



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรล
และอนุพันธ์บนอิเล็กโทรดทองคำขนาดไมโคร

Fabrication of Glucose Sensor by Immobilizing Enzyme into Polypyrrole and
Derivative on Au Microelectrode

ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพร์โรล

และอนุพันธ์บนอิเล็กโทรดทองคำขนาดไมโคร

Fabrication of Glucose Sensor by Immobilizing Enzyme into Polypyrrole

and Derivative on Au Microelectrode

ดร.อรรณ ชัยลภากุล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF/85/2540

ชื่อโครงการ: การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลและอนุพันธ์บนอิเล็กโทรดทองขนาดไมโคร

E-mail Address: corawon@chula.ac.th

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย: 2 ปี

งานวิจัยนี้ได้สร้างอิเล็กโทรดขนาดไมโคร และอิเล็กโทรดขนาดใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เพื่อใช้เตรียมกลูโคสเซนเซอร์ ได้ใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าทำการโพลีเมอร์ไรซ์ในสารละลายที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและไพโรลบนอิเล็กโทรดทอง และได้ทำการปรับปรุงเซนเซอร์นี้ โดยการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน เพื่อให้สามารถทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่า 0.7 โวลต์ ซึ่งทำให้สามารถหลีกเลี่ยงตัวรบกวนได้ สำหรับการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ บนอิเล็กโทรดขนาดไมโคร ได้ตรงไปขณะเดียวกับที่ทำการโพลีเมอร์ไรซ์ไพโรล แต่สำหรับการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ได้ทำการตรึง nafion ที่มีประจุลบก่อน แล้วจึงตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ที่มีประจุบวก แล้วจึงทำการโพลีเมอร์ไรซ์สารละลายที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและไพโรล ได้ตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมกลูโคสเซนเซอร์ ตัวแปรที่ทำการศึกษาคือ ปริมาณไฟฟ้าที่ใช้สำหรับการเตรียมฟิล์ม ความเข้มข้นของไพโรล ความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์ ปริมาณของ nafion และปริมาณของ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ นอกจากนี้ได้ทำการทดลองหาปริมาณน้ำตาลมาตรฐานที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่า 0.7 โวลต์ ศึกษาเวลาในการตอบสนองและความเสถียรของกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรี งานที่จะทำต่อจากนี้คือใช้ระบบ Flow injection Analysis เข้ามาช่วยให้เวลาในการทดลองน้อยลง และวัดปริมาณกลูโคสได้ต่ำลง

คำสำคัญ: โพลีไพโรล กลูโคสเซนเซอร์, ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน แอมเพอโรเมทรี

Abstract

Project Code: PDF/85/2540

Project Title: Fabrication of Glucose Sensor by Immobilizing Enzyme into Polypyrrole and Derivative on Au Microelectrode

E-mail Address: corawon@chula.ac.th

Project period: 2 years

In this research, microelectrodes and macroelectrodes with diameters of 4 millimeters were fabricated for the preparation of glucose sensors. The electrochemical technique was used to polymerize pyrrole on a gold microelectrode in the presence of the enzyme glucose oxidase. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ or $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ were used as electron mediators instead of oxygen so that glucose can be determined at potentials lower than +0.7 V to avoid the problem of interference. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ was co-immobilized into the polypyrrole films during the electrochemical polymerization process. For $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$, the electrode was modified with nafion prior $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ treatment, then electrochemical polymerization of pyrrole in the presence of the enzyme glucose oxidase was carried out. The optimum conditions for the preparation of the glucose sensor were investigated. Variation in charge passed during polymerization, pyrrole concentration, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ / $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ loading and amount of nafion were studied. Moreover, these electrodes were used to determine glucose at potentials lower than +0.7 V. Response time and stability of these glucose sensors also were studied using amperometry. In further work, flow injection analysis will be attempted to reduce the experimental time and to improve detection limit.

Keywords: POLYPYRROLE, GLUCOSE SENSOR, MEDIATOR, AMPEROMETRY

Executive Summary

วัตถุประสงค์

1. สร้างอิเล็กโทรดขนาดไมโคร และอิเล็กโทรดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร
2. เตรียมกลูโคสเซนเซอร์ โดยตรึงเอนไซม์ลงในฟิล์มพอลิเมอร์ที่นำไฟฟ้า ซึ่งทำการปรับปรุงโดยการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน เช่น $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ บนอิเล็กโทรดขนาดไมโคร และใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ บนอิเล็กโทรดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เพื่อให้สามารถทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่า 0.7 โวลต์ ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงตัวรบกวนได้
3. ทดสอบคุณภาพและความสามารถของกลูโคสเซนเซอร์นี้ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส

การดำเนินงานวิจัย และผลงานวิจัยที่ได้รับอย่างย่อ ๆ

1. สามารถสร้างอิเล็กโทรดขนาดไมโคร และอิเล็กโทรดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรได้ และได้ทำการตรวจสอบทางเคมีไฟฟ้าเพื่อหาศักย์ของอิเล็กโทรด นอกจากนี้ได้ทดลองนำอิเล็กโทรดขนาดทั้งสองขนาดนี้มาใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ให้ค่า i_{pa} ใกล้เคียงค่า i_{pc} และค่า Formal potential ได้เท่ากับ 0.269 V vs Ag/AgCl
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยตรึงเอนไซม์ลงในฟิล์มพอลิเมอร์ที่นำไฟฟ้า ซึ่งทำการปรับปรุงโดยการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ บนอิเล็กโทรดขนาดไมโคร และใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ บนอิเล็กโทรดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ทำการตรวจสอบที่แสดงให้เห็นว่ามีสารประกอบรีดอกซ์นี้ ตรึงอยู่ในฟิล์มพอลิเมอร์ สำหรับการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ บนอิเล็กโทรดขนาดไมโคร ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกลูโคสเซนเซอร์นี้ โดยทำการศึกษาปริมาณไฟฟ้า ความเข้มข้นของไพโรล ความเข้มข้นของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ที่ค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรด จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ ปริมาณไฟฟ้าที่ทำให้เกิดความหนาของฟิล์ม 0.1 ไมครอน ความเข้มข้นของไพโรลที่เหมาะสมที่สุด (ให้สัญญาณกระแสตอบรับที่มีต่อกลูโคสสูงที่สุด) คือ 40 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติต่าง ๆ เช่น ความเสถียร เวลาที่ใช้ในการตอบสนอง ของอิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นมาได้ พบว่าอิเล็กโทรดไม่เสถียรอย่างที่คาดไว้ เวลาที่ใช้ในการตอบสนองค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองลองใช้ ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนชนิดอื่น เช่น $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$

3. สำหรับการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ซึ่งจะให้ไอออนประจุบวก เมื่ออยู่ในน้ำ ดังนั้นวิธีดรีมบนอิเล็กโทรด จึงแตกต่างจากการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ บนอิเล็กโทรดขนาดไมโคร จำเป็นต้องใช้อิเล็กโทรดขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร) เพื่อจะได้มีพื้นที่มากพอที่จะยึด nafion ที่มีประจุลบ แล้วจึงยึด $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ที่มีประจุบวก แล้วจึงทำการโพลีเมอร์ไรซ์ และดรีมกลูโคสออกซิเดส ได้ใช้อิเล็กโทรดที่เตรียมได้นี้ทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ตรวจสอบความไวและความเสถียร จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการดรีมกลูโคสออกซิเดสที่มีความเข้มข้น 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสามารถวัดปริมาณกลูโคสที่ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำ คือ 0.4 โวลต์ ใช้เวลาในการตอบสนอง 80 วินาที ความไว 9.0×10^{-10} แอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ มีเสถียรภาพมากกว่า 16 วัน นอกจากนี้ยังสามารถวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ได้ถึง 1.5 มิลลิโมลาร์

บทนำ

การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดเป็นสิ่งสำคัญในการวินิจฉัยโรคบางชนิด เช่น โรคเบาหวาน ซึ่งการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยมีความสำคัญมาก จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการตรวจสอบปริมาณกลูโคสในตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ เชื่อถือได้ และสามารถหลีกเลี่ยงสิ่งรบกวนต่าง ๆ ที่ปนมากับเลือด เช่น catechol, uric acid, paracetamol และ ascorbate

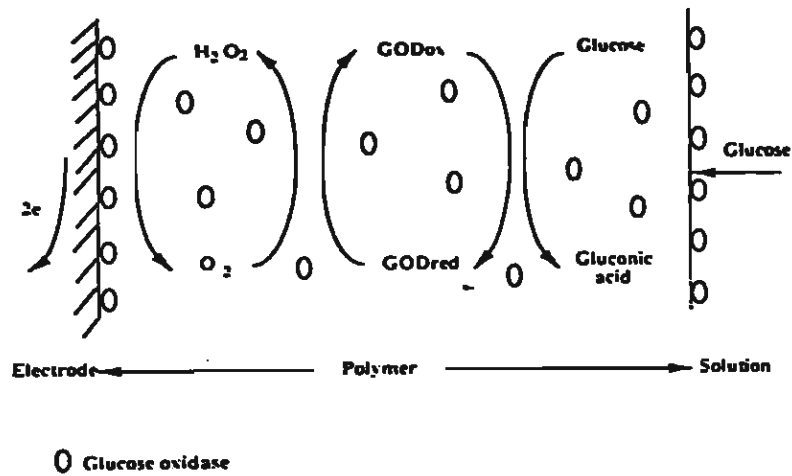
กลูโคสจัดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดส์ เช่น cupric hydroxide จึงสามารถนำไปตรวจสอบได้ด้วยวิธี Fehling's test และ Benedict's test ซึ่งวิธีการเหล่านี้ใช้ตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสที่มีปริมาณมาก ในการวิเคราะห์สารละลายที่มีปริมาณกลูโคสน้อยไม่สามารถใช้วิธีการเหล่านี้ได้ จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการตรวจสอบ เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าก็นับว่าเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นให้มีความจำเพาะเจาะจงกับการวิเคราะห์อย่างมาก โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า กลูโคสเซนเซอร์

กลูโคสเซนเซอร์เป็นอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารตัวอย่าง หลักการพื้นฐานคือ มีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ขั้วอิเล็กโทรดทำงาน เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกลูโคสที่เป็นซับสเตรตได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็น electroactive species เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้ากับอิเล็กโทรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดส์และให้สัญญาณซึ่งจะถูกตรวจจับด้วยเครื่องมือทางเคมีไฟฟ้า โดยที่สัญญาณดังกล่าวจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารตัวอย่างดังแสดงในสมการ



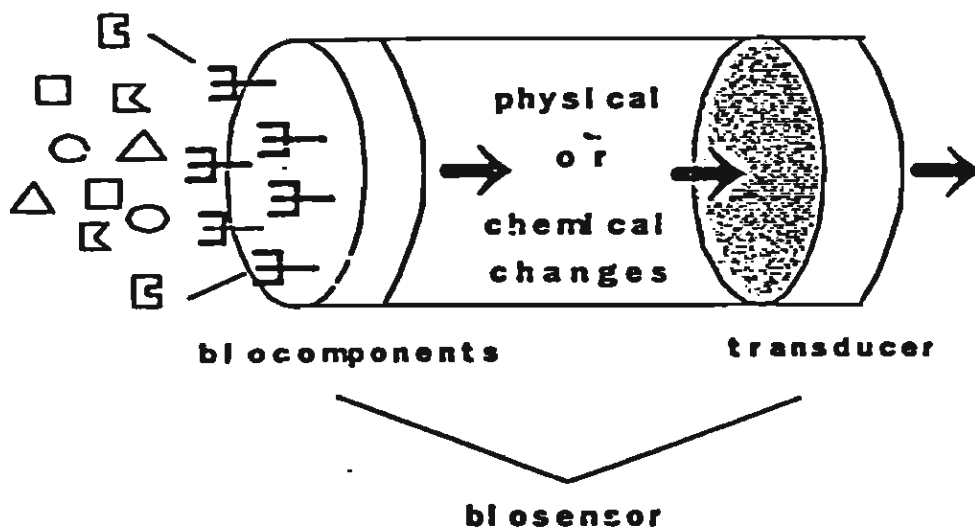
ในที่นี้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน (mediator) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ +0.7 V ค่าศักย์ไฟฟ้านี้เป็นค่าที่ตัวรบกวนต่าง ๆ เช่น ยูเรีย และกรดยูริก สามารถส่งสัญญาณกระแส เป็นผลให้เกิดความผิดพลาดทางบวกได้ ทำให้ได้ค่ามากกว่าที่เป็นจริง ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนอื่น ๆ จึงได้ถูกนำมาใช้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่าค่านี้

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ใช้ $K_3Fe(CN)_6$ และ $Ru(NH_3)_6Cl_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน เพราะสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า +0.7 V ทำให้สามารถวัดสัญญาณกระแสได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า +0.7 V ซึ่งสามารถลดปัญหาจากตัวรบกวนต่าง ๆ ได้ คุณภาพของกลูโคสเซนเซอร์ที่ต้องการ คือ มีความถูกต้องและต้องใช้เวลาในการตอบสนองน้อย



รูปที่ 1 การถ่ายเทอิเล็กตรอนสำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

ไบโอเซนเซอร์ คืออุปกรณ์ทางเคมีวิเคราะห์ที่มีความไวต่อสารทางชีววิทยา เมื่อสารเหล่านี้สัมผัสกับทรานสดิวเซอร์แล้วจะให้ผลออกมาในรูปกระแส ซึ่งค่ากระแสที่ได้นี้จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นหรือปริมาณของสารตัวอย่าง ทรานสดิวเซอร์อาจเป็นวัสดุที่ผลิตจากสารทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ แอนติเจน-แอนติบอดี ซึ่งจะส่งผลให้ไบโอเซนเซอร์มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวัด ผลที่ได้อาจออกมาในรูปของแสง ความร้อน piezo-electric หรือปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าแล้วทรานสดิวเซอร์จะแปรผลเหล่านี้เป็นค่าสัญญาณทางไฟฟ้า



รูปที่ 2 ส่วนประกอบของไบโอเซนเซอร์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารทางชีวภาพและทรานสดิวเซอร์

เซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า

เซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าส่วนใหญ่สามารถแยกออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ โฟเทนซิโอเมตริกเซนเซอร์ แอมเพโรเมตริกเซนเซอร์ และคอนดักโตเมตริกเซนเซอร์ ซึ่ง 2 แบบแรกนั้นกำลังเป็นที่นิยมและแพร่หลายในเทคโนโลยีเกี่ยวกับไบโอเซนเซอร์ ประโยชน์ที่เด่นชัดของแอมเพโรเมตริกเซนเซอร์ คือ สามารถวัดได้ด้วยความเข้มข้นในระดับ 100 นาโนโมล/ลิตร ในขณะที่โฟเทนซิโอเมตริกเซนเซอร์ สามารถวัดได้ด้วยความเข้มข้นในระดับ 200 นาโนโมล/ลิตร ซึ่งพบว่าความไวของเซนเซอร์แต่ละชนิดไม่เพียงแต่เป็นผลมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับทรานส์ดิวเซอร์อีกด้วย สำหรับงานวิจัยนี้ได้เตรียมกลูโคสเซนเซอร์ชนิดแอมเพโรเมตริกเซนเซอร์

แอมเพโรเมตริกเซนเซอร์

แอมเพโรเมตริกเซนเซอร์อาศัยการเกิดปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอนแบบเนื้อผสม เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารที่ไวทางเคมี ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าออกซิเจนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำหน้าที่เป็น co-substrate และเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งหลายปฏิกิริยา ทำให้สามารถวัดโดยใช้เทคนิคแอมเพโรเมตริได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตัวกลางชนิดอื่นส่งผ่านอิเล็กตรอนแทน เช่น ferricyanide, ferrocene และ benzoquinone

การตรึงเอนไซม์

เอนไซม์จัดเป็นส่วนประกอบทางชีวภาพที่ใช้บ่อยมากในการทำไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากความจำเพาะเจาะจงของมัน ในแอมเพโรเมตริกเซนเซอร์นิยมใช้เอนไซม์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์โดยออกซิเจนเป็นตัวรับส่งอิเล็กตรอน เอนไซม์จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปที่สามารถตรวจวัดได้บริเวณผิวของอิเล็กโทรด เอนไซม์ที่ใช้ออกซิเจนในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจะเรียกว่า oxidases ในขณะที่ NAD^+ หรือ NADP^+ จะถูกเรียกว่า dehydrogenase หรือ reductase โดยทั่วไปจะใช้เอนไซม์ในกลุ่ม oxidases มากกว่า

วิธีการตรึงเอนไซม์ลงบนผิวอิเล็กโทรดนั้นมีหลายวิธี ได้แก่ adsorption, covalent attachment, crosslinking, gel/polymer entrapment แต่ละวิธีที่กล่าวมานี้มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งการเลือกใช้วิธีใดนั้นควรพิจารณาจากลักษณะการใช้งาน activity ของเอนไซม์ที่ตรึงแล้ว ควรสูง เอนไซม์ที่ตรึงแล้วควรทนต่อค่า pH ในช่วงกว้างและมีความเสถียร มีความสามารถในการ co-immobilized ในกรณีที่มีการตรึงหลายเอนไซม์ และสามารถติดอยู่บนผิวอิเล็กโทรดได้โดยไม่หลุดออก การตรึงเอนไซม์ลงบนผิวอิเล็กโทรดมีข้อดีคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะแยกออกจากส่วนพื้นผิว ทำให้เอนไซม์ถูกนำกลับมาใช้ได้อย่างรวดเร็ว ค่ากระแสที่ได้จากแอมเพโรเมตริกเซนเซอร์นี้ถูกกำหนดโดยพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรด ความหนาของพื้นผิวที่เกิดปฏิกิริยาและปริมาณของเอนไซม์ต่อปริมาตรของพื้นที่ผิว ดังนั้นแอมเพโรเมตริกเซนเซอร์ที่มีความหนาของพื้น

ผิวน้อยและมีปริมาณเอนไซม์ที่พื้นผิวมากย่อมส่งผลดีในแง่ของสัญญาณตอบรับและยังช่วยเพิ่มความไว เทคโนโลยีใหม่ จึงมีการพัฒนาให้พื้นผิวบางมาก แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

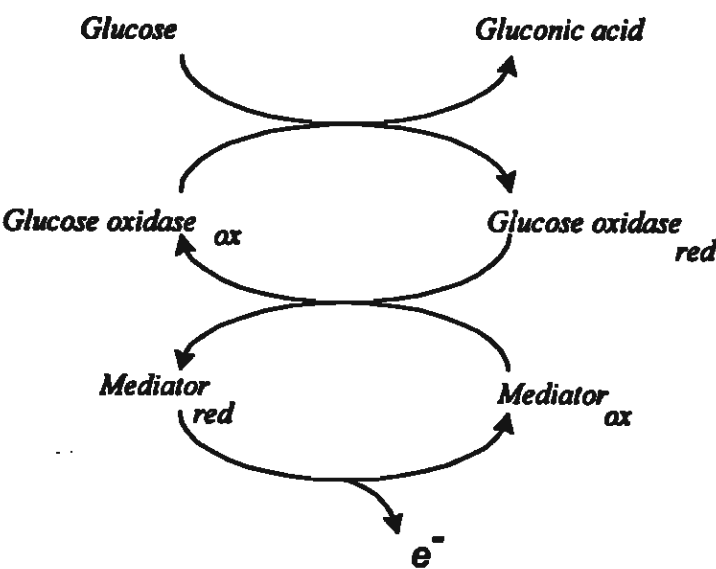
อิเล็กโทรเคมีคัลพอลิเมอร์ไรเซชันเป็นกระบวนการพอลิเมอร์ไรซ์โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตรึงเอนไซม์บนแผ่นฟิล์ม กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเคมีไฟฟ้าของ สารละลายมอนอเมอร์ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยและเกิดเป็นพอลิเมอร์ที่อาจนำไฟฟ้าได้หรือไม่ก็ได้ กระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันควรทำในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายและควรทำในช่วง pH ที่เป็นกลางเพื่อให้สารประกอบทางชีวภาพสามารถตรึงเข้ากับฟิล์มพอลิเมอร์ได้ในรูปแบบที่เหมาะสม

กระบวนการนี้ทำได้โดยการควบคุมค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่อิเล็กโทรดซึ่งจะควบคุมความหนาของฟิล์มพอลิเมอร์และเป็นการกำหนดปริมาณเอนไซม์ที่ถูกกักอยู่บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดอีกด้วย เนื่องจากกระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน จะเกิดเฉพาะบริเวณพื้นผิวของขั้วทำงาน วิธีการนี้จึงเหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ลงบนฟิล์มของพอลิเมอร์ที่นำไฟฟ้าได้ลงบนอิเล็กโทรดที่มีขนาดเล็ก

สาเหตุที่เลือกเอาไพโรลมาใช้ในการสร้างแผ่นฟิล์มที่นำไฟฟ้าได้เพื่อกักเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เนื่องจากไพโรลละลายน้ำสามารถเตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ได้ และสามารถควบคุมความหนาของแผ่นฟิล์มได้จากปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ให้

ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

เป็นตัวกลางสำหรับส่งผ่านอิเล็กตรอน สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับเอนไซม์และเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ย้อนกลับเป็นตัวเดิมได้ ตัวอย่างเช่น O_2 เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนในธรรมชาติ เมื่อ O_2 ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตัวอย่างตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น ferrocene (η^5 -bis-cyclopentadienyl-iron)



รูปที่ 6 วงจรของการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยผ่านตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

ปัญหาของไบโอเซนเซอร์ : ตัวรบกวนและฟอลลิง (fouling)

ปัญหาหลักของแอมเพโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ คือเรื่องของตัวรบกวน เมื่อทำการวิเคราะห์อาหารหรือเลือด ตัวรบกวนคือสารประกอบที่สามารถถูกออกซิไดส์ได้ที่พื้นผิวของขั้วทำงาน ซึ่งจะทำได้ค่ากระแสสูงขึ้นและเกิดความผิดพลาดทางบวกขึ้น เช่น วิตามินซี (ascorbic Acid) จะส่งผลรบกวนในการวิเคราะห์ ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้มีปริมาณมากกว่าปกติ

อิเล็กโทรดฟอลลิง คือ การที่ผิวของอิเล็กโทรดถูกดูดซับด้วยสารที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าหรือสารที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น โปรตีน ซึ่งสารเหล่านี้จะส่งผลไปลดการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์เมื่อเวลาผ่านไป

เพื่อที่จะเอาชนะปัญหาเหล่านี้ เราสามารถใช้เยื่อเมมเบรนของฟิล์มพอลิเมอร์เพื่อเป็นตัวกั้น ในบางครั้งสามารถกำจัดฟอลลิงโดยวิธีการทางเคมี อาจใช้ระบบเอนไซม์ เช่น วิตามินซีถูกกำจัดโดย ascorbate oxidase catalyzed อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมสำหรับงานที่ต้องวัดเป็นประจำ เพราะต้องมีการ Pretreated ใน anti-ascorbate chamber ก่อนการวัด

การใช้เมมเบรนอื่น ๆ เช่น cellulose acetate, nafion และ dialysis membrane ก็นับว่าเป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปในการกำจัดก่อกวนโดยการรีดิวซ์ตัวรบกวนเหล่านั้น นอกจากนี้ได้มีการใช้ osmium-redox hydrogel สำหรับการตรึงกลูโคสออกซิเดส หรือ แลคเตสออกซิเดส โดยใช้ค่าศักย์ไฟฟ้า +200 mV vs. SCE สามารถรีดิวซ์ตัวรบกวนได้ อย่างไรก็ตามการใช้เมมเบรนนี้มีข้อจำกัดสำหรับ two-dimensional electrode surface เนื่องจากไม่สามารถควบคุมความหนา reproducibility uniformity ของเมมเบรนได้

ฟิล์มของพอลิเมอร์ที่ได้จากการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันมีประสิทธิภาพในการป้องกันตัวรบกวนและการฟอลลิง ฟิล์มพอลิเมอร์ที่เป็น non-conducting มีลักษณะเฉพาะในการเลือกผ่าน และยังสามารถจำกัดความหนาได้ ฟิล์มจะยังคงอยู่ในรูปเดิมเพราะมันจะต้องมีความหนาระดับหนึ่งจึงจะเป็น non-conducting polymer ได้ กระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชันจะดำเนินไปจนกระทั่งผิวของอิเล็กโทรดถูกปกคลุมหมด ซึ่งจะสังเกตได้จากการที่กระแสต่อเวลาลดลงเนื่องจากมอนอเมอร์ไม่สามารถผ่านฟิล์มได้ ในการทำอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันให้ได้ความหนาในระดับนาโนเมตร สามารถกำจัดตัวรบกวนและป้องกันการเกิดฟอลลิงได้เนื่องจากจะลดปัญหาที่เกิดจากการแพร่

สำหรับเซนเซอร์ที่ตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ใช้ฟิล์ม poly (o-phenylenediamine) เคลือบบนแพลตินัม เมื่อมีเอนไซม์อยู่ในฟิล์มของพอลิเมอร์พบว่าสามารถกำจัดตัวรบกวนได้, มี activity ของเอนไซม์ที่สูง และมีเวลาตอบสนองต่ำ ทำให้มีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับการตรวจวัดทางชีววิทยา ได้มีการศึกษาการทำเอนไซม์อิเล็กโทรด ประยุกต์โดยใช้พอลิไพโรลเคลือบบนผิวอิเล็กโทรด เพื่อป้องกันตัวรบกวนและการเกิดฟอลลิง

ในงานวิจัยนี้จะใช้พอลิไพโรลเป็นพอลิเมอร์ไฟฟ้าที่เคลือบอยู่บนอิเล็กโทรด เนื่องจากมีค่าการนำไฟฟ้าที่สูงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทำอิเล็กโทรด นอกจากนี้ภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงในพอลิไพโรลเป็นภาวะที่ไม่ทำลายเอนไซม์ และฟิล์มพอลิไพโรลเป็นฟิล์มที่เสถียร

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ จะถูกตรึงในฟิล์มพอลิไพโรลในขณะที่ทำการพอลิเมอร์ไรซ์ทางเคมีไฟฟ้าของ

pyrrole ที่ขั้วไฟฟ้าทองขนาดไมโคร เมื่อมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และสารละลาย $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ อยู่ จะทำที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.70 โวลต์ โดยมีขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และมีสารละลาย $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์

สำหรับการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ภาวะที่ทำการพอลิเมอร์ไรซ์ จะได้ฟิล์มพอลิไพโรลที่มีประจุบวก ดังนั้นถ้าทำการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ซึ่งมีประจุบวกในเวลาเดียวกับที่ทำการพอลิเมอร์ไรซ์ คาดว่า จะเกิดการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ได้ยาก งานวิจัยนี้จะเคลือบ Nafion ซึ่งมีประจุลบบนผิวของอิเล็กโทรดก่อน แล้วจึงจุ่มลงในสารละลายของ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ เพื่อให้เกิด Electrostatic binding ระหว่าง Nafion และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ แล้วจึงนำไปทำการพอลิเมอร์ไรซ์ ในสารละลายไพโรล และกลูโคสออกซิเดส

วิธีการทดลอง

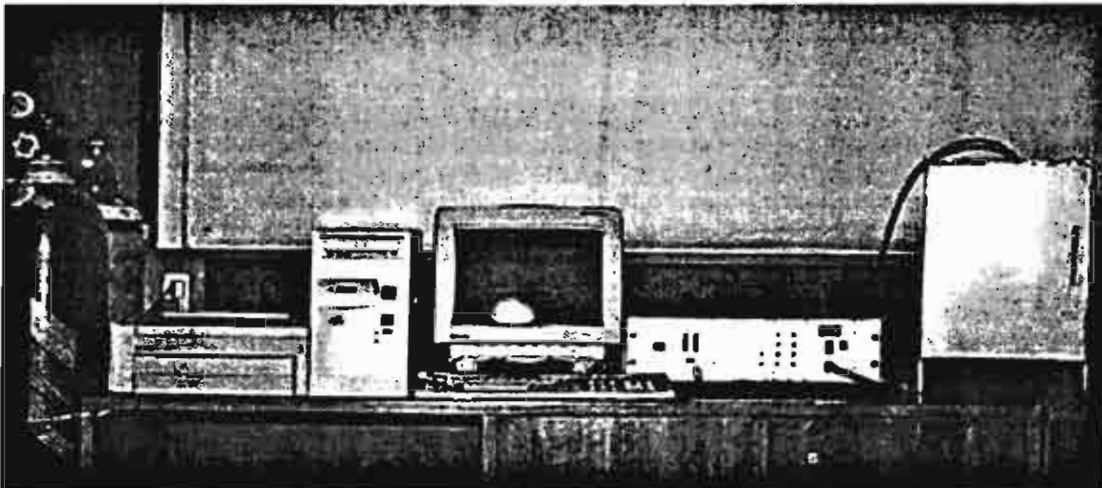
เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง potentiostat PGSTAT 10 (รูปที่ 3)
2. personal computer และ printer พร้อมโปรแกรม AUTOLAB version 4.4
3. ขั้วอ้างอิง (Ag/AgCl reference electrode) (รูปที่ 4)
4. ขั้วเคาน์เตอร์ (counter electrode, Pt electrode) (รูปที่ 4)
5. Gold wire $\varnothing$ 250 μ m 25 cm. (99.999%)
6. Gold sheet 5 cm x 5 cm (99.999%)
7. แท่งแก้วแคปิลลารี $\varnothing$ 6mm 6 แท่ง
8. สายไฟเงิน 100 m.
9. Faradaic cage
10. ชุดเครื่องกลั่นลดความดัน
11. ultrasonic bath
12. micropipette ขนาด 20 μ L และ 5 mL
13. pH meter
14. desiccator
15. stirrer
16. microsyringe ขนาด 100 μ L
17. บีกเกอร์ ขนาด 5, 10, 25 mL

