compare the performance of the on-column affinity smart polymer gel sensor with the conventional method, 10 glucose samples in the range of 5.0-50.0 mM, prepared in distilled water where the matrix effect is minimal were tested. These glucose concentrations are within the determination range of the strip test technique (2.8- 55.0 mM) [28]. Each sample was analyzed with the smart polymer gel sensor and the conventional DNS method [17]. Each sample was diluted with the different dilution factor to obtain the concentration in the linear range and analyzed by both methods. The obtained signals were converted to glucose concentrations by the linear equation of the calibration curve of each technique and multiplied by the dilution factor. The comparison of glucose concentration from both methods was shown in Fig. 8. Using the Wilcoxon Signed Rank test, it was found that there is no significant difference between the two methods at the confidence level of 95% ($P>0.05$).

3.3.7 Real sample analysis

To confirm the applicability of the on-column affinity smart polymer gel sensor for the analysis of glucose in real samples, the developed method was used to detect urine glucose. Although, the monitoring of glucose in urine cannot be used to substitute for blood glucose, it can still provide useful information when blood glucose monitoring is not available [29-30]. Three urine samples obtained from the Songklanagarind Hospital, Hat Yai, Thailand were analyzed.

The samples were filtered and first tested to see if there was any effect due to the matrix. Filtered samples were spiked with three different concentrations of glucose to produce the matrix matched calibration curve (4 calibration points including unspiked urine samples with 3 replications for each concentration). The slopes of these matrix matched calibration curves were compared with that of the standard curve. The significant difference was determined using two ways ANOVA by R software [31]. The result showed that the slopes of the matrix matched and standard curves were significantly different ($P>0.05$), and clearly indicated that the matrix had some influence on the analysis. Therefore, the matrix matched calibration curve was used to determine the concentration of glucose in urine samples.

The signals from three un-spiked urine samples were 9.7, 7.2 and 9.0 mV and the corresponding linear equations were $y = (5.3 \pm 0.2)x + (9.6 \pm 0.8)$, $y = (2.8 \pm 0.2)x + (7 \pm 1)$ and $y = (3.1 \pm 0.1)x + (8.9 \pm 0.2)$, respectively. The concentrations of glucose in the samples were calculated from the extrapolation of the y-intercept of the matrix matched calibration curve obtained from each sample, and they were found to be 1.8 ± 0.2 mM, 2.5 ± 0.4 mM and 2.8 ± 0.1 mM for samples no. 1, 2 and 3, respectively (Table 2). The results of these three samples provided by the hospital using the strip test were labeled at “trace level” (Table 2) meaning that the concentrations of glucose in urine samples were less than 50 mg dL^{-1} (2.8 mM) which is the limit of detection of this strip test [28]. In other words, the lowest concentration of glucose that can be reported by the strip test is 2.8 mM. Whereas the proposed sensor, that provided a 5.6 times lower detection limit, could report the lowest concentration of glucose at 0.5 mM.

Normally the concentration of glucose in urine is between 0.0-0.8 mM and when glucose blood level exceeds the renal threshold of 10 - 12 mM, it is excreted in the urine. This may indicate the presence of renal glycosuria or diabetes mellitus [32]. Therefore, if the

method used to determine the concentration of glucose can provide more quantitative results, it will provide further useful diagnostic information. From the results, the proposed sensor can indicate very low quantitative concentrations that are normally identified only as “trace levels” in the normal strip test.

To further validate the system, the recoveries were tested and calculated according to the guideline from EURACHEM [18]. The concentration found in spiked urine sample was subtracted with that of un-spiked sample and it was then divided with the fortified concentration. The recovery was obtained by multiplying this value by a hundred. The recoveries were obtained in the range of 88 ± 2 to 103 ± 4 (Table 2).

4. Conclusions

A simple on-column detection, non-enzymatic glucose sensor, based on the use of an affinity smart polymer gel containing a chemoselective ligand, phenylboronic acid, was obtained. This affinity smart polymer gel sensor provided good operational stability; a single sensor can be reused up to 250 times with only a 0.036% reduction of the signal for each injection and a short analysis time of 6 minutes per analysis. The limit of detection of the sensor (0.5 mM) is suitable for analysis of glucose in several types of samples, such as urine, human serum or cell growth media. Especially for glucose monitoring in urine, the developed sensor provide more than a factor of 5 lower detection limit compared with that of the strip test. Even though this affinity smart polymer gel does not display specificity to a particular monosaccharide, in the case where it is known a priori that any of these would be the dominant sugar, this sensor would be suitable. For example the use of this sensor to determine glucose in the urine and blood as well as in some bioprocess where glucose is used as the primary carbon source in cell growth media.

