



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การปรับปรุงผิวอิเล็กทรอนิกส์ด้วยฟิล์มเส้นใยนาโนพอลิเมอร์โดย
เทคนิคอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งสำหรับประยุกต์ใช้ทางไบโอเซนเซอร์

โดย ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม และคณะ

เมษายน พ.ศ. 2556 เสร็จโครงการ

สัญญาเลขที่ MRG 5380269

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การปรับปรุงผิวอิเล็กทรอนิกส์ด้วยฟิล์มเส้นใยนาโนพอลิเมอร์โดย
เทคนิคอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่งสำหรับประยุกต์ใช้ทางไบโอเซนเซอร์

ดร.อาภรณ์ นุ่มนวม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การปรับปรุงผิวอิเล็กทรอนิกส์โทรดด้วยฟิล์มเส้นใยนาโนพอลิเมอร์โดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิงสำหรับประยุกต์ใช้ทางไบโอเซนเซอร์” สามารถดำเนินการได้สำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ต่อโครงการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดร. เปรดิพิชญ์ คณาธารณา ภาควิชาเคมีและรองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ตั้งแต่เริ่มต้นทำวิจัยจนกระทั่งเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์

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

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ สำหรับตัวอย่างซีรัมและข้อมูลผลการวิเคราะห์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และสมาชิกในสถานวิจัยการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซนเซอร์ รวมถึงทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามที่ได้อำนวยความสะดวกและให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

อาภรณ์ นุ่มนวม

1.บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

รหัสโครงการ: MRG5380269

ชื่อโครงการ: การปรับปรุงผิวอิเล็กทรอนิกส์ด้วยฟิล์มเส้นใยนาโนพอลิเมอร์โดยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์พิน
นึ่งสำหรับประยุกต์ใช้ทางไบโอเซนเซอร์

ชื่อนักวิจัย: ดร. อภรณ์ นุ่มนวม

Email Address: apon.n@psu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยทรานสดิวเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า โดยเตรียมเส้นใยนาโนคอมโพสิตระหว่างไคโตซานผสมคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์พินนึ่งบนอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่บนอิเล็กทรอนิกส์ทอง ซึ่งฟิล์มของเส้นใยนาโนที่เตรียมได้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงและมีความเป็นรูพรุน จึงประยุกต์ใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับการตรึงเอนไซม์ยูริกเอส (uricase) เพื่อใช้ในการตรวจวัดกรดยูริกด้วยเทคนิคแอมเพโรเมทรี โดยตรวจวัดสัญญาณของปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนที่ลดลงโดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนในระบบ -0.35 โวลต์ ซึ่งจะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของกรดยูริก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.001 – 0.4 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 1 ไมโครโมลาร์ อิเล็กทรอนิกส์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดกรดยูริกซ้ำได้ถึง 205 ครั้ง โดยไม่มีสัญญาณรบกวนเมื่อมีการทดสอบผลของตัวรบกวนที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น กรดแอสคอบิก น้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติก เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดยูริกในตัวอย่างซึ่งพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับทางโรงพยาบาลซึ่งใช้วิธีมาตรฐานเอนไซเมติกคัลเลอริเมตริก (enzymatic colorimetric method) ($P > 0.05$)

Keywords: กรดยูริกไบโอเซนเซอร์; นาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์; เส้นใยนาโน; อิเล็กทรอนิกส์พินนึ่ง

Project code: MRG5380269

Project Title: Modification of electrode surface with polymer nanofiber film through electrospinning for biosensor application

Investigator: Dr. Apon Numnuam

Email Address: apon.n@psu.ac.th

Abstract

Nanofibrous film was fabricated from mixed chitosan/carbon nanotube solution by electrospinning method on silver nanoparticles (AgNPs) layer that electrodeposition on gold electrode. The nanocomposite of chitosan/carbon nanotube nanofiber was used as support for uricase enzyme immobilization due to the characteristics of excellent biocompatibility, high surface to volume ration and large porosity. This modified electrode was used for uric acid detect by using amperometric system. Uric acid response was determined at applied potential of -0.35 V vs Ag/AgCl in flow injection system based on the decrease in reduction current of dissolving oxygen during the oxidation of uric acid by immobilized uricase, which is directly proportional to uric acid concentration. Under optimum conditions, the fabricated uric acid biosensor provide the linear range from 0.001 – 0.4 mM with limit of detection ($S/N \geq 3$) of 1 μ M. The amperometric uric acid biosensor demonstrated high operation stability up to 205 times (%RSD = 3.2). In the presence of the common interference, ascorbic acid, glucose, urea and lactic acid, in physiological level, have negligible effect on the performance of this biosensor. When applied to analyze uric acid in serum samples, the results agreed well with the standard enzymatic colorimetric method ($P > 0.05$).

Keywords: uric acid biosensor; chitosan /carbon nanotube nanocomposite; nanofiber; electrospinning

2. Executive summary

ไบโอเซนเซอร์ เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างวัสดุชีวภาพ (biological sensing element) และทรานสดิวเซอร์ (transducer) โดยวัสดุชีวภาพจะตอบสนองอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทรานสดิวเซอร์ทำหน้าที่ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น (Eggins, 1996) ตัวอย่างของวัสดุชีวภาพที่ใช้ได้แก่ เอ็นไซม์ เซลล์ ดีเอ็นเอ แอนติเจน และแอนติบอดี ส่วนทรานสดิวเซอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ทรานสดิวเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า แสง และมวล (Eggins, 1996; Thèvenot *et al.*, 1999) ข้อดีของไบโอเซนเซอร์คือ มีความจำเพาะเจาะจงและความไววิเคราะห์สูง และใช้เวลาในการตรวจวัดสั้น จากข้อดีดังกล่าวจึงได้มีการนำเทคนิคไบโอเซนเซอร์ไปตรวจวิเคราะห์สารทั้งในทางการแพทย์ อุตสาหกรรม หรือสิ่งแวดล้อม (Turner, 1987)

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ในปัจจุบันมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีความไววิเคราะห์และเสถียรภาพสูงขึ้นและราคาไม่แพง การศึกษาด้านหนึ่งที่ได้รับคามสนใจคือการพัฒนาการตรึงวัสดุชีวภาพบนทรานสดิวเซอร์หรือวัสดุรองรับโดยการปรับปรุงผิวอิเล็กโทรด (modified electrode) กล่าวคือหากมีวัสดุชีวภาพตรึงในปริมาณที่มากขึ้นจะทำให้สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ปริมาณสารได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นด้วย (Ren *et al.*, 2006) โดยวัสดุรองรับที่นำมาใช้ในการตรึงและปรับปรุงผิวหน้าอิเล็กโทรดนั้นควรมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง จึงได้มีการนำวัสดุโครงสร้างนาโน (nanostructured material) เช่น ซิลิกาพรุน (mesoporous silica) (Shimomura *et al.*, 2008) มาใช้ร่วมกับไบโอเซนเซอร์ อย่างไรก็ตามพบว่าข้อด้อยคือ เอ็นไซม์ที่เข้าไปอยู่ในรูพรุนของซิลิกาทำให้ความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ (enzyme activity) ลดลง นอกจากนี้ชั้นผิวของซิลิกายังขัดขวางการแพร่ของสารตัวอย่างที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ (Wang *et al.*, 2009) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการนำเส้นใยนาโนซึ่งเตรียมได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง (electrospinning nanofiber) มาใช้มากขึ้น เทคนิคนี้อาศัยแรงทางไฟฟ้าที่เกิดจากการให้ศักย์ไฟฟ้าแรงสูง (high voltage) กับสารละลายพอลิเมอร์ที่บรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยา เมื่อแรงทางไฟฟ้ามีค่ามากกว่าแรงตึงผิวจะทำให้สารละลายพอลิเมอร์พุ่งออกมาจากปลายเข็ม ซึ่งจะทำให้ได้เส้นใยที่มีขนาดเล็กและบาง การซ้อนทับกันของเส้นใยจะทำให้ได้ฟิล์มบางที่มีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากเหมาะสำหรับการเป็นวัสดุรองรับสำหรับการตรึงวัสดุชีวภาพ และผิวของเส้นใยนาโนสามารถตรึงวัสดุชีวภาพได้โดยที่ความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ (enzyme activity) ไม่ลดลง (Wang *et al.*, 2009) นอกจากนี้เส้นใยที่เตรียมได้จากเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิงสามารถทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ราคาถูก และสามารถเตรียมได้จากพอลิเมอร์หลายชนิด (Kim *et al.*, 2005)

ในการผลิตเส้นใยนาโนสำหรับใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับการตรึงเอ็นไซม์ มีการใช้พอลิเมอร์หลายชนิดเช่น polyvinyl alcohol (PVA) (Rent *et al.*, 2006), polymethylmethacrylate (PMMA) (Manesh *et al.*, 2008), polyvinylpyrrolidone (PVP) (Sawicka *et al.*, 2005) โดยการตรึงเอ็นไซม์สามารถทำได้ทั้งการ

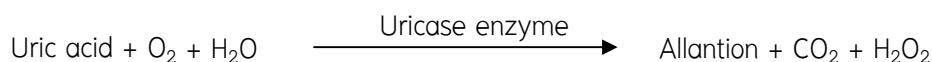
กักเอ็นไซม์ไว้ในเส้นใยนาโนของพอลิเมอร์ (encapsulation immobilization of enzyme in nanofiber) หรือตรึงอยู่บนผิวของเส้นใยนาโน (surface attachment of enzyme on nanofiber) แต่การตรึงเอ็นไซม์แบบกักไว้ในเส้นใยมีข้อด้อยคือ มีเสถียรภาพต่ำเนื่องจากเอ็นไซม์หลุดจากเส้นใยได้ง่ายระหว่างการตรวจวัดหรือการเก็บรักษา ส่วนการตรึงเอ็นไซม์บนเส้นใยนาโนไม่ว่าจะเป็นพันธะโคเวเลนต์ (covalent) หรือการเชื่อมไขว้ (crosslink) พันธะที่เกิดขึ้นระหว่างเอ็นไซม์และเส้นใยค่อนข้างแข็งแรง จึงลดการสูญเสียของเอ็นไซม์ในระหว่างการตรวจวัดหรือการเก็บรักษาและสารตัวอย่างสามารถทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ได้ง่ายโดยไม่ต้องแพร่เข้าไปในเส้นใย จึงช่วยให้การวิเคราะห์เร็วขึ้น (Wang *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2005)

การตรึงเอ็นไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์หรือการเชื่อมไขว้บนเส้นใยนาโนนั้น เส้นใยนาโนของพอลิเมอร์ต้องมีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่ช่วยให้เอ็นไซม์สามารถตรึงติดอยู่ได้ เช่น หมู่คาร์บอกซิลิก ($-\text{COOH}$) หรือหมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) วัสดุชนิดหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้ได้คือ ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากไคติน โดยในโครงสร้างของสายพอลิเมอร์ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส ที่มีหมู่อะมิโนติดอยู่ (Homayoni *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2005) เหมาะสมกับการใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับการตรึงเอ็นไซม์ (Abdullah *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2008)