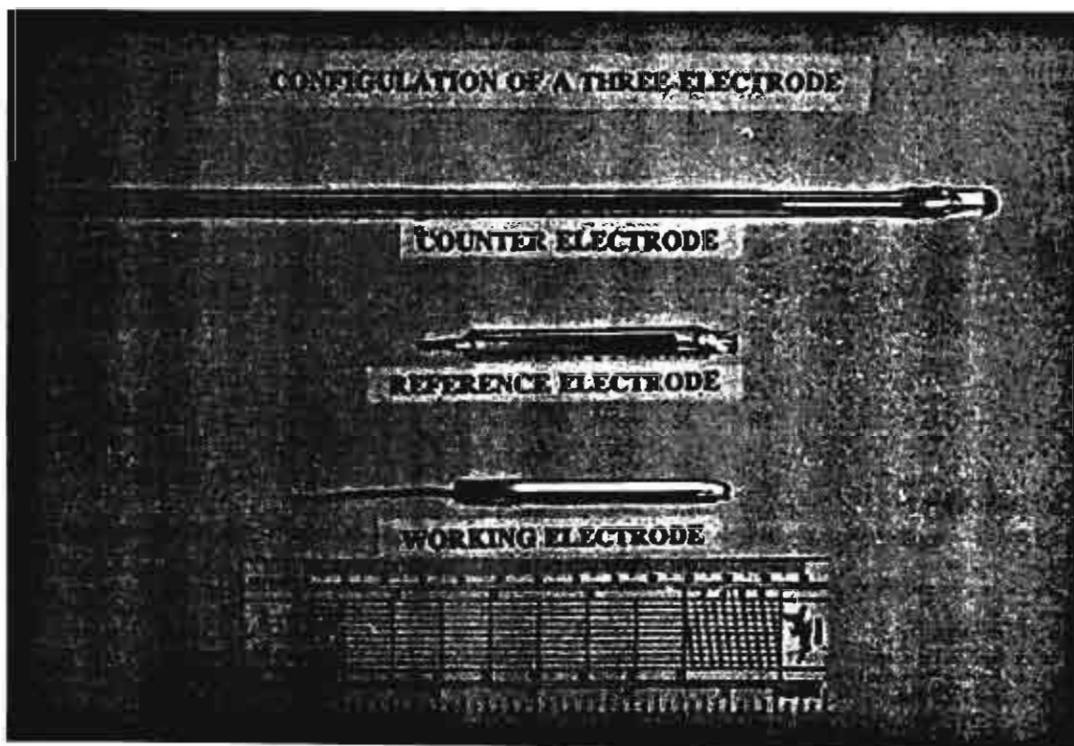
สารเคมี

1. Pyrrole monomer (Fluka)
2. hexaamineruthenium(III) chloride (Sigma)
3. nafion (BDH)
4. D(+) glucose anhydrous (BDH)
5. Glucose Oxidase type II from *Aspergirus* (Sigma)
6. potassium ferricyanide(III) (Aldrich)
7. di-potassium hydrogen orthophosphate anhydrous (BDH)
8. sodium dihydrogen phosphate dihydrate (BDH)
9. Al₂O₃ (particle size 0.3 μ m) (Fluka)
10. Absolute C₂H₅OH (Fluka)
11. KCl (Fluka)

- 12. HCl conc. (Fluka)
- 13. H₂SO₄ conc. (Fluka)
- 14. N₂ (TIG)



รูปที่ 3 เครื่อง potentiostat PGSTAT 10



รูปที่ 4 อิเล็กโทรดที่ใช้ในการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้แบ่งเป็น 2 โครงการย่อยคือ

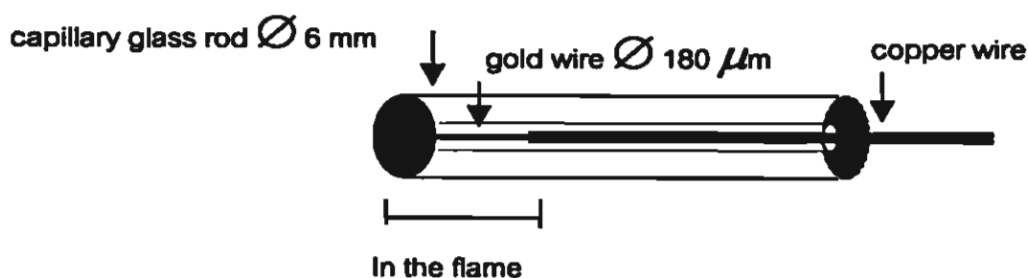
1. การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทองขนาดไมโคร
2. การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $Ru(NH_3)_6Cl_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง

ดังนั้นการทดลองจึงขอรายงานเป็น 2 ส่วนดังต่อไปนี้

โครงการที่ 1: การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทองขนาดไมโคร

การเตรียมอิเล็กโทรดทองขนาดไมโคร

- เตรียมลวดทอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $180\ \mu m$ ยาว $1.5\ cm$ ทำความสะอาด โดย แช่ลวดทอง ในสารละลายผสมของกรดซัลฟิวริกเข้มข้น กับ 38% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง ทิ้งให้แห้ง
- เตรียมหลอดแก้วแคปิลลารี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก $6\ mm$. ยาว $4-5\ cm$. ตัดแก้วด้วย ตะไบ ขัดกับกระดาษทรายละเอียด ทำความสะอาดหลอดแก้ว ด้วย Ultrasonic Cleaning นาน 5 นาที ทำให้แห้ง
- เตรียมอุปกรณ์หลอมหลอดแก้ว ได้แก่ ตะเกียงแก๊สความร้อนสูง หลอมปลายของหลอดแก้วด้านที่มีลวดทอง โดยให้ส่วนปลายของสายไฟอีกข้างหนึ่งโผล่เหลืออกมา ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ภาพประกอบคำอธิบายการเตรียมอิเล็กโทรดทองขนาดไมโคร

- ขัดผิวหน้าของอิเล็กโทรดก่อนนำไปใช้งาน โดยขัดผิวหน้าอิเล็กโทรดกับ อะลูมิเนียม ออกไซด์ (Aluminium Oxide , Al_2O_3 , particle size $0.3\ \mu m$) บนผ้าสักราด ที่ชุ่มด้วยน้ำกลั่น นาน 10 นาที หรือ จนกว่าผิวหน้าอิเล็กโทรดจะสะอาด แล้วล้างทำความสะอาดด้วยเครื่อง Ultrasonic Cleaning เป็นเวลา 5 นาที

- การทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยจุ่มอิเล็กโทรดทองที่เตรียมได้ใน 0.1 M H_2SO_4 แล้วทำเทคนิค Cyclic Voltammetry ด้วยเครื่อง Potentiostat , รุ่น PGSTAT10 โดยให้ ศักย์ไฟฟ้า -0.1 V ถึง 1.6 V เทียบกับขั้ว Ag/AgCl และ โลหะแพลทินัมเป็นเคาน์เตอร์อิเล็กโทรด ด้วยอัตราสแกน 0.1 V/sec. จนกระทั่งได้กราฟที่พลอตระหว่าง กระแสกับศักย์ไฟฟ้าคงที่

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์ โดยใช้พอลิไพโรลเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เกิดกลไกการส่งผ่านแบบ คัดขนาด

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

การทดลองนี้ได้เตรียมฟิล์มพอลิไพโรลโดยเทคนิคโครโนคูลอมเมทรี ในสารละลาย 43 mM ของไพโรลมอนอเมอร์ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 โดยเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลจากการให้ ปริมาณไฟฟ้าค่าต่าง ๆ (0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 24.0 μC) เพื่อวัดปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ได้จากสารละลาย 10 mM กลูโคส + free GOD 25 U/mL 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยใช้พอลิไพโรล เอนไซม์และตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$

การตรวจสอบ เฟอร์ริไซยาไนด์ที่ตรึงอยู่ในฟิล์มพอลิไพโรลโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

การทดลองทั้งหมดจะทำในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เพื่อให้มีสภาวะเหมือนกับสภาวะในสิ่งมีชีวิต โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ได้ทำการทดลองโดยให้อัตราการให้ศักย์ไฟฟ้า 100 mV/s ใช้ อิเล็กโทรดซึ่งเตรียมจากไพโรล/เฟอร์ริไซยาไนด์ เปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไพโรลอย่างเดียว

การศึกษาปริมาณไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในขณะเตรียมอิเล็กโทรด

สำหรับการทดลองนี้ ความเข้มข้นของสารประกอบที่ใช้ คือ

- กลูโคสออกซิเดส 25 units/ลูกบาศก์เซนติเมตร
- ความเข้มข้นของไพโรล 40 มิลลิโมลาร์
- ความเข้มข้นของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 50 มิลลิโมลาร์
- เทคนิคไซคลิก โวลแทมเมทรี ถูกใช้สำหรับตรวจสอบผลของปริมาณไฟฟ้าที่ใช้เพื่อสร้างฟิล์ม ซึ่งมี เฟอร์ริไซยาไนด์ตรึงอยู่ด้วย การทดลองนี้จะใช้ปริมาณไฟฟ้าเป็นตัวแปร (ให้ปริมาณไฟฟ้าค่าต่าง ๆ 0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 24.0 μC) วัดกระแสแอโนดิกแล้วนำมาพลอตกราฟ

การศึกษาผลของความเข้มข้นของไพโรลที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

การทดลองนี้ใช้

- ความเข้มข้นของเอนไซม์ 25 units/mL
- ความเข้มข้นของ เฟอร์ริไซยาไนด์ 50 มิลลิโมล/ลิตร
- ความเข้มข้นของไพโรล ต่าง ๆ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, มิลลิโมลาร์
- ปริมาณกลูโคสออกซิเดส 25 units/mL
- ปริมาณกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์

การศึกษาผลของความเข้มข้นของเฟอร์ริไซยาไนด์ ที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

การทดลองนี้ใช้

- ความเข้มข้นของเฟอร์ริไซยาไนด์ 5, 10, 25, 50 มิลลิโมลาร์
- ความเข้มข้นของไพโรล 40 มิลลิโมลาร์
- ความเข้มข้นของ GOD 25 units/ลูกบาศก์เซนติเมตร และ
- ปริมาณไฟฟ้า 45 มิลลิคูลอมป์/ ตารางเซนติเมตร
- สารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์

การตรวจสอบคุณภาพ ของอิเล็กโทรดที่เตรียมได้

ความไว (Sensitivity)

สำหรับการศึกษาด้านไบโอเซนเซอร์ ความไวสามารถหาได้จากการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่วัดได้ เมื่อความเข้มข้นของสารที่สนใจเปลี่ยนไป ($\Delta S/\Delta C$)

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $K_3Fe(CN)_6$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.45 V โดยเทคนิคแอมเพโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7 ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและทำการทดลองภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.2 M ครั้งละ 25 μ L เมื่อ background current มีค่าคงที่ นำกระแสสัญญาณที่ได้มาทำ calibration curve คำนวณหาความไวของอิเล็กโทรดจากความชันของ calibration curve

ความเสถียร (Stability)

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเสถียร 2 แบบ คือ

1. ความเสถียรต่อการใช้งาน (Operational Stability)

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส $K_3Fe(CN)_6$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและทำการทดลองภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.2 M ครั้งละ 25 μ L เมื่อ background current มีค่าคงที่ ทำการฉีดกลูโคสครั้งละ 5 mMอย่างต่อเนื่อง จนครบ 20 ครั้ง และบันทึกจำนวนครั้งที่ใช้งานและค่ากระแส

2. ความเสถียรในระหว่างเก็บ (Storage Stability)

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $K_3Fe(CN)_6$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและทำการทดลองภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.2 M ครั้งละ 25 μ L เมื่อ background current มีค่าคงที่ จากนั้นนำอิเล็กโทรดไปเก็บไว้ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำมาวัดกลูโคส โดยบันทึกจำนวนชั่วโมงการเก็บ (storage) และค่ากระแส

ตัวรบกวน (Interference)

ตัวรบกวนที่ทำการศึกษา คือ ascorbic acid และ 4-acetaminophenol ตัวรบกวน 2 ตัวนี้ ถูกเลือกมาทำการศึกษาเนื่องจากว่าทั้ง ascorbic acid และ 4-acetaminophenol สามารถให้กระแสเช่นเดียวกับกลูโคส ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์

การทดลองนี้ใช้ ascorbic acid และ 4-acetaminophenol ความเข้มข้น 1-40 μ M ทำการทดลองโดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรี วัดกระแสที่ศักย์ไฟฟ้าต่าง ๆ (0-0.7 โวลต์) อิเล็กโทรดที่ใช้มี 2 ชนิดคือ อิเล็กโทรดทองที่ไม่ได้ทำการพอลิเมอร์ และตรึงกลูโคสออกซิเดสและ $K_3Fe(CN)_6$ กับอิเล็กโทรดทองที่ทำการพอลิเมอร์ และตรึงกลูโคสออกซิเดสและ $K_3Fe(CN)_6$

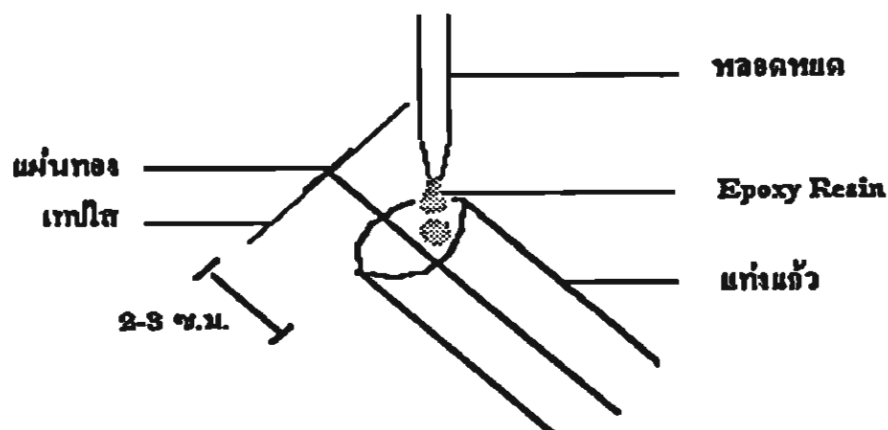
โครงการที่ 2: การเตรียมกลุโคสเซนเซอร์โดยวิธีรีดิงเอนไซม์กลุโคสออกซิเดสในพอลิไพโรล โดยใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง

การสร้างอิเล็กโทรดทอง

สำหรับงานวิจัยโครงการที่ 2 นี้ได้สร้างอิเล็กโทรด 2 แบบดังต่อไปนี้

1. อิเล็กโทรดทองแบบฝัง

- เตรียมแผ่นโลหะทองแบบวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 cm ทำความสะอาดโดยเอทานอล
- เตรียมหลอดแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 0.6 cm ยาว 5 cm ตัดแก้วด้วยตะไบ ขัดกับกระดาษทรายละเอียด นำไปกำจัดอนุภาคต่าง ๆ ออกด้วย ultrasonic bath เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วล้างด้วยเอทานอล
- เตรียมสายไฟใส่โลหะเงิน ขนาดยาวกว่าหลอดแก้วประมาณ 2 cm ลอกปลายสายไฟทั้ง 2 ด้าน ประมาณ 0.5 cm
- เชื่อมแผ่นโลหะทองและสายไฟโดยใช้กาวนำไฟฟ้า ในทิศทางตั้งฉาก
- ผสม epoxy resin และสอดสายไฟที่เชื่อมกับแผ่นโลหะทองแล้ว ลงในหลอดแก้ว ให้เหลือช่องว่างประมาณ 2 cm จึงค่อย ๆ หยอด epoxy resin ลงไป ดังรูปที่ 6
- จัดให้แผ่นโลหะทองอยู่ตรงกลางแท่งแก้ว หุ้มอิเล็กโทรดด้วยเทปใส
- จัดอิเล็กโทรดให้ตั้งตรงในแนวตั้ง และปล่อยให้แห้ง



รูปที่ 6 แสดงการเตรียมอิเล็กโทรดแบบฝังอยู่ในเรซิน โดยการหยอด epoxy resin

2. อิเล็กโทรดทองแบบเสมอ

- วิธีการสร้างเหมือนกับวิธีการสร้างอิเล็กโทรดทองแบบฝัง แต่เลือกขนาดของแผ่นทองและแท่งแก้วให้เสมอกันพอดี

การทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด

ได้ทำความสะอาดอิเล็กโทรดทองแบบฝังและแบบเสมอดังต่อไปนี้

- ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอลตามลำดับ
- หยอดน้ำกลั่นลงบนแผ่นขัด nylon disk และ หยด diamond polish slurry 2-3 หยด
- ขัดอิเล็กโทรดตามทิศทางรูปเลข 8 โดยวางอิเล็กโทรดตั้งฉากกับแผ่นขัดเสมอ
- หยอดน้ำกลั่นลงบนแผ่น microcloth disk และหยดผงอะลูมินา ขนาด 0.1 μm ประมาณ 5-6 หยด
- ขัดอิเล็กโทรดประมาณ 1-2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
- นำอิเล็กโทรดไปทำความสะอาดด้วย ultrasonic bath เพื่อให้อนุภาคของผงขัดหลุดออกจากพื้นผิว แล้วล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่น
- ล้างอิเล็กโทรดด้วยเอทานอล และซับให้แห้ง

หมายเหตุ

- ไม่ควรทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วย ultrasonic bath เป็นเวลานานมากกว่า 5 นาที เพราะอาจทำให้อิเล็กโทรดร้อนและเสียหายได้
- ไม่ควรสัมผัสที่พื้นผิวหน้าอิเล็กโทรดด้วยเล็บมือหรือของมีคม เพราะจะทำให้อิเล็กโทรดเป็นรอย

การตรวจหาพื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรด

สามารถหาพื้นที่ของอิเล็กโทรดทองแบบฝังและแบบเสมอดังต่อไปนี้

- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด
- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง +1.6 V จำนวน 3 รอบ
- ทำการทดลองในสารละลาย $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 – 0.5 mmol/mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก 0.0 ถึง +0.6 V จำนวน 2 รอบ ในแต่ละความเข้มข้น บันทึกค่ากระแสที่ได้จากไซคลิกโวลแทมเมทรี โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอิเล็กโทรดทองขนาดเสมอ

การหาความเข้มข้นของ nafion และเวลาที่ใช้ในการรอให้ nafion แห้งที่เหมาะสม

- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด
- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง $+1.6$ V จำนวน 3 รอบ
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าพื้นผิวไม่มีสิ่งเจือปน
- หยด nafion ปริมาตร 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, และ 3.0 μL และควบคุมเวลาในการรอให้ nafion แห้ง เป็นเวลา 10, 15, และ 20 นาที ในแต่ละชุดของปริมาณ nafion
- นำอิเล็กโทรดไปทำอิเล็กโตรสแตติกไบดิงโดยจุ่มในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 10 mM เป็นเวลา 10 นาที
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ ในแต่ละการทดลอง
- บันทึกค่ากระแสที่ตอบสนอง จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้

การศึกษาความเข้มข้นของ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ และเวลาที่ใช้ในการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด
- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง $+1.6$ V จำนวน 3 รอบ
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าพื้นผิวไม่มีสิ่งเจือปน
- หยด nafion ปริมาตร 1.0 μL และควบคุมเวลาในการรอให้ nafion แห้ง เป็นเวลา 10 นาที
- นำอิเล็กโทรดไปทำอิเล็กโตรสแตติกไบดิง โดยจุ่มในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 5, 10, 15, 20, และ 25 mM เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, และ 25 นาที ในแต่ละชุดของความเข้มข้นของสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ ในแต่ละการทดลอง
- บันทึกค่ากระแสที่ตอบสนอง จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้

การศึกษาความเข้มข้นของไฟโรลและประจุไฟฟ้าที่ใช้ในการควบคุมการเตรียมฟิล์มพอลิไฟโรล

- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด
- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง $+1.6$ V จำนวน 3 รอบ
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าพื้นผิวไม่มีสิ่งเจือปน
- นำภาวะที่ทดลองได้มาใช้ โดยหยด nafion ปริมาตร 1.0 μL และควบคุมเวลาในการรอให้ nafion แห้ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำอิเล็กโทรดไปทำอิเล็กโตรสแตติกไบดิงโดยจุ่มในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 10 mM เป็นเวลา 10 นาที
- ทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ในสารละลายไฟโรลความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 M โดยเทคนิคคูลอมป์เมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ
- บันทึกค่ากระแสที่ตอบสนอง จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้

การเตรียมฟิล์มพอลิไฟโรล

- เมื่อใช้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน
- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด
- ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง $+1.6$ V จำนวน 3 รอบ
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าบนพื้นผิวไม่มีสิ่งเจือปน
- ทำการพอลิเมอร์ไรเซชันในสารละลายไฟโรล 0.1 M ที่มี GOD 50 units/mL โดยเทคนิคคูลอมป์เมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ แล้วเปรียบเทียบกับไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้ก่อนการพอลิเมอร์ไรเซชัน

- เมื่อใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน
 - ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัด
 - ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยเทคนิคไซคลิก
 - โวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง $+1.6$ V จำนวน 3 รอบ
 - ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าบนพื้นผิวไม่มีสิ่งเจือปน
 - ทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลาย H_2SO_4 0.1 M 5 mL โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.2 ถึง $+1.6$ V จำนวน 1 รอบ
 - นำภาวะที่ทดลองได้มาใช้ โดยหยด nafion ปริมาตร 1.0 μL และควบคุมเวลาในการรอให้ nafion แห้ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำอิเล็กโทรดไปทำอิเล็กโตรสแตติก -ไบดิง โดยจุ่มในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 10 mM เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง
 - ทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน สารละลายไพโรล 0.1 M ที่มี GOD 50 units/mL โดยเทคนิคคูลอมป์เมทรี ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V
 - ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมโมแกรม ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ เพื่อเปรียบเทียบกับโวลแทมโมแกรมที่ได้ก่อนการพอลิเมอร์ไรเซชัน

การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

● ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

นำอิเล็กโทรดที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน ที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดสแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 V โดยใช้เทคนิคแอมเพอโรเมทรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสครั้งละ 2 mM เมื่อ background current มีค่าคงที่

● ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4, 0.3, 0.2, และ 0.0 V

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ แล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า 0.7 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและขณะทำการทดลอง เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสครั้งละ 2 mM เมื่อ background current มีค่าคงที่

การตรวจสอบคุณภาพ ของอิเล็กโทรดที่เตรียมได้

การตรวจสอบเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ (response time)

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและขณะทดลองต้องทำภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสครั้งละ 2 mM เมื่อ background current มีค่าคงที่ และทำการวัดเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณของกลูโคสเมื่อเริ่มทำการฉีด จนกระทั่งมีกระแสตอบสนองเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

ความไว (sensitivity)

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและทำการทดลองภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสครั้งละ 2 mM เมื่อ background current มีค่าคงที่ นำกระแสสัญญาณที่ได้มาทำ calibration curve คำนวณหาความไวของอิเล็กโทรดจากความชันของ calibration curve

ความเสถียร (stability)

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนในสารละลายก่อนทำการทดลองและทำการทดลองภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน และทำการฉีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสครั้งละ 12 mM เมื่อ background current มีค่าคงที่ จากนั้นนำอิเล็กโทรดไปเก็บไว้ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำมาวัดกลูโคส โดยบันทึกจำนวนชั่วโมงการเก็บ (storage) และค่ากระแส

ผลการทดลองและวิจารณ์

รายงานผลการทดลองและวิจารณ์แบ่งเป็น 2 ส่วนดังต่อไปนี้

โครงการที่ 1: การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทองคำขนาดไมโคร

การตรวจสอบพื้นที่ของอิเล็กโทรด

1. การคำนวณพื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรดทองคำ สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$i_{pa} = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} V^{1/2} C_0$$

เมื่อ

n = number of electron transfer

A = Area of electrode [cm^2]

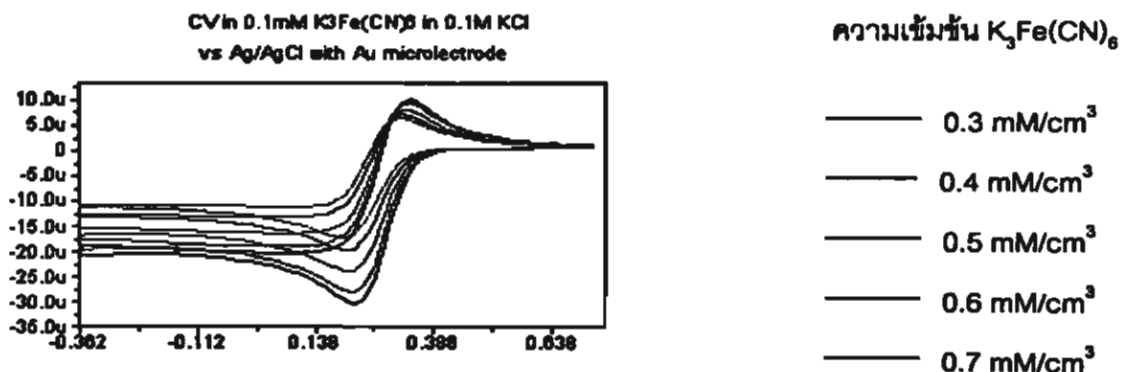
D_0 = Diffusion coefficient = 0.763×10^{-5} [cm^2/sec]

V = Scan rate

C_0 = Concentration [M/cm^3]

จาก $i_{pa} / C_0 = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} V^{1/2}$ สามารถคำนวณได้จากการใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry ในสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ดังสมการข้างล่าง

จะได้กราฟไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ ที่ความเข้มข้น 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, และ 0.7 mM/ cm^3 เริ่มที่ศักย์ไฟฟ้า -0.7 ถึง 0.7 V เทียบกับขั้ว Ag/AgCl ด้วยอัตราศักย์ไฟฟ้า 0.1 V/s.



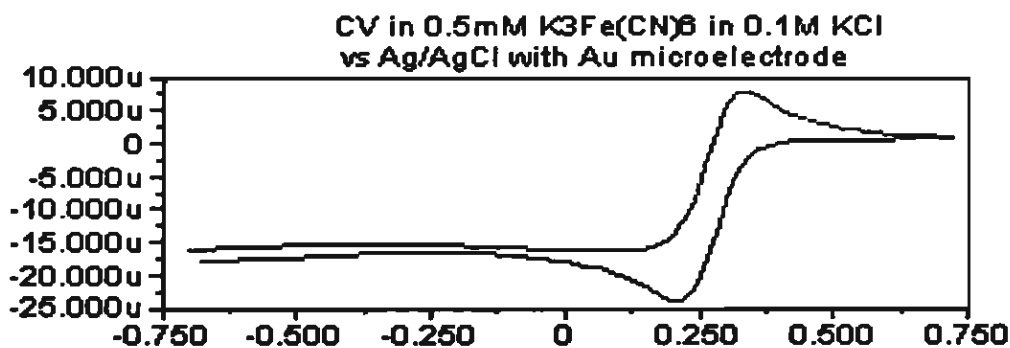
เมื่อพล็อตกราฟเส้นตรงระหว่าง i_{pa} กับ C_0 ค่าความชันของเส้นตรงดังกล่าว i_{pa}/C_0 มีค่าเท่ากับ 2.985×10^{-2} ดังนั้น ไมโครอิเล็กโทรดที่ใช้มีพื้นที่เท่ากับ $1.27 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$

ค่า Formal Potential ($E^{0'}$)

ค่า $E^{0'}$ ได้จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลาย $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ ดังแสดงในรูปที่ 8

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \text{ เมื่อ } E_{pa} \text{ เท่ากับ } 0.319 \text{ V}$$

$$\text{Formal Reduction, } E^{0'} = (E_{pa} - E_{pc})/2 = 0.269 \text{ V}$$



รูปที่ 8 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารละลาย $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ ที่ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเริ่มที่ศักย์ไฟฟ้า -0.7 ถึง 0.7 V เทียบกับขั้ว Ag/AgCl ด้วยอัตราศักย์ไฟฟ้า 0.1 V/s.