Acknowledgements

This work was supported by the Office of the Higher Education Commission and the Thailand Research Fund (TRF) granting no. MRG 5180106. Partial support from the Trace Analysis and Biosensor Research Center (TAB-RC), the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the Department of Chemistry, Faculty of Science, and the Songklanakarind Hospital, Prince of Songkla University. Associate Professor Dr. Alexander E. Ivanov and Professor Dr. Bo Mattiasson are gratefully thanked for providing the opportunity for C. Thammakhet to work with this smart polymer during a research visit at the Department of Biotechnology, Lund University, Lund, Sweden. The authors would also like to thank Dr. Brian Hodgson for his help in a proof reading of the manuscript.

References

- [1] X. Kang, Z. Mai, X. Zou, P. Cai, J. Mo, *Analytical Biochemistry*. 363 (2007) 143-150.
- [2] S. Chaterji, I.K. Kwon, K. Park, *Progress in Polymer Science*. 32 (2007) 1083-1122.
- [3] B. Peng, Y. Qin, *Analytical Chemistry*. 80 (2008) 6137-6141.
- [4] S. Park, H. Boo, T.D. Chung, *Analytica Chimica Acta*. 556 (2006) 46-57.
- [5] R. Wilson, A.P.F. Turner, *Biosensors and Bioelectronics*. 7 (1992) 165-185.
- [6] J. Zhao, L. Wu, J. Zhi, *The Analyst*. 134 (2009) 794-799.
- [7] E. Miller, M. Przybyt, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 363 (1999) 103-107.
- [8] S. Takahashi, J.-i. Anzai, *Langmuir*. 21 (2005) 5102-5107.
- [9] G. Zenkl, I. Klimant, *Microchimica Acta*. 166 (2009) 123-131.
- [10] K. Kataoka, H. Miyazaki, M. Bunya, T. Okano, Y. Sakurai, *Journal of the American Chemical Society*. 120 (1998) 12694-12695.

- 449 [11] S. Kabilan, J. Blyth, M.C. Lee, A.J. Marshall, A. Hussain, X.P. Yang, C.R. Lowe,
450 Journal of Molecular Recognition. 17 (2004) 162-166.
- 451 [12] M.C. Lee, S. Kabilan, A. Hussain, X. Yang, J. Blyth, C. R. Lowe, Analytical
452 Chemistry. 76 (2004) 5748-5755.
- 453 [13] M.V. Kuzimenkova, A.E. Ivanov, C. Thammakhet, L.I. Mikhlovska, I.Y. Galaev, P.
454 Thavarungkul, P. Kanatharana, B. Mattiasson, Polymer. 49 (2008) 1444-1454.
- 455 [14] A.E. Ivanov, C. Thammakhet, M.V. Kuzimenkova, P. Thavarungkul, P. Kanatharana,
456 L.I. Mikhlovska, S.V. Mikhlovsky, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Journal of
457 Molecular Recognition. 21 (2008) 89-95.
- 458 [15] I. Hisamitsu, K. Kataoka, T. Okano, Y. Sakurai, Pharmaceutical Research, 14 (1997)
459 289-293.
- 460 [16] A.E. Ivanov, H. Larsson, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Polymer, 45 (2004) 2495-2505.
- 461 [17] G.L. Miller, Analytical Chemistry. 31 (1959) 426-428.
- 462 [18] Guide EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory
463 Guide to Method Validation and Related Topics, 1998. <http://www.eurachem.org>.
- 464 [19] T. Hoare, R. Pelton, Macromolecules. 40 (2007) 670-678.
- 465 [20] W. Wu, T. Zhou, M. Aiello, S. Zhou, Biosensors and Bioelectronics. 25 (2010) 2603-
466 2610.
- 467 [21] G. Ye, X. Wang, Zhou, Biosensors and Bioelectronics. 26 (2010) 772-777.
- 468 [22] A. Tiwari, D. Terada, C. Yoshikawa, H. Kobayashi, Talanta. 82 (2010) 1725-1732.
- 469 [23] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, TrAC, Trends in Analytical
470 Chemistry. 23 (2004) 535-552.
- 471 [24] AOAC International, Method Validation Programs (OMA/PVM Department),
472 including Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate
473 characteristics of a method of analysis, 2000. [http://www.aoac.org/vmeth/](http://www.aoac.org/vmeth/devmethno.htm)
474 [devmethno.htm](http://www.aoac.org/vmeth/devmethno.htm).