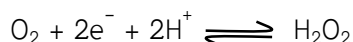
ในกรณีของระบบไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยทรานสดิวเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ปัจจุบันมีการนำคาร์บอนนาโนทิวป์ (carbon nanotube) มาใช้เพื่อให้ได้ค่าความไววิเคราะห์หรือสัญญาณตอบสนองที่สูงขึ้นและเวลาการตอบสนองที่สั้นลง เนื่องจากคาร์บอนนาโนทิวป์เป็นวัสดุนาโนที่ช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer) ดังนั้นจึงทำให้สัญญาณที่ได้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารตัวอย่าง ซึ่งมีข้อดีคือ ช่วยในการลดสัญญาณที่เกิดมาจากตัวรบกวน (Lee *et al.*, 2006; Manesh *et al.*, 2008; Muasameh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยทรานสดิวเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า โดยการเตรียมเส้นใยนาโนของไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงเพื่อใช้ในการปรับปรุงผิวอิเล็กโทรด และเป็นวัสดุรองรับสำหรับการตรึงวัสดุชีวภาพ เช่นเอ็นไซม์ โดยจะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดกรดยูริก (uric acid) ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูริกในเลือด หรือในปัสสาวะมีความสำคัญ เพราะหากร่างกายมีปริมาณกรดยูริกสะสมมากเกินไปจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเกาต์ นอกจากนี้ปริมาณของกรดยูริกในกระแสเลือดยังเป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติของไต จึงมีความจำเป็นต้องมีการตรวจวัดปริมาณกรดยูริกในร่างกายเพื่อเป็นการเฝ้าระวังในการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากกรดยูริก สำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดยูริกทั่วไปใช้เทคนิคทางแสง (colorimetric) ซึ่งพบว่าค่อนข้างซับซ้อนและไม่จำเพาะเจาะจง (Huang *et al.*, 2004) อีกวิธีที่นิยมใช้คือ โครมาโทกราฟี ซึ่งพบว่าให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ต้องมีการเตรียม สารตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

นอกจากนี้เครื่องมือมีราคาแพงและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ (Kafi *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008) ดังนั้นระบบไบโอเซนเซอร์ที่จะพัฒนาขึ้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์หากรดยูริกได้ โดยการตรึงเอนไซม์ยูริเคส (uricase enzyme) ซึ่งมีความจำเพาะ ใ้กับเส้นใยนาโนของสารผสมไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ โดยเอนไซม์ยูริเคสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของกรดยูริก ซึ่งแสดงได้ดังปฏิกิริยา



จากปฏิกิริยาจะสามารถวัดปริมาณออกซิเจนที่ลดลงได้ สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ดังปฏิกิริยาซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรี



ในการตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ลดลงนั้น ได้มีงานวิจัยพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์เป็นวัสดุนาโนที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนได้ดี (Singh and Buttry, 2012; Wu *et al.*, 2006) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดกรดยูริกให้ดีขึ้นจึงใช้ดัดแปลงขั้วไฟฟ้าอนุภาคนาโนซิลเวอร์ร่วมกับเส้นใยนาโนคอมโพสิทระหว่างไคโตซานผสมคาร์บอนนาโนทิวป์

เอกสารอ้างอิง

- Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L. Y., Karuppiyah, N., and Sidek, H. 2006. Chitosan-based tyrosinase optical phenol biosensor employing hybrid nafion/sol-gel silicate for MBTH immobilization. *Talanta* **70**, 527–532.
- Eggins, B. R. 1996. *Biosensor: an introduction*. Chichester: John Wiley&Son Ltd.
- Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., and Valizadeh, M. 2009. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* **77**, 656–661.
- Huang, S.-H., Shih, Y.-C., Wu, C.-Y., Yuan, C.-J., Yang, Y.-S., Li, Y.-K., and Wu, T.-K. 2004. Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. *Biosensors and Bioelectronics* **19**, 1627–1633.
- Kim, B. G. Nair, S., Kim, J., Kwak, J., H., Grate, J. W., Kim, S. H. and Gu. M. B. 2005. Preparation of biocatalytic nanofibres with high activity and stability via enzyme aggregate

- coating on polymer nanofibres. *Nanotechnology*. **16**, S382–S388.
- Lee, K.-P., Gopalan, A. I., Santhosh, P., Manesh, K. M., Kim, J. H., and Kim, K. S. 2006. Fabrication and Electrocatalysis of Self-Assembly Directed Gold Nanoparticles Anchored Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **6**, 1575–1583.
- Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Xu, Z., and Dong, S. 2005. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 984–988.
- Manesh, K. M., Kim, H. T., Santhosh, P., Gopalan, A. I., and Lee, K.-P. 2008. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase into multiwall carbon nanotubes–polyelectrolyte–loaded electrospun nanofibrous membrane. *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 771–779.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., and Lin, Y. 2002. Low-potential stable NADH detection at carbon–nanotube–modified glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications* **4**, 743–746.
- Ren, G., Xu, X., Liu, Q., Cheng, J., Yuan, X., Wu, L., and Wan, Y. 2006. Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications. *Reactive and Functional Polymers* **66**, 1559–1564.
- Sawicka, K., and Gouma, P. 2006. Electrospun composite nanofibers for functional applications. *Journal of Nanoparticle Research* **8**, 769–781.
- Sawicka, K., Gouma, P., and Simon, S. 2005. Electrospun biocomposite nanofibers for urea biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **108**, 585–588.
- Singh, P., Buttry, D. A. 2012. Comparison of Oxygen Reduction Reaction at Silver Nanoparticles and Polycrystalline Silver Electrodes in Alkaline Solution. *The Journal of Physical Chemistry C*, **116**: 10656–10663
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, G. S. 1999. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*. **77**: 2333–2348.
- Turner, A. P. F., Isao, K. and George, S. W. 1987. *Biosensors fundamentals and application* : Oxford University Press
- Wang, J., Li, M., Shi, Z., Li, N., and Gu, Z. 2002. Direct Electrochemistry of Cytochrome c

- at a Glassy Carbon Electrode Modified with Single-Wall Carbon Nanotubes. *Analytical Chemistry* **74**, 1993–1997.
- Wang, Z.-G., Wan, L.-S., Liu, Z.-M., Huang, X.-J., and Xu, Z.-K. 2009. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **56**, 189–195.
- Wu, S., Zhao, H., Ju, H., Shi, C., Zhao, 2006. J. Electrodeposition of silver–DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Electrochemistry Communications*, **8**: 1197–1203.
- Yang, G., Yuan, R., and Chai, Y.-Q. 2008. A high-sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on gold colloid/l-cysteine/gold colloid/nanoparticles Pt–chitosan composite film–modified platinum disk electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **61**, 93–100.
- Ye, P., Xu, Z.-K., Wu, J., Innocent, C., and Seta, P. 2005. Nanofibrous Membranes Containing Reactive Groups: Electrospinning from Poly(acrylonitrile-co-maleic acid or Lipase Immobilization. *Macromolecules* **39**, 1041–1045.
- Yi, H., Wu, L.-Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., and Payne, G. F. 2005. Biofabrication with Chitosan. *Biomacromolecules* **6**, 2881–2894.
- Zou, Y., Xiang, C., Sun, L.-X., and Xu, F. 2008. Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan–SiO₂ sol-gel. *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 1010–1016.

3. วัตถุประสงค์

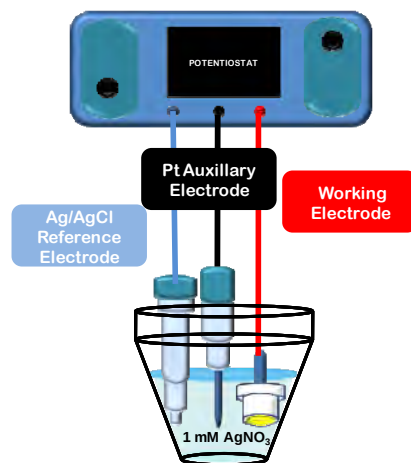
พัฒนาการตรึงวัสดุชีวภาพบนทรานสดิวเซอร์หรือวัสดุรองรับโดยอาศัยการปรับปรุงผิวอิเล็กโทรด (modified electrode) ด้วยการเตรียมเส้นใยนาโนของไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตร สปินนิงบนอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่บนขั้วไฟฟ้าทอง สำหรับระบบไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยทรานสดิวเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า เพื่อให้ได้ความไวและความไวในการตรวจวัดสูง รวดเร็ว มีเสถียรภาพสูง และนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูริก

4. วิธีการทดลอง

4.1 เตรียมเส้นใยนาโนไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงบนอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่บนอิเล็กโทรดทอง ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

4.1.1 เตรียมอนุภาคนาโนซิลเวอร์บนอิเล็กโทรดทอง

เตรียมได้โดยการเกาะติดทางเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) โดยใช้เทคนิคโครโนคูลอมเมทรี (chronocoulometry) ดังแสดงได้ดังรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) ซึ่งเป็นอิเล็กโทรดทอง อิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) เป็นซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และอิเล็กโทรดช่วย (auxiliary electrode) เป็นแพลททินัม ในการทดลองให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -0.4 โวลต์เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เวลา 30 วินาที (Chen *et al.*, 2007)

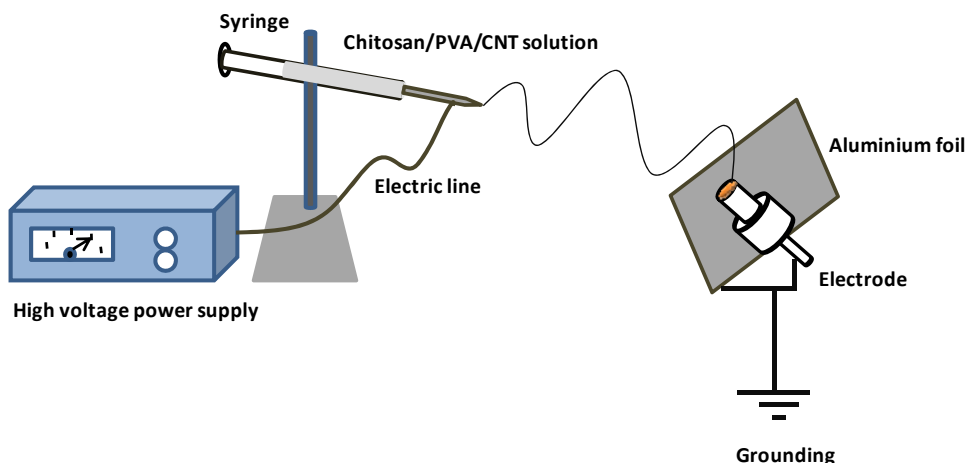


รูปที่ 1 ชุดอุปกรณ์การเตรียมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ด้วยการเกาะติดทางเคมีไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคโครโนคูลอมเมทรี

4.1.2 เตรียมเส้นใยนาโนไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง

ชุดอุปกรณ์สำหรับการอิเล็กโตรสปินนิงแสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยเครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้าแรงสูง (high voltage power supply) อุปกรณ์สำหรับบรรจุสารละลายพอลิเมอร์ซึ่งเป็นกระบอกลอย โดยมีการฉีดพ่นทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรด และอุปกรณ์รองรับเส้นใยซึ่งเป็นอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 วาง