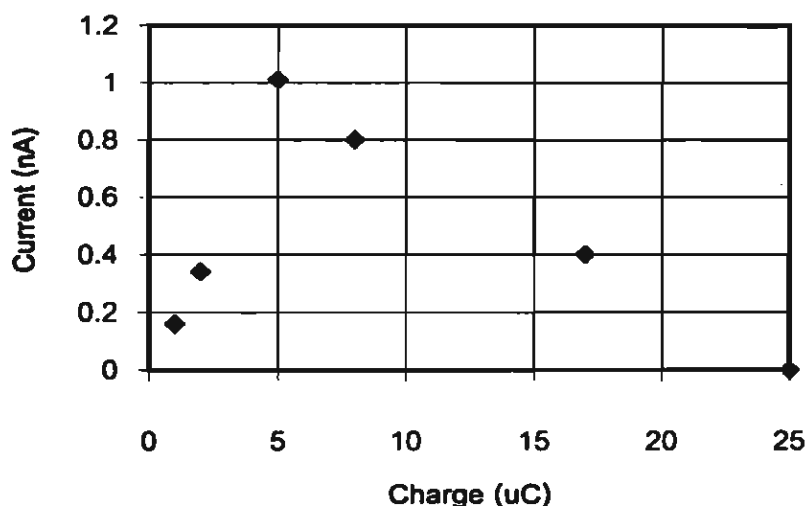
การเตรียมกลุโคสเซนเซอร์ โดยใช้พอลิไพโรลเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เกิดกลไกการส่งผ่านแบบคัตขาด

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

สำหรับกิจกรรมนี้ จะต้องเตรียมกลุโคสเซนเซอร์ โดยใช้พอลิไพโรล และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

แต่เนื่องจากอิเล็กโทรดมีขนาดเล็กมาก ทำให้วัดความหนาของแผ่นฟิล์มไม่ได้ อย่างไรก็ตาม การสืบค้นข้อมูลหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ประมาณได้ว่า ปริมาณไฟฟ้า 45 mC /ตารางเซนติเมตร จะให้ความหนา 0.1 ไมครอน

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการสร้างฟิล์มพอลิไพโรลโดยวัดกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการวัดปริมาณกลูโคส เมื่อใช้ free GOD จากเทคนิคแอมเพอโรเมทรี



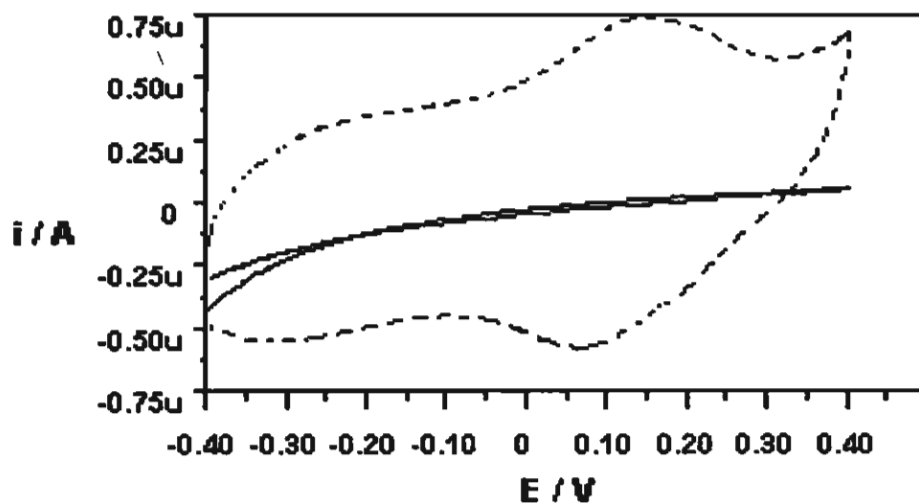
รูป ที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (charge) และปริมาณกระแสไฟฟ้า (i) ที่ได้การวัดสารละลาย 10 mM กลูโคส + free GOD 25 Uni/ลูกบาศก์เซนติเมตร 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7

ดังนั้นความหนาจึงสามารถหาได้จากรูป ที่ 9 ปริมาณไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการสร้างฟิล์มพอลิไพโรล เพื่อให้ได้ปริมาณกระแสไฟฟ้ามากที่สุด คือใช้สารละลาย 10 mM กลูโคส + free GOD 25 Uni/ลูกบาศก์เซนติเมตร 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จะต้องให้ ปริมาณไฟฟ้า 4 μC ซึ่งจะได้ฟิล์มหนา 0.07 μm (จากการสืบค้นข้อมูล ปริมาณไฟฟ้า 45 mC /ตารางเซนติเมตร จะให้ฟิล์มหนา 0.1 μm)

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยใช้พอลิไพโรล เอนไซม์และตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$

การตรวจสอบ เฟอริไซยาไนด์ที่ตรึงอยู่ในฟิล์มพอลิไพโรลโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10 จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างระหว่าง อิเล็กโทรดทั้งสอง อิเล็กโทรดที่ตรึงด้วย ไพโรล/เฟอริไซยาไนด์ จะให้ electrochemical reversibility ของสารประกอบเฟอริไซยาไนด์ แสดงให้เห็นว่ามีสารประกอบรีดอกซ์นี้ ตรึงอยู่ในฟิล์มโพลีเมอร์สำหรับอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไพโรลอย่างเดียว จะไม่สังเกตเห็นการถ่ายเทอิเล็กตรอนของเฟอริไซยาไนด์ เกิดขึ้น



รูปที่ 10 แสดงไซคลิก โวลแทมโมแกรม_____ เมื่อใช้ Au/PPy/GOD อิเล็กโทรด -----

เมื่อใช้ Au/PPy/Ferri/GOD อิเล็กโทรด ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH7 ไซคลิก โวลแทมโมแกรม สำหรับ PPy/Ferri/GOD แสดงคุณลักษณะสามารถผันกลับได้ของ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ซึ่งเป็นยืนยันว่ามี $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ตรึงอยู่ในพอลิไพโรฟิล์ม

การศึกษาปริมาณไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในขณะเตรียมอิเล็กโทรด

รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสัญญาณแอมเพอโรเมตริกและปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ถ้าให้ปริมาณไฟฟ้าในการสร้างฟิล์มเพิ่มมากขึ้น กระแสแอมเพอโรเมตริกที่แสดงว่ามี เฟอร์ริไซยาไนด์ อยู่ในฟิล์มก็จะมากขึ้นด้วย ตามที่คาดไว้ จากข้อมูลที่ได้ทำการสืบค้น สามารถประมาณได้ว่าปริมาณไฟฟ้าที่ใช้ในการสร้างฟิล์ม 45 mC /ตารางเซนติเมตร จะให้ฟิล์มที่มีความหนา 0.1 μ ดังนั้นถ้าให้ปริมาณไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น ความหนาของฟิล์มจะเพิ่มมากยิ่งขึ้นด้วย

จากการทดลองเมื่อให้ปริมาณไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น จะได้สัญญาณแอมเพอโรเมตริกที่ได้จากการวัดปริมาณกลูโคสที่ 0.45 V เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 12 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณไฟฟ้าที่ใช้ในการโพลีเมอร์ไรซ์มากกว่า 8 μ C พบว่าสัญญาณแอมเพอโรเมตริกที่ได้จากการวัดปริมาณกลูโคสที่ 0.45 V จะเริ่มลดลง ผลการทดลองที่ได้สามารถอธิบายได้ ดังต่อไปนี้

เมื่อให้ X_r คือ ระยะทางเฉลี่ยของกลูโคสโมเลกุลที่เคลื่อนที่ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดส และมีความสัมพันธ์กับค่าคงที่ต่าง ๆ ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

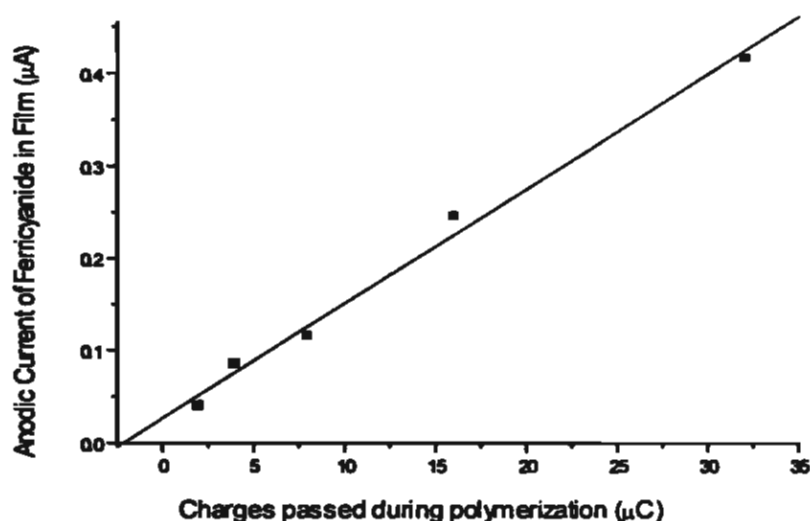
$$X_r = \sqrt{D_s K_m / K_{cat} \theta_T}$$

เมื่อ D_s คือ Diffusion coefficient
 K_m คือ Michaelis constant สำหรับเอนไซม์
 K_{cat} คือ rate constant ของ สารประกอบเชิงซ้อน ระหว่างเอนไซม์-กลูโคส
 θ_T คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด

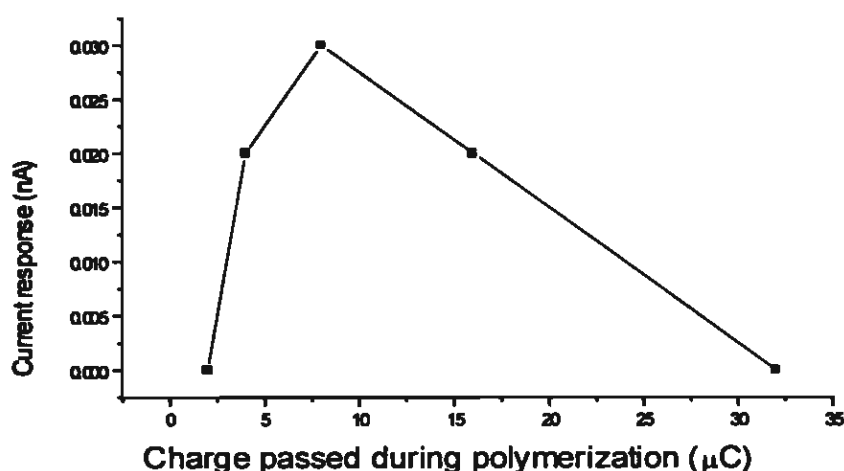
เมื่อระยะทาง X_p มีค่ามากกว่าความหนาของฟิล์ม จะมีการสูญเสียปริมาณของกลูโคสในระหว่างทาง ก่อนที่กลูโคสจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

ในช่วงแรก ขณะที่ฟิล์มมีความหนาเพิ่มมากขึ้น ระยะทางที่กลูโคสจะเข้าทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ยังสั้น กลูโคสสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้มาก ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอิเล็ก โทรดได้ง่าย กระแสสัญญาณก็จะมีค่ามาก จนกระทั่งถึงความหนาของฟิล์มมีค่าหนึ่ง ซึ่งมากกว่า X_p ปฏิกิริยาจะเกิดที่ชั้นนอกของแผ่นฟิล์ม เท่านั้น ไม่สามารถแพร่เข้าไปในฟิล์มที่อยู่ใกล้ผิวของอิเล็กโทรด ได้ ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนจะมีระยะที่ห่างจากอิเล็กโทรด ทำให้ส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ยาก และอาจ จะแพร่ออกจากฟิล์มเข้าสู่สารละลายได้ด้วย ดังนั้น การเพิ่มปริมาณไฟฟ้าซึ่งจะทำให้ความหนาของ ฟิล์มเพิ่มมากขึ้น และจะทำให้มีผลกับ สัญญาณที่มีต่อปริมาณกลูโคสลดน้อยลง สัญญาณที่ได้ที่มีค่าสูง สุด คือ สัญญาณที่มีความหนาของฟิล์มมีค่าเท่ากับ X_p สำหรับงานวิจัยนี้จะต้องให้ปริมาณไฟฟ้าที่ทำให้ เกิดความหนาของฟิล์มเท่ากับ 0.1μ จึงจะได้สัญญาณที่ได้ที่มีค่าสูงสุด

กล่าวโดยสรุปได้ว่าปริมาณไฟฟ้าที่ให้กับอิเล็กโทรดนอกจากจะมีผลกับ ความหนาของฟิล์มแล้ว ยังมีผลกับปริมาณของเฟอริไซยาไนด์ ที่จะถูกตรึงลงไปในฟิล์มและสัญญาณกระแสที่ได้เมื่อทำการวัด ปริมาณกลูโคสด้วย



รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าที่ให้กับอิเล็กโทรดในขณะที่โพลิเมอร์ไรซ์ และ สัญญาณกระแสที่ได้จากไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของเฟอริไซยาไนด์ที่ถูกตรึงอยู่ในพอลิไพโรลฟิล์ม



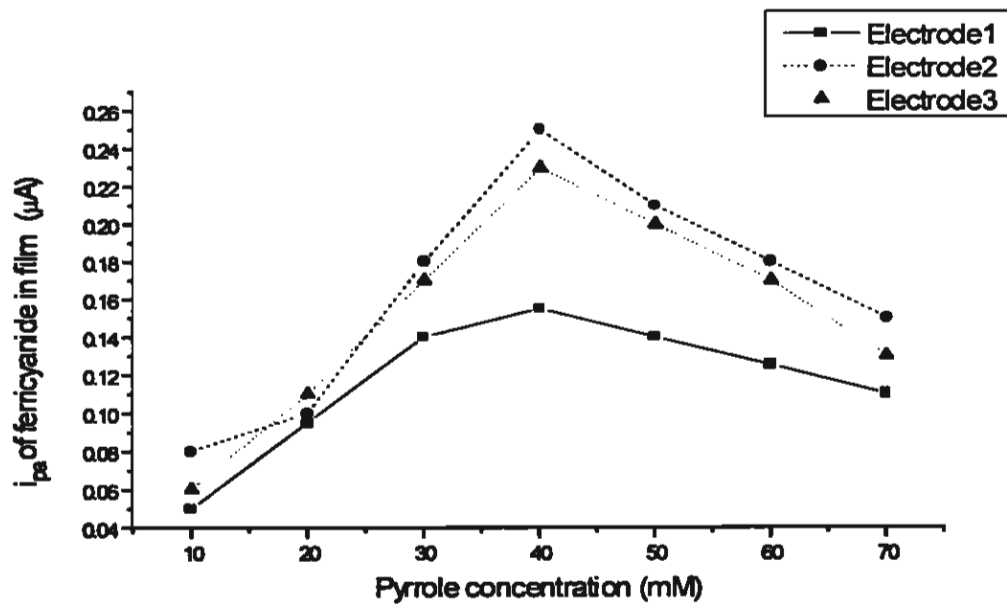
รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สัญญาณตอบสนองที่มีต่อสารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์และปริมาณไฟฟ้าที่ผ่านอิเล็กโทรดในสารละลายของ 40 มิลลิโมลาร์ของไฟโรล GOD ล 25 unit/ลูกบาศก์ เซนติเมตรของ และ 50 มิลลิโมลาร์เฟอริไซยาไนด์

การศึกษาผลของความเข้มข้นของไฟโรลที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

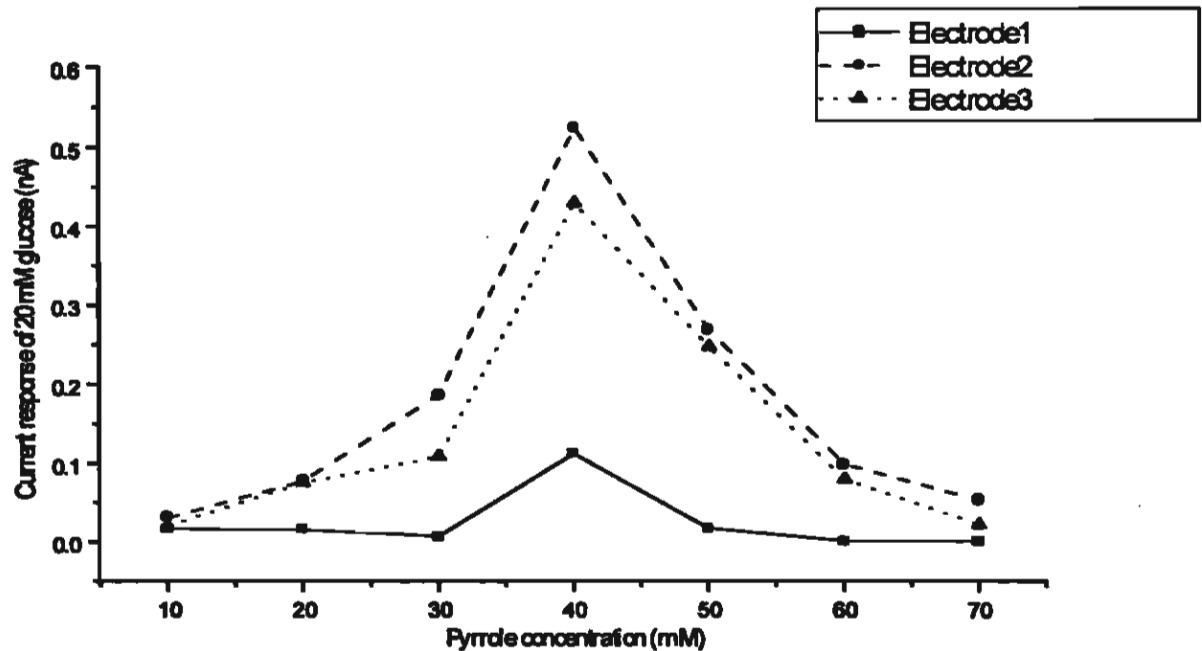
จากการตรวจสอบเมื่อใช้ไฟโรลที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อสัญญาณตอบสนองในขณะที่ทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 13

พบว่าปริมาณของ เฟอริไซยาไนด์ ที่ตรึงอยู่ในฟิล์มที่ถูกวัดในรูปของ กระแสแคโทดิก (i_{pa}) จากไซคลิกโวลแทมโมแกรม จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฟโรลในสารละลายที่ใช้ในการโพลีเมอไรซ์ จนกระทั่งความเข้มข้นของไฟโรลมากกว่า 50 mM พบว่า กระแสแคโทดิกของ เฟอริไซยาไนด์จะเริ่มลดลง

สำหรับผลของความเข้มข้นของไฟโรลในสารละลายที่ใช้สร้างฟิล์ม PPy/Ferri/GOD บนอิเล็กโทรดทอง ที่มีต่อสัญญาณแอมเพอโรเมตริก ที่ได้จากการวัดปริมาณกลูโคสสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 14 ปริมาณไฟฟ้าที่ให้กับอิเล็กโทรด แต่ละครั้งมีค่าคงที่คือ 42.5 มิลลิคูลอมป์/ตารางเซนติเมตร ซึ่งคำนวณเป็นความหนาของฟิล์มได้ประมาณ 0.1 ไมโครเมตร (0.095 ไมโครเมตร) กระแสตอบสนองต่อปริมาณกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์ จะถูกบันทึกที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V จากการทดลองนี้ ความเข้มข้นของไฟโรลที่เหมาะสมที่สุด (ให้สัญญาณกระแสตอบรับที่มีต่อกลูโคสสูงที่สุด, 0.115 นาโนแอมแปร์) คือ 40 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของไฟโรลนี้ สำหรับการทดลองอื่น ๆ ตลอดงานวิจัยนี้



รูปที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไพโรลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสัญญาณกระแสที่ได้จากไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของเฟอริไซยาไนด์ที่ถูกตรึงอยู่ในพอลิไพโรลฟิล์ม



รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สัญญาณกระแสที่มีต่อสารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์และปริมาณไฟฟ้าที่ผ่านอิเล็กโทรดในสารละลายของ 40 มิลลิโมลาร์ของไพโรล 25 units ของ GOD/ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 50 มิลลิโมลาร์เฟอริไซยาไนด์

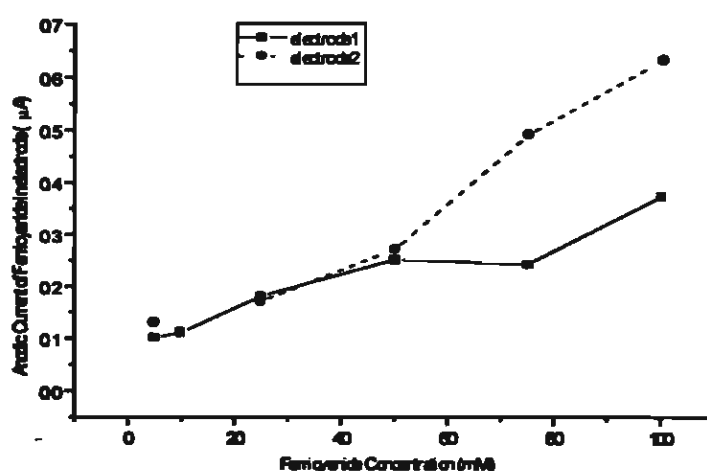
การศึกษาผลของความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์ ที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Anodic peak current (i_{pa}) และความเข้มข้นของ เฟอริไซยาไนด์ จากรูปเมื่อความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์มากขึ้น พบว่าในฟิล์มจะมีเฟอริไซยาไนด์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้ปริมาณกลูโคสออกซิเดสที่ตรึงอยู่ในฟิล์มลดน้อยลง

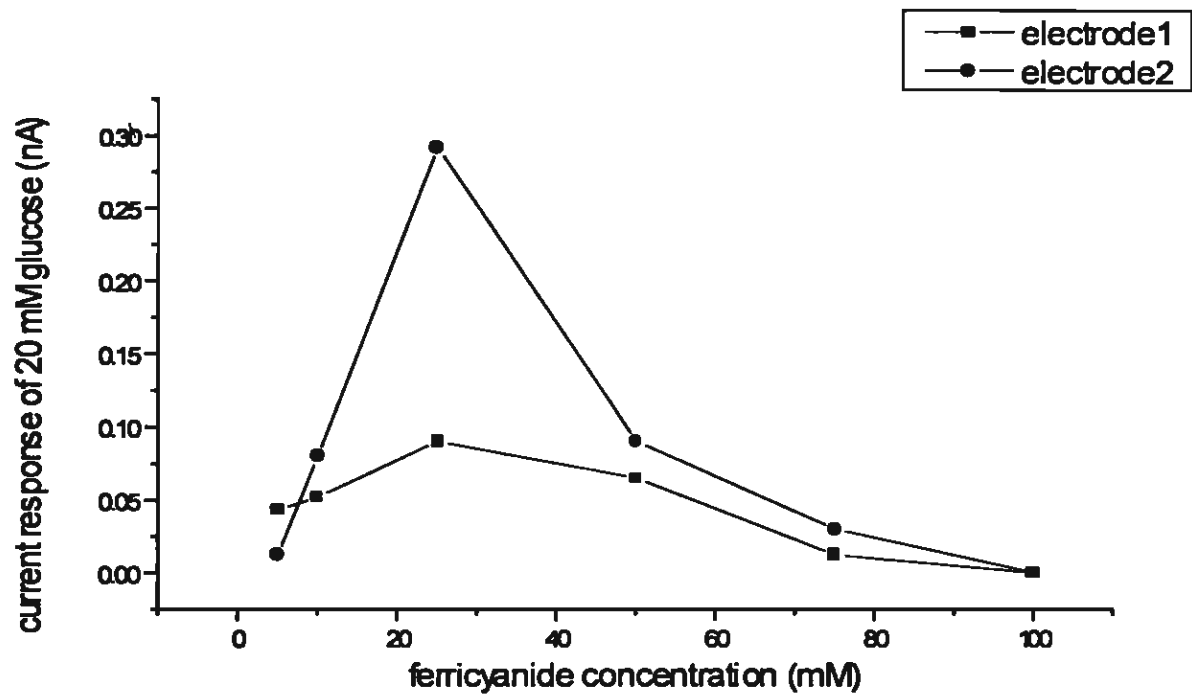
ในระหว่างที่ทำการอิเล็กโทรโพลีเมอร์ไรซ์เซชัน ที่ 0.7 V กลูโคสออกซิเดส ซึ่งมีประจุลบเมื่อมี pH สูงกว่า 6 สามารถจะเข้าไปอยู่ในฟิล์มได้เพราะ พอลิไพโรลมีประจุบวกกลูโคสออกซิเดส มีประจุลบ จึงยึดติดได้เพราะเป็น counter ion

เฟอริไซยาไนด์ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนที่มีประจุลบสาม และมีขนาดเล็ก ดังนั้นจึงสามารถแข่งขันกับกลูโคสออกซิเดสที่จะไปเกิดการยึดติดแบบ electrostatic กับพอลิไพโรลมีประจุบวกได้ เมื่อมีปริมาณเฟอริไซยาไนด์น้อยกลูโคสออกซิเดสก็สามารถจะเข้าไปอยู่ใน ฟิล์มพอลิเมอร์ได้แต่เมื่อ เพิ่มความเข้มข้นของ เฟอริไซยาไนด์ โอกาสที่กลูโคสออกซิเดสจะเข้าไปอยู่ในฟิล์มจะน้อยลง ซึ่งสามารถเห็นได้จาก Anodic peak current ของเฟอริไซยาไนด์ ก็จะสูงขึ้นด้วย แสดงว่ามีเฟอริไซยาไนด์อยู่ในฟิล์มได้มากขึ้น

ผลของความเข้มข้นของ เฟอริไซยาไนด์ เมื่อใช้ เอนไซม์อิเล็กโทรด ทำการทดลองวัดปริมาณ กลูโคสความเข้มข้น 20 mM ได้สัญญาณตอบรับดังแสดงในรูปที่ 16 เราพบว่า เมื่อมีเฟอริไซยาไนด์อยู่ในฟิล์มมาก สัญญาณตอบรับที่มีต่อกลูโคส ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย จนถึงความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์ค่าหนึ่ง ซึ่งจะให้สัญญาณตอบรับที่สูงที่สุด สำหรับการทดลองนี้ คือ ความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์เท่ากับ 25 mM เมื่อความเข้มข้นของ เฟอริไซยาไนด์มากกว่าค่านี้ สัญญาณตอบรับที่มีต่อกลูโคสจะเริ่มลดลง เพราะว่าในฟิล์มจะมีปริมาณกลูโคสออกซิเดสน้อยลง



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเฟอริไซยาไนด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสัญญาณกระแสที่ได้จากไซคลิกโวลแทมโมแกรม ของเฟอริไซยาไนด์ที่ถูกตรึงอยู่ในพอลิไพโรลฟิล์ม

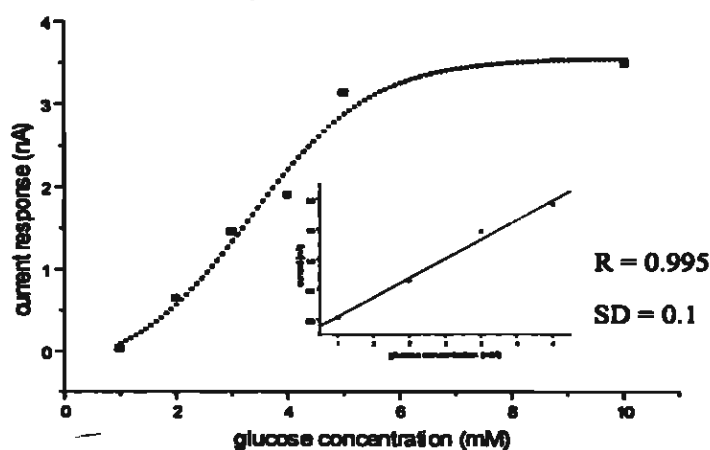


รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สัญญาณกระแสที่มีต่อสารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์และความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์ ในสารละลายของ 40 มิลลิโมลาร์ของไฟโรล 25 units ของ GOD/ลูบาสก์ เซนติเมตร และปริมาณไฟฟ้า 45 มิลลิคูลอมป์/ ตารางเซนติเมตร

การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์อีเล็กโทรด

ความไว (Sensitivity)

ความไวของกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้จากการทดลองนี้ พบว่าเท่ากับ 0.05 มิลลิโมลาร์ / แอมแปร์ ดังแสดงในรูปที่ 13

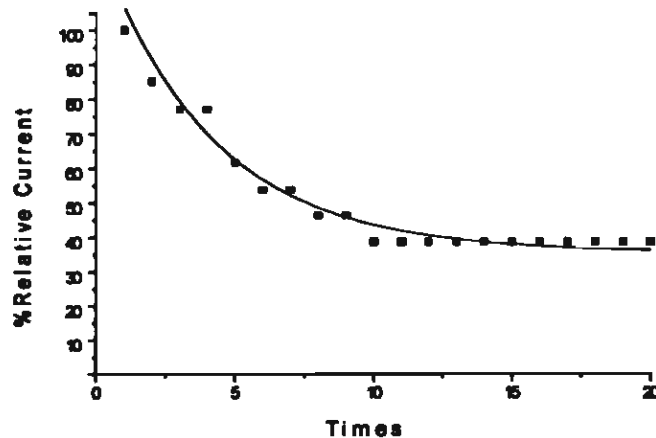


รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแส และความเข้มข้นของกลูโคส

ความเสถียร (Stability)

1. ความเสถียรต่อการใช้งาน (Operational Stability)

จากการตรวจสอบความเสถียรของกลูโคสไมโครอิเล็กโทรดที่เตรียมได้นี้ โดยทำการฉีกกลูโคสแล้ววัดปริมาณกลูโคสอย่างต่อเนื่อง 20 ครั้ง พบว่าสัญญาณตอบสนองต่อปริมาณกลูโคสเปลี่ยนแปลง สัญญาณลดลง และเริ่มคงที่เมื่อทำการวัดครั้งที่ 3 และ 6 ดังแสดงในรูปที่ 18 อย่างไรก็ตามสัญญาณเริ่มลดน้อยลงเมื่อทำการวัดครั้งที่ 11



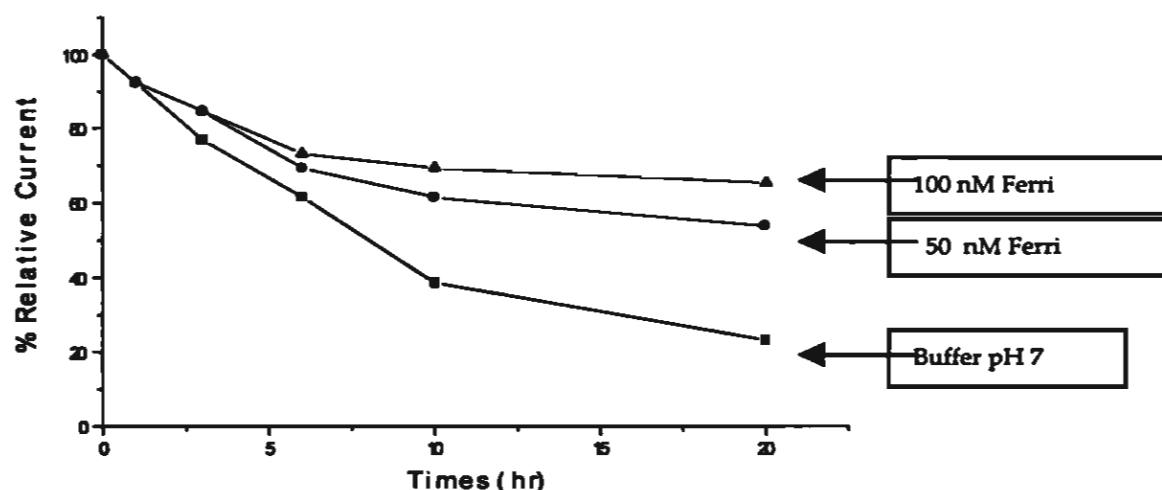
รูปที่ 18 แสดงความเสถียรต่อการใช้งานของอิเล็กโทรดที่ทำกรวัดกลูโคส 20 mM ที่ 0.45 โวลท์

จากเอกสารอ้างอิง สามารถอธิบายได้ว่า สัญญาณที่ลดลงเนื่องมาจาก ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน เฟอร์ริไซยาไนด์ สามารถแพร่หนีออกจากฟิล์มมาอยู่ในสารละลาย และยังเนื่องมาจากการสูญเสียแอกทिवิตีของเอนไซม์อีกด้วย ดังนั้นหลังจากใช้อิเล็กโทรดวัดปริมาณกลูโคสแล้ว ได้นำอิเล็กโทรดมาตรวจสอบปริมาณเฟอร์ริไซยาไนด์ที่อยู่ในฟิล์มอีกด้วย และเมื่อทำการวัดกระแสแอโนดิกจากไซคลิกโวลแทมโมแกรม แล้วนำมาพล็อตกราฟเทียบกับจำนวนครั้งที่ใช้งาน จะเห็นได้ว่าปริมาณของเฟอร์ริไซยาไนด์ลดลง และเริ่มคงที่เมื่อทำการวัดครั้งที่ 10 แสดงว่าปริมาณของเฟอร์ริไซยาไนด์ในฟิล์มเป็นแฟกเตอร์หนึ่งที่มีผลกับความเสถียรของอิเล็กโทรด

2. ความเสถียรในระหว่างเก็บ (Storage Stability)

จากการตรวจสอบความเสถียรในระหว่างการเก็บของกลูโคสไมโครอิเล็กโทรดที่เตรียมได้นี้ พบว่าสัญญาณตอบสนองต่อปริมาณกลูโคสเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อใช้แล้วเก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปราศจากกลูโคส 1 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บไว้นานกว่า 24 ชั่วโมง พบว่าสัญญาณลดลงมากกว่า 50% จากค่าที่วัดได้ในขณะเริ่มต้น จากข้อมูลที่ได้ทำการทดลอง เพื่อยืนยันว่าเฟอร์ริไซยาไนด์ สามารถแพร่หนีออกจากฟิล์มมาอยู่ในสารละลาย ทำให้ปริมาณของเฟอร์ริไซยาไนด์ในฟิล์มลดน้อยลง ดังนั้นจึงได้ลองเก็บอิเล็กโทรดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเฟอร์ริไซยาไนด์อยู่ด้วย ได้ทำการทดลองเก็บอิเล็กโทรดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มีเฟอร์ริไซยาไนด์ความเข้มข้นต่าง ๆ 50, 100, 500 nM และ 1 mM

ทำการวัดกลูโคสได้ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 19 สำหรับอิเล็กโทรดที่เก็บอยู่ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มีเฟอริไซยาไนด์ความเข้มข้นมากกว่า 100 mM พบว่าจะไม่สามารถวัด ปริมาณกลูโคสได้ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากสูญเสียแอกทีวิตีของเอนไซม์ โดยเฟอริไซยาไนด์ที่มีมาก เป็นตัวทำลาย



รูปที่ 19 แสดงความเสถียรในระหว่างการเก็บของกลูโคสไมโครอิเล็กโทรดใน 100, 50 nM ferricyanide และ phosphate buffer pH 7 at 4 °C.