- 475 [25] W. Wang, X. Gao, B. Wang, *Current Organic Chemistry*. 6 (2002) 1285-1317.
- 476 [26] J.P. Lorand, J.O. Edwards, *Journal of Organic Chemistry*. 24 (1959) 769-774.
- 477 [27] K.E.S. Dean, A.M. Horgan, A.J. Marshall, S. Kaliban, J. Pritchard, *Chemical*
- 478 *Communications*. (2006) 3507-3509.
- 479 [28] Urine test AUTIONTM Sticks. retrieved on September 10, 2010. [http://www.](http://www.arkray.co.jp/english/products/urinalysis.html)
- 480 [arkray.co.jp/english/products/urinalysis.html](http://www.arkray.co.jp/english/products/urinalysis.html).
- 481 [29] Position Statement - Urine Glucose Monitoring, International Diabetes Federation.
- 482 retrieved on July 4, 2010. http://www.idf.org/Position_statementsurine_monitoring.
- 483 [30] M. Miyashita, N. Ito, S. Ikeda, T. Murayama, K. Oguma, J. Kimura, *Biosensors and*
- 484 *Bioelectronics*. 24 (2009) 1336-1340.
- 485 [31] R Development Core Team, *R: A language and Environment for Statistical*
- 486 *Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006.
- 487 [32] Glucose in urine, Home test kits by Sanitoets, retrieved on July 4, 2010. [http://www.](http://www.anytestkits.com/utk-glucose-in-urine.htm)
- 488 [anytestkits.com/utk-glucose-in-urine.htm](http://www.anytestkits.com/utk-glucose-in-urine.htm).

Figure captions

Fig. 1 Schematic diagram showing the on-column affinity smart polymer gel glucose sensor flow injection system (a), pictures of the detection cell and the coated smart polymer gel capillary with the detection window in the middle (b) and a scanning electron microscopy image at 1500 $\times$ magnification of the gel (c).

Fig. 2 Characteristics of the sensor signals at various concentrations of glucose. Inset; the optical density change after (a) 6.0 mM glucose was injected, (b) regeneration solution was injected to the flow injection system, (c) pH adjusted to its original value. Analytical conditions: sample flow rate 0.08 mL min⁻¹, sample volume 300 μ L, carrier buffer 15 mM phosphate buffer pH 7.75, regeneration solution 20 mM phosphate buffer pH 5.50, detection wavelength 500 nm. The time taken between points 1 and 2 is the dissociation time and between point 2 and 3 is the return to baseline time.

Fig. 3 The effect of pH and concentration of carrier phosphate buffer on the signal of the on-column affinity smart polymer gel glucose sensor. Analytical conditions: sample flow rate 0.05 mL min⁻¹, sample volume 200 μ L, regeneration solution 20 mM phosphate buffer pH 5.50, glucose concentration 8.0 mM, detection wavelength 500 nm.

Fig. 4 The effect of the internal diameter (I.D.) of the capillary tube on the sensitivity of the on-column glucose sensor. Three replications were done for each point of the calibration curves. Analytical conditions: sample flow rate 0.08 mL min⁻¹, sample volume 300 μ L, carrier buffer 15 mM phosphate buffer pH 7.75, regeneration solution 20 mM phosphate buffer pH 5.50, detection wavelength 500 nm.