บนอะลูมิเนียมฟอยล์ โดยให้ปลายเข็มฉีดยาห่างจากอิเล็กโทรด 15 เซนติเมตร การจ่ายศักย์ไฟฟ้าจากเครื่องกำเนิดไฟฟ้าแรงสูงสามารถทำได้โดยผ่านวัสดุที่เป็นตัวนำคือเข็มฉีดยา และต่อสายดินกับอิเล็กโทรดและอะลูมิเนียมฟอยล์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าแรงสูง 15 กิโลโวลต์



รูปที่ 2 ชุดอุปกรณ์ของการทำอิเล็กโตรสปินนิง

สำหรับสารละลายพอลิเมอร์ที่บรรจุในกระบอกฉีดยาที่บรรจุในกระบอกฉีดยาจะประกอบด้วยสารละลายไคโตซาน ผสมกับสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

4.1.2.1 สารละลายไคโตซาน เตรียมโดยชั่งไคโตซาน 1.5 กรัม ละลายใน 90% กรดอะซิติก 50 d กรัม คนจนละลายหมด ทำให้ได้ความเข้มข้นของไคโตซาน 3 wt%

4.1.2.2 สารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ เตรียมได้โดยชั่งโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ 4.5 กรัม ละลายด้วยน้ำอุณหภูมิประมาณ 80 °C คนจนละลายหมด ทำให้ได้ความเข้มข้นของโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ 9 wt %

4.1.2.3 ผสมไคโตซานและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ โดยศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซาน:โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่ 70:30, 60:40 50:50, และ 40:60 w/w โดยทุกอัตราส่วนจะมีคาร์บอนนาโนทิวป์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยเมื่อได้อัตราส่วนของไคโตซานต่อโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม จะทำการล้างโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ออกโดยการแช่ด้วย 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Huang *et al.*, 2007).

4.2 ตรึงเอ็นไซม์ยูริเคสบนเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์

การตรึงเอ็นไซม์ยูริเคสมี 3 ขั้นตอน ในขั้นแรกจะเป็นการตัดแปลงผิวอิเล็กโทรดของด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และชั้นของเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ ซึ่งเตรียมได้จากขั้นตอน 4.1 สำหรับขั้นตอนที่ 2 เป็นการ activated หมู่อะมิโน ($R-NH_2$) บนสายโซ่ของไคโตซาน โดยการจุ่ม

อิเล็กโทรดใน glutaraldehyde 5% (v/v) ใน 10 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.00 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างอิเล็กโทรดด้วย 10 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.00 ขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นขั้นตอนการตรึงเอ็นไซม์ยูริเนส โดยการหยด 5 ไมโครลิตรของเอ็นไซม์ยูริเนสที่ความเข้มข้น 5–25 ยูนิตต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการป้องกันการเกิด unspecific binding ต่อหมู่ฮัลด์ไฮลส์ที่เหลืออยู่ของ glutaraldehyde โดยการนำอิเล็กโทรดจุ่มในในสารละลาย 0.1 M ethanamine pH 8.00 เป็นเวลา 30 นาที

4.3 ตรวจวัดการตรึงด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

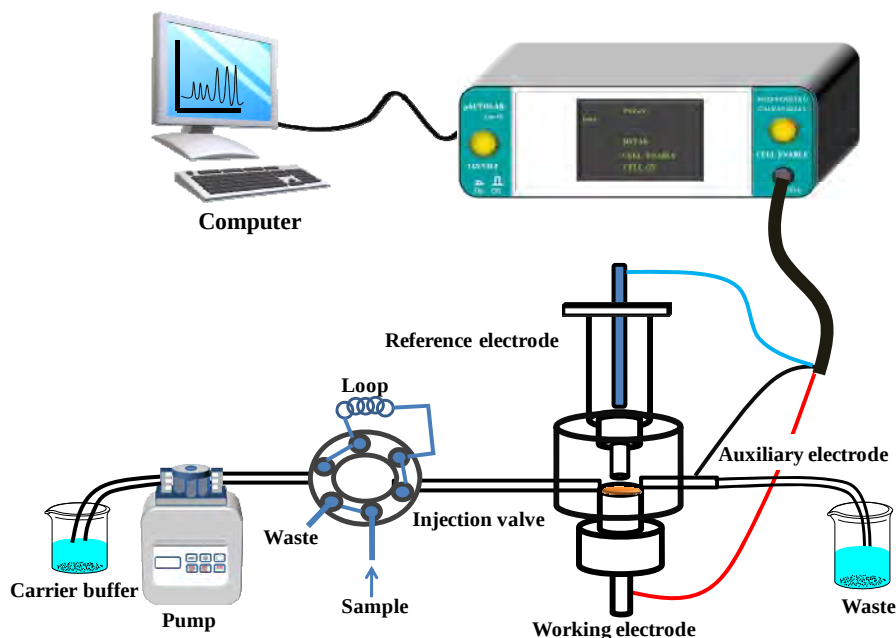
4.3.1 ศึกษาการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดยูริกโดยเอ็นไซม์ยูริเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะสามารถตรวจวัดการตรึงได้โดยวัดการลดลงของออกซิเจนที่ลดลงซึ่งจะแปรผันตามความเข้มข้นของกรดยูริก ศักยภาพไฟฟ้าสำหรับปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนเบื้องต้นในระบบ batch โดยการใช้อิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงผิว 4 แบบ คือ (1) ปรับปรุงด้วยเส้นใยนาโนไคโตซาน (Chi/Au) (2) ปรับปรุงด้วยเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/Au) (3) ปรับปรุงด้วยชั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์และชั้นเส้นใยนาโนไคโตซาน (Chi/AgNP/Au) และ (4) ปรับปรุงด้วยชั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์และชั้นเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) โดยสแกนศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0.0 โวลต์ ถึง -0.6 โวลต์ ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.00 โดยเริ่มต้นจะทำการเติมแก๊สไนโตรเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 10 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากสารละลาย จากนั้นทำการเติมอากาศเป็นเวลา 5 นาที และเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากอิเล็กโทรดทั้ง 4 แบบ

4.3.2 ศึกษาการตรวจวัดการตรึงด้วยระบบโพลาร์อินเจกชันแอมเพอโรเมทรี

นำอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงด้วยชั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์และชั้นเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีการตรึงเอ็นไซม์ยูริเนส มาต่อเข้ากับระบบโพลาร์อินเจกชันแอมเพอโรเมทรี ดังรูปที่ 3 ซึ่งจะประกอบด้วยปั๊ม สำหรับขับเคลื่อนสารละลายในระบบโดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีการเติมอากาศให้อิ่มตัวตลอดเวลากลายเป็นสารละลายตัวพา อินเจกชันวาล์วสำหรับฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกและสารตัวอย่าง และ โพลาร์เซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งมีอิเล็กโทรด 3 อิเล็กโทรดอยู่ภายใน คืออิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) ซึ่งเป็นอิเล็กโทรดที่ได้จากการปรับด้วยชั้นเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์และตรึงเอ็นไซม์ยูริเนส อิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) เป็นซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ และอิเล็กโทรดช่วย (Auxiliary electrode) เป็นทอัสแตนเลน ซึ่งทั้งสามอิเล็กโทรดจะเชื่อมเข้ากับเครื่องวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าโพเทนทิโอสแตต (potentiostat)

((Autolab PGSTAT30 electrochemical impedance analyzer and potentiostat/galvanostat (Eco Chemie B.V., Netherlands))



รูปที่ 3 ระบบตรวจวัดกรดยูริกด้วยระบบโพลาร์อินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

4.3.2.1 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในระบบโพลาร์อินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนที่ลดลงเนื่องจากการออกซิเดชันของกรดยูริกด้วยเอ็นไซม์ยูริกเคสในระบบโพลาร์อินเจคชันด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีที่ -0.20 -0.30 -0.35 -0.40 -0.45 และ -0.50 โวลต์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่มีความเข้มข้น 0.05 – 0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปริมาตรตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร และใช้อัตราการไหลของสาร 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

4.3.2.2 ผลของพีเอชและความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่

โดยในการทดลองนี้ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยทำการศึกษาผลของความเข้มข้นและพีเอชควบคู่กัน โดยศึกษาผลของความเข้มข้นที่ 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ และที่ทุกความเข้มข้นจะทำการศึกษาที่ พีเอช 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่

ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปริมาตรตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร และใช้อัตราการไหลของสาร 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

4.3.2.5 ปริมาตรและอัตราการไหลของสารตัวอย่าง

ศึกษาอัตราการไหลและปริมาตรของสารตัวอย่างควบคู่กัน โดยจะทำการศึกษาที่อัตราการไหล 0.25 0.3 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที และที่ทุกอัตราการไหลจะศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่าง ที่ 250 300 และ 400 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำความไววิเคราะห์ไปเปรียบเทียบ เพื่อหาปริมาตรและอัตราการไหลของสารตัวอย่างที่เหมาะสม

4.3.3 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด

ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงจะต้องให้ค่าสหสัมพันธ์เชิงปริมาณ (R^2) เข้าใกล้ 1 และทำการศึกษาโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานยูริกที่ความเข้มข้น 0.001–0.6 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือความเข้มข้นที่ให้สัญญาณการตรวจวัดเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน ($S/N \geq 3$)

4.3.4 ความสามารถในการเลือก (selectivity) ของอิเล็กโทรด

ศึกษาความสามารถในการเลือกของอิเล็กโทรดในระบบแอมเพโรเมตริกสำหรับการตรวจวัดกรดยูริก เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์กรดยูริกในซีรัมอาจมีสารอื่นที่มีผลต่อสัญญาณการตรวจวิเคราะห์กรดยูริก ดังนั้นในการทดลองจึงทดสอบสารที่มีอยู่ในตัวอย่างซีรัม เช่น กรดแอสคอบิก น้ำตาลกลูโคส และกรดแลกติก ที่ระดับความเข้มข้นปกติที่มีอยู่ในซีรัม และที่ความเข้มข้นสูงกว่ากรดยูริก 100 เท่า หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณแสดงว่าระบบมีความสามารถในการเลือกสูง

4.3.5 ความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้า

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ต่อเนื่องหลายครั้ง ในระบบโพลีวินิลเจคชันแอมเพโรเมตริกที่มีอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และชั้นของเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์และมีการตรึงเอนไซม์ยูริกเคสบนอิเล็กโทรด โดยให้สัญญาณการฉีดครั้งแรกเป็น 100 % จากนั้นจึงเขียนกราฟระหว่าง

จำนวนครั้งที่ฉีดกับเปอร์เซ็นต์ของสัญญาณที่ได้แล้วหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำที่ได้

4.3.6 ระยะเวลาการทำงานของขั้วไฟฟ้า

ศึกษาอายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัดยูริก โดยทำการเก็บอิเล็กโทรดที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยในแต่ละสัปดาห์จะนำอิเล็กโทรดมาทดสอบการตรวจวัดกรดยูริกภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำความไววิเคราะห์ที่ได้ในแต่ละสัปดาห์มาเปรียบเทียบกัน