ตัวรบกวน

ตัวรบกวนที่ทำการศึกษา คือ ascorbic acid อิเล็กโทรดที่ใช้มี 2 ชนิดคือ อิเล็กโทรดทองที่ไม่ ได้ทำการพอลิเมอร์ และตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $K_3Fe(CN)_6$ กับอิเล็กโทรดทองที่ได้ทำการพอลิเมอร์ และตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $K_3Fe(CN)_6$

Ascorbic acid

ตารางที่ 1 แสดงกระแสของ ascorbic acid ความเข้มข้น 40 μM เมื่อใช้อิเล็กโทรดทองที่ไม่ ได้ทำการตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $K_3Fe(CN)_6$ ในฟิล์มพอลิไพโรล (PPy/GOD/Ferri electrode) และ ตารางที่ 2 แสดงกระแสของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทำการวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 และ 0.7 โวลต์ จากผลการทดลองพบว่า ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์ ค่ากระแสจะต่ำกว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ ทุกความเข้มข้นของ ascorbic acid

ตารางที่ 1 แสดงกระแสของ ascorbic acid ความเข้มข้น 40 μM เมื่อใช้อิเล็กโทรดทองที่ไม่ได้ทำการตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ในฟิล์มพอลิไพโรล (PPy/GOD/Ferri electrode)

E(V)	I (nA)
0.70	200
0.45	3.0
0.30	0.27
0.10	0.1
0	none

ตารางที่ 2 แสดงกระแสของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทำการวัดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 และ 0.7 โวลต์ จากผลการทดลองพบว่า ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 โวลต์ ค่ากระแสจะต่ำกว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ ทุกความเข้มข้นของ ascorbic acid

Ascorbic acid (μM)	I (nA) 0.45 V	I (nA) 0.70 V
40	1.57	10.19
20	1.45	4.70
10	1.19	1.64
5	0.12	0.20
1	none	none

สรุป

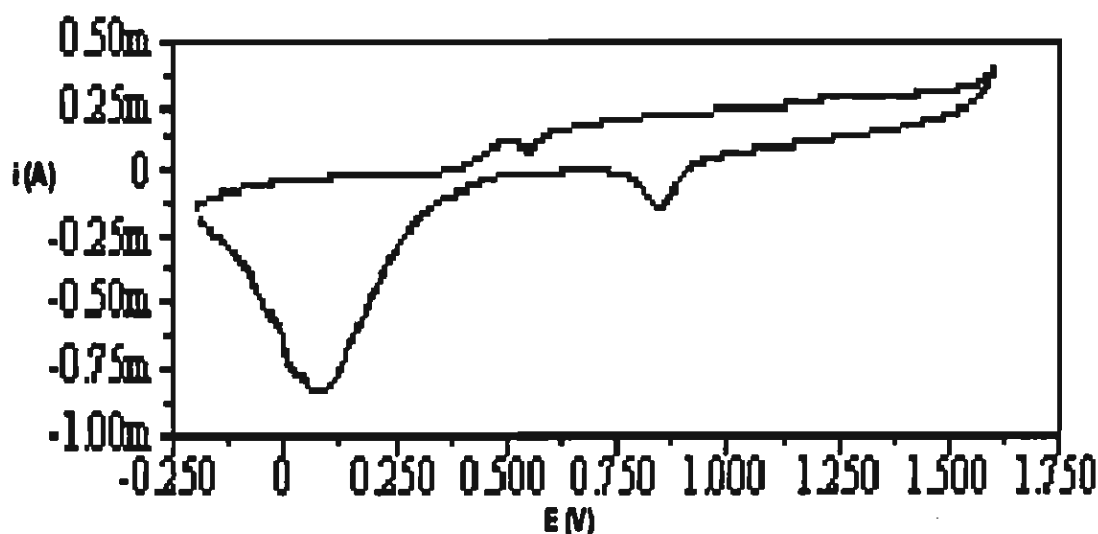
งานวิจัยนี้ สามารถสร้างไมโครอิเล็กโทรด ที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส/เฟอริไซยาไนด์ ลงในพอลิไพโรล พบว่ามีไซยาไนด์ตรึงอยู่ในฟิล์มจริง นอกจากนี้ยังสามารถใช้เฟอริไซยาไนด์นี้เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน สามารถนำอิเล็กโทรดชนิดนี้มาหาปริมาณกลูโคส โดยเทคนิค แอมเพอโรเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V ซึ่งสามารถลดตัวรบกวนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้ามากกว่า 0.45 V ได้

โครงการที่ 2: การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีดริ้งเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง

การสร้างอิเล็กโทรดทอง

1. อิเล็กโทรดแบบฝัง

นำอิเล็กโทรดแบบฝังมาทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่าอิเล็กโทรดแบบฝังเกิดการรั่วของอีพอกซี เรซิน (Epoxy resin) ทำให้ได้โวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 20 ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลสำหรับกลูโคสเซนเซอร์ได้

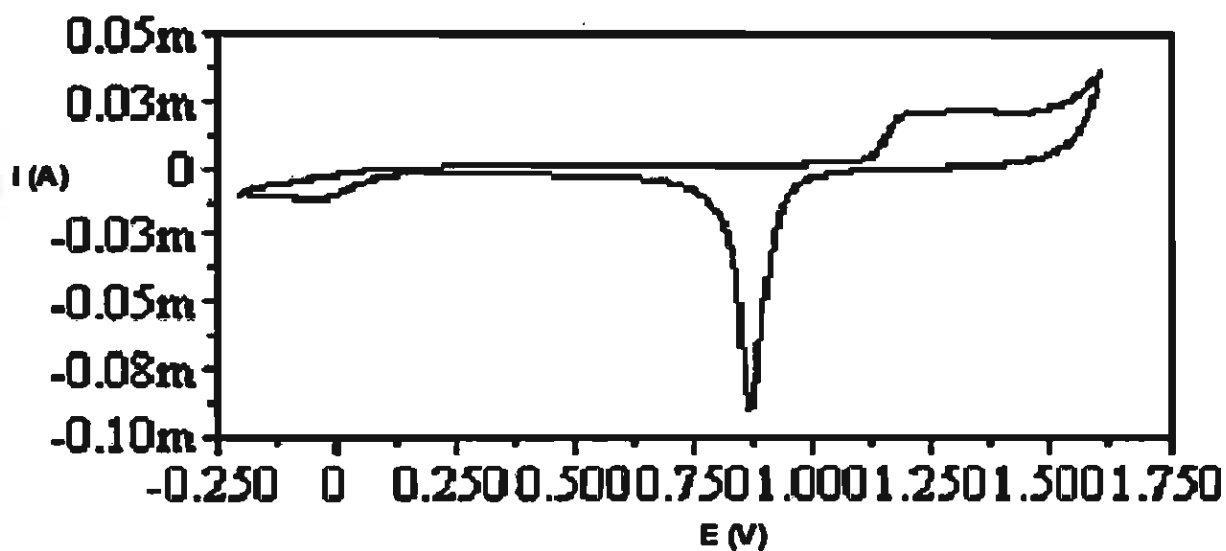


รูปที่ 20 โวลแทมโมแกรมของสารละลาย $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ที่ได้จากอิเล็กโทรดแบบฝัง แสดงการทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าพบว่าการรั่วของอีพอกซีเรซิน

2. อิเล็กโทรดแบบเสมอ

จากการสร้างอิเล็กโทรดแบบฝังไม่สามารถนำมาใช้ในโครงการนี้ได้ จึงมีการสร้างอิเล็กโทรดอีกชนิดหนึ่ง คือแบบเสมอ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นโลหะทองปิดแท่งแก้วอย่างสนิทเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการรั่วของอีพอกซี เรซิน ออกมาสู่ภายนอกขณะทำการทดลอง

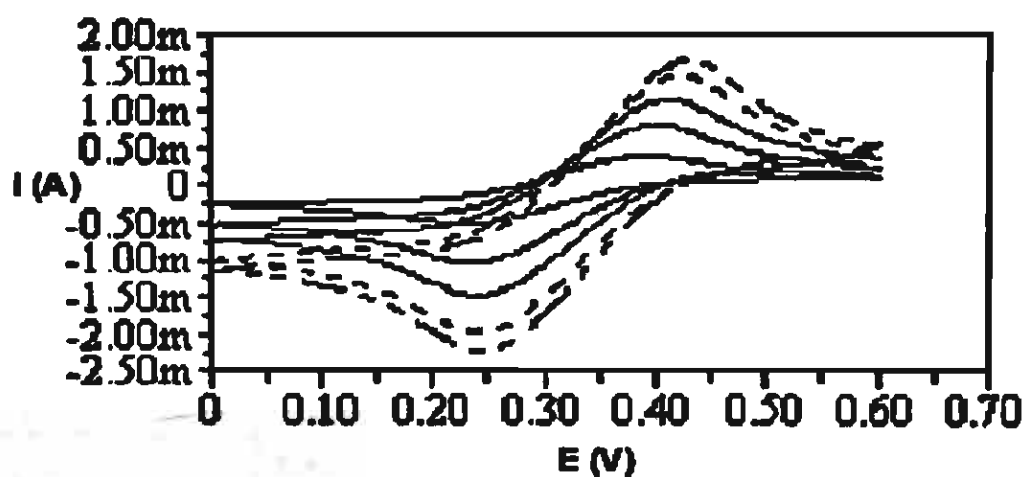
จากการทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า พบว่าโวลแทมโมแกรมที่ได้จากอิเล็กโทรดแบบเสมอไม่เกิดการรั่วของอีพอกซีเรซิน (Epoxy resin) ดังโวลแทมโมแกรมรูปที่ 21



รูปที่ 21 โวลแทมโมแกรมของสารละลาย 0.1 M H_2SO_4 ที่ได้จากอิเล็กโทรดแบบเสมอ แสดงการทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าพบว่าไม่เกิดการรบกวนของอีพอกซีเรซิน

การตรวจหาพื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรดทอง

ทำการตรวจหาพื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรดโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ซึ่งใช้ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ เป็นรีดอกซ์ โมเลกุล ในสารละลาย 0.1M KCl ได้โวลแทมโมแกรมดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงไซคลิก โวลแทมโมแกรมของ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 – 0.5 mmol/cm³

จากโวลแทมโมแกรมของ $K_3Fe(CN)_6$ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้น $K_3Fe(CN)_6$ และข้อมูลที่ได้จากไซคลิก โวลแทมโมแกรม

C (mmol/cm ³)	E _{red}	I _{red}
0.10	0.14	1.9624×10^{-3}
0.20	0.13	3.5822×10^{-3}
0.30	0.13	4.7772×10^{-3}
0.40	0.13	5.3748×10^{-3}
0.50	0.12	5.6410×10^{-3}

นำกรผลจากตารางที่ 3 มาคำนวณพื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรดทองได้จากสมการ

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0$$

$$\text{ดังนั้นพื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรดที่ได้จากการคำนวณ} = 0.1964 \text{ cm}^2$$

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอิเล็กโทรดทองขนาดเสมอ

ศึกษาหาความเข้มข้นของ Nafion และเวลาที่ใช้ในการรอให้ Nafion แห้ง

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่า I_{red} ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Nafion และเวลาที่ใช้ในการรอให้ Nafion แห้ง

ปริมาณ Nafion (μL)	I _{red} (A)		
	เวลา 10 นาที	เวลา 15 นาที	เวลา 20 นาที
0.5	1.51×10^{-4}	2.29×10^{-4}	2.37×10^{-4}
1.0	1.67×10^{-4}	4.57×10^{-8}	1.57×10^{-4}
1.5	2.09×10^{-4}	2.17×10^{-4}	2.15×10^{-4}
2.0	2.10×10^{-4}	2.02×10^{-4}	2.01×10^{-4}
2.5	1.42×10^{-4}	2.48×10^{-4}	2.53×10^{-4}
3.0	2.02×10^{-4}	2.37×10^{-4}	1.48×10^{-4}

จากตารางที่ 4 พบว่าจากการใช้ปริมาณ Nafion 2.5 μL และเวลาที่ในการรอ Nafion แห่งเป็น เวลา 20 นาที ได้ค่า I_{red} ที่สูงที่สุด คือ $2.53 \times 10^{-4} \text{ A}$

แต่เมื่อนำภาวะนี้ไปใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส ไม่สามารถ นำไปใช้วัดกลูโคสต่อไปได้ เนื่องจากแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้มีความหนาเกินไป จากผลการตรวจสอบความหนาของฟิล์มพอลิไพโรลโดย SEM นอกจากนี้แผ่นฟิล์มยังเกิดการร่อนหลุดของฟิล์ม จึง เลือกค่า I_{red} $1.67 \times 10^{-4} \text{ A}$ เพื่อลดความหนาของฟิล์ม โดยใช้ปริมาณ Nafion 1.0 μL และเวลาที่ในการรอให้ Nafion แห่งเป็นเวลา 10 นาที

การศึกษาความเข้มข้นของ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ และเวลาที่ใช้ในการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ ที่มีผลต่อกระแสตอบสนอง

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า I_{red} ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ และเวลาที่ใช้ในการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

เวลา (min)	$I_{\text{red}} \text{ (A)}$				
	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 5 mM	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 10 mM	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 15 mM	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 20 mM	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 25 mM
5	2.90×10^{-7}	1.87×10^{-4}	2.53×10^{-4}	2.65×10^{-4}	2.81×10^{-4}
10	6.00×10^{-5}	2.98×10^{-4}	2.09×10^{-4}	2.36×10^{-4}	2.38×10^{-4}
15	2.97×10^{-4}	2.54×10^{-4}	2.08×10^{-4}	1.82×10^{-4}	2.79×10^{-4}
20	2.09×10^{-4}	2.31×10^{-4}	1.55×10^{-4}	1.64×10^{-4}	2.94×10^{-4}
25	1.02×10^{-4}	2.63×10^{-4}	1.68×10^{-4}	1.68×10^{-4}	2.62×10^{-4}

จากตารางที่ 5 พบว่าจากการใช้ความเข้มข้นของ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 10 mM และเวลาที่ใช้ในการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลาย เป็นเวลา 10 นาที ได้ค่า I_{red} ที่สูงที่สุด คือ $2.98 \times 10^{-4} \text{ A}$ จึงนำภาวะนี้มาใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรล

การศึกษาความเข้มข้นของโพโรล และประจุไฟฟ้าที่ใช้ในการควบคุมการเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล

เมื่อให้ปริมาณประจุไฟฟ้า 45 mC ได้ความหนา 0.1 ไมครอน ดังนั้นอิเล็กโทรด ซึ่งมีพื้นที่ผิว 0.1964 cm² จึงให้ปริมาณไฟฟ้าในการเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล 8.8 mC

สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของโพโรลได้ใช้สองความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโพโรล

ความเข้มข้นของโพโรล (M)	สัญญาณกระแสจากการวัดปริมาณกลูโคส (nA)
0.1	25.00
0.3	27.87

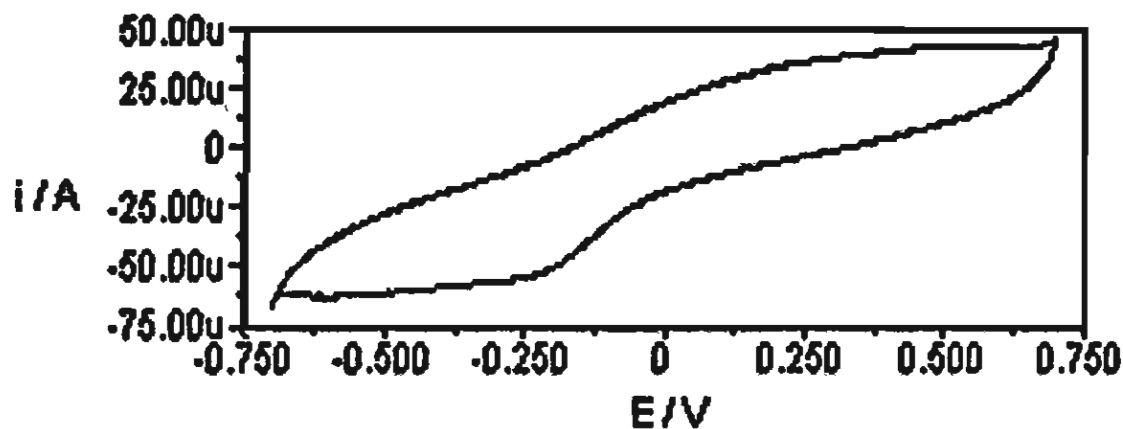
จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าความเข้มข้นของโพโรลที่ให้สัญญาณกระแสมากที่สุดคือความเข้มข้น 0.3 M แต่เมื่อนำความเข้มข้นนี้ไปเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล พบว่าแผ่นฟิล์มไม่เรียบ และไม่ปกคลุมทุกส่วนของพื้นผิวอิเล็กโทรด อาจเกิดจากความเข้มข้นของโพโรลมากเกินไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโพโรล 0.1 M ซึ่งมีความเรียบและสม่ำเสมอของแผ่นฟิล์มมากกว่า

การเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล

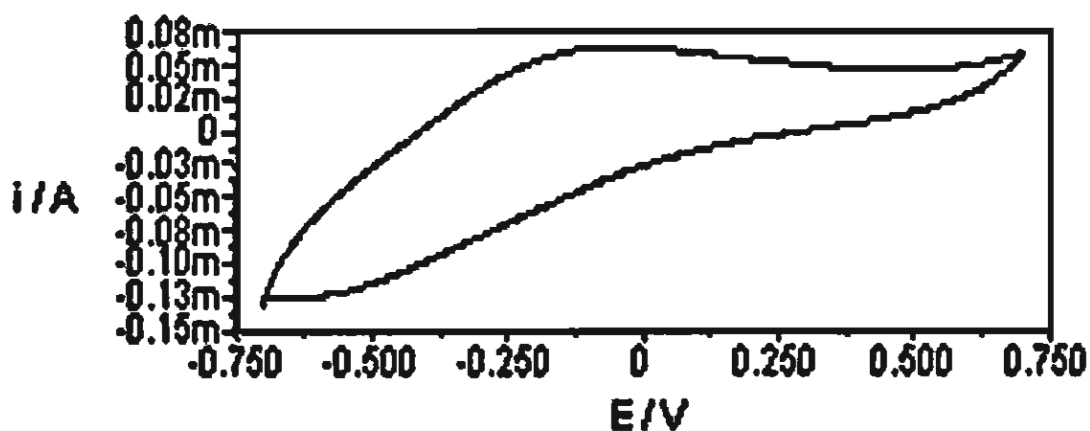
เมื่อใช้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

การตรวจสอบอิเล็กโทรด ก่อนและหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

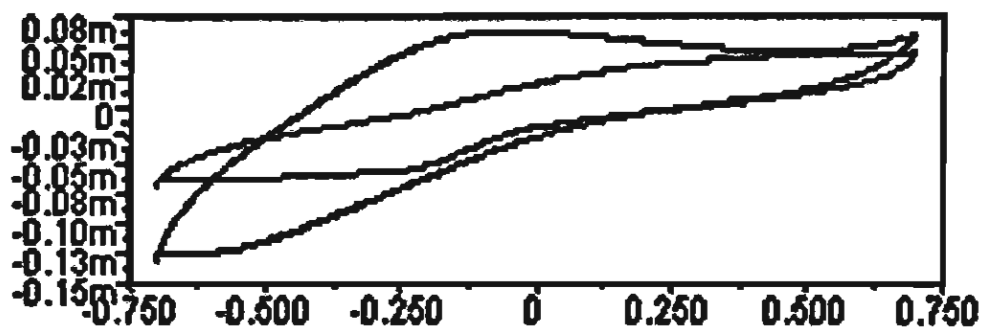
ทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเปรียบเทียบไซคลิก โวลแทมโมแกรมก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชันที่พื้นผิวอิเล็กโทรดดังรูปที่ 23 และหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ดังรูปที่ 24 ซึ่งจากโวลแทมโมแกรมที่แสดงการเปรียบเทียบดังรูปที่ 25 ภายหลังจากทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน มีกระแสเพิ่มสูงขึ้นกว่าก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน แสดงให้เห็นความแตกต่างของอิเล็กโทรดที่ยังไม่ได้ทำการเตรียมฟิล์ม และภายหลังเมื่อมีการเตรียมฟิล์มพอลิโพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส



รูปที่ 23 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



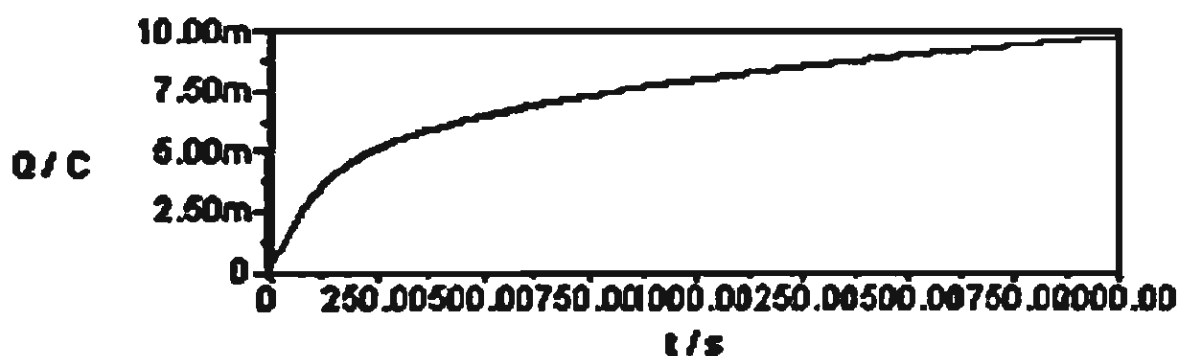
รูปที่ 24 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V หลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



รูปที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และหลังพอลิเมอร์ไรเซชัน

การพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล

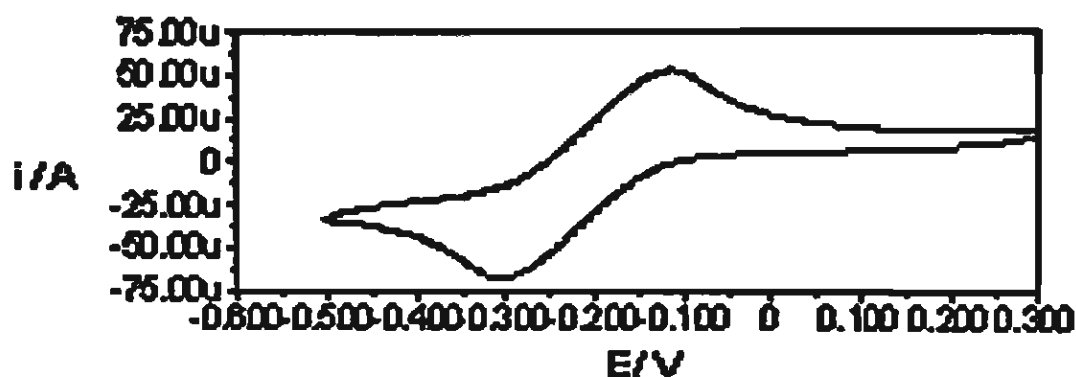
ใช้เทคนิคคูลอมป์เมตรีในการพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.7 V ในสารละลาย 50 Units/mL GOD และ 0.1 M ไพโรล โดยมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ทำการควบคุมปริมาณไฟฟ้าที่ให้ จะเกิดปฏิกิริยาการพอลิเมอร์ไรเซชันดังแสดงในรูปที่ 26 ซึ่งเมื่อเวลาที่ใช้ในการพอลิเมอร์ไรเซชันมากขึ้น ปริมาณกระแสไฟฟ้าก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย



รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (Q) กับเวลา (t) ในการพอลิเมอร์ไรเซชัน

เมื่อใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

การตรวจสอบไซคลิก โวลแทมโมแกรมของ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ ในสารละลาย 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำการทดลองใน 5 mM สารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ ด้วยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมตรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก 0.3 ถึง -0.5 V ดังแสดงในรูปที่ 27

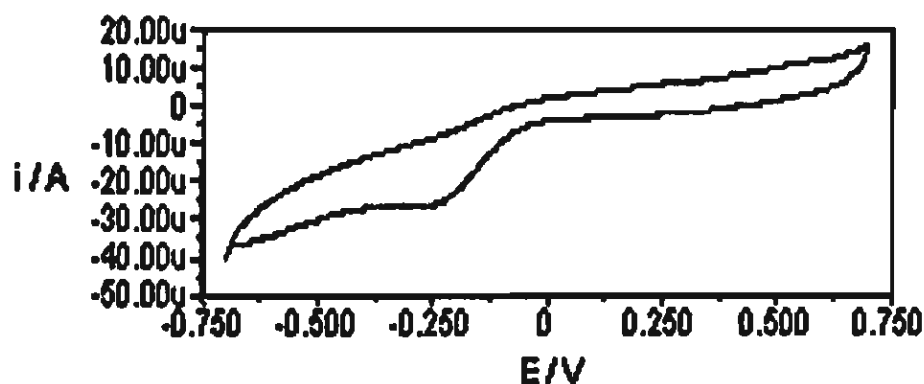


รูปที่ 27 แสดงโวลแทมโมแกรมของ 5 mM สารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ โดยเทคนิคทางไซคลิก โวลแทมเมตรีโดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก 0.3 ถึง -0.5 V

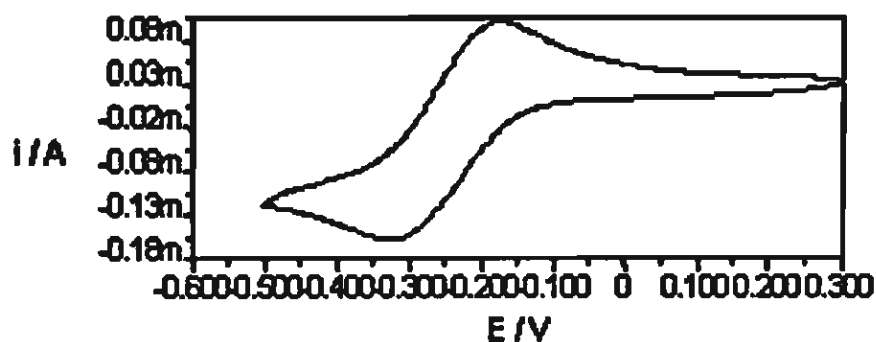
การตรวจสอบอิเล็กโทรด ก่อนและหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

ทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเปรียบเทียบไซคลิก โวลแทมโมแกรมก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชันที่พื้นผิวอิเล็กโทรดดังรูปที่ 28 และหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ดังรูปที่ 29

ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ได้นำอิเล็กโทรดไปทำความสะอาดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าอีกครั้งหนึ่ง เพื่อกำจัดไอออนที่ติดอยู่บริเวณพื้นผิวหน้าอิเล็กโทรด เนื่องจากต้องทำการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ โดยวิธีอิเล็กโตรสแตติก ไบดิงส์ (Electrostatic binding) ดังนั้นพื้นผิวหน้าจะต้องมีความสะอาดที่สุดเพื่อให้การตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ มีประสิทธิภาพมากที่สุด
หลัง ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ บนอิเล็กโทรด