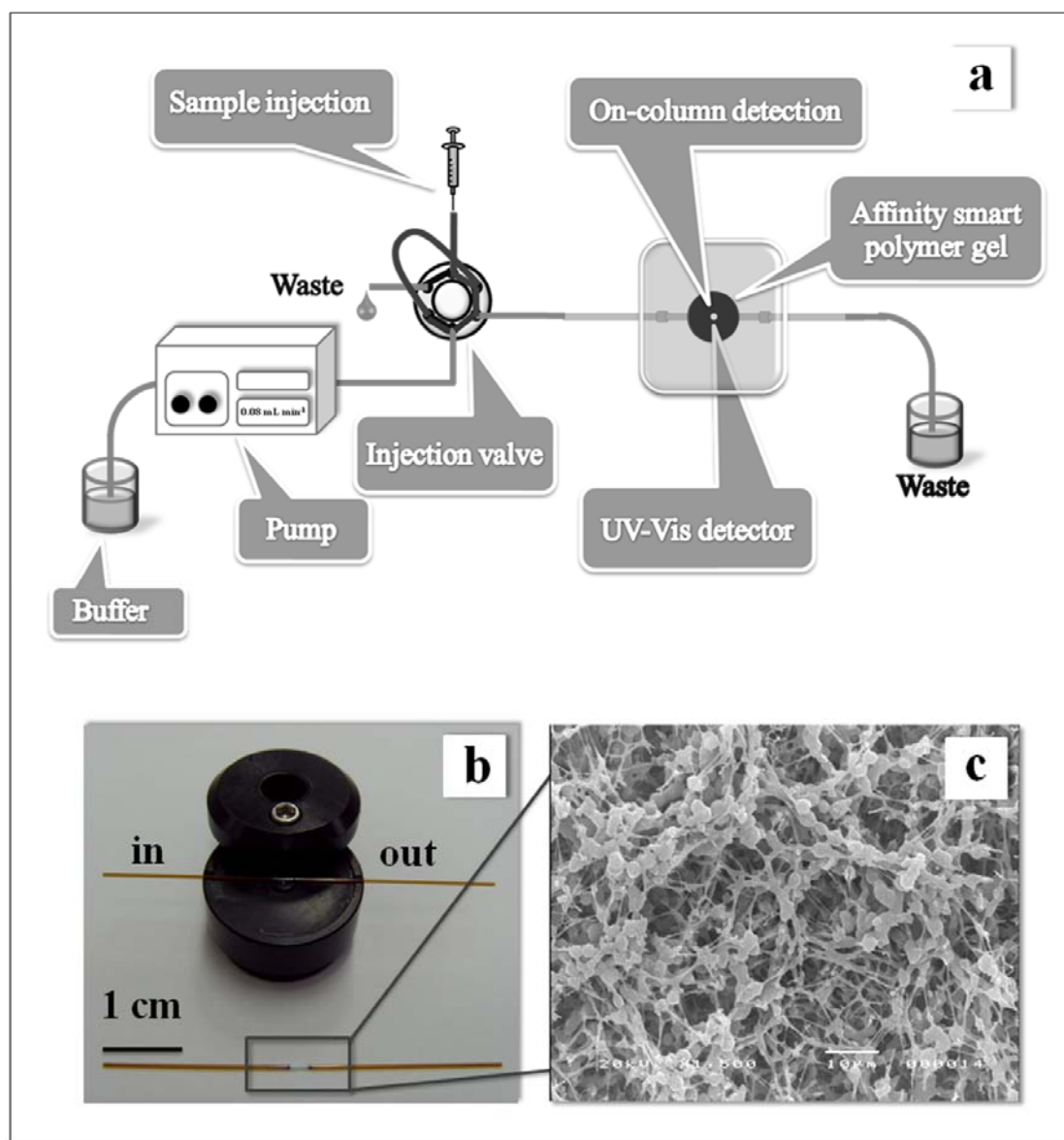
Fig. 5 The operational stability of the affinity smart polymer gel. Analytical conditions: sample flow rate 0.08 mL min^{-1} , sample volume $300 \text{ }\mu\text{L}$, carrier buffer 15 mM phosphate buffer pH 7.75 , regeneration solution 20 mM phosphate buffer pH 5.50 , glucose concentration 8.0 mM , detection wavelength 500 nm .

Fig. 6 The sensitivities of six different coated affinity smart polymer gel sensors prepared from the same coating solution. Three replications were done for each point of the calibration curves. Analytical conditions: sample flow rate 0.08 mL min^{-1} , sample volume $300 \text{ }\mu\text{L}$, carrier buffer 15 mM phosphate buffer pH 7.75 , regeneration solution 20 mM phosphate buffer pH 5.50 , detection wavelength 500 nm .