4.3.7 ความสามารถในการทำซ้ำได้ในการปรับปรุงผิวขั้วอิเล็กโทรด

ทำการศึกษาโดยการเตรียมขั้วอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และชั้นของเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีการตรึงเอนไซม์ยูริกเนส ทั้งหมด 6 อิเล็กโทรด จากนั้นนำแต่ละอิเล็กโทรดมาต่อเข้ากับระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ นำสัญญาณที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแล้วเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ ที่ได้จากอิเล็กโทรดแต่ละอัน

4.3.8 วิเคราะห์ตัวอย่างจริง

ได้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยในการวิเคราะห์จะทำการเจือจางสารตัวอย่าง 20 เท่าเพื่อลดการรบกวนของสารต่างๆที่อาจปนเปื้อนในตัว และก่อนจะวิเคราะห์ตัวอย่างจริงจะทำการศึกษาสารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างรบกวนการวิเคราะห์หรือไม่ หลังจากเจือจาง 20 เท่า สามารถทำการศึกษาได้ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดยูริก 2 แบบ แบบที่ 1 คือ เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างๆลงไปในตัวตัวอย่างซีรัม และเจือจาง 20 เท่า เพื่อให้ได้ตัวอย่างซีรัมที่มีความเข้มข้นของกรดยูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบนี้เรียกว่า matrix match calibration curve ส่วนแบบที่ 2 จะเป็นการเตรียมสารละลายมาตรฐานปกติ คือ เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำการเจือจาง 20 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเดียวกันกับที่เดิมในซีรัม แบบนี้จะเรียก standard curve โดยช่วงความเข้มข้นของกรดยูริกที่เตรียมทั้งสองแบบ หลังจากเจือจาง 20 เท่า จะอยู่ในช่วงเดียวกัน คือ 0.010 0.015 0.020 0.025 และ 0.030 มิลลิโมลาร์

ทำการวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมขึ้นทั้งหมดด้วยระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดยูริกกับสัญญาณการตอบสนองที่ได้ นำค่าความชัน

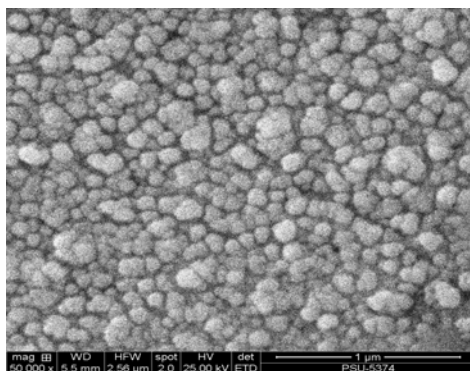
ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วถ้าพบว่าความชันที่ได้จากการพหุคูณสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงจึงสามารถใช้ standard curve ในการวิเคราะห์กรดยูรีนในซีรัม จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงด้วยเทคนิคกรดยูริก โบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธีมาตรฐานเอนไซม์คัลเลอรีเมตริก (enzymatic colorimetric method) ที่ได้จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์ที่เทียบเท่ากับวิธีที่ใช้จริงทางโรงพยาบาล

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลการเตรียมเส้นใยนาโนไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงบนอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่บนอิเล็กโตรดทอง

5.1.1 ผลของเตรียมอนุภาคนาโนซิลเวอร์บนอิเล็กโตรดทอง

อนุภาคนาโนซิลเวอร์บนอิเล็กโตรดที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคการเกาะติดทางเคมีไฟฟ้า ทำการศึกษาคุณลักษณะพื้นที่ผิวด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscopy (SEM) (Quanta 400, FEI) (รูปที่ 4) จากรูป SEM จะเห็นอนุภาคนาโนซิลเวอร์เกาะอยู่บนหัวบริเวณผิวหน้าอิเล็กโตรด เมื่อทำการวัดขนาดอนุภาคนาโนซิลเวอร์ จำนวน 250 อนุภาค พบว่ามีขนาด 80–120 นาโนเมตร



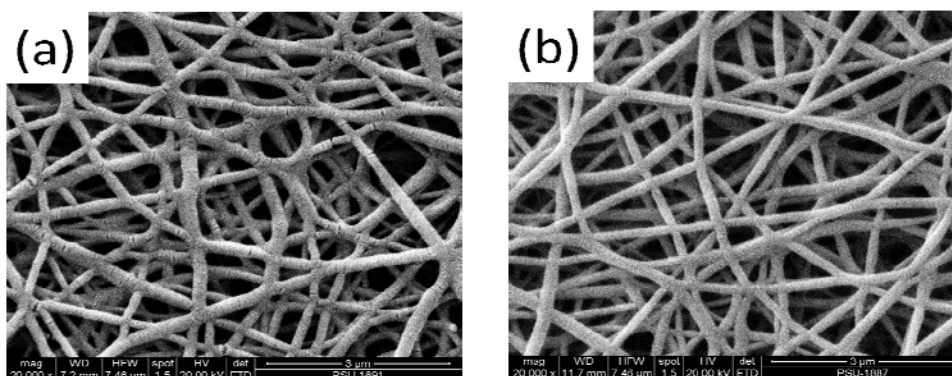
รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของชั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์บนอิเล็กโตรดทองที่เตรียมได้จากการเกาะติดทางเคมีไฟฟ้าด้วยเทคนิคโครโนคูลอมเมตรี

5.1.2 ผลของการเตรียมเส้นใยนาโนไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง

โดยศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซาน (3 % w/v): โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (9% w/v) ที่ 80:20 70:30, 60:40 50:50, และ 40:60 w/w โดยทุกอัตราส่วนจะมีคาร์บอนนาโนทิวป์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากศึกษาคุณลักษณะของเส้นใยนาโนที่อัตราส่วนต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4) พบว่า เมื่ออัตราส่วนของปริมาณไคโตซานสูงจะทำให้ได้ลักษณะเป็นหยด รูปที่ 4 (a) (chitosan: PVA =80: 20 w/w) และเมื่อมีปริมาณของไคโตซานลดลง จะได้หยดที่มีขนาดเล็กลงและมีความเป็นเส้นใยนาโนเพิ่มขึ้น รูปที่ 5 (b)–4 (d) จนกระทั่งที่อัตราส่วนของไคโตซานต่อโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่ 40: 60 w/w จะได้เส้นใยนาโนที่ต่อเนื่องและไม่มีหยดเกิดขึ้น ทั้งนี้ที่ไคโตซานปริมาณสูงทำให้ความหนืดสูง ทำให้ในช่วงขั้นตอนการสปิน สารละลายจะหลุดออกจากปลายเข็มฉีดยากกว่าที่ปริมาณต่ำ ดังนั้นจึงทำให้ได้ลักษณะเป็นเม็ดไม่เป็นเส้นใยนาโน ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า ที่อัตราส่วนของไคโตซานต่อโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่ 40: 60 w/w เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใยนาโน

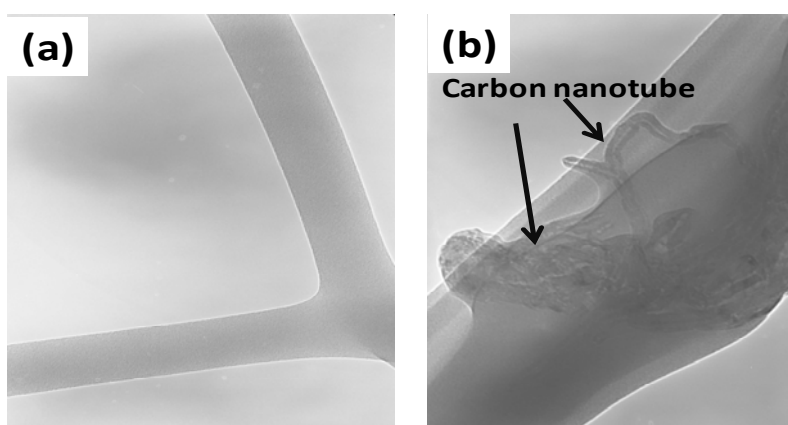
รูปที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเส้นใยนาโนที่เตรียมได้เทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง ของสารละลายผสมไคโตซานและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

เมื่อได้อัตราส่วนของโคโตนานตอโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม คือที่อัตราส่วน 40: 60 w/w จะทำการล้างโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ออกโดยการแช่ด้วย 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นใยนาโนก่อนและหลังแช่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดังรูปที่ 5 พบว่าขนาดของเส้นใยนาโนโดยเฉลี่ยมีขนาดเล็กลงจาก 240 ± 15 เป็น 145 ± 15 นาโนเมตร



รูปที่ 6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเส้นใยนาโนที่เตรียมได้เทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง ของสารละลายผสมโคโตนานตอโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วน 40: 60 (w/w) (a) ก่อน และ (b) หลังแช่ใน 0.5 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 ชั่วโมง

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy (TEM) เพื่อดูมีคาร์บอนนาโนทิวอยู่ภายในเส้นใยนาโนที่เตรียมได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่ามีคาร์บอนนาโนทิวป์ภายในเส้นใยนาโน

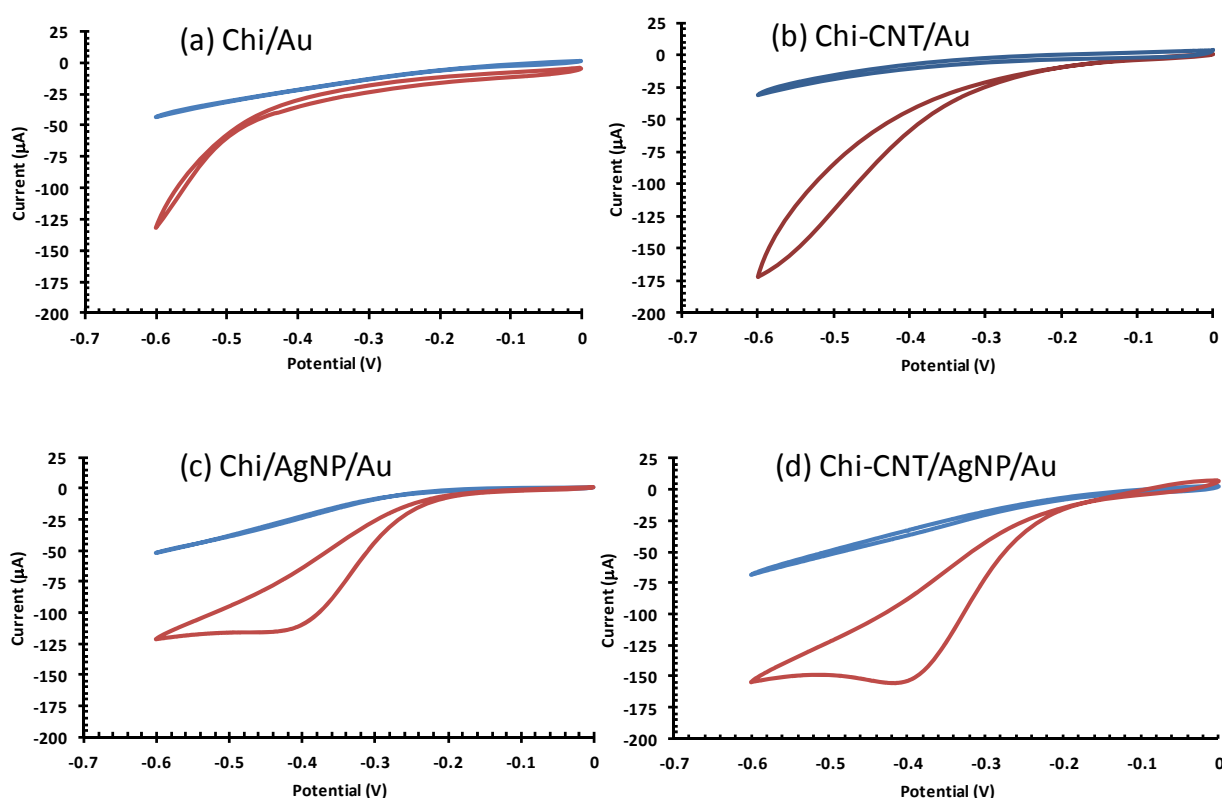


รูปที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เปรียบเทียบเส้นใยนาโน (a) ไม่มี และ (b) มีการเติมคาร์บอนนาโนทิวป์