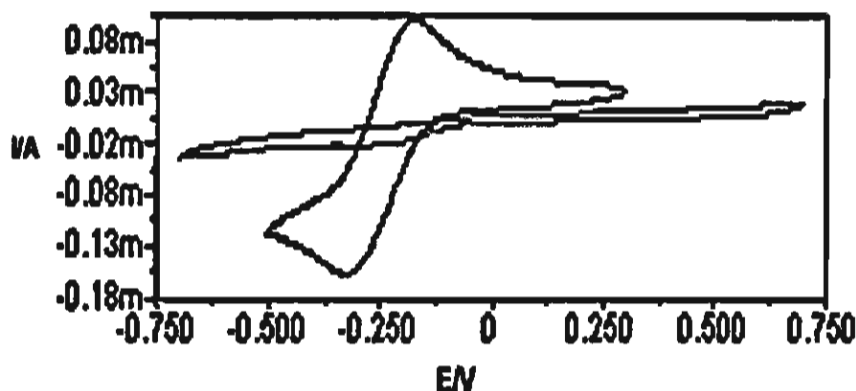


รูปที่ 28 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน สารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



รูปที่ 29 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองในสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V หลังตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ บนอิเล็กโทรด และทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

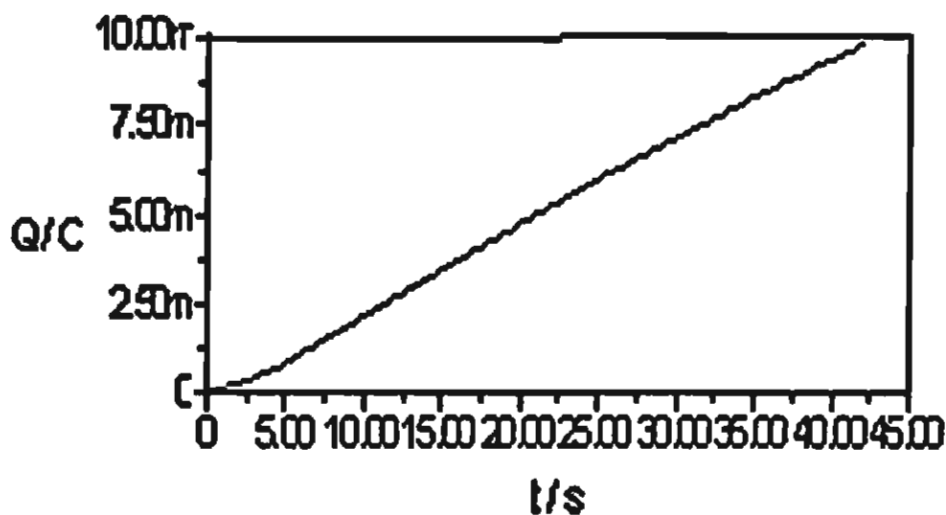
เมื่อนำไซคลิก โวลแทมโมแกรม ของรูปที่ 28 และ 29 มาเปรียบเทียบจะได้ โวลแทมโมแกรม ดังแสดงในรูปที่ 30 จะเห็นได้ว่าโวลแทมโมแกรมที่ได้ก่อน และหลัง ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ บนอิเล็กโทรด มีความแตกต่าง โวลแทมโมแกรมหลัง ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ แสดงฟีก ของ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ ขึ้น ทำให้ทราบว่าได้มีการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ บนอิเล็กโทรดแล้ว



รูปที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และหลังพอลิเมอร์ไรเซชัน

การพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล

หลังจากการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ โดยวิธีอิเล็กโตรสแตติก ไลดิงส์ (Electrostatic binding) นำอิเล็กโทรดไปทำการพอลิเมอร์ไรเซชันในสารละลาย 50 Units/mL GOD และ 0.1M ไพโรล โดยเทคนิคคูลอมป์เมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V ดังรูปที่ 12 ลักษณะของกราฟมีความชันมากกว่ารูปที่ 7 ซึ่งเป็นการพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล เมื่อไม่มีการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ นอกจากนี้ เวลาที่ใช้ในการพอลิเมอร์ไรเซชันสำหรับอิเล็กโทรดที่มีการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ จะใช้เวลาน้อยกว่าอิเล็กโทรดที่ใช้ O_2 เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน เมื่อควบคุมปริมาณไฟฟ้าที่ให้เท่าเดิม คาดว่าเนื่องจาก $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล ดังแสดงในรูปที่ 31



รูปที่ 31 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (Q) กับเวลา (t) ในการพอลิเมอร์ไรเซชันเมื่อมีการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$

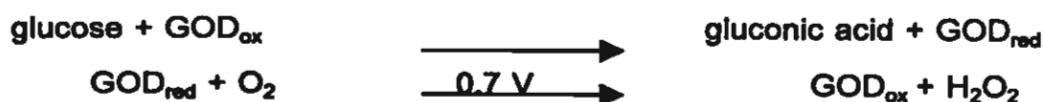
นอกจากนี้ขั้นตอนใน การตรึงกลูโคสออกซิเดส ผู้ทำการวิจัยได้ทดลองทำการจุ่มอิเล็กโทรดที่ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ แล้ว ในสารละลายกลูโคสออกซิเดสก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน เพื่อต้องการให้มีการตรึง GOD อยู่ในอิเล็กโทรดปริมาณมาก แต่เมื่อนำไปใช้ตรวจวัดสำหรับหาปริมาณกลูโคส ไม่สามารถวัดสารละลายกลูโคสมาตรฐานได้ จากผลการทดลองคาดว่าเป็นผลมาจากการที่ GOD มีประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่อทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ไฟโรลซึ่งมีประจุเป็นบวกจึงเข้ามาจับกับ GOD ที่ตรึงอยู่ที่ขั้วอิเล็กโทรดอยู่ก่อนแล้วได้ดีกว่า GOD ที่อยู่ในสารละลาย ทำให้กลูโคสไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าอิเล็กโทรดได้ เนื่องจาก GOD ถูกปกคลุมด้วยฟิล์มพอลิไฟโรลที่มีความหนาแน่นมาก ดังนั้นในการนำอิเล็กโทรดไปวัด จึงไม่เกิดกระแสไฟฟ้าเนื่องจากการแพร่ขึ้น

การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

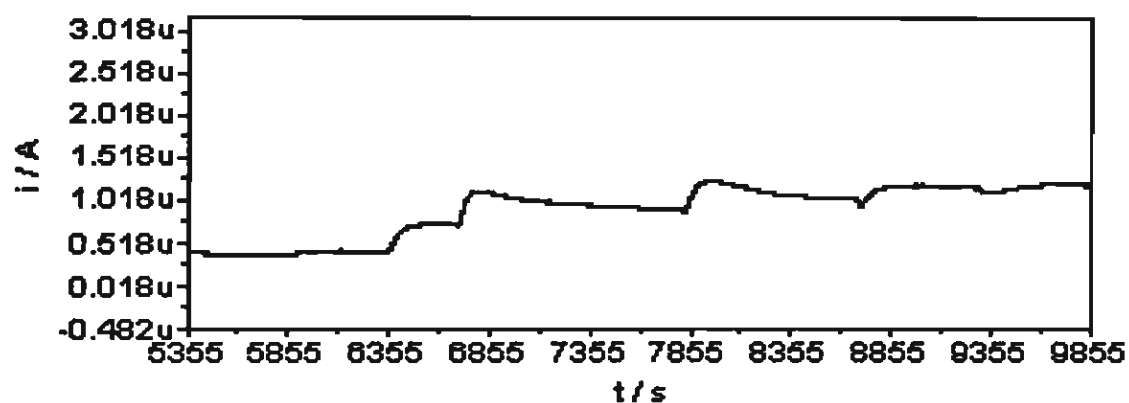
ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

เมื่อนำอิเล็กโทรดที่ได้ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไฟโรลและตรึง GOD แล้ว มาตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 V โดยมีออกซิเจนซึ่งอิ่มตัวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

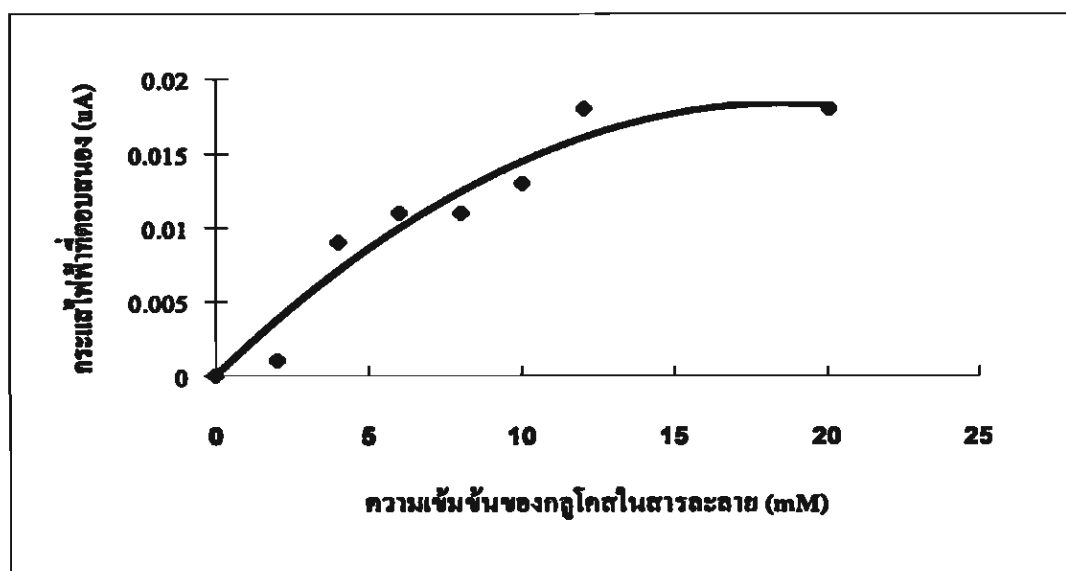
กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วทำงาน คือ



สามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสได้ดังรูปที่ 32



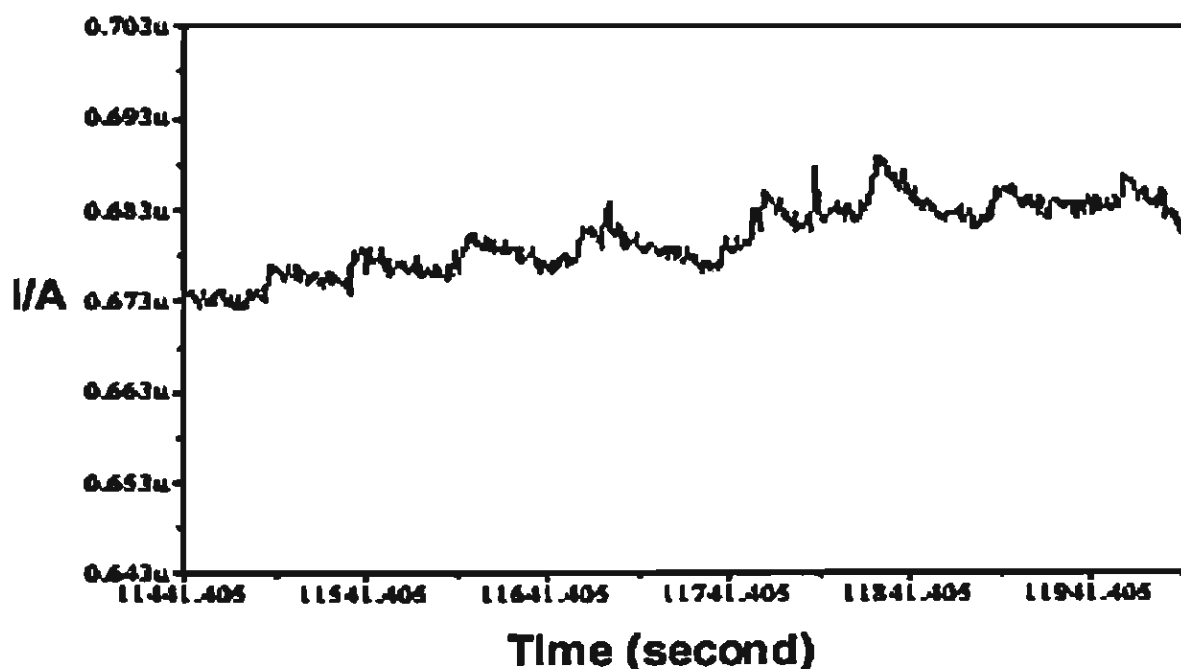
รูปที่ 32 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V



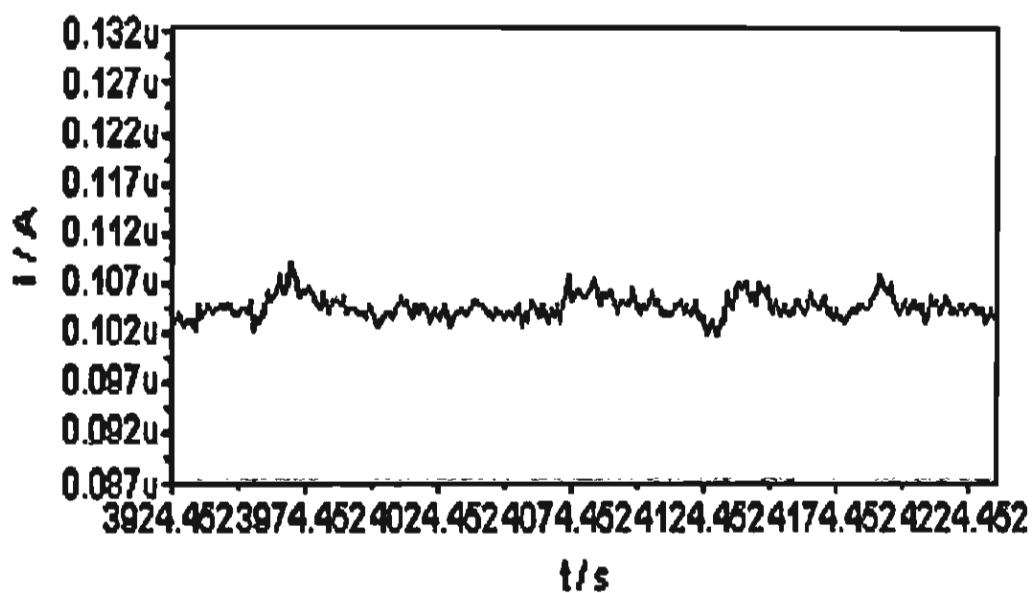
รูปที่ 33 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนอง ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4, 0.2 , 0.0 V

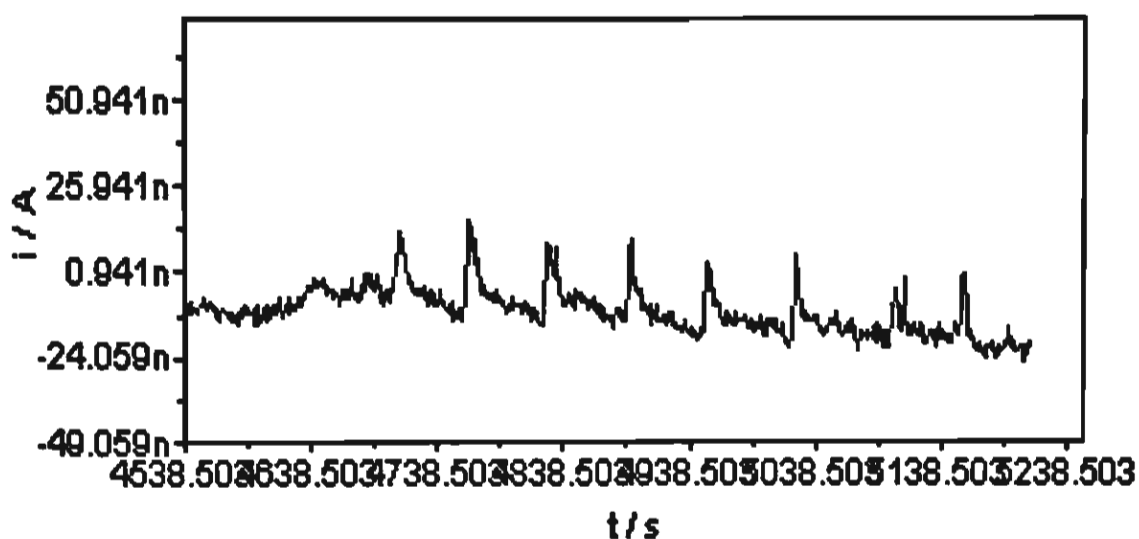
การพัฒนาเกลือโคส ไบโอเซนเซอร์ ในงานวิจัยนี้ต้องการปรับปรุงเพื่อให้สามารถวัดปริมาณเกลือโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า 0.7 V ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงตัวรบกวน และสามารถวัดค่าได้ถูกต้อง โดยใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ดังรูปที่ 34, 35 และ 36 แสดงให้เห็นว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4, 0.2, และ 0.0 V สามารถให้กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลเกลือโคสมาตรฐานตามลำดับ



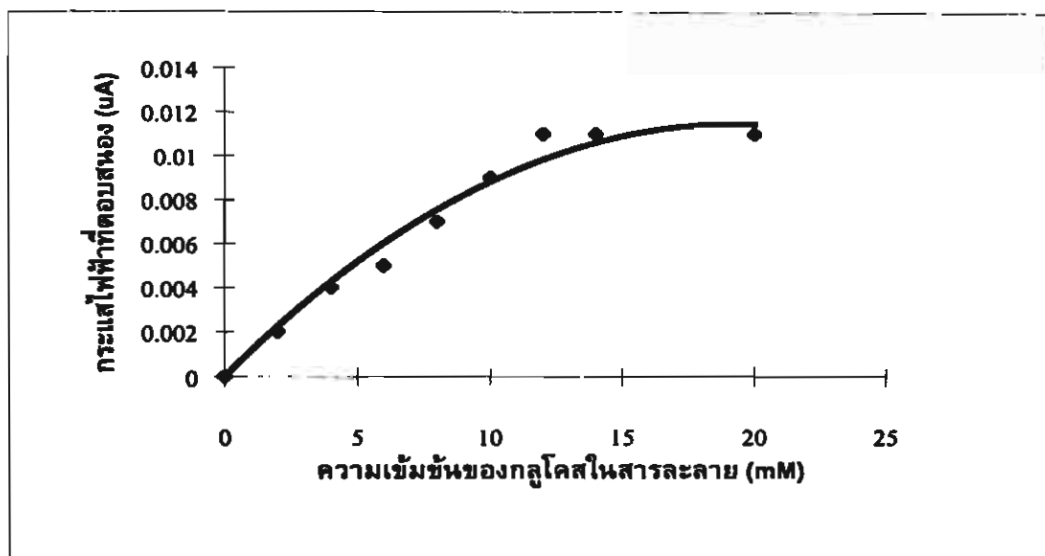
รูปที่ 34 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลเกลือโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V



รูปที่ 35 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.2 V

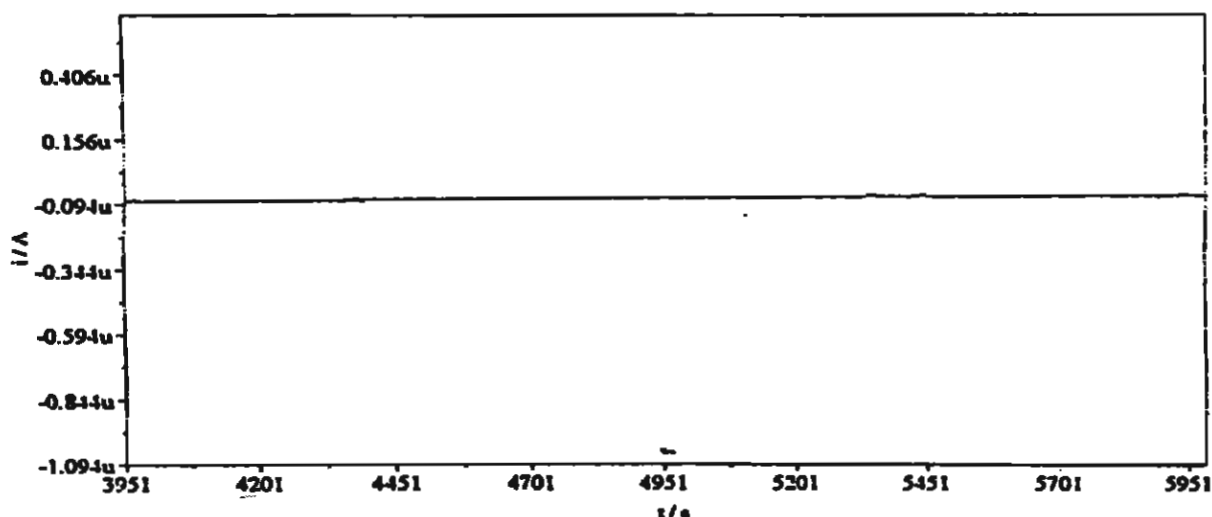


รูปที่ 36 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.0 V



รูปที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนอง ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

ถ้าใช้อิเล็กโทรดที่ไม่มี $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ ตั้งอยู่ในฟิล์มพอลิไพโรลมาทำการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.0 V ไม่สามารถวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากไม่มีตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนที่มาทำหน้าที่แทนออกซิเจนซึ่งเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนในธรรมชาติ

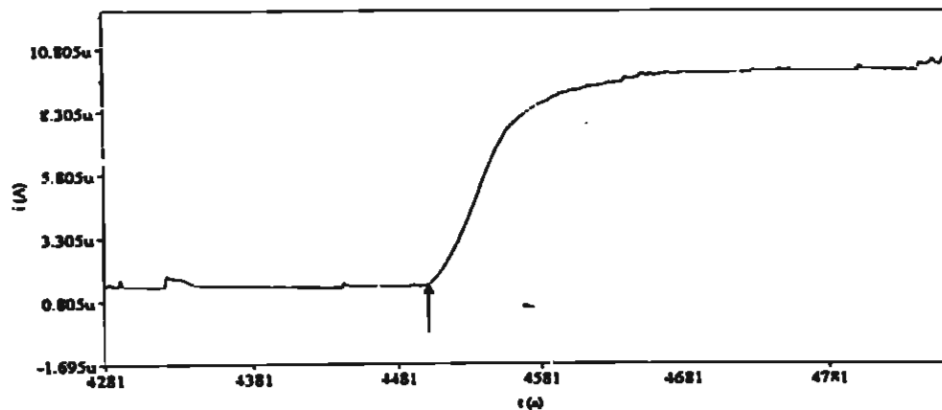


รูปที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองกับเวลาในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.0 V โดยใช้อิเล็กโทรดที่ไม่มีสารตั้ง Ru(NH₃)₆Cl₃

การทดสอบคุณภาพและความสามารถของอิเล็กโทรด

เวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ (response time)

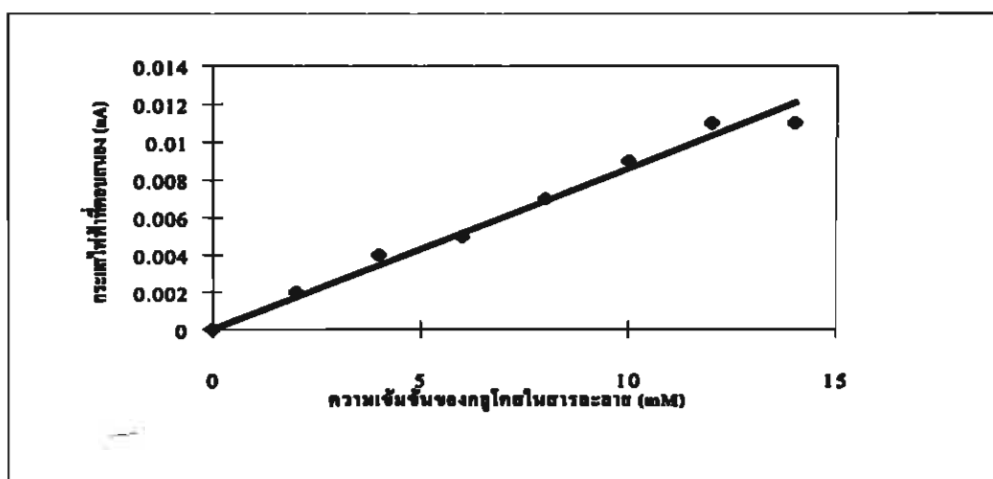
จากการศึกษาเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณของอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลและมีการตรึงกลูโคสออกซิเดส โดยมี $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน ทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V พบว่าเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ คือ 5 วินาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 39



รูปที่ 39 แสดงเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ เมื่อทำการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

ความไว (sensitivity)

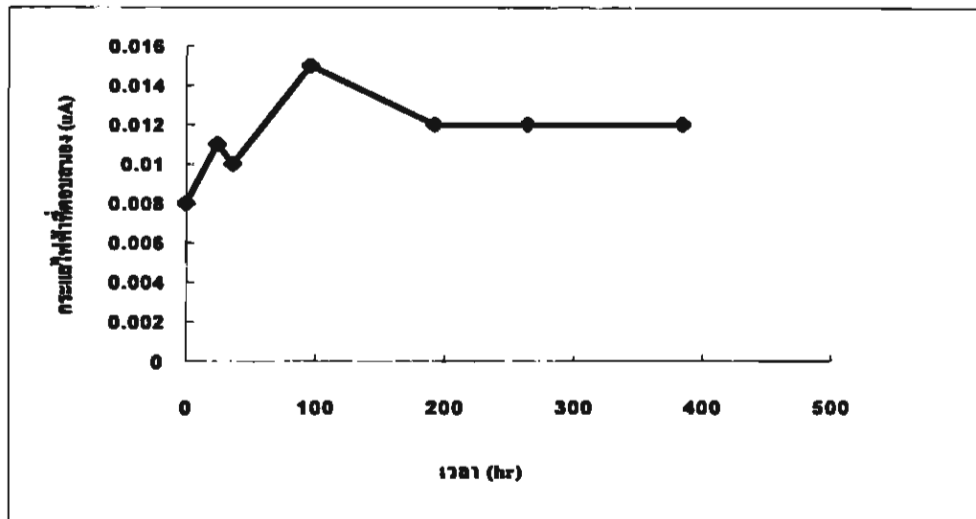
จาก calibration curve ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส เมื่อทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V สามารถคำนวณความไวได้เท่ากับ $5.5 \times 10^{-9} \text{ A/mM}$ ดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

ความเสถียร (stability)

ทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 12 mM ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 V ภายหลังทำการพัฒนาอิเล็กโทรดโดยเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ ในช่วงเวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 41



รูปที่ 41 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

สรุป

งานวิจัยนี้สามารถสร้างแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดน้ำตาลกลูโคสได้ โดยการเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ด้วยกระบวนการอิเล็กโตรพอลิเมอไรเซชัน พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมอิเล็กโตรดนี้มีดังนี้

- การทำอิเล็กโตรพอลิเมอไรเซชันของเอนไซม์บนอิเล็กโตรด :
 - อิเล็กโตรดชั่วคราว: ขั้วทองอิเล็กโตรด
 - ขั้วอ้างอิง: Ag/AgCl อิเล็กโตรด
 - ขั้วเคาน์เตอร์: อิเล็กโตรดแพลตินัม
- โมโนเมอร์ ไพโรล: ความเข้มข้น 0.1 mM
- เอนไซม์: กลูโคสออกซิเดส (*Aspergillus niger*) 50 units/mL
- สารละลายบัฟเฟอร์และค่า pH: ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นประมาณ 0.1 M pH = 7
- ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการพอลิเมอไรเซชัน 0.7 V เทียบกับ Ag/AgCl อิเล็กโตรด
- ปริมาณไฟฟ้าที่ใช้ในการพอลิเมอไรเซชัน 45 mC/cm^2
- การทำอิเล็กโตรสแอดติกไบคิง
 - ใช้ปริมาณ nafion 1 μL เวลาในการรอให้ nafion แห้ง 10 นาที
 - สารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 10 mM จุ่มเป็นเวลา 10 นาที
- ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการวัดกลูโคส 0.4 V เทียบกับ Ag/AgCl อิเล็กโตรด
- ภาวะที่ใช้ในการวัด
 - 0.1 M ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ค่า pH = 7 ที่ 25 °C
- sensitivity $9.0 \times 10^{-10} \text{ A}/\text{mM}$
- เวลาตอบสนอง 80 วินาที
- storage stability มากกว่า 16 วัน
- ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ 1.5 mM

Output

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

- Chailapakul, O.; Promnil. J.; Somasandrum, M. and Tanticharoen, M.
"Immobilized $K_3F_6(CN)_6$ and Glucose Oxidase in polypyrrole on gold microelectrode and its application as glucose sensors" *J. Sci. Res. Chula. Univ.* (In press. June 2000 Issue)
- Ngamukot, P.; Chailapakul, O. and Tanticharoen, M. " Optimal condition for Preparation of Polypyrrole Films with Immobilization of Glucose Oxidase and $Ru(NH_3)_6Cl_3$ " *Analytical Sciences* , (Submitted 2000)

การไปเสนอผลงาน

- Chailapakul, O.; Promnil. J.; Somasandrum, M. and Tanticharoen, M.
"Immobilized $K_3F_6(CN)_6$ and Glucose Oxidase in polypyrrole on gold microelectrode " ISE Sponsored Pre-Satellite Meeting of the 49th Annual Meeting of the ISE, Seoul, September 9-12. 1998
- Ngamukot, P.; Chailapakul, O. and Tanticharoen, M. " Optimal condition for Preparation of Polypyrrole Films with Immobilization of Glucose Oxidase and $Ru(NH_3)_6Cl_3$ ", *25th Congress on Science and Technology of Thailand*, pisanulok, October 24-26, 1999.
- Ngamukot,P Chailapakul, O. and Tanticharoen, M. "Amperometric Glucose Sensor Using $Ru(NH_3)_6Cl_6$ -Nafion Coated Gold Electrode for Flow-Injection Analysis "The fourth Princess Chulabhorn International Science Congress: Chemicals in the 21st Century, Bangkok, December 28 1999–January 2 2000.
- Chailapakul, O.; Promnil. J.; Somasandrum, M. and Tanticharoen, M.
"Immobilized $K_3F_6(CN)_6$ and Glucose Oxidase into polypyrrole on gold microelectrode and Its Application as Glucose Sensors" การประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัย โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ครั้งที่ 1 โรงแรมเฟริกซ์ม กาจณบุรี 28-30 มกราคม 2543

ภาคผนวก

Optimal Condition for Preparation of Polypyrrole Film with Immobilization of Glucose Oxidase and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

Passapol Ngamukot¹ Sutthida Watcharaphalakorn¹ Atinut Ketithum¹

Orawon Chailapakul¹ and Morakot Tanticharoen²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,

Payathai, Bangkok 10330, Thailand

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand

Abstract

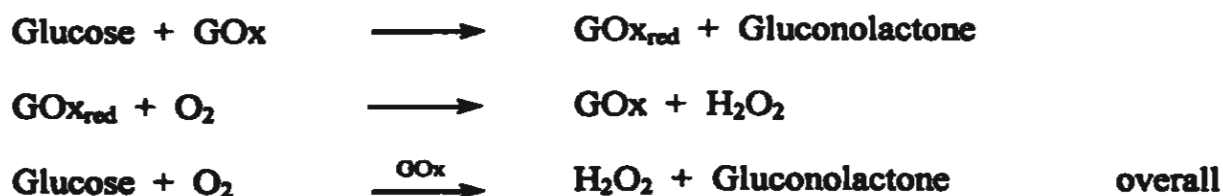
Preliminary studies of a new preparation procedure for an amperometric glucose sensor were investigated. The enzyme glucose oxidase was immobilized on the surface of a nafion coated gold electrode by entrapment in an electropolymerized film of pyrrole. Glucose responses were measured amperometrically via a $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ mediator. The optimal conditions for preparation of the sensor, the effects of applied potential, and the capability of the sensor were investigated. With the optimized glucose sensor, the detection limit was 1.5 mM and sensitivity was 9.0×10^{-10} A/mM. The response time was 80 seconds and the linearity of the sensor response ranged from 2 to 12 mM glucose solutions. The long-term stability of the sensor was improved by the electrostatic interaction between $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ and immobilized sulfonate groups of nafion. The storage and operational stability of the optimized glucose sensor exceeded 16 days and 9 times, respectively.