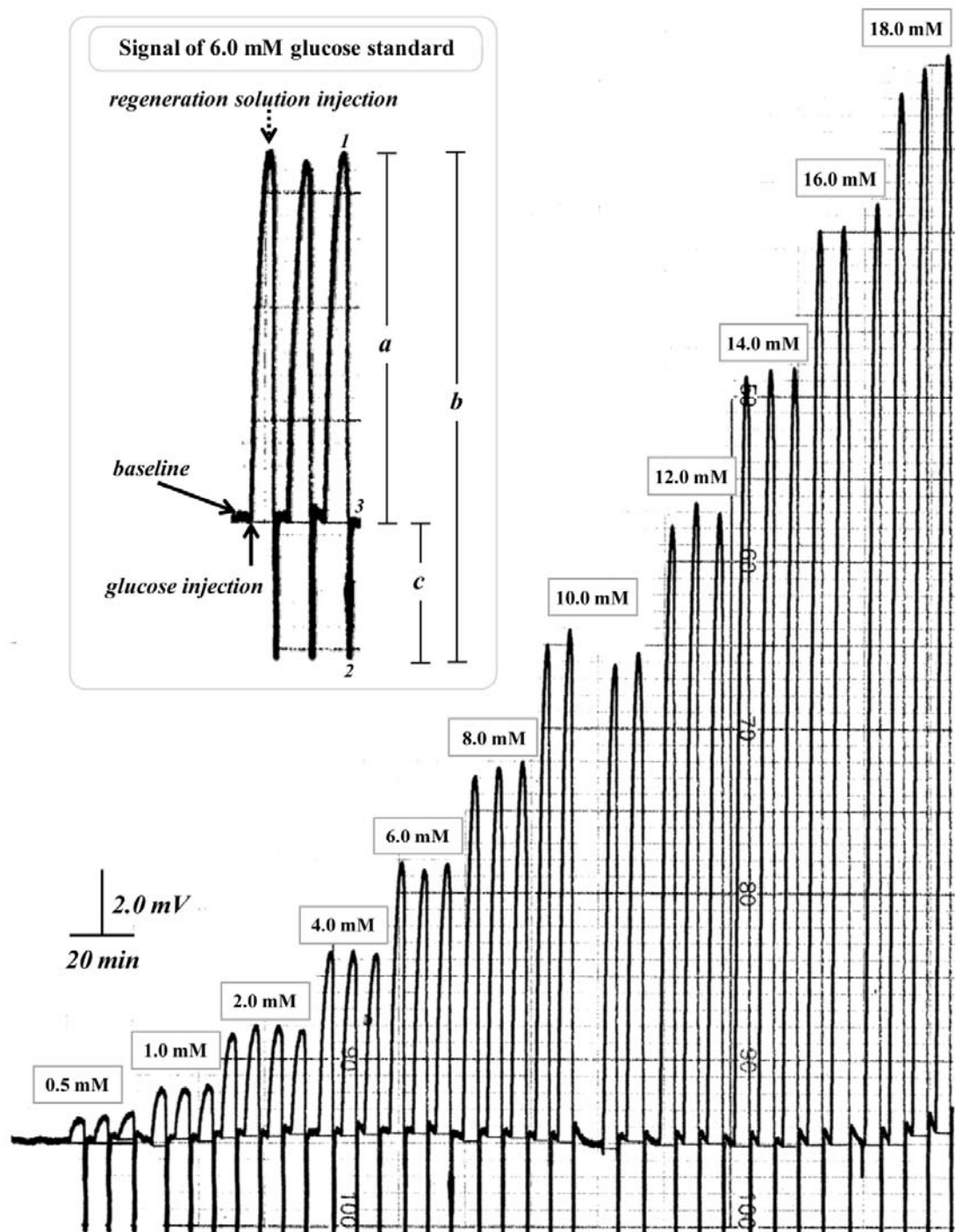
Fig. 7 The sensitivities of the on-column affinity smart polymer gel for various saccharides. Three replications were done for each point of the calibration curves of each saccharide. Analytical conditions: sample flow rate 0.08 mL min^{-1} , sample volume $300 \text{ }\mu\text{L}$, carrier buffer 15 mM phosphate buffer pH 7.75 , regeneration solution 20 mM phosphate buffer pH 5.50 , detection wavelength 500 nm .

Fig. 8 Comparison of glucose concentrations in samples obtained from the affinity smart polymer gel sensor and DNS method (mean $\pm$ SD, n=3)