5.2 ตรวจวัดกรดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

5.2.1 ผลศึกษาการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

ศึกษาศักย์ไฟฟ้าสำหรับปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนเบื้องต้นในระบบ batch โดยใช้อิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงผิว 4 แบบ คือ (1) ปรับปรุงด้วยเส้นใยนาโนไคโตซาน (Chi/Au) (2) ปรับปรุงด้วยเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/Au) (3) ปรับปรุงด้วยชั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์และชั้นเส้นใยนาโนไคโตซาน (Chi/AgNP/Au) และ (4) ปรับปรุงด้วยชั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์และชั้นเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) โดยสแกนศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0.0 โวลต์ ถึง -0.6 โวลต์ ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.00 โดยเริ่มต้นจะทำการเติมแก๊สไนโตรเจนลงไปในสารละลายเป็นเวลา 10 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนจากสารละลาย จากนั้นทำการเติมอากาศเป็นเวลา 5 นาที และเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากอิเล็กโทรดทั้ง 4 แบบ ดังรูปที่ 8



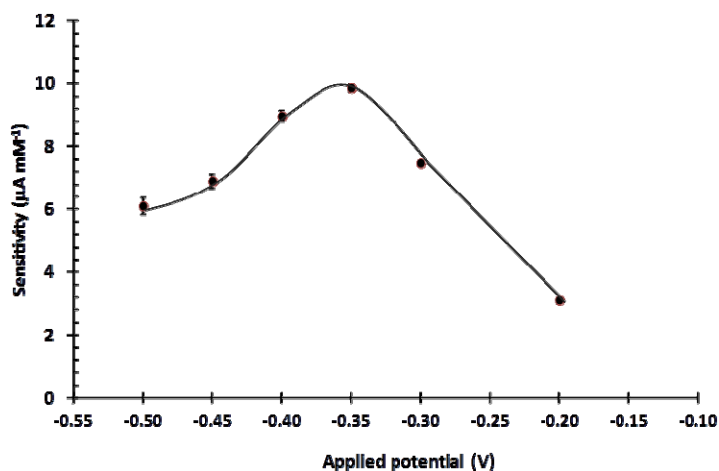
รูปที่ 8 โวลแทมโมแกรมของอิเล็กโทรดทองที่มีการปรับปรุงด้วย (a) Chi/Au (b) Chi-CNT/Au (c) Chi/AgNP/Au และ (d) Chi-CNT/AgNP/Au ต่อสัญญาณการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน

จากผลการทดลองพบว่าอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงผิวด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และเส้นใยนาโนไคโตซาน (Chi/AgNP/Au) รูปที่ 8(c) และ อิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) รูปที่ 8(d) จะพบสัญญาณการเกิดปฏิกิริยารีดักชันอย่างชัดเจน ที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.4 โวลต์ แต่ในกรณีของอิเล็กโทรดที่ไม่มีชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ รูปที่ 8 (a) และ 8 (b) จะไม่ปรากฏพบ ทั้งนี้เนื่องจากการรายงานพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนได้ดี (Wang *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2005) และนอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงผิวด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนไคโตซาน (Chi/AgNP/Au) รูปที่ 4 (c) และ อิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) รูปที่ 4(d) พบว่าในกรณีที่การเติมคาร์บอนนาโนทิวป์ จะให้สัญญาณที่สูงกว่ากรณีที่ไม่มีการเติม ทั้งนี้เนื่องจากคาร์บอนนาโนทิวป์เป็นวัสดุนาโนที่ช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer) ดังนั้นจึงทำให้สัญญาณที่ได้สูงขึ้น (Lee *et al.*, 2006; Manesh *et al.*, 2008; Muasameh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002) ดังนั้นจากผลการศึกษาพบว่าอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงด้วยอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) จะให้สัญญาณการตอบสนองต่อการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อิเล็กโทรดดังกล่าว มาประยุกต์ใช้ทางไบโอเซนเซอร์ เพื่อในการนำมาใช้เพื่อตรึงเอ็นไซม์ยูรีเนสสำหรับตรวจวัดกรดยูริกด้วยระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

5.2.2 การตรวจวัดกรดยูริกด้วยระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

5.2.2.1 ผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี

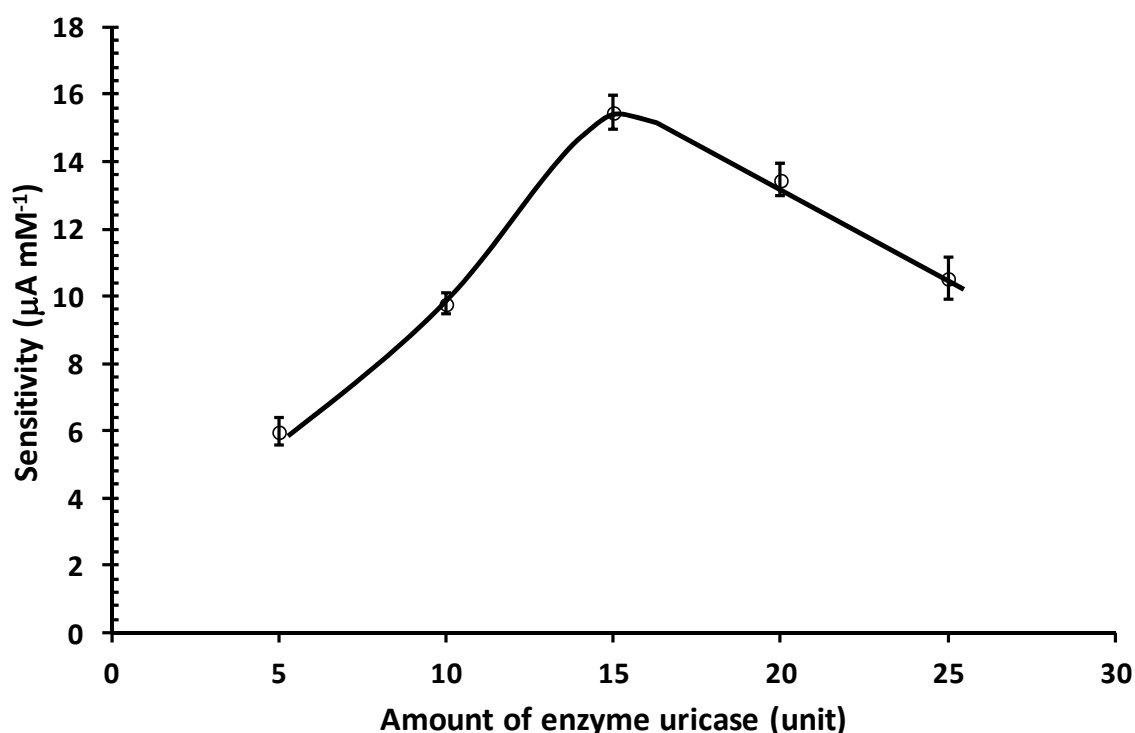
จากผลการทดลองที่ได้จาก ข้อ 5.2.1 อิเล็กโทรดที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) ถูกนำมาใช้เพื่อตรึงเอ็นไซม์ยูรีเนส โดยเบื้องต้นใช้ปริมาณเอ็นไซม์ เข้มข้น 2 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ปริมาณเอ็นไซม์ 10 หน่วย) และจากโซดิกคลอไรด์โมแกรมที่ได้จากหัวข้อ 5.2.1 พบว่าออกซิเจนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ -0.20 ถึง -0.50 โวลต์ จึงเลือกศักย์ไฟฟ้า ช่วง -0.20 ถึง -0.5 โวลต์ ในการศึกษา ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทรี ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 9 จะเห็นได้ว่า ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 โวลต์ ให้ค่าความไววิเคราะห์ต่อการตรวจวัดกรดยูริกได้สูงสุด ดังจึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ -0.35 โวลต์ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 9 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อการตรวจวัดกรดยูริกโดยวัดจากการปฏิกิริยารีดักชันของการลดลงของออกซิเจนที่ใช้ในการเกิดออกซิเดชันของกรดยูริกไอโซเอ็นไซม์ยูรีเคส โดยมีสภาวะในการทดลองคือ ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปริมาตรตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร และใช้อัตราการไหลของสาร 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที

5.2.2.2 ผลของปริมาณเอนไซม์ยูรีเคสที่ตรึงบนผิวอิเล็กโทรด

จากการศึกษาปริมาณการตรึงเอ็นไซม์บนผิวของอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงด้วยปรับปรุงด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ (Chi-CNT/AgNP/Au) ที่ ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หรือคิดเป็นปริมาณเอ็นไซม์ยูรีเคสได้ 5 10 15 20 และ 25 ยูนิต ตามลำดับ พบว่าที่ 25 ยูนิต จะให้ค่าความไวเคราะห์ของการวิเคราะห์สูงที่สุด (รูปที่ 10) แต่เมื่อปริมาณเอ็นไซม์มากขึ้นจะทำให้ความไววิเคราะห์ลดลงต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป อาจทำให้อิเล็กโทรดมีความหนาเพิ่มขึ้นส่งผลให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนบริเวณหัวไฟฟ้าเกิดได้ยากขึ้น ค่าความไววิเคราะห์จึงต่ำลง (Liu et al.,2006)