Introduction

Today electrochemical detection has clearly proved the favored method for use in bio-sensors. Electrochemical sensors may be divided into two categories: potentiometric devices that

monitor the potential changes and amperometric devices that record the current flows when the potential is held at a constant value [1]. The first category includes pH meters, ion-selective electrodes and ion-selective field effect transistors. These instruments suffer from the inherent characteristics of potentiometry, i.e., rather slow response to solutions at low concentrations of analyte and high detection limits. Amperometric determination offers better sensitivity, lower detection limits and relatively low cost.

A further classification of amperometric biosensors may be made into direct and indirect electron transfer systems (as shown in Fig 1) [2]. For a direct amperometric biosensor, electron transfer occurs freely between the redox center of a catalytic protein and the electrode [3]. A cyanometalate-modified electrode based on direct electron transfer has been reported [4]. A more practical way is the use of electron mediators that shuttle electrons between the protein and the electrode. A mediator becomes important in attempts to eliminate oxygen depletion effects on signals of oxidoreductase sensors. Consider the following problem in the case of amperometric glucose sensors.



Glucose oxidase is a flavoprotein, which catalyzes the oxidation of glucose to gluconolactone. The natural electron mediator is oxygen, which is reduced to hydrogen peroxide. The operating potential for this sensor is +0.7 V (vs Ag/AgCl). At this potential, ascorbic acid and uric acid are very important interferences. The linearity of the calibration curve is affected by the depletion of oxygen in the sample. This mediated approach is used to remove oxygen dependence from the sensor's function and avoid the interferences. Several mediators have been reported. Compounds such as ferrocene have been shown to be well suited to this purpose [5,6].

Systems with the application of conducting polymer-modified electrodes have been developed. The optimal conditions for the preparations of polypyrrole films on platinum electrodes have been reported [7,8]. The electropolymerization of polypyrrole, polythiophene and polyaniline on the nafion-modified electrode have been investigated [9].

This paper reports a preliminary investigation of a new preparation procedure for an amperometric glucose sensor. Glucose oxidase and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ were immobilized on a gold disk electrode, pre-coated with nafion, by entrapment in an electropolymerized film of pyrrole.

Experimental Section

Materials and Equipment.

The enzyme glucose oxidase (GOx) from *Aspergillus niger* was purchased from Sigma. Anhydrous dipotassium hydrogen orthophosphate was purchased from BDH. Potassium chloride, potassium ferricyanide and pyrrole were all from Merck. Nafion 117 solution was purchased from Fluka. Hexaammine ruthenium (III) chloride was purchased from Aldrich and glucose anhydrous from CARLO-ERBA. All electrochemical experiments were conducted with the PGSTAT10 potentiostat with the operating software (GPES version 4.4). The electrode polishing kit and Ag/AgCl reference electrode were purchased from BAS (Bioanalytical Systems, Inc.). The homemade gold disk electrode (6 mm diameter) and platinum gouge electrode were used as working and counter electrode, respectively. The three-electrode system was used in all experiments.

Surface Preparation of Gold Disk Electrode.

In order to prepare the gold disk electrode for determination of the electrode area or enzyme modification, the electrode surface must be rinsed with distilled water followed by methanol to flush away any encrusted material on the surface. Then, a few drops of the 1 μm

diamond slurry were applied on the white nylon-polishing pad. The electrode was placed face down on the pad and polished using a smooth figure-eight motion with even pressure. After 1-2 minutes, the electrode was removed and all remaining polishing grit was rinsed away with distilled water. Next, the microcloth-polishing pad was wetted with distilled water and several drops of polishing alumina were added. The electrode was polished in the same manner as in the previous step. Then, the electrode surface was immersed in shallow distilled water in a small beaker and placed in an ultrasonic cleaner for no more than 5 minutes. It was rinsed again with distilled water and the remaining water was shaken off. The electrode was then ready for the experiments.

Electrochemical Cleaning of Gold Disk Electrode.

Electrochemical cleaning was performed using cyclic voltammetry. The gold disk electrode was immersed in 0.1 M sulfuric acid and the potential was swept between -0.2 to 1.6 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) with a scan rate 0.1 V/s (about 10 cycles). Then all the electrodes were removed, rinsed well with distilled water and wiped dry.

Determination of Electrode Area.

The electrochemical area of the bare electrode was determined using cyclic voltammetry and the Randles – Sevcik equation [10] for a reversible redox couple, which is

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C_{\infty} \nu^{1/2}$$

When I_p is a peak current (Ampere), n is the number of electrons transferred, A is the electrode area (cm^2), D is the diffusion coefficient of the electroactive species ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C_{∞} is the bulk concentration of the same species (mol cm^{-3}), and ν is the scan rate (V s^{-1}). The peaks

currents obtained from each known concentration of electroactive species are plotted versus the concentration. If a reversible electroactive species which has a known diffusion coefficient is used, the electrode area can be calculated from the slope. In this research, the determination of the electrode area were performed in potassium ferricyanide, concentration range from 0.1 – 0.5 mmol cm⁻³ (Potassium ferricyanide has a diffusion coefficient 7.6×10^{-6} cm²s⁻¹ at 25°C).

Surface Pre-coating with Nafion.

The nafion solution was applied onto the cleaned gold disk electrode and left to air-dry. The applied volume of nafion ranged from 0.5 – 3.0 µL and the duration times waiting for air-drying were 10, 15 and 20 minutes. The dried nafion electrode was immersed in 10 mM hexaammine ruthenium (III) chloride solution for 10 minutes and left to air-dry. The peak current from each batch was obtained from a cyclic voltammogram in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Potentials were swept between –0.7 to 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) with a scan rate 0.1 V/s (2 cycles).

Surface Pre-coating with Ru(NH₄)₆Cl₃.

First, 0.1 µL of nafion solution was applied onto the cleaned gold disk electrode and left to air-dry for 10 minutes. Next, the dried nafion electrode was immersed in hexaammine ruthenium (III) chloride solution (concentration range from 5 –25 mM) and dipping period range from 5 – 25 minutes. The electrode was left to air-dry. The peak current from each batch was obtained from a cyclic voltammogram in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Potentials were swept between –0.7 to 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) with a scan rate of 0.1 V/s (2 cycles).

Preparation of Polypyrrole Film.

First, 0.1 μL of nafion solution was applied onto the cleaned gold disk electrode. The electrode was left to air-dry for 10 minutes. Next, the dried nafion electrode was immersed in 10 mM hexaammine ruthenium (III) chloride solution for 10 minutes and left to air-dry again. The electropolymerization of the polypyrrole film was carried out by chronocoulometry at 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) and the concentration of pyrrole solution ranged from 0.1 – 0.3 M. The peak current from each batch was obtained from a cyclic voltammogram in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0). Potentials were swept between -0.7 to 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) with a scan rate 0.1 V/s (2 cycles).

Immobilization of Glucose Oxidase.

The optimal conditions obtained from the three previous experiments were used in this step. After the electrostatic binding process between nafion and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, the electrode was placed in pyrrole solution containing 50 units/mL of glucose oxidase. The electropolymerization of polypyrrole film was carried out by chronocoulometry at 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) to immobilized the enzyme on the electrode surface.

Results and Discussion

Optimal Condition for Preparation of Glucose Sensor.

The optimal volume and duration time for air-drying of nafion at a fixed concentration of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ were studied. The results are shown in table 1. The highest current response was found for 2.5 μL of nafion with 20 minutes duration time. But, when this condition was used to prepare the sensor, we found that it did not respond to standard glucose solution. Peeling of the polypyrrole film on the electrode surface was found. This was because the film too thick. Thus

another set of conditions was used. It was found that 1.0 μL of nafion with a 10 minutes duration time was optimal.

The concentration and duration time for $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ at the optimal conditions for nafion were studied by varying the concentration of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ solution from 5–25 mM with different dipping periods. The highest current response was found for 10 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ solution and a dipping period of 10 minutes (as shown in table 2.).

The effect of the variation of pyrrole concentration with the optimal conditions for nafion and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ was investigated. The electropolymerization of polypyrrole film was carried out by chronocoulometry at 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode). The film thickness was estimated by assuming that 45 mC/cm^2 corresponds to a film thickness of 0.1 μm [11]. Because the electrode area calculated by Randles – Sevcik equation was 0.2827 cm^2 , thus the charge passed to grow the film (0.1 μm) for this electrode was 17.4 mC. The highest current response was found for 0.3 M pyrrole solution (as shown in table 3.). However a rugged film was found at this concentration, while 0.1 M pyrrole solution that gives a uniform film was the better choice.

Using to the optimal conditions described above, the surface of gold disk electrode was coated with nafion and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. In the presence of nafion, which is a cation exchanger, the immobilized sulfonate groups serve as a charge compensator to $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. In this case, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ was used as an electron mediator instead of oxygen. The enzyme, glucose oxidase, was immobilized by electropolymerization of a polypyrrole film. The schematic profile of the optimized sensor is shown in figure2. The electropolymerization using chronocoulometry was a reproducible method to produce the polymer film. The film thickness can be controlled by the charge passed into the solution.

Amperometric Detection of Glucose.

The capability of the sensor was demonstrated by the injection of a standard glucose solution into the electrochemical cell containing 5 mL of 0.1 M phosphate buffer. The current response of glucose was obtained using chronoamperometry at different operating potentials (under N₂ atmosphere). Operating potentials of 0.0, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.7 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) were investigated. For comparison, the sensor without an electron mediator was studied at the same potential. It was found that the sensor without an electron mediator gives a current response only at 0.7 V, but the sensor with electron mediator, Ru(NH₃)₆Cl₃, can give the current response at a potential range from 0.0 - 0.7 V. The results show that the sensor can be operated at the potential below 0.7 V to avoid the interference. The optimal potential for the detection of glucose was 0.4 V (vs. Ag/AgCl reference electrode) because a linear calibration curve could be obtained at this potential. Figure3. shows the amperometric response of the sensor to standard glucose solution.

Analytical Performance of Glucose Sensor.

The response time of the sensor for glucose analysis was studied using chronoamperometry at 0.4 V (vs. Ag/AgCl reference electrode). A 50 μ L of 0.2 M standard glucose solution was injected into the electrochemical cell containing 5 mL of 0.1 M phosphate buffer (the final concentration of glucose was 2 mM). In the studied solution, it took about 80 second for the current response to reach its maximum.

The dynamic range of the sensor was investigated by monitoring the standard glucose solution in the concentration range from 2 – 14 mM. Figure4. shows a plot of the current response of standard glucose solutions. Good linearity was found in the low concentration range of the calibration curve. When the glucose concentration was larger than 10 mM, a curvature on the calibration curve appeared. The sensitivity of the sensor, obtained from the slope of the

calibration curve, was 9.0×10^{-10} A/mM. The detection limit of the sensor was estimated to be about 1.5 mM.

The long-term stability of the sensor was investigated by monitoring its current response to standard glucose solutions at different times. In this research, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ was used as the electron mediator. The sensor's life time depended on the remaining amount of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ on the electrode surface that can be monitored by cyclic voltammetry. The long-term stability was divided in two categories, operational and storage stability. For the operational stability, the sensor was operated continuously to investigate the change of current response. The storage stability was studied by storing the sensor for a few days and recording the current response repeatedly. Operational stability for more than 9 times and more than 16 days of storage stability of the optimized sensor were found.

Conclusion

This paper illustrates a preliminary investigation into the preparation of an amperometric glucose sensor with $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ as electron mediator. The optimized sensor can be operated at the potential of 0.4 V (vs. Ag/AgCl reference electrode). Interfering species having an oxidation potential close to 0.7 V can be eliminated effectively. The electrostatic interaction between nafion and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ offers good storage stability of the sensor. The electropolymerization using chronocoulometry improved the reproducibility for the preparation of polypyrrole film in the enzyme immobilization process. The detection limit was estimated to be about 1.5 mM with sensitivity of 9.0×10^{-10} A/mM.

However, further work is required, with regard to understanding the parameters that influence the reproducibility of the immobilization method, how to control the amount of enzyme and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ that are immobilized, to develop a reproducible method to control the film thickness of nafion in the surface pre-coating step, for example. Moreover, the application

of the amperometric glucose sensor as the detector in flow injection analysis (FIA) system is very interesting [12]. This further work is the subject of current study in our laboratory.

References

- (1) Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S. *Biosensors: Fundamentals and Applications*; Oxford University Press: Oxford, 1987.
- (2) Cunningham, A. J. *Introduction to Bioanalytical Sensors*; Wiley: New York, 1998.
- (3) Mosbach, K. *Immobilized Enzymes and Cells: Part D*; Academic Press: San Diego, 1988.
- (4) Du, G.; Lin, C.; Bocarsly, A. B. *Anal. Chem.* 1996, 68, 796-806.
- (5) Bartlett, P. N.; Ali, Z.; Eastwick-field, V. J. *Chem. Soc. Faraday Trans.* 1992, 88, 2677-2683.
- (6) Foulds, N. C.; Lowe, C. R. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2473-2478.
- (7) Fortier, G.; Brassard, E.; Belanger, D. *Biosensor & Bioelectronics* 1990, 5, 473-490.
- (8) Gros, P.; Bergel, A. J. *Electroanal. Chem.* 1995, 386, 65-73.
- (9) Imisides, M. D.; Jonh, R.; Wallace, G. G. *CHEMTECH* 1996, 26, 19-25.
- (10) Gooding, J. J.; Praig, V. G.; Hall, E. A. H. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2396-2402.
- (11) Holdcroft, S.; Funt, B. L. *J. Electroanal. Chem.* 1988, 240, 89-103.
- (12) Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Flow-Injection Analysis*, 2 ed.; Wiley: New York, 1988.

Table

Table 1. Current response of the gold disk electrode prepared by applying different amounts of nafion with different duration times for air-drying in surface pre-coating process (with fixed conditions for $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$)

Amount of nafion applied (μL)	Current response (μA) at the various duration time waiting for air-dried		
	10 min.	15 min.	20 min.
0.5	151	229	237
1.0	167	0.05	157
1.5	209	217	215
2.0	210	202	201
2.5	142	248	253
3.0	202	237	148

Table 2. Current response of the gold disk electrode prepared by varying concentration of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ solution with different dipping periods in surface pre-coating process (with fixed conditions for nafion)

Concentration of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ dipping solution	Current response (μA) at the various dipping period				
	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.
5 mM	0.3	60	297	209	102
10 mM	187	298	254	231	263
15 mM	253	209	208	155	168
20 mM	265	236	182	164	168
25 mM	281	238	279	294	262

Table 3. Current response of the gold disk electrode prepared by varying concentrations of pyrrole solution in the electropolymerization process (with fixed conditions for nafion and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$)

Concentration of pyrrole solution	Current response (mA)
0.1 M	25.00
0.3 M	27.87

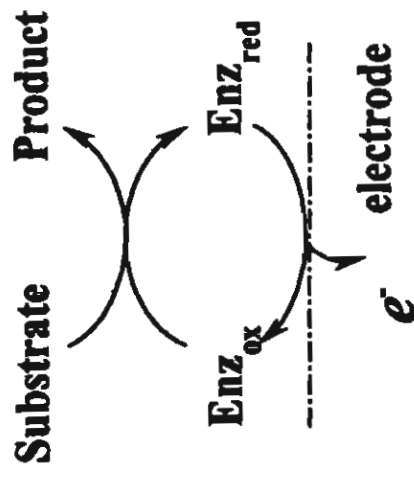
Figure Captions

Fig. 1. Schematic diagram of the direct electron transfer system (A) and the indirect electron transfer system (B).

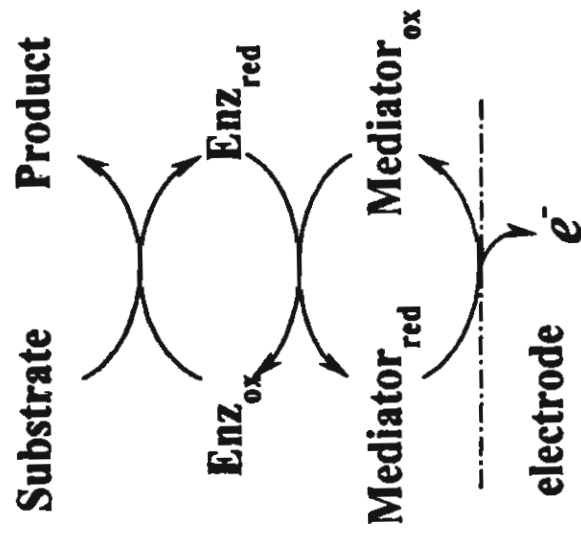
Fig. 2. Schematic profile of the optimized glucose sensor (PPy = Polypyrrole, GOx = Glucose Oxidase).

Fig. 3. The current response to standard glucose solution at 0.4V (vs Ag/AgCl reference electrode) by chronoamperometry.

Fig. 4. Calibration curve obtained for the optimized sensor in glucose concentration range from 2 mM to 14 mM.

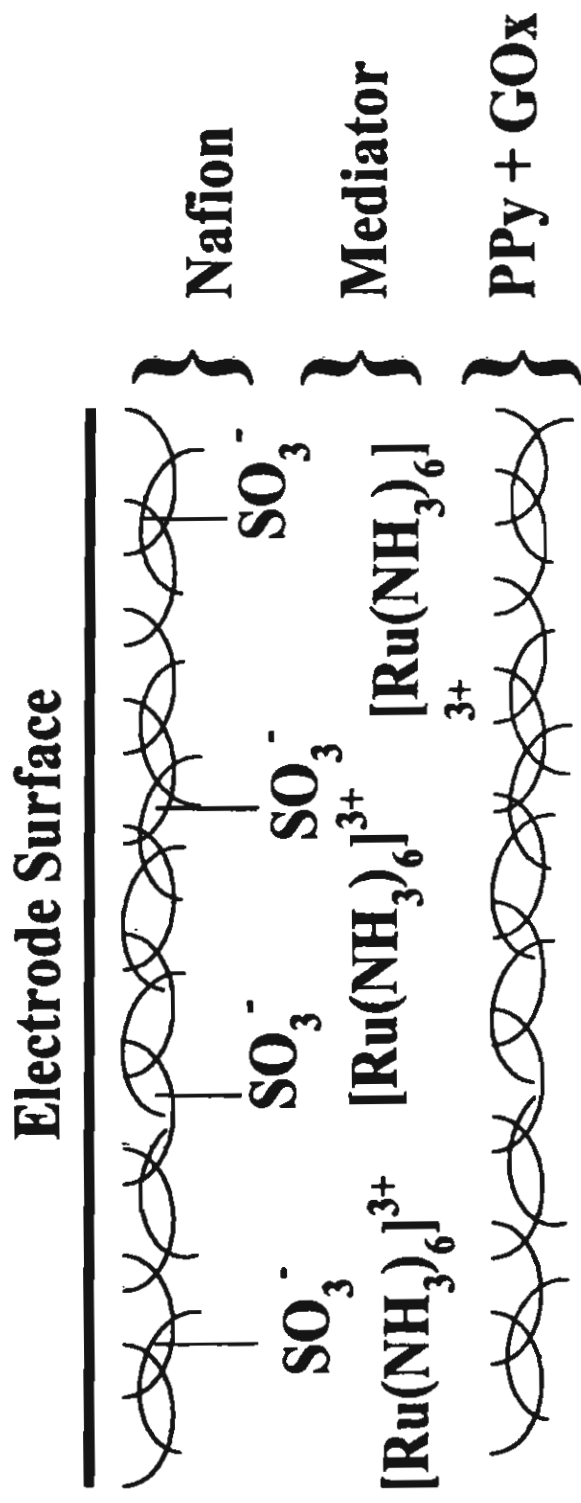


A)

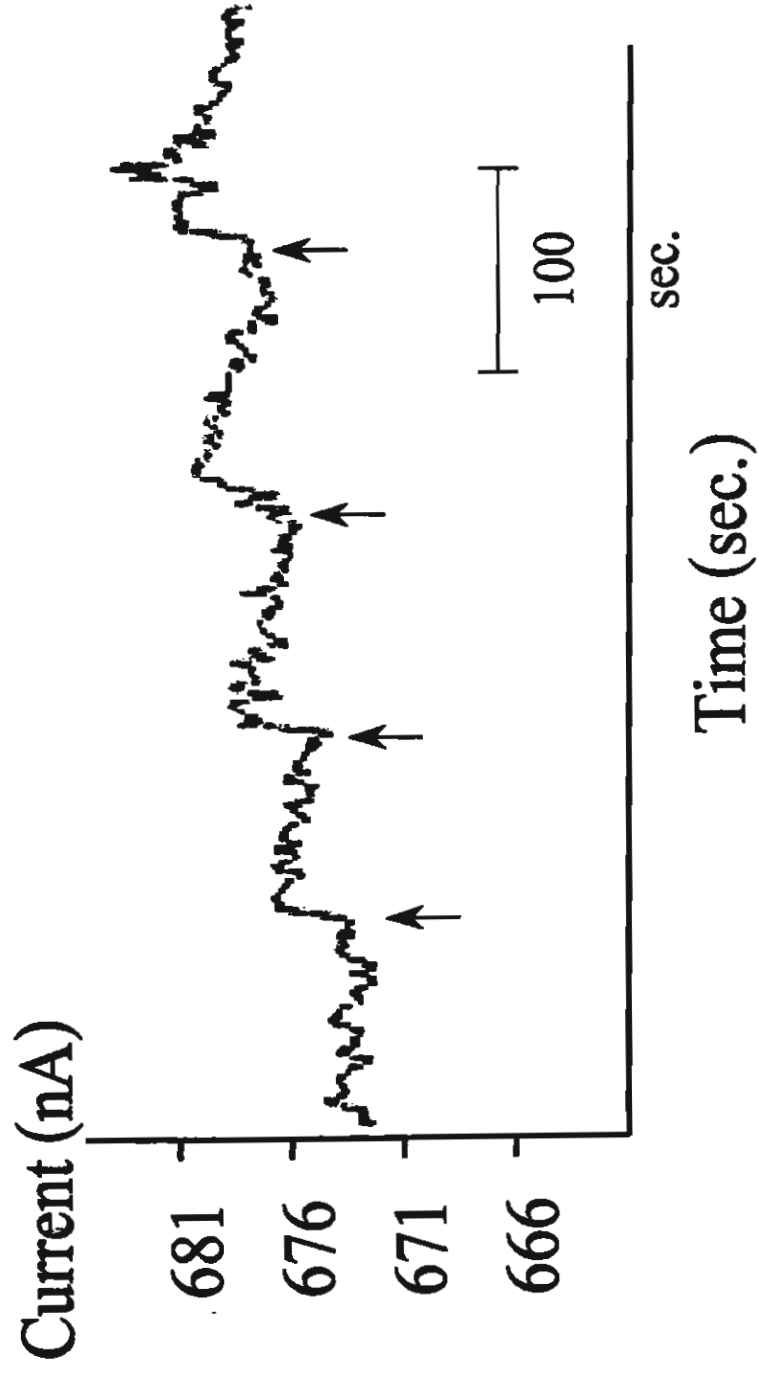


B)

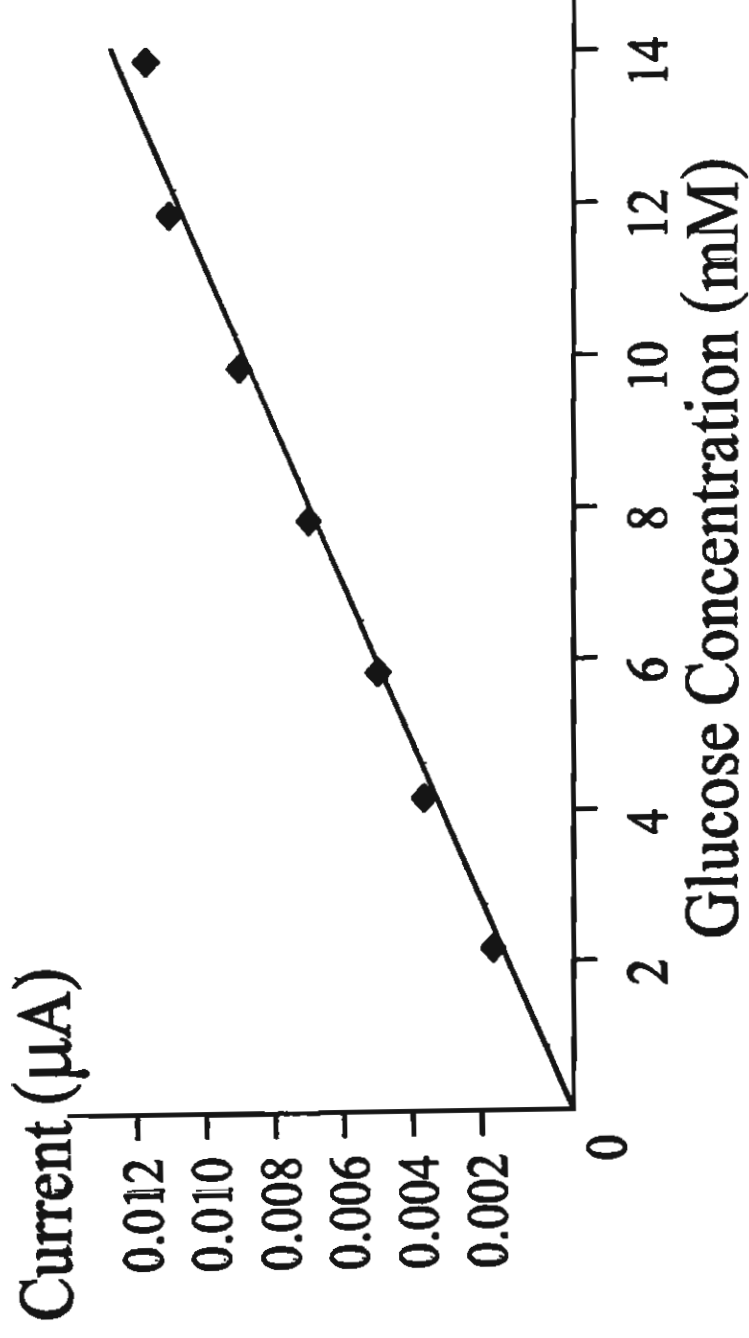
Ngamukot et al. Fig. 1



Ngamukot et al. Fig. 2



Ngamukot et al. Fig. 3



Ngamukot et al. Fig. 4

**Immobilized $K_3Fe(CN)_6$ and Glucose Oxidase in Polypyrrole on Gold
Microelectrode and Its Application as Glucose Sensors**

Chailapakul. O*, Promnil. J**, Somasundrum. M*** and Tanticharoen. M****

* Department of Chemistry, Chulalongkorn University, BKK, Thailand

** Department of Chemistry, KMUTL, BKK, Thailand

*** Department of Chemistry, KMUTT, BKK, Thailand

*** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, BKK, Thailand

Received:.....

Abstract

The purpose of this research is to prepare a glucose sensor using electrochemical polymerization of pyrrole onto a gold microelectrode in the presence of the enzyme glucose oxidase and ferricyanide at a potential of 0.70 V *versus* Ag/AgCl. The enzyme glucose oxidase and ferricyanide are co-immobilized into the polypyrrole films during the electrochemical polymerization process. The two species compete for incorporation into the films so that on increasing the concentration of enzyme in the growth solution less ferricyanide is incorporated into the film. The ferricyanide entrapped within the film acts as a redox mediator for the oxidation of the enzyme at 0.45 V *versus* Ag/AgCl. The effects of variation in charge passed during polymerization, pyrrole concentration and ferricyanide loading are studied. Moreover, the determination of standard glucose and the stability of glucose sensor were investigated.