550 Fig. 1



558 Fig. 2

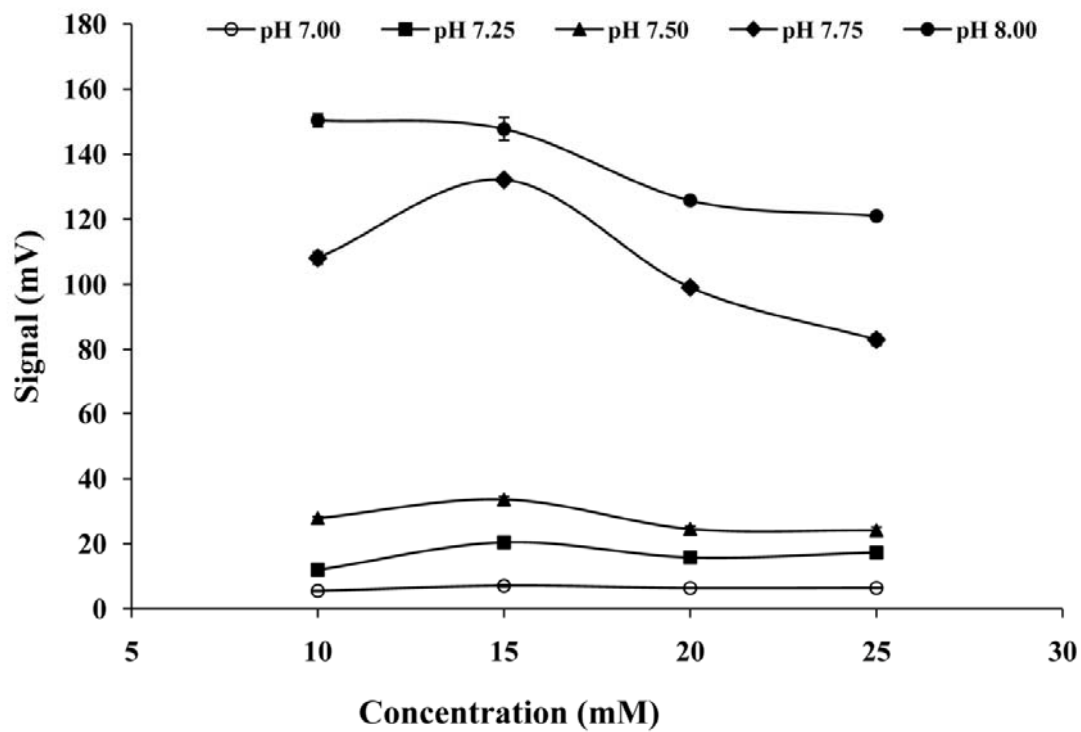


559

560

561

562 Fig. 3



576 Fig. 4

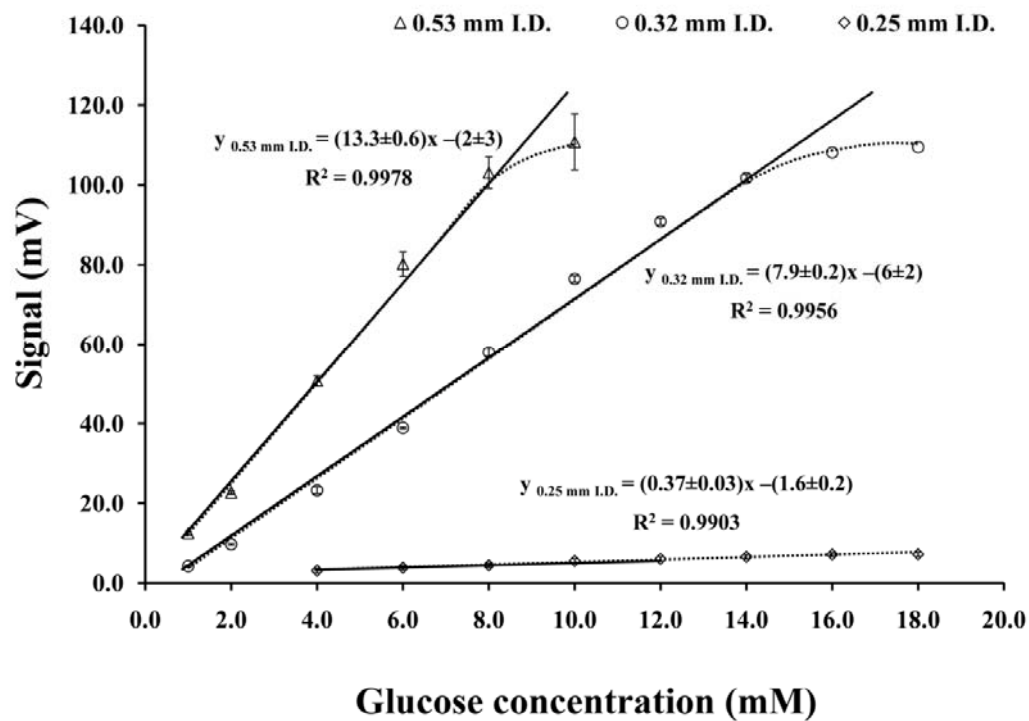


Fig. 5

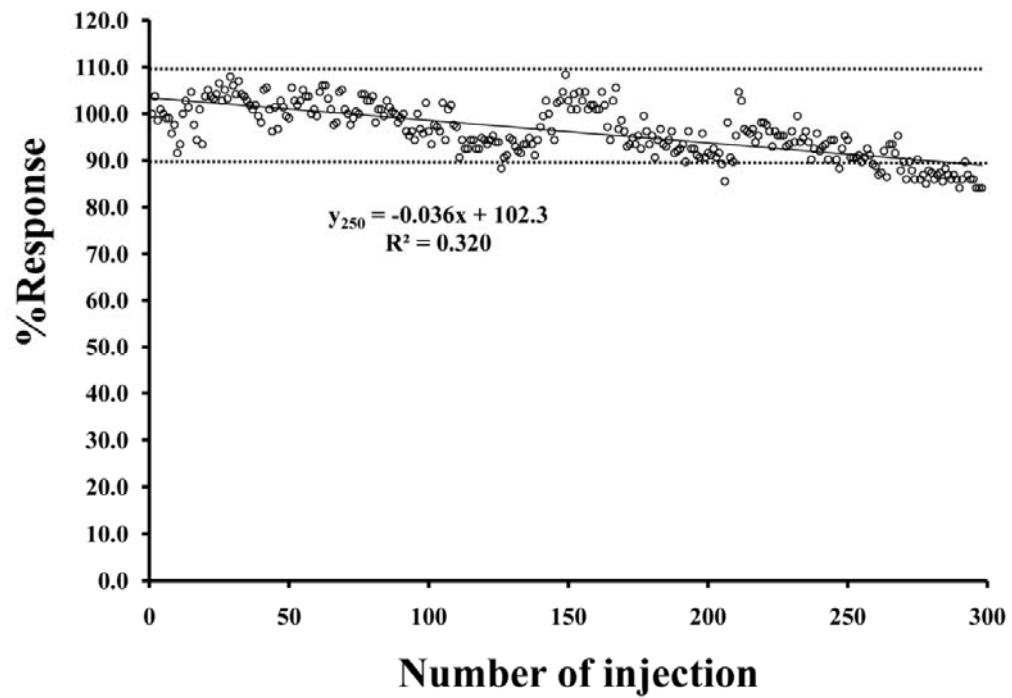


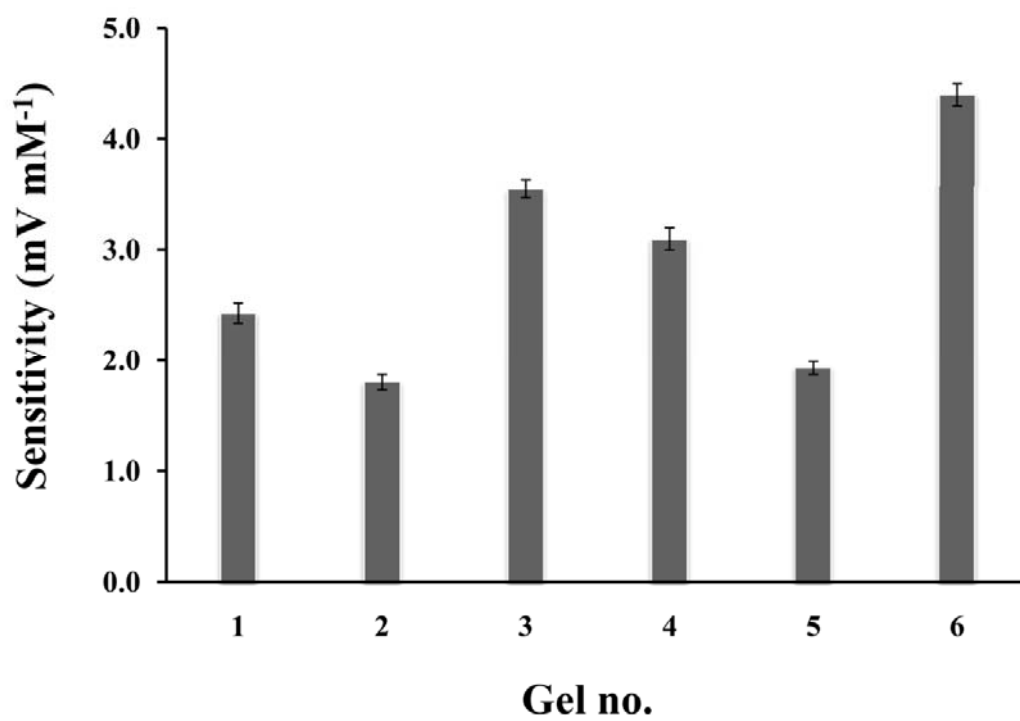
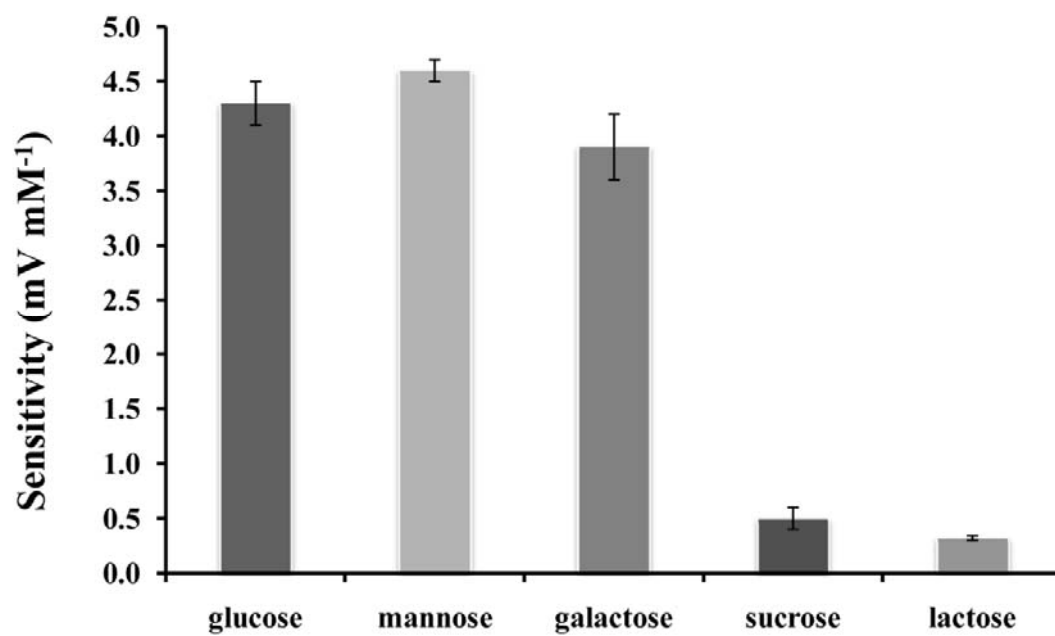
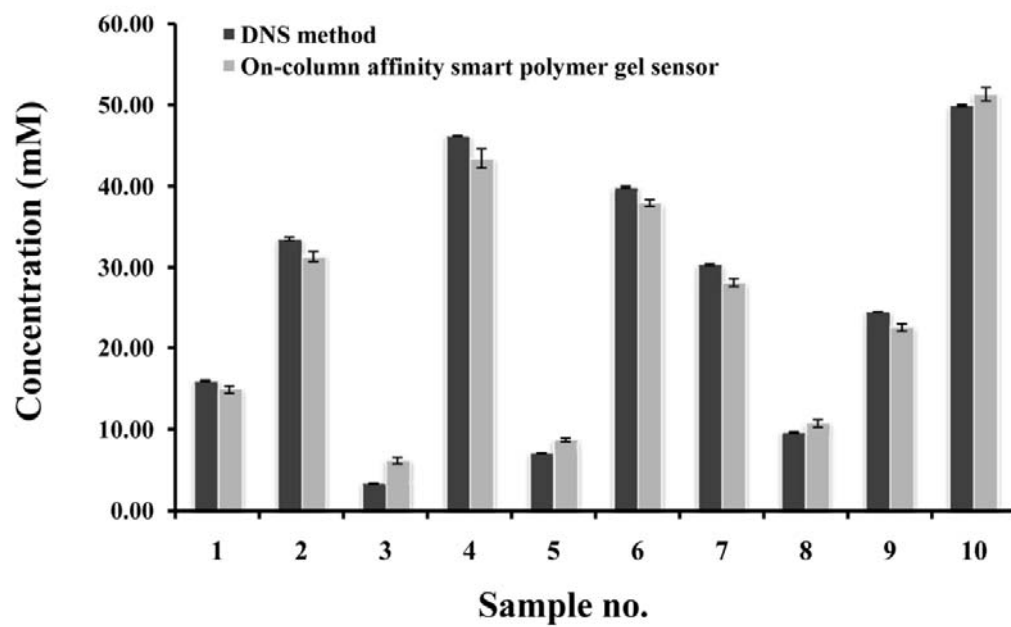
Fig. 6

Fig. 7



634 Fig. 8



635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

Table 1 Optimization of parameters for measuring glucose the on-column affinity smart polymer gel flow injection system

Parameter	Studied range	Optimum value
<i>Phosphate as carrier buffer</i>		
concentration (mM)	10-25	15
pH	7.00-8.00	7.75
<i>Phosphate as regeneration buffer</i>		
concentration (mM)	15-30	20
pH	5.00-7.00	5.50
<i>Sample volume (μL)</i>	100-400	300
<i>Flow rate (mL min^{-1})</i>	0.02-0.10	0.08

Table 2 The results from the analysis of three urine samples compared with that from the strip test provided by the hospital

Sample no.	Concentration of glucose (mM)		%Recovery at spiked concentration of glucose ^a (mM)		
	Affinity smart polymer gel sensor ^a	Strip test	2.0	4.0	8.0
1	1.8±0.2	trace level ^b	103±4	99±1	100±6
2	2.5±0.4	trace level ^b	98±9	95±10	88±2
3	2.8±0.1	trace level ^b	91±5	96±2	99±6

^a n =3

^b Less than 50 mg dL⁻¹ or 2.8 mM of glucose