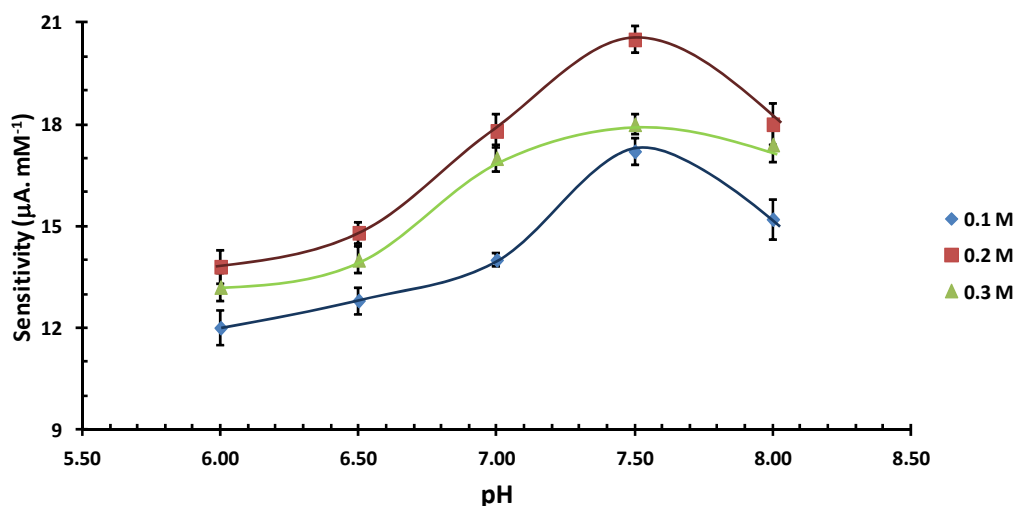


รูปที่ 10 ผลของปริมาณเอ็นไซม์ยูริเคสที่ถูกตรึงบนอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ ที่มีต่อความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดกรดยูริก โดยฉีดสารละลายมาตรฐานยูริกที่มีความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปริมาตรตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร และใช้อัตราการไหลของสาร 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 โวลต์

5.2.2.3 ผลของพีเอชและความเข้มข้นของสารละลายตัวพา

โดยในการทดลองนี้ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายตัวพา ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นและพีเอชควบคู่กัน โดยศึกษาผลของความเข้มข้นที่ 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ และที่ทุกความเข้มข้นจะทำการศึกษาที่ พีเอช 6.00 6.50 7.00 7.50 และ 8.00 ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 11 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์จะให้ความไววิเคราะห์ที่สูงที่สุด และพบว่าที่ทุกความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ เมื่อพีเอชสูงขึ้น ความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดกรดยูริกจะมีค่าสูงขึ้น จนกระทั่งที่ พีเอช 7.50 แต่เมื่อพีเอชสูงขึ้น พีเอช 8.00 ให้ความไววิเคราะห์ที่ต่ำลง ทั้งนี้ เนื่องจากกรดยูริกมีโครงสร้างหลาย

โครงสร้างขึ้นอยู่กับพีเอช ซึ่งการแตกตัวของยูริกที่พีเอชสูงอาจมีผลต่อค่าความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดกรดยูริก

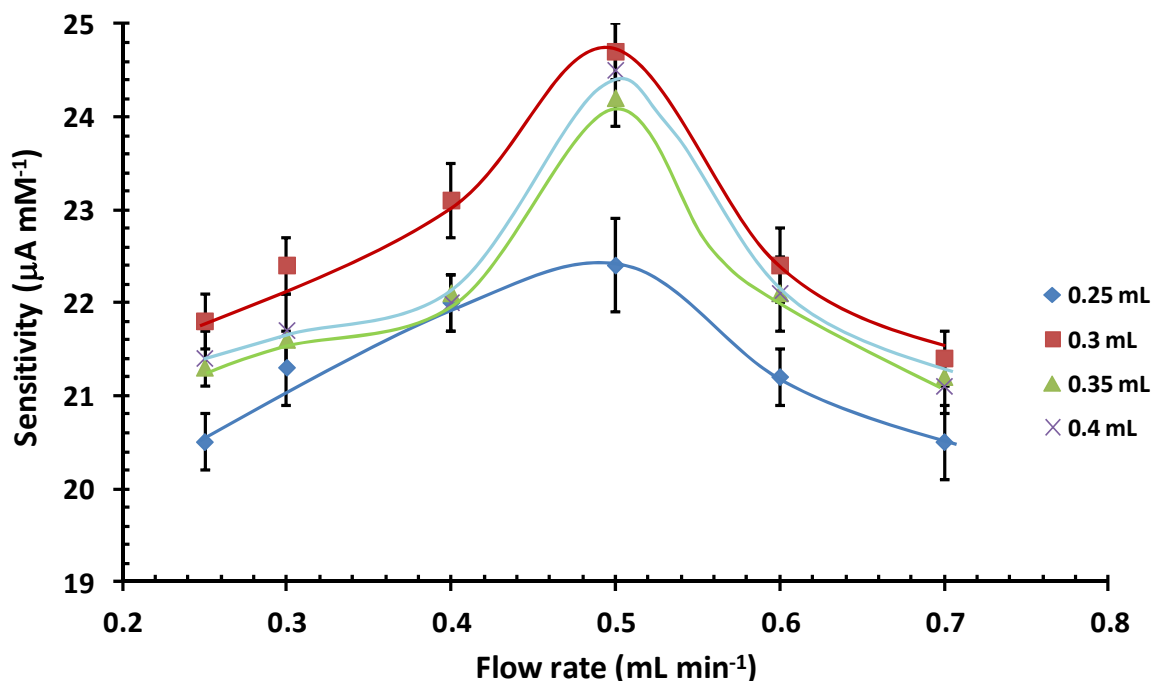


รูปที่ 11 ผลของความเข้มข้นและพีเอชของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อความไววิเคราะห์ในการตรวจวัดกรดยูริกโดยฉีดสารละลายมาตรฐานยูริกที่ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปริมาตรตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร และใช้อัตราการไหลของสาร 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 โวลต์

5.2.2.4 ปริมาตรและอัตราการไหลของสารตัวอย่าง

ศึกษาอัตราการไหลและปริมาตรของสารตัวอย่างควบคู่กัน โดยจะทำการศึกษาที่อัตราการไหล 0.25 0.3 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที และที่ทุกอัตราการไหลจะศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่าง ที่ 250 300 และ 400 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำความไววิเคราะห์ไปเปรียบเทียบ เพื่อหาปริมาตรและอัตราการไหลของสารตัวอย่างที่เหมาะสม จากผลการทดลองพบว่าปริมาตรที่เหมาะสมของสารตัวอย่างคือ 300 ไมโครลิตร ดังรูปที่ 12 จากผลของอัตราไหลพบว่าเมื่ออัตราไหลเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.25 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้ค่าความไววิเคราะห์สูงขึ้น แต่หลังจาก 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าความไววิเคราะห์จะลดลง ทั้งนี้ที่อัตราการไหลที่ต่ำกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที สารเกิดการแพร่ได้ช้าทำให้สารตัวอย่างเกิดการเจือจางได้ ส่วนที่อัตราเร็วที่สูงกว่า 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที สารอาจจะเคลื่อนที่ได้เร็วทำให้ปฏิกิริยา

ระหว่างกรดยูริกและเอ็นไซม์เกิดไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อให้ค่าความไววิเคราะห์สูงและใช้เวลาสั้น จึงเลือกใช้ อัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ปริมาตรกรดยูริก 300 ไมโครลิตร

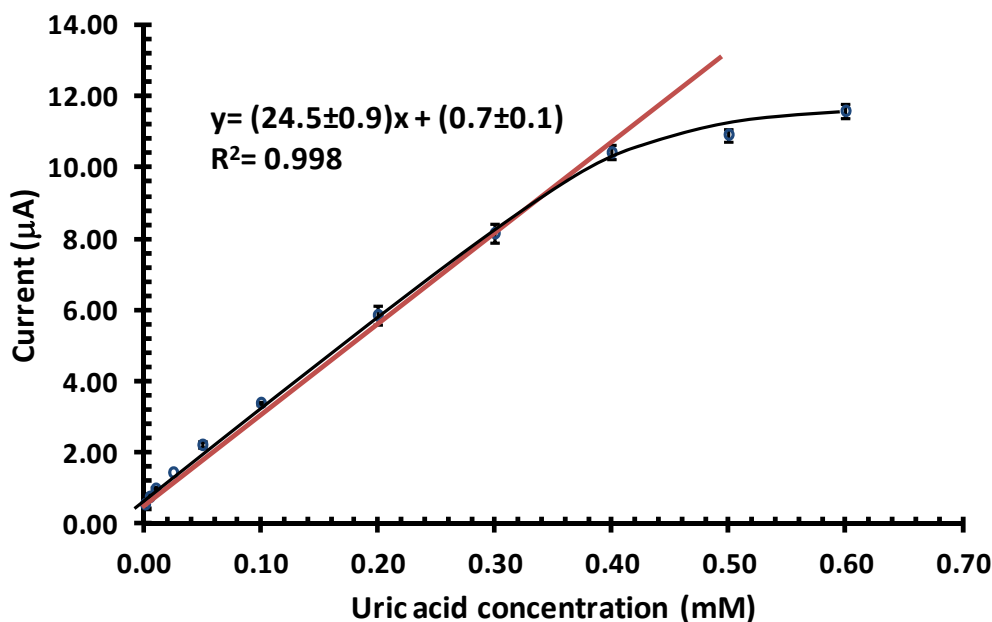


รูปที่ 12 ผลของปริมาตรและอัตราการไหลของสารตัวอย่างที่มีผลต่อความไววิเคราะห์ในการตรวจวัด กรดยูริกโดยฉีดสารละลายมาตรฐานยูริกที่ความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำ การตรวจวัดที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 โวลต์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดกรดยูริกด้วยระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโร เมทรี สามารถสรุปได้ว่า ปริมาณเอ็นไซม์ยูรีเอสในการตึงบนอิเล็กโทรด 15 ยูนิต ศักย์ไฟฟ้าที่ป้อน -0.35 โวลต์ ใช้ 0.2 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.50 เป็นสารละลายตัวพา ปริมาตรในการฉีด สารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร และอัตราการไหลของสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

5.2.3 ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัด

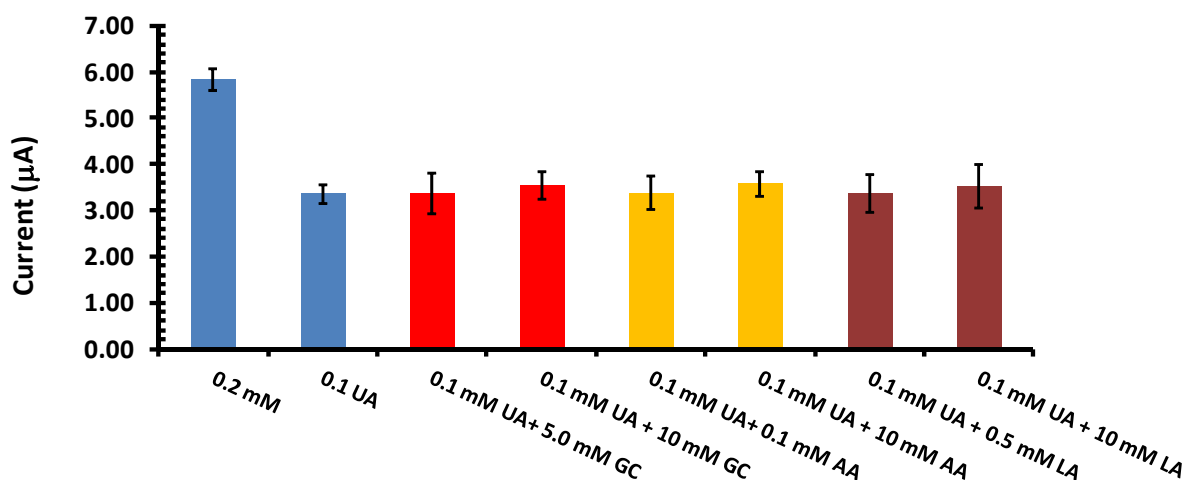
หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมของการทดลองในระบบโพลีอินเจคชันแอมเพอโรเมทริกแล้ว จึงใช้ สภาวะดังกล่าวในการศึกษาช่วงการตอบสนองเชิงเส้นตรงและขีดจำกัดในการตรวจวัด โดยการฉีด