KEYWORD: POLYPYRROLE, GLUCOSE SENSOR, FERRICYANIDE, AMPEROMETRY

***Author for correspondence**

1. Introduction

Electropolymerization is an adaptable and easily controlled method for the immobilization of enzymes at an electrode surface. This makes electropolymerization an interesting method for the immobilization of enzymes on microelectrodes, for applications such as glucose sensors.

An amperometric sensor is a device for measuring the current that is generated by an electrochemical reaction at a fixed potential. There are some advantages of the amperometrical sensors that make them very useful in bioprocess control. Amperometric sensors are inexpensive, simple to make and operate, and adaptable to process control instrumentation. The sensors can be often operated in a wide concentration range. However, they can sometimes lack selectivity¹ and can suffer from fouling when used in complex matrices². For an amperometric glucose sensor, the reaction of glucose and oxygen in the presence of enzyme glucose oxidase (GOD) will generate hydrogen peroxide as shown below:



This is an electroactive species, which is oxidizable at an electrode surface as described by an electrochemical half reaction as follows.



The response to hydrogen peroxide will be proportional to the concentration of glucose. This reaction is monitored amperometrically by measuring the current generated by the increase of hydrogen peroxide.



as oxygen is consumed by the enzyme.

The limited solubility of oxygen in solution creates a problem at high substrate concentrations often encountered in bioprocesses, because it limits the linear range of the sensor. Oxygen can be generated from hydrogen peroxide at the electrode surface, when it is at a positive potential. However, this regenerated oxygen is sometimes not enough to meet the demands of the enzymatic reaction at high substrate concentrations due to loss of oxygen from diffusion.

In this study, preparation of a glucose sensor by immobilization of glucose oxidase and ferricyanide (Ferri) into polypyrrole (PPy) by electrochemical polymerization on gold (Au) microelectrode was investigated. The glucose sensor is expected to determine glucose concentration at low potentials (lower than 0.7 V *versus* SCE) in order to avoid interference.

Electron transfer mediators, such as ferri/ferrocyanide ($E^\circ = 0.34$ V *versus* SCE), ferrocene and benzoquinone can sometimes take the place of oxygen. This can sometimes overcome the problem of limited availability of oxygen¹. Also, the focus of recent research is the coupling of an electron mediator with a species that electrochemically polymerizes to form a film over the electrode. The film can mediate electron transfer, serve to screen out interference and prevent electrode fouling³. Polypyrrole has been a particular choice for entrapment of protein molecules because films can be grown from aqueous solutions compatible with most biological elements⁴.

2. Experimental

2.1 Chemicals

Glucose oxidase type II derived from *Aspergillus Niger* 10,000 unit from Sigma Chemical Company. 96% Pyrrole was received from Fluka Co. Ltd., and freshly distilled before use. β -D-Glucose purchased from BDH Ltd. was used to prepare the standard solutions of glucose. These solutions was prepared 24 hr before use to ensure mutarotation between the α and β forms was complete. Other reagents were analytical grade.

2.2 Equipment

A Potentiostat/gavanostat (Autolab, model PGSTAT10) was used for the electrochemical polymerization, and current measurement. Output from the scanning potentiostat/galvanostat was connected to a personal computer and HP Laser jet 4L printer, supported by GPES 4.4 operating software. The conventional three-electrode system consisted of gold microelectrode of diameter 180 μm (this number is obtained from electrochemical experiments as explained in topic 2.3.1), silver/silver chloride reference electrode, and platinum wire counter electrode. Electrochemical measurements were made using a Faraday cage for noise prevention and under N_2 gas.

2.3 Procedures

2.3.1. Preparation Gold Microelectrodes

The gold microelectrodes were prepared by sealing fine gold wire into capillary glass rods of diameter of 0.6 mm. (Figure 1). The gold microelectrodes were cleaned in H_2O_2 :

H₂SO₄, 3:1 solution, then they were polished with emery paper and then with aluminium oxide (0.3 μm particle size). Before use, the microelectrodes were pretreated by electrochemical cleaning in 0.1 M H₂ SO₄ by cyclic voltammetry from 0.2 to -1.6 V *versus* silver/silver chloride, at scan rate of 0.1 V/sec. The radii were determined from the equation (4)⁵ by measuring the diffusion controlled current for the oxidation of K₃Fe (CN)₆ in 0.1 M KCl.

$$i_p = (2.69 \times 10^{-5}) n^{3/2} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0^* \dots\dots\dots(4)$$

Where i_p = peak current, n = number of electron transfer, A = area of electrode [cm²], D_0 = diffusion coefficient of ferricyanide in 0.1 M KCl (0.673×10^{-5} [cm²/sec])⁶, v = scan rate [V/sec], and C_0^* = concentration of ferricyanide [mol/cm³].

2.3.2. Electrochemical Polymerization of Pyrrole and Immobilization of Glucose Oxidase and Ferricyanide

Electrochemical polymerization of pyrrole onto a gold microelectrode in the presence of the enzyme glucose oxidase and ferricyanide solution was performed at a potential of 0.70 V *versus* silver/silver chloride. Ferricyanide was also used as an electrolyte during polymerizing process.

2.3.3 Determination of Glucose

The amperometric response to glucose was evaluated using the three electrode system in 5 ml of 10 mM phosphate buffer pH 7.0. After applying an overpotential, the current background was left to stabilize and then glucose solution was added into the measuring cell.

The current-time response was recorded as the difference between the stable current (i) after substrate addition and the background current (i_0)

3. Results and Discussion

3.1 Cyclic Voltammetry of Ferricyanide Incorporated in the Polypyrrole Films

Experiments were performed to determine the optimal conditions of the PPy/Ferri/GOD film preparation. Cyclic voltammetry of ferricyanide and the response to glucose from Au/PPy/Ferri/GOD electrode were evaluated as a function of charge passed, pyrrole concentration and ferricyanide concentration.

Cyclic voltammetry of ferricyanide at PPy and PPy/Ferri modified electrodes at 100mV/s was performed in phosphate buffer solutions having pH 7.0. (pH 7.0 is used because it is similar to physiological conditions.) There was a significant difference between the two electrodes, as shown in Fig. 2. Characteristic voltammograms for the redox of ferricyanide in phosphate buffer solution were observed at the PPy/Ferricyanide electrode. At PPy modified electrodes, no evidence of electron transfer was observed.

3.2 Effect of Charge Passed during Polymerization on the Enzyme Electrodes

For these experiments, the concentration of the following compounds was kept constant: glucose oxidase at 25 unit/cm³, pyrrole concentration was 40 mM and K₃Fe(CN)₆ concentration was 50 mM. Cyclic voltammetry was used to investigate the effect of charge passed during film growth on the amount of ferricyanide incorporated. In Fig 3, the charge passed is plotted as a function of anodic peak current (i_{pa}) measured from ferricyanide oxidation. It is found that the amount of ferricyanide incorporated increases linearly with the

total charge passed during film growth. This suggests that film thickness increases linearly with charge passed over this range. Based on this information, the film thickness would be estimated by assuming a charge density of 1 mC cm^{-2} . This gives an apparent film thickness of $0.22 \times 10^{-6} \text{ cm}^7$.

The quantity of charge passed should presumably be related to the quantity of enzyme entrapped in the same manner. The effect of charge passed on the amperometric response of an Au/PPy/Ferri/GOD electrode is studied and the results is shown in Fig.4. The response to glucose at 0.45 V decreases on increasing the charge passed beyond $8 \mu\text{C}$. These results can be explained as follows: The average distance, X_r travelled by a glucose molecule through the film before reacting is given by ⁸

$$X_r = \sqrt{D_s K_m / K_{cat} e_T} \dots\dots\dots(5)$$

Where D_s is the diffusion coefficient, K_m is the Michaelis for the enzyme, K_{cat} is rate constant for the breakdown of the enz-substrate complex and e_T is the total enzyme concentration.

When the length X_r is greater than the film thickness, much of the glucose will be lost to the bulk solution before it can react. Hence increasing the film thickness will increase the response, as this enables more glucose to be retained. However, if the film thickness becomes much longer than X_r , most of the glucose will react only at the outer edge of the film. This means the mediators have a long way to travel before reaching the electrode, and so some mediators are lost to the bulk solution. Hence now increasing the thickness causes the response to go down. The optimum response will occur when the film thickness and X_r are equal. Thus Fig 4, X_r can be estimated as approximately 0.1 micron .

Thus, for all subsequent experiments charge passed the electrodes during polymerization was 8 μC .

3.3 Effect of Pyrrole Concentration on the Response of the Enzyme Electrodes

We have also investigated the effect of variation of the pyrrole concentration at fixed concentrations of ferricyanide (50 mM) and enzyme (25 unit/cm³), on the response to glucose at 0.45 V, Fig. 5. We find that, at a constant enzyme concentration, the amount of ferricyanide incorporated into the film, as determined by cyclic voltammetry, increases with increasing the pyrrole concentration in the growth solution, upto 40mM. Beyond this, the amount of entrapped ferricyanide decreases.

The effect of the pyrrole used to prepare the Au/PPy/Ferri/GOD electrodes is presented in Fig. 6. The total charge passed in modifying the electrodes is 42.5 mC/cm² and corresponds to a film thickness of about 0.095 μm , assuming 45 mC/cm² is equivalent to a thickness of 0.1 m⁷. The steady state current response to 20 mM glucose was recorded at 0.45 V. The optimal concentration of pyrrole was 40 mM as indicated by the maximum current response observed. Thus, for all subsequent experiments a concentration of 40 mM pyrrole was used.

3.4 Effect of Ferricyanide Concentration on the Response of the Enzyme Electrodes

Fig 7 shows the correlation between the ferricyanide concentration as a function of anodic peak current (i_{pa}) measured from ferricyanide oxidation. We find that the amount of ferricyanide incorporated increases linearly when the ferricyanide concentration increases. We don't obtain a maxima ferricyanide oxidation from Fig.7.

Glucose oxidase is negatively charged at a pH higher than 4.2⁹. During electropolymerization at 0.7 V, therefore glucose oxidase can be incorporated into films as a counter ion of polypyrrole¹⁰. When comparing glucose oxidase to ferricyanide, which also has a negative charge, ferricyanide can diffuse easier and faster than glucose oxidase according to the size of ferricyanide which is smaller than glucose oxidase.

The effect of the ferricyanide concentration on the response of the modified electrode to 20 mM glucose was studied as depicted in Fig 8. We find that with increasing ferricyanide incorporation into the film, the current response of glucose increases until reaching an optimum at 25 mM ferricyanide. Beyond this concentration, the current response of glucose starts to decrease. Thus there appears to be a competition between the enzyme and the ferricyanide for incorporation into the film. This is because both are negative charged and are entrapped into the positively charged polymer by electrostatic attraction. Beyond 25 mM ferricyanide, the quantity of entrapped glucose oxidase decreases so the response to glucose starts to decrease. We can conclude that the polymerization solution should contain 25 mM ferricyanide.

Stability

Preliminary studies of the stability of the immobilized enzyme films were performed. We found that there was change in the response with repeated use, and that the responses decreased by more than 50% of the initial value after storage for 24 h at room temperature in glucose-free buffer solution. The stability information suggested that the decrease in the response, in part, due to the diffusion away of ferricyanide into the solution and in part due to loss of enzyme activity.

Sensitivity

The glucose sensitivity of this sensor which was optimized in this experiment was found to be ca 0.05 nA/mM with a linear response up to ca 5 mM as shown in Fig 9.

4. Conclusions

Both GOD and ferri/ferrocyanide can be entrapped within polypyrrole films. Using cyclic voltammetry we can recognize ferricyanide incorporated during film growth. Amperometric experiments to measure glucose suggest that the two species compete with each other for sites within the film. This is to be expected since they are both incorporated as counter ions during the deposition of the cationic polymer.

The optimum condition to prepare the glucose is use of electrochemical polymerization of 40 mM pyrrole onto a gold microelectrode in the presence of the 45 unit/cm³ enzyme glucose oxidase and 25 mM ferricyanide at a potential of 0.70 V *versus* Ag/AgCl. The ferricyanide entrapped within the film is able to mediate the re-oxidation of the enzyme so that glucose can be detected amperometrically using these films at 0.45 V *versus* Ag/Ag Cl. The optimized sensitivity was found to be ca 0.05 nA/mM.

Acknowledgments

We thank The Thailand Research Fund for financial support (PDF/85/2540).

References

1. Work, J.V.; Yacynych, A.M. *Sensors in Bioprocess control*; Work, J.V.; Yacynych, A.M., Ed., 1990 ; Vol. 6.
2. Lowery, L.P.; Macateer, K.; Elatrash, S.S.; Duff, A.; O'Neill, R.D. *Anal Chem.* 1994, 66, 1754
3. Cho, J.-H.; Shin, M.-C.; Kim, H.-S. *Sensors and Actuators B* 1996, 30, 137.
4. Asavapiriyannout, S. *J. Electroanal. Chem.* 1984, 177, 229.
5. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods*; John Wiley & Sons: New York, 1981
6. Adams, R. N. *Electrochemistry of Solid Electrodes.*; Marcel Dekker: New York, 1969.
7. Holdcroft, S.; Funt, B.L. *J. Electroanal Chem.* 1988, 240, 89
8. Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. *J. Electroanal. Chem.* 1987, 224, 27
9. Swoboda, B.E.P.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* 1961, 241, 3409
10. Diaz, A.F.; J.I. Castillo; Logan, A.; Lee, W.-Y. *J. Electroanal. Chem.* 1981, 129, 115

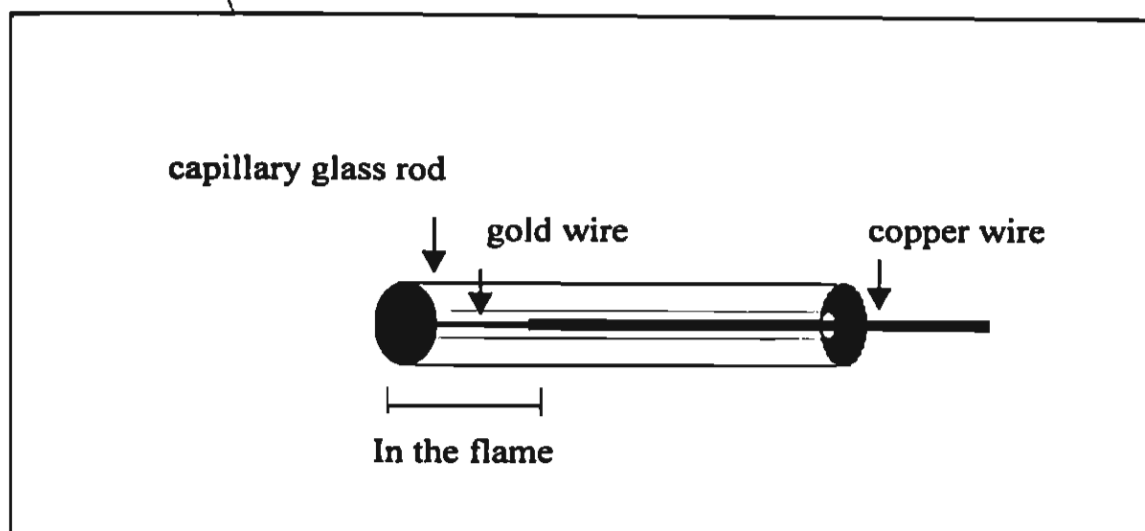


Fig. 1 preparation of gold microelectrode

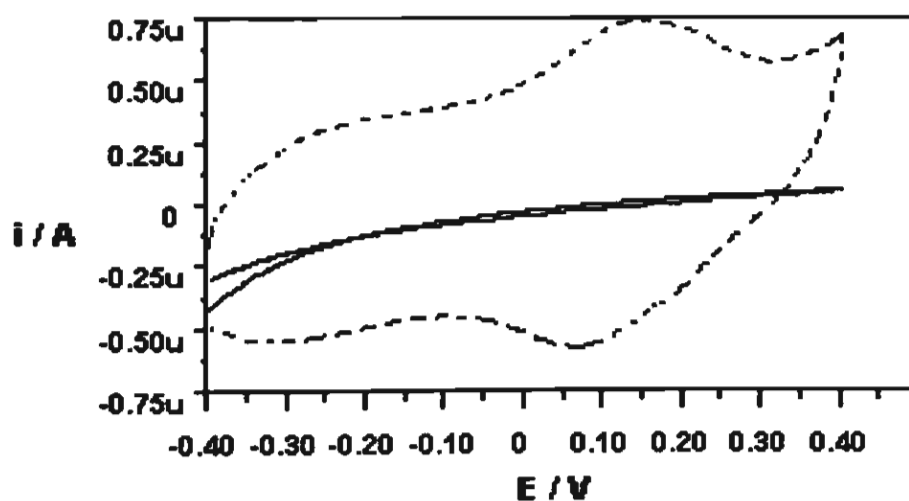


Fig. 2 shows cyclic voltammograms for——the Au/PPy/GOD electrode and ----- for Au/PPy/Ferri/GOD electrode obtained in phosphate buffer pH 7 after the electropolymerization. Scan rate 100 mV/s

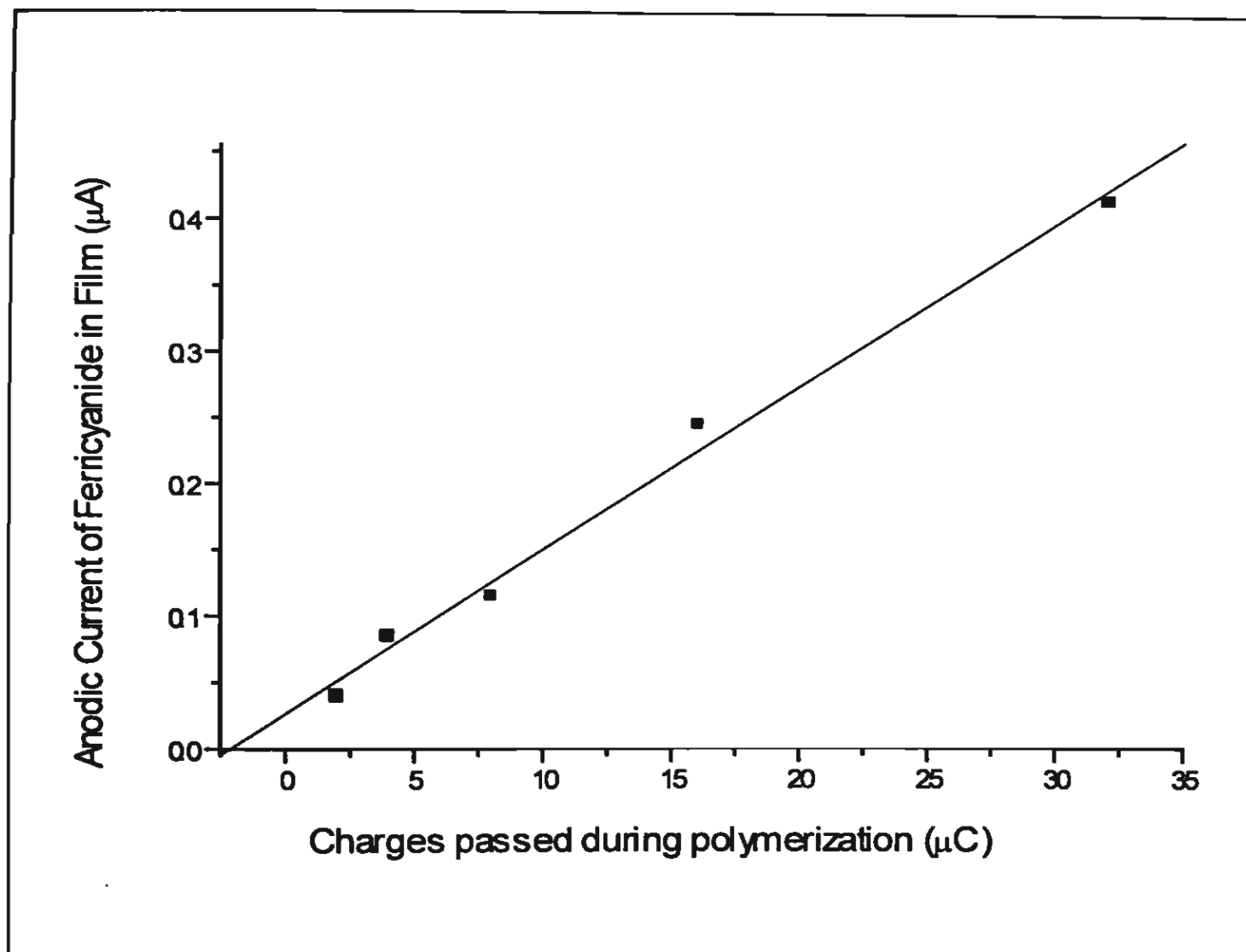


Fig. 3 shows the relationship between charge passed Au/PPy/Ferri/GOD electrode and i_{pa} of ferricyanide incorporated into the polypyrrole films.

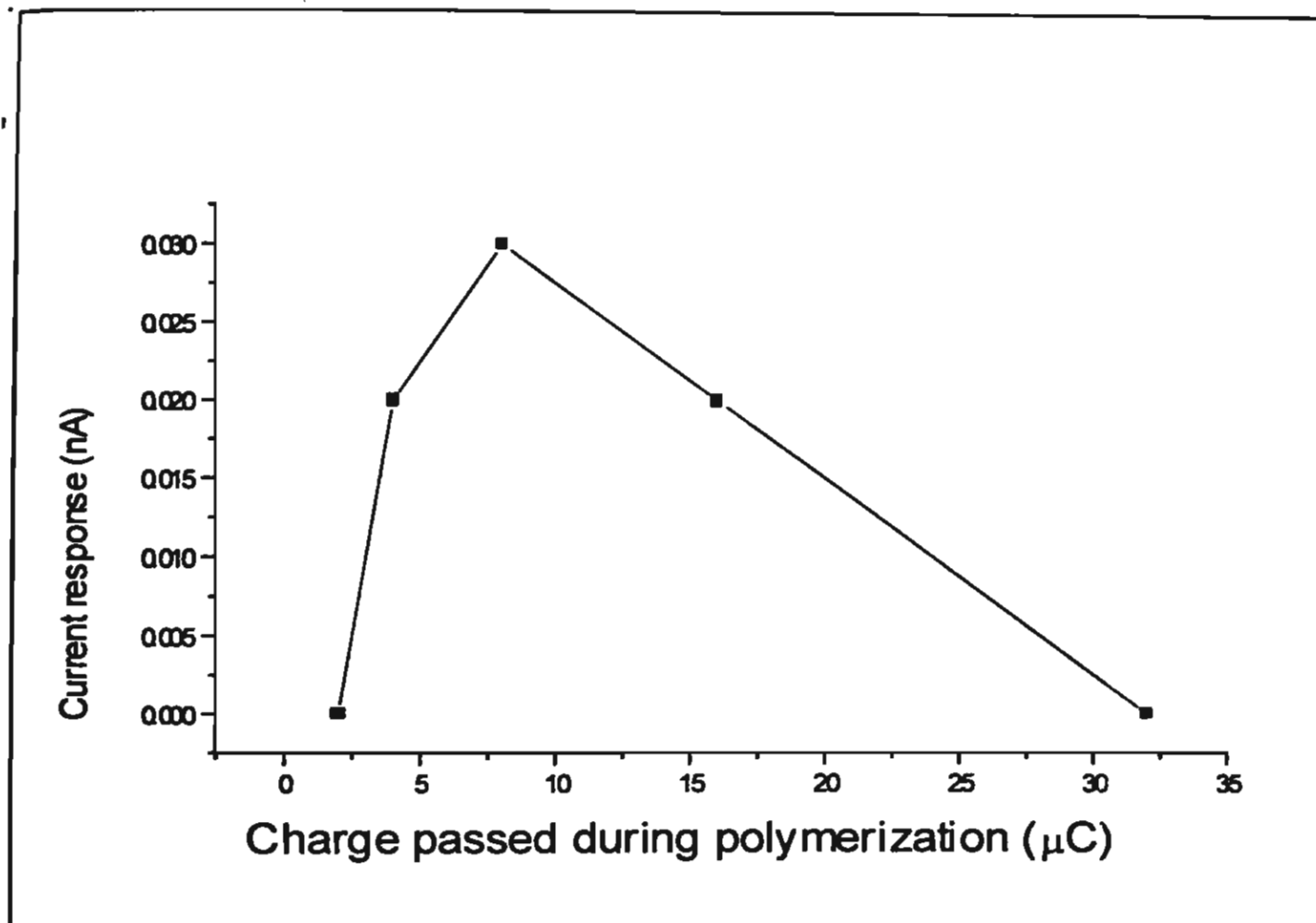


Fig. 4 shows the relationship between the current response to 100 mM glucose solution and charge passed into the 40 mM pyrrole, 25 unit/cm³ GOD and 50 mM ferricyanide solution.

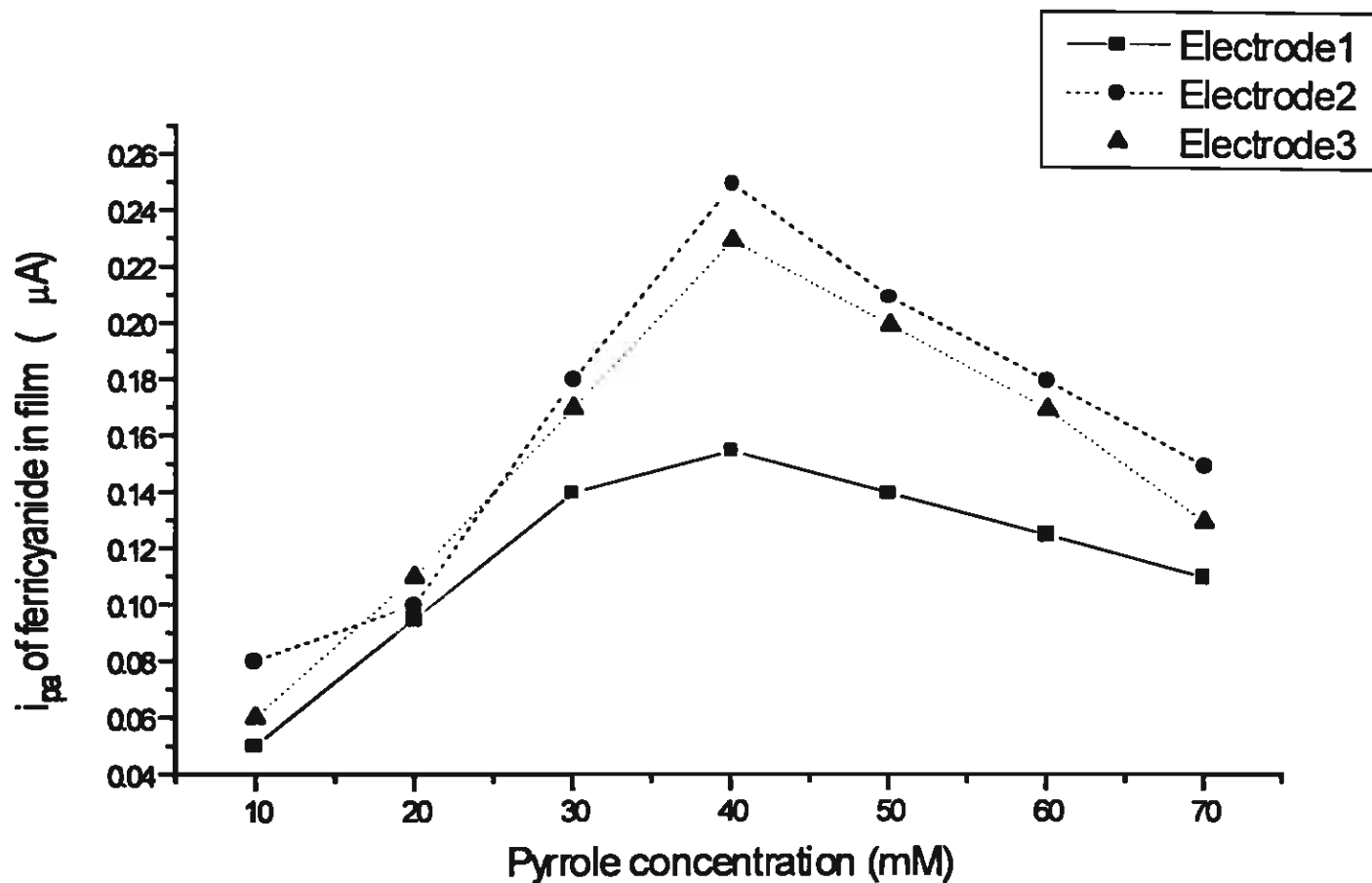


Fig.5 shows the effect of pyrrole concentration function with i_{pa} of ferricyanide incorporated in films.