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดยูริกในระบบโพลีวินิเจนเซนแอมเพอโรเมทรี ช่วงความเข้มข้น 0.01 mM ถึง 0.6 มิลลิโมลาร์ ในระบบโพลีวินิเจนเซนแอมเพอโรเมทรี ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

5.2.4 ความสามารถในการเลือก (selectivity) ของอิเล็กโทรด

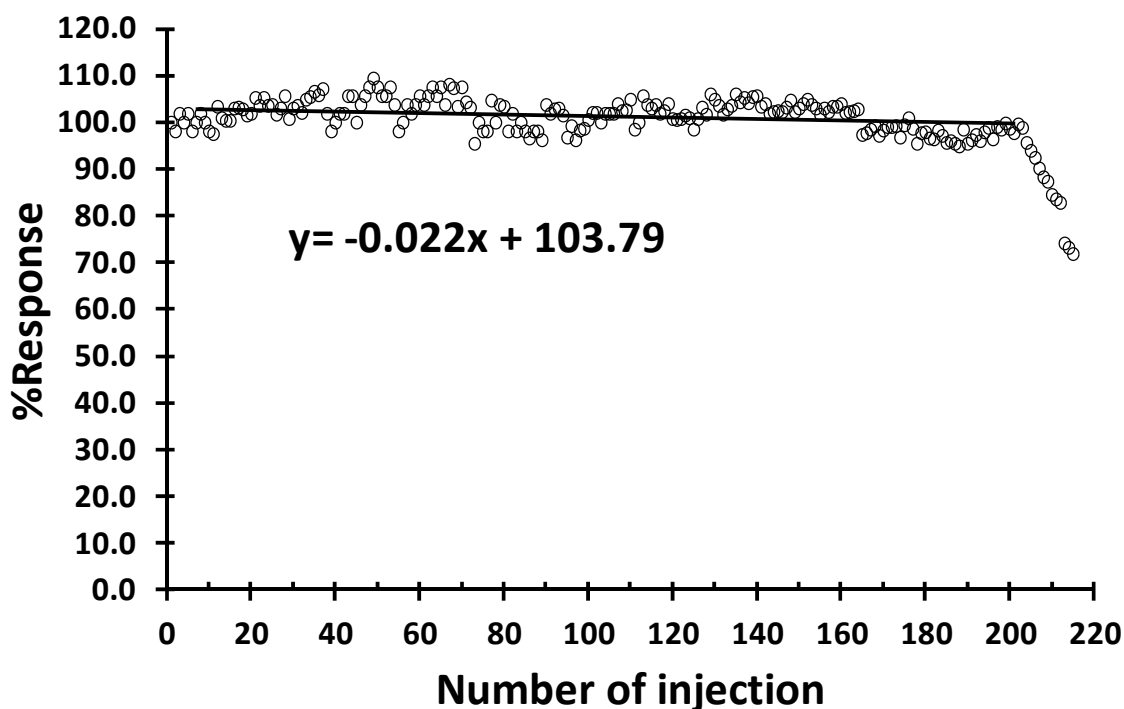
ศึกษาความสามารถในการเลือกของอิเล็กโทรดในระบบแอมเพอโรเมทรีสำหรับการตรวจวัดกรดยูริก ในการทดสอบจึงทดสอบสารที่มีอยู่ในตัวอย่างซีรัม เช่น กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AA) น้ำตาลกลูโคส (Glucose, GC) และกรดแลกติก (lactic acid, LA) โดยเติมสารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นปกติที่มีอยู่ในซีรัม และที่ความเข้มข้นสูงกว่ากรดยูริก 100 เท่า ผสมกับสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงได้ดังรูป 14 จะเห็นได้ว่า สัญญาณที่ได้จากการผสมสารดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก 0.1 มิลลิโมลาร์กรดยูริก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เอ็นไซม์ยูรีเอสที่ตรึงบนอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงด้วยชั้นของอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ มีความจำเพาะเจาะจงต่อกรดยูริก



รูปที่ 15 สัญญาณของเอ็นไซม์ยูรีเอสที่ตรึงบนอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์สำหรับการวิเคราะห์กรดยูริก และการผสมของกรดยูริกกับกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AA) น้ำตาลกลูโคส (Glucose, GC) และกรดแลกติก (lactic acid, LA) โดยทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

5.2.5 ความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้า

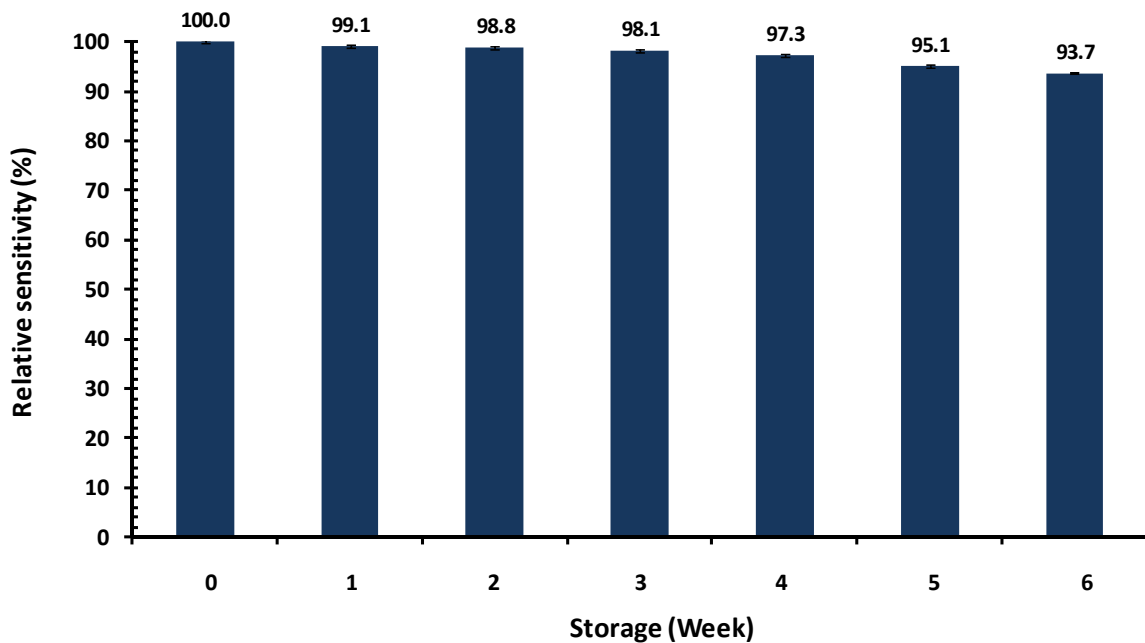
เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้ จึงศึกษาความเสถียรของอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีการตรึงเอ็นไซม์ยูรีเอส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ต่อเนื่องหลายครั้ง จากการศึกษาพบว่าอิเล็กโทรดสามารถใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ 205 ครั้ง (รูปที่ 16) โดยที่ค่าเฉลี่ยของ % สัญญาณการตอบสนองอยู่ที่ 98 ± 3 % สัญญาณการตอบสนองที่ได้ยังอยู่ในช่วง ± 10 % (T_{L10}) (Thverniers et al., 2004) ของสัญญาณการตอบสนองที่ได้จากการฉีดครั้งแรก การลดลงของสัญญาณจากการฉีดแต่ละครั้งมีค่าเพียง 0.022% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ยูรีเอสที่ตรึงบนอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่พัฒนาขึ้นมีเสถียรภาพสูงและให้ค่าการทำซ้ำที่ดี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 3%)



รูปที่16 ความเสถียรในการใช้งานของเอ็นไซม์ยูริเคสที่ตรึงบนอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกความเข้มข้น 0.1 มิลลาร์

5.2.6 ระยะเวลาการใช้งานของอิเล็กโทรด

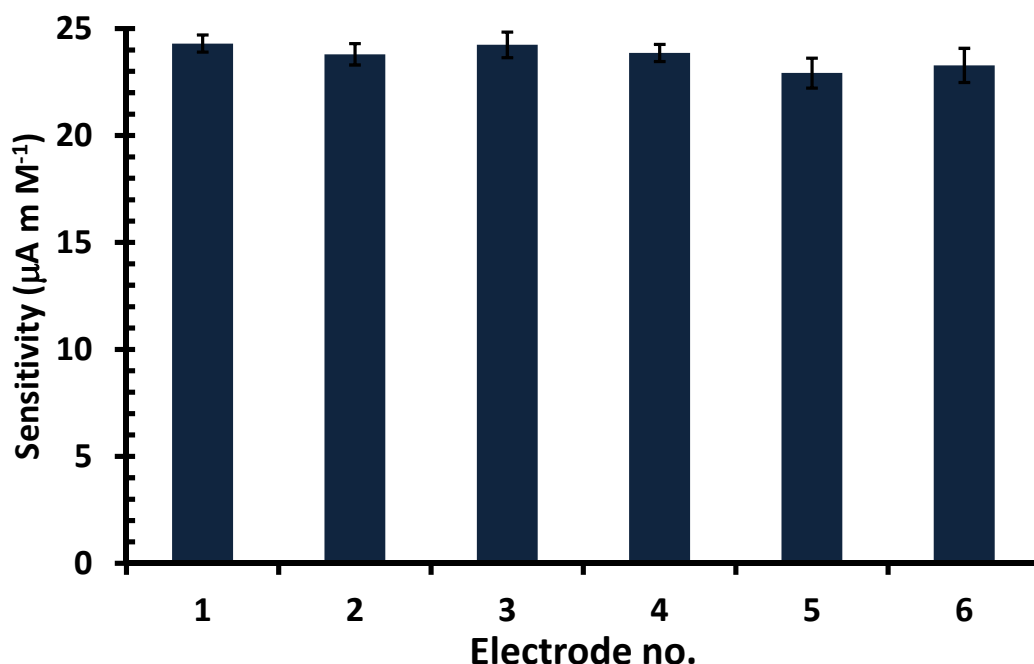
ศึกษาอายุการใช้งานของอิเล็กโทรดสำหรับการตรวจวัดยูริก โดยทำการเก็บอิเล็กโทรดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยในแต่ละสัปดาห์จะนำอิเล็กโทรดมาทดสอบการตรวจวัดกรดยูริกภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาอิเล็กโทรดที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่สัปดาห์ที่ 6 ยังคงให้ค่าความไววิเคราะห์ 93.7 % หรือลดลงเพียง 6.3 % เมื่อเทียบกับความไววิเคราะห์ที่ได้จากการเตรียมอิเล็กโทรดแล้วนำมาใช้เลย (0 สัปดาห์) จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าอิเล็กโทรดสามารถเก็บรักษาได้ถึง 6 สัปดาห์