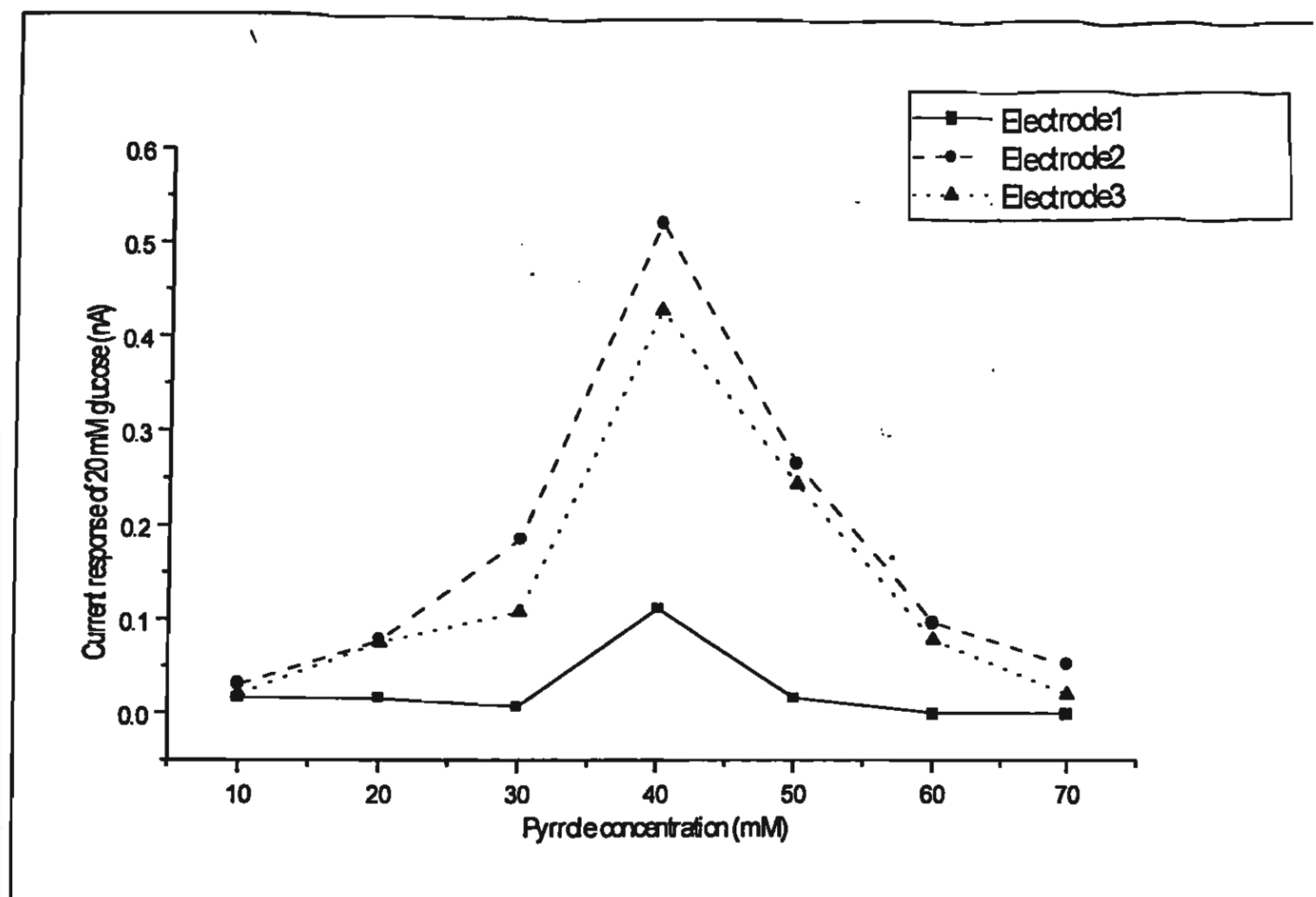


Fig. 6 shows the relationship between pyrrole concentration and current response to 20 mM Glucose. The films were grown at 0.7 V from aqueous buffered solutions containing 50 mM ferricyanide and 25 unit/cm³ GOD in the variation of pyrrole concentration.

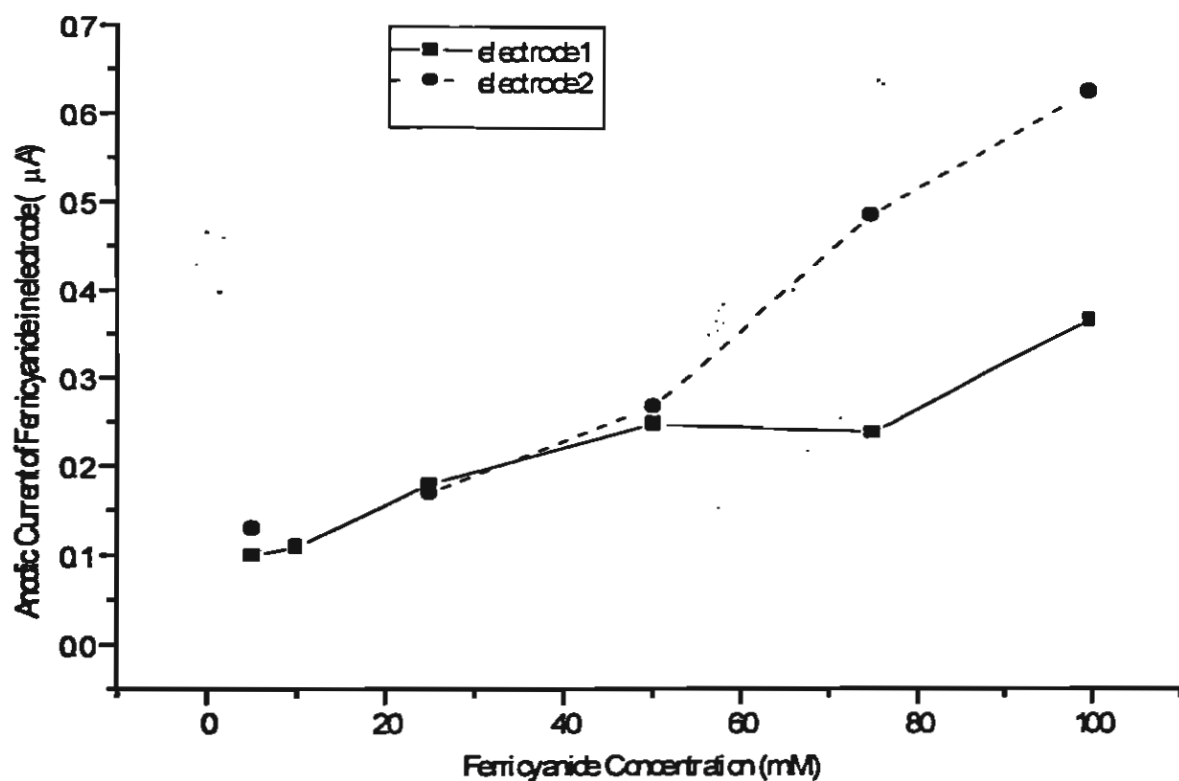


Fig. 7 shows the effect of ferricyanide concentration function with i_{pa} of ferricyanide incorporated films.

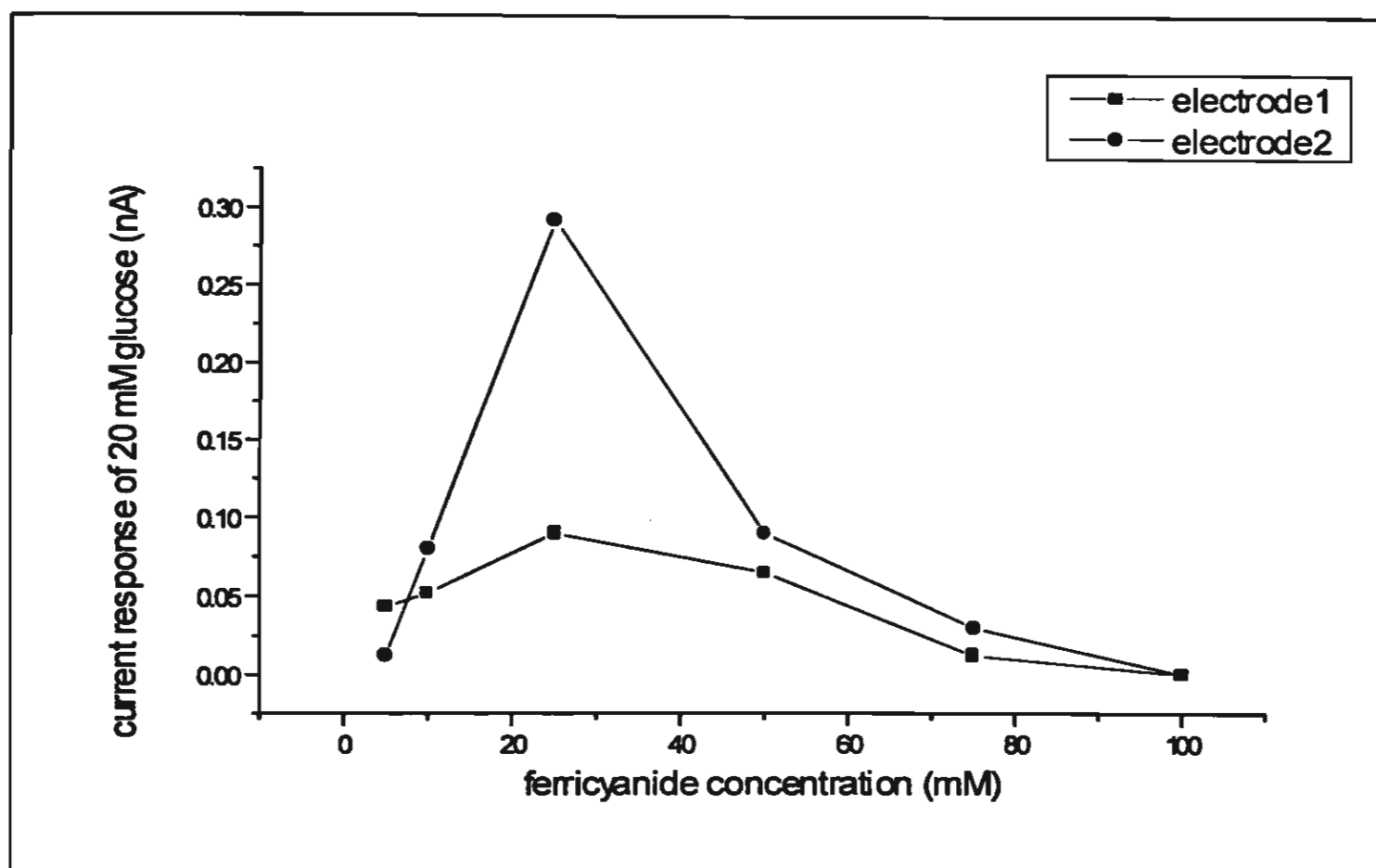


Fig. 8 shows the relationship between ferricyanide concentration and current response to 20 mM Glucose. The films were grown at 0.7 V from aqueous buffered solutions containing 50 mM pyrrole and 25 unit/cm³ GOD in the variation of ferricyanide concentration.

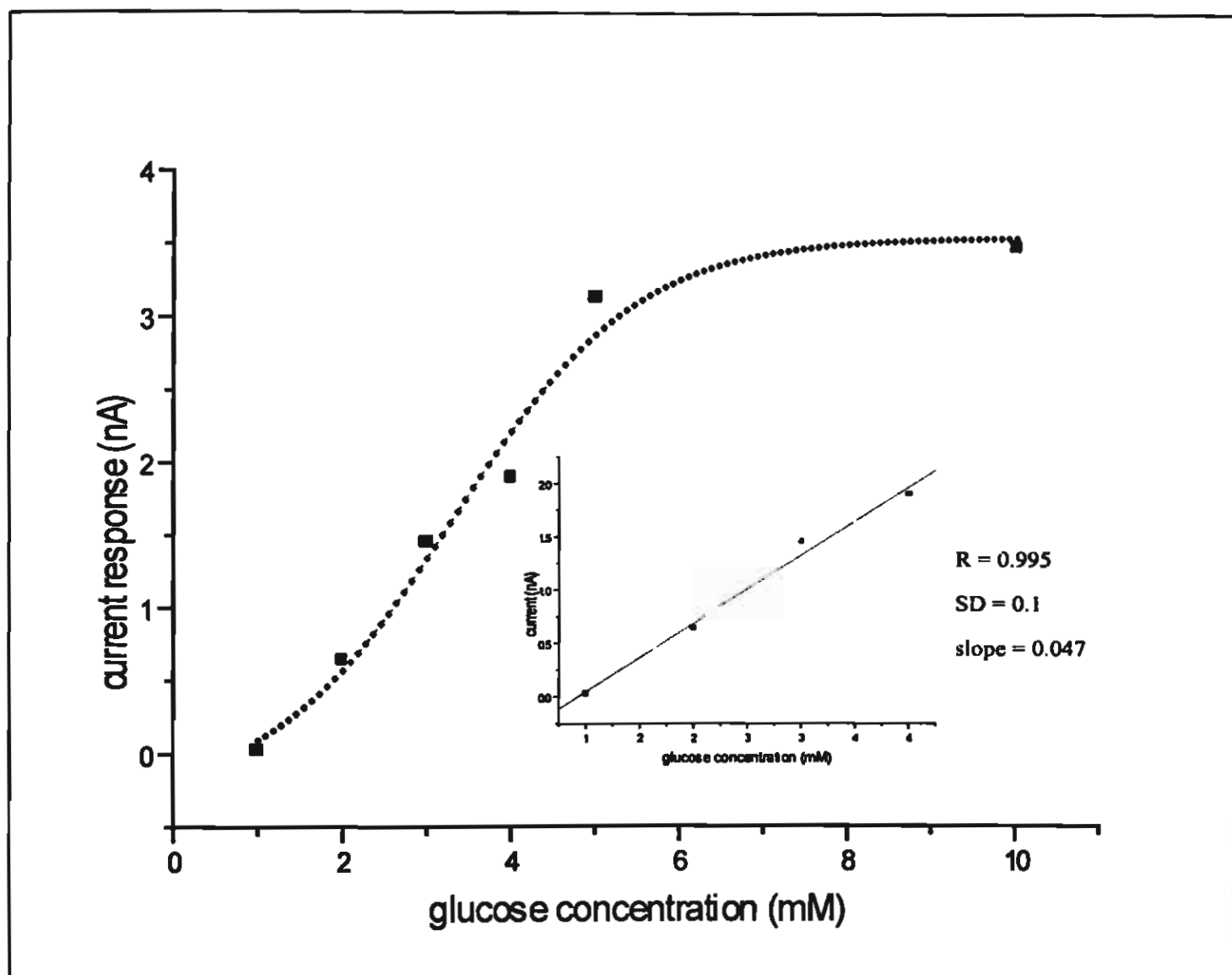


Fig. 9 Calibration curve of glucose sensor at 0.45 V using ferricyanide as mediator

Abstract Book



Pre-satellite Symposium of the 49th ISE Meeting on the New Trends in Electroanalytical Chemistry

September 10 – 12, 1998
Hoam Convention Center, Seoul National University

International Society of Electrochemistry
Korean Electrochemical Society
Center for Molecular Catalysis, S.N.U.

Oratoron Chai Lapakul

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE AND $K_3Fe(CN)_6$ INTO POLYPYRROLE ON Au MICROELECTRODE

Chailapakul. O, and Promnil. J*, Somasundrum. M** Tanticharoen. M***

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

*Department of Chemistry, Faculty of Science, KMITL

**School of Bioresources, KMITT

***National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

The co-immobilization of enzymes with mediator into conducting polymers has gained interest recently(1,2,3). We have fabricated glucose sensors by immobilization of glucose oxidase into polypyrrole films on 155 μm diameter Au electrodes. $Fe(CN)_6^{3-}$ was co-immobilized as electron mediator between the enzymes and the electrode. After polymerization from the pyrrole/glucose oxidase/ $Fe(CN)_6^{3-}$ solution, investigation of $Fe(CN)_6^{3-}$ embedded in conducting polymer films was carried on in 0.1 M phosphate buffer pH 7, as shown in Figure. 1.

At a fixed potential, steady-state responses to glucose were records in the absence of stirring, due to radial diffusion of the analyte. In Figure.2, it was found that the optimal polymerization charge for creating the GOD/ferricyanide films should be approximately 42.5 mC.cm^{-2} , based on the steady-state response to 100 mM glucose

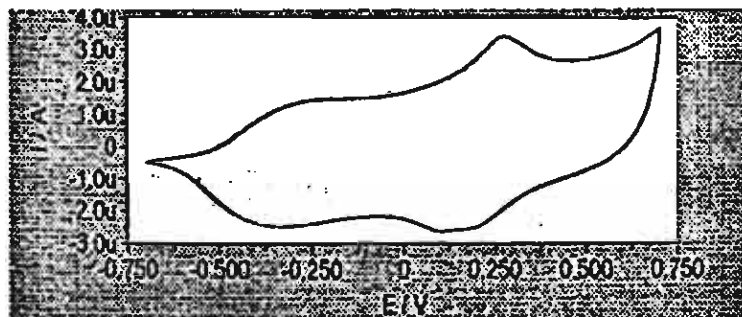


Fig. 1.Cyclic voltammogram of the Au/polypyrrole/GOD/Ferricyanide electrode obtained in 0.1 M phosphate buffer pH 7 at the potential between -0.750 V to $+0.750 \text{ V}$ vs Ag/AgCl. The scan rate was 100 mV/s .

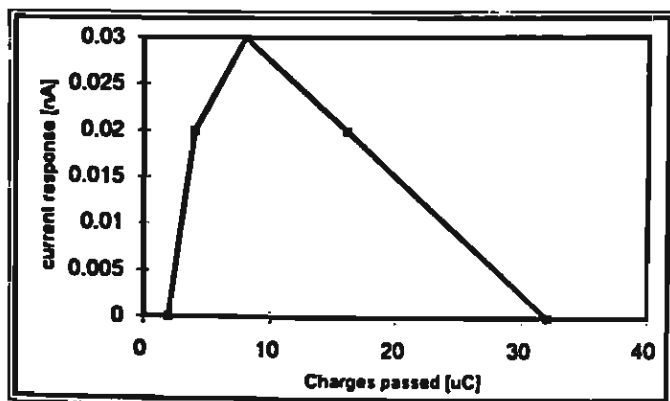


Fig. 2.The relationship between polymerization charge at 0.7 V vs Ag/AgCl used to prepare polypyrrole/GOD/Ferricyanide-films and current response obtained from determining 100 mM glucose at polymer-modified electrodes at 0.45 V vs Ag/AgCl.

In addition, the response time and stability of the sensors are studied, and the detection limit and sensitivity are determined. The kinetic parameters of the sensor are discussed

References

- (1) Bartlett, P. N., Ali. Z.and Eastwick-Field, V., *J. Chem.Soc.,Faraday Trans.*, 88 (1992) 2677
- (2) Ikeda. S, Yoshioka. T and Nankai. S., *Denkikagaku.*, 63 (1995) 1145
- (3) Ge. F, Zhang XE, Zhang ZP, et al., *Anal Lett.*, 31 (1998) 383

Best Don-
vention Award

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25

20-22 ตุลาคม 2542

ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน

พิษณุโลก

กำหนดการและบทคัดย่อ
PROGRAMME AND ABSTRACTS

ISBN 974-97169-4-5

25th Congress on Science and Technology of Thailand

20-22 October 1999

at Amarin Lagoon Hotel

Pitsanuloke



ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย ภัทสรพล งามอุโฆษ

สาขาวิชา:

☒ นาย ☐ น.ส. ☐ นาง ☐ ดร. ☐ อ. ☐ ผศ. ☐ รศ. ☐ ศ.
☒ กายภาพ☐ ชีวภาพ

ที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

☐ แพทย์☐ ทรัพย์สิน-แวดล้อม

ถนนพญาไท กรุงเทพมหานคร 10330

โทร.

2184980

☐ เกษตร☐ วิศวกรรม-เทคโนโลยี☐ วิทยาศาสตร์☐ ทวีป

Optimal Condition for Preparation of Polypyrrole Film with Immobilization of Glucose Oxidase and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

Passapol Ngamukol¹ Sutthida Watcharaphalakorn¹ Atinut Ketithum¹Orawon Chailapakul¹ and Morakot Tanticharoen²¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

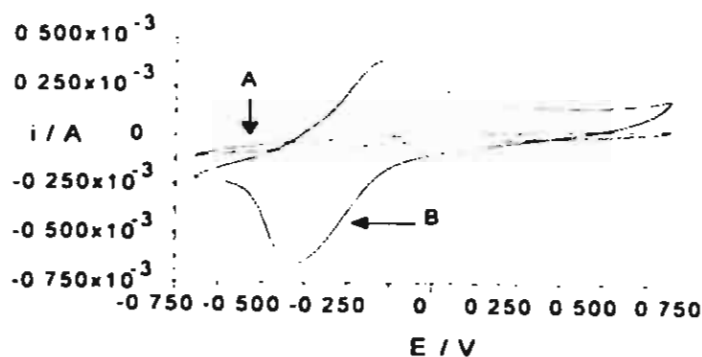
In this research, the specific glucose detection device, glucose sensor, was developed. Enzyme-modified gold disc electrode with $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, as an electron mediator instead of oxygen, were able to determine glucose at potential lower than +0.7 V to avoid the interference. The conducting polymer, polypyrrole, were used to entrap glucose oxidase at the surface of the electrode. It was found that the sensor can detect glucose at the potential of +0.4 V, the response time is 80 seconds with a sensitivity of 9.0×10^{-10} A/mM. The storage stability of the sensor exceeded 16 days and the operational stability is more than 9 times. In addition, it was found that the detection limit was 1.5 mM.

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟิล์มพอลิไพร์โรลที่ใช้ตรึงกลูโคสออกซิเดสและ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ ภัทสรพล งามอุโฆษ¹ สุทธิดา วัชรพลากรณ์¹ อติณัฐ เกติธรรม¹ อรวรรณ ชัยลพกุล¹ และ มรกต ดันติเจริญ²¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

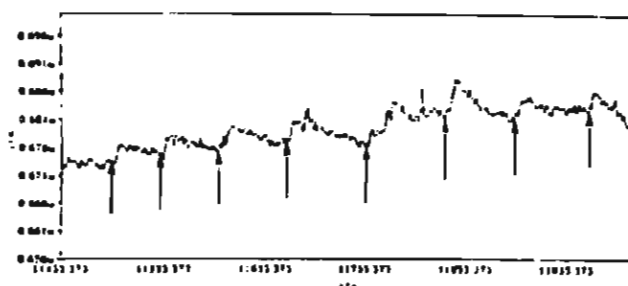
ปัจจุบันเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าได้ถูกพัฒนาให้มีความจำเพาะกับการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในปริมาณน้อยๆ ได้ โดยอาศัยอุปกรณ์ที่เรียกว่า กลูโคสเซนเซอร์ งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนากลูโคสเซนเซอร์ซึ่งสามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า +0.7 V เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงตัวรบกวนต่างๆ ที่เจือปนอยู่ในเลือดโดยใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนและใช้พอลิไพร์โรลซึ่งเป็น conducting polymer ทำหน้าที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไว้ที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน (gold disc electrode) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม รวมทั้งประสิทธิภาพและความเสถียรของกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้ จากการศึกษพบว่าสามารถใช้วัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า +0.4 V ใช้เวลาในการตอบสนอง 80 วินาที ความไว 9.0×10^{-10} A/mM มี operational stability มากกว่า 9 ครั้ง และมี storage stability มากกว่า 16 วัน นอกจากนี้สามารถวัดกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่ำถึง 1.5 mM

INDEX KEY WORDS: glucose sensor, polypyrrole, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, Amperometry

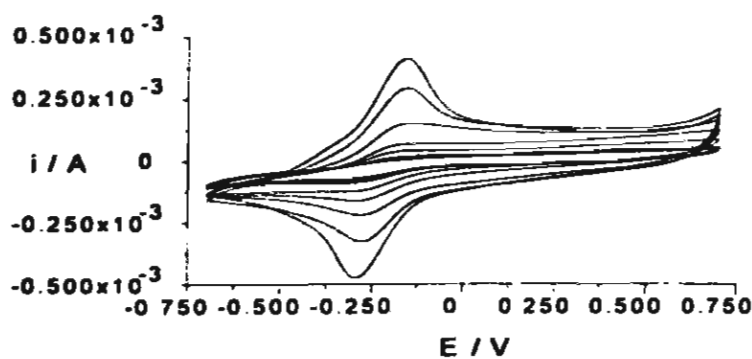
ชื่อเรื่อง (ไทย) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่ใช้ตรึงกลูโคสออกซิเดสและ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$



รูปที่ 1. แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมในสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ก่อน (A) และหลัง (B) พอลิเมอร์โรเซชัน



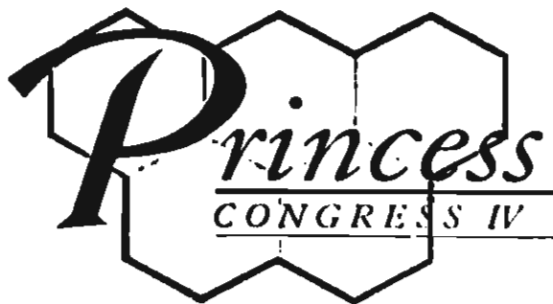
รูปที่ 2. แสดงกระแสที่ตอบสนองต่อสารละลายมาตรฐานกลูโคส 2 mM โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี (หัวลูกศรแสดงตำแหน่งที่ฉีดสารละลาย)



รูปที่ 3. แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำ operational stability test เมื่อนำเซนเซอร์ไปใช้งาน ติดต่อกัน 9 ครั้ง (ความสูงของกระแสที่ลดลง หมายถึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ ที่ตรึงไว้มีปริมาณลดลง)

เอกสารอ้างอิง

1. Imisides M.D., John R., Wallace G. G., *Chemtech*, 1996, 26(5), 19-25
2. Holcroft, S., Funt, B.L., *Journal of Electroanal. Chem*, 1988, 240, 89-103



***The Fourth
Princess Chulabhorn International Science Congress
Chemicals in the 21st Century***

28 November - 2 December, 1999 Bangkok, Thailand

***organized by
Chulabhorn Research Institute***

Program - Abstracts

COMPARATIVE DETERMINATION OF ALUMINIUM (III) IN TAP WATER BY FLOW INJECTION SPECTROPHOTOMETRY USING PYRIDOXAL SALICYLOYLHYDRAZONE AND CHROME AZUROL S.

Sakchai Satienderakul¹ and Saisunee Liawruangrath²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai THAILAND 50290.

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai THAILAND 50200.

Two different spectrophotometric flow injection (FI) systems were developed for trace aluminium determination, based on the reactions between aluminium (III) with two different selective the reagents, Pyridoxal Salicyloylhydrazone (PSH) and Chrome Azurol S. PSH reacts with aluminium (III) in an acid solution resulting in a yellow complex with a suitable absorption at 415 nm. The optimum conditions for trace aluminium (III) determination were investigated. A linear calibration graph over the concentration range 0.0 – 0.8 ppm of Al (III) was established. Another FI-colormetric method was based on the reaction between aluminium (III) and Chrome Azurol S in an acetate buffer pH 4.6 solution, forming a water-soluble purple complex, giving a maximum absorption at 567.5 nm. The optimum conditions for this method were determined and a linear calibration graph over the concentration 0 – 0.4 ppm of Al (III) was obtained. Both recommended methods were found to be reproducible, accurate and sensitive which have been applied to the determination of aluminium (III) in tap water samples collected from Chiang Mai University campus, the aluminium contents in the samples were found to be in the range 0.08-0.30 ppm.

AMPEROMETRIC GLUCOSE SENSOR USING $Ru(NH_3)_6Cl_3$ – NAFION COATED GOLD ELECTRODE FOR FLOW – INJECTION ANALYSIS

Passapol Ngamukot¹ Morakot Tanticharoen² and Orawon Chailapakul¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

Enzyme-modified amperometric glucose sensor was adapted to flow-injection analysis (FIA) for the determination of glucose. The conducting polymer, polypyrrole, was used to entrap glucose oxidase at the surface of a gold disc electrode. Nafion precoating was applied to improve the long-term stability of the sensor.⁽¹⁾ The problem of interference signals can be overcome by taking advantage of $Ru(NH_3)_6Cl_3$, as an electron mediator instead of oxygen. It was found that the sensor can operate at a potential lower than + 0.7 V (vs. Ag/AgCl) to avoid interference. Glucose solution was injected into the carrier stream of phosphate buffer before passing through a homemade flow-cell connected with the amperometric glucose sensor. The combination of the amperometric method and flow-injection analysis⁽²⁾ provides a high performance glucose determination method in term of specificity, reproducibility and good accuracy.

References:

- (1) Imisides, M. D.; Jonh, R.; Wallace, G. G. *CHEMTECH* 1996, 26, 19-25.
- (2) Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Flow-Injection Analysis*, 2 ed.; Wiley: New York, 1988.

การประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัย โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ครั้งที่ ๑



ISBN 974-7774-30-5

ณ โรงแรมเฟลิกซ์ จ.กาญจนบุรี
ระหว่างวันที่ 28-30 มกราคม 2543



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
The Thailand Research Fund

ชื่อ-สกุล ผู้รับทุนวิจัย ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล
 ที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 โทร. 2184985 e-mail
 อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. มรกต ตันติเจริญ

สาขาวิชา :

- ☐ ชีวภาพ และการแพทย์
☒ กายภาพ และวิศวกรรมศาสตร์
☐ สังคมศาสตร์ และมนุษยศาสตร์

Immobilized $K_3Fe(CN)_6$ and Glucose Oxidase in Polypyrrole Film on Au Microelectrode and Its Application as Glucose Sensors

Dr. Orawon Chailapakul, Jitrudee Promnil, Dr. Mithran Somasundrum and Associate Prof. Dr. Morakot Tanticharoen

The purpose of this research is to prepare a glucose sensor using electrochemical polymerization of pyrrole onto a gold microelectrode in the presence of the enzyme glucose oxidase and ferricyanide at a potential of 0.70 V vs. Ag/AgCl. The enzyme glucose oxidase and ferricyanide are co-immobilized into the polypyrrole films during the electrochemical polymerization process. The two species compete for incorporation into the films so that on increasing the concentration of enzyme in the growth solution less ferricyanide is incorporated into the film. During the measurement of glucose, ferricyanide entrapped within the film will be used as a redox mediator for the oxidation of the enzyme at 0.45 V vs. Ag/AgCl, so that it avoids the oxidation of interferences at the higher potential. The effects of variation in charge passed during polymerization, pyrrole concentration and ferricyanide loading also are studied. Moreover, the stability of glucose sensor was investigated. The PPy/GOD/Ferri enzyme electrode was found more stable by storing in 100 nM ferricyanide and 0.1 M phosphate buffer pH 7 at 4 °C.

การตรึง $K_3Fe(CN)_6$ และ กลูโคสออกซิเดสในฟิล์มพอลิไพร์โรลบนอิเล็กโทรดทองคำขนาดไมโคร และการประยุกต์ใช้เป็น กลูโคสเซนเซอร์

ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล จิตฤดี พรหมนิล ดร. มิตราน โซมาซันดรัม และ รศ. ดร. มรกต ตันติเจริญ