รูปที่ 17 ผลของเก็บรักษาอิเล็กทรอนิกส์ที่ปรับปรุงผิวด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์และเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่ตรึงเอ็นไซม์ยูริกเอส ที่มีผลต่อความไววิเคราะห์ของการตรวจวัดกรดยูริก

5.2.7 ความสามารถในการทำซ้ำได้ในการปรับปรุงผิวขั้วอิเล็กทรอนิกส์

จากการเตรียมขั้วอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการปรับปรุงด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และชั้นของเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีการตรึงเอ็นไซม์ยูริกเอส ทั้งหมด 6 อิเล็กโทรด โดยแต่ละอิเล็กโทรดวิเคราะห์ด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดยูริกความเข้มข้น 0.05–0.2 มิลลิโมลาร์ แล้วเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ ดังรูปที่ 18 ความไววิเคราะห์ที่ได้จากอิเล็กโทรดแต่ละอัน ทั้ง 6 อัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)



รูปที่ 18 ความไววิเคราะห์ที่ได้จากการเตรียมขั้วอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และชั้นของเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีการตรึงเอนไซม์ยูริกเคส ทั้งหมด 6 อิเล็กโทรด

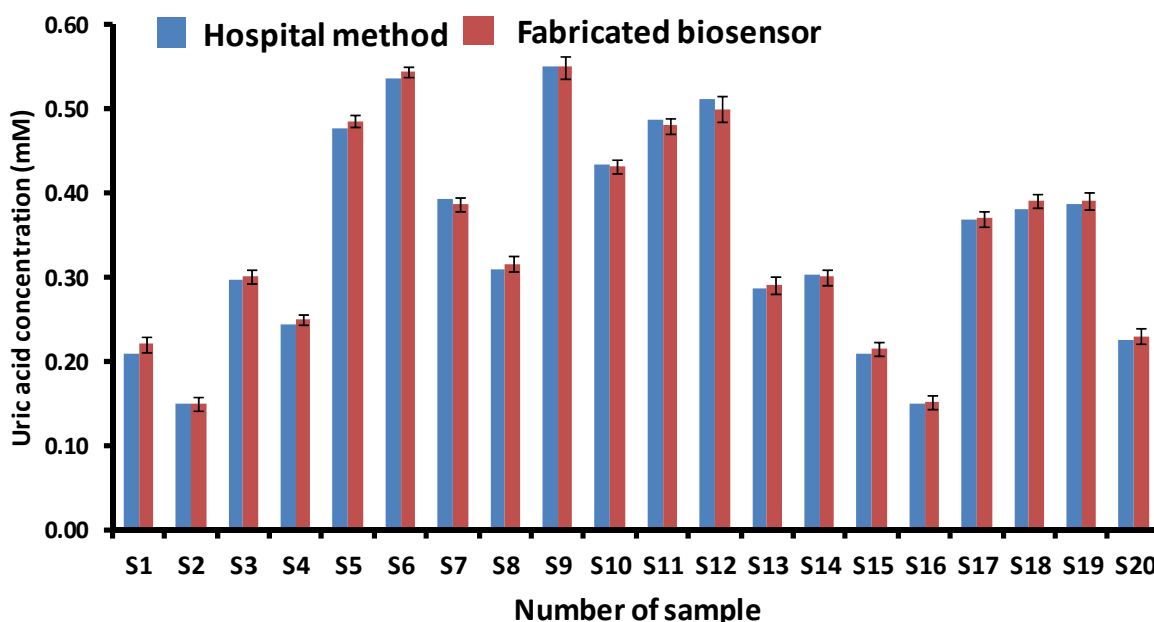
5.2.8 วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของกรดยูริกในตัวอย่างซีรัม

เพื่อยืนยันว่าขั้วอิเล็กโทรดที่มีการปรับปรุงด้วยชั้นของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และชั้นของเส้นใยนาโนคอมโพสิตของไคโตซานและคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีการตรึงเอนไซม์ยูริกเคสที่พัฒนาขึ้น สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้ จึงได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยในการวิเคราะห์จะทำการเจือจางสารตัวอย่าง 20 เท่าเพื่อลดการรบกวนของสารต่างๆที่อาจปนเปื้อนใน และจากการศึกษาผลของตัวรบกวนอื่นที่มีในตัวอย่างหลังจากเจือจางลง 20 เท่า โดยการเปรียบเทียบความชันที่ได้จาก matrix matched calibration curve กับ standard calibration curve โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าความชันด้วยเทคนิค two way ANOVA โดยใช้โปรแกรม R (R Development Core Team, 2006) พบว่าค่าความชันของกราฟมาตรฐานทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงว่าหลังจากเจือจางตัวอย่าง 20 เท่า องค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์กรดยูริก ดังนั้นในการวิเคราะห์กรดยูริกในตัวอย่างซีรัมจึงใช้ standard calibration curve

จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์กรดยูริกในซีรัม 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเอนไซเมติกัลเลอริเมทริก (enzymatic colorimetric method) ซึ่งระดับความเข้มข้นของกรดยูริกในซีรัมพบอยู่ในช่วง 0.15–0.55 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 19 โดยได้ทดสอบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่จากทั้งสองวิธี ด้วยวิธี Wilcoxon signed test พบว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองให้ผลที่สอดคล้องกัน ($P>0.05$)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของกรดยูริกที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐานเอนไซเมติกัลเลอริเมทริก (enzymatic colorimetric method)

No. Sample	Uric acid concentration (mM)	
	Hospital	Biosensor
1	0.21	0.22±0.01
2	0.15	0.15±0.008
3	0.30	0.30±0.008
4	0.24	0.25±0.006
5	0.48	0.49±0.007
6	0.54	0.55±0.006
7	0.39	0.39±0.008
8	0.31	0.32±0.009
9	0.55	0.55±0.01
10	0.43	0.43±0.008
11	0.49	0.48±0.009
12	0.51	0.50±0.015
13	0.29	0.29±0.01
14	0.30	0.30±0.009
15	0.21	0.22±0.008
16	0.15	0.15±0.008
17	0.37	0.37±0.009
18	0.38	0.39±0.008
19	0.39	0.39±0.01
20	0.23	0.23±0.01



รูปที่ 19 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของกรดยูริกที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐานเอนไซม์เมติกัลเลอริเมตริก (enzymatic colorimetric method)

6. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสรุปได้ว่าผลการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้คือได้การปรับปรุงผิวอิเล็กโทรด (modified electrode) ด้วยการเตรียมเส้นใยนาโนของไคโตซานร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวป์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงบนอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่อยู่บนขั้วไฟฟ้าทอง เพื่อใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับการประยุกต์ใช้ทางไบโอเซนเซอร์ โดยนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ยูริเคส เพื่อตรวจวัดกรดยูริกในซีรัม ให้ช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรงต่อกรดยูริกตั้งแต่ 0.001–0.4 มิลลิโมลาร์ และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ 1.0 ไมโครโมลาร์ โยมีเสถียรภาพในการใช้งานดี สามารถวิเคราะห์กรดยูริกได้อย่างต่อเนื่อง 205 ครั้ง โดยที่เปอร์เซ็นต์การลดลงของการฉีดแต่ละครั้งมีค่าเพียง 0.022 % ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน 4 นาที มีความสามารถในการเลือก (selectivity) สูง และจำเพาะเจาะจงต่อกรดยูริก นอกจากนี้จากค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดที่มีค่าต่ำ ในการวิเคราะห์กรดยูริกในตัวอย่างซีรัม สามารถลดสัญญาณของตัวรบกวนได้โดยการเจือจางสารตัวอย่างลง 20 เท่า และจากผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของกรดยูริกในตัวอย่างซีรัม

โดยใช้ระฟโพลวอินเจคชันแอมเพอโรเมทรีพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานเอนไซเมติกัลเลอริเมทริก (enzymatic colorimetric method) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในโรงพยาบาล ($P>0.05$)

6.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดยูริกในทางเคมีคลินิกได้ แต่เนื่องจากเครื่องมือมีขนาดใหญ่ จึงยังเป็นการตรวจวัดในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจจะพัฒนาให้ขนาดเล็กลงได้ และนอกจากนี้อิเล็กโทรดที่ใช้เป็นอิเล็กโทรดซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงซึ่งอาจจะใช้อิเล็กโทรดที่มีราคาถูกลง และมีขนาดเล็กลงได้ เช่น สกรีนพริ้นต์อิเล็กโทรด (screen print electrode) ซึ่งเป็นอิเล็กโทรดขนาดเล็ก และเหมาะกับการใช้งานแบบใช้แล้วทิ้ง (disposable electrode)

7. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน สกว.

7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

1. Numnuam. A, Thavarungkul, P, Kanaharanna, P. An Amperometric Uric Acid Biosensor based on Chitosan–Carbon Nanotube Electrospun Nanofiber/ Silver Nanoparticle ดังแสดงในภาคผนวกที่ 1 ((คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ ใน Electrochimica Acta (impact factor 3.832) ช่วง เดือน มิถุนายน 2556)

7.2 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการแบบโปสเตอร์

1. Numnuam. A, Thavarungkul, P, Kanaharanna, P. “An Amperometric Uric Acid Biosensor based on Chitosan–Carbon Nanotube Electrospun Nanofiber/ Silver Nanoparticle”. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 12 ณ Holiday Inn Regent Beach Cha-Am, Petchburi, Thailand. 10–12 October 2012.

เอกสารอ้างอิง

- Chen, Y.-C., Young, R. J., Macpherson, J. V., Wilson, N. R. 2007. Single-Walled Carbon Nanotube Networks Decorated with Silver Nanoparticles: A Novel Graded SERS Substrate. *The Journal of Physical Chemistry C*. **111**: 16167–16173.
- Huang, X.-J., Ge, D., Xu, Z.-K. 2007. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*. **43**: 3710–3718.
- Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., Dong, S. Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21 (12), 2195–2201.
- Lee, K.-P., Gopalan, A. I., Santhosh, P., Manesh, K. M., Kim, J. H., and Kim, K. S. 2006. Fabrication and Electrocatalysis of Self-Assembly Directed Gold Nanoparticles Anchored Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **6**, 1575–1583
- Manesh, K. M., Kim, H. T., Santhosh, P., Gopalan, A. I., and Lee, K.-P. 2008. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase into multiwall carbon nanotubes–polyelectrolyte–loaded electrospun nanofibrous membrane. *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 771–779.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., and Lin, Y. 2002. Low-potential stable NADH detection at carbon–nanotube–modified glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications* **4**, 743–746.
- Wang, J., Li, M., Shi, Z., Li, N., and Gu, Z. 2002. Direct Electrochemistry of Cytochrome c at a Glassy Carbon Electrode Modified with Single-Wall Carbon Nanotubes. *Analytical Chemistry* **74**, 1993–1997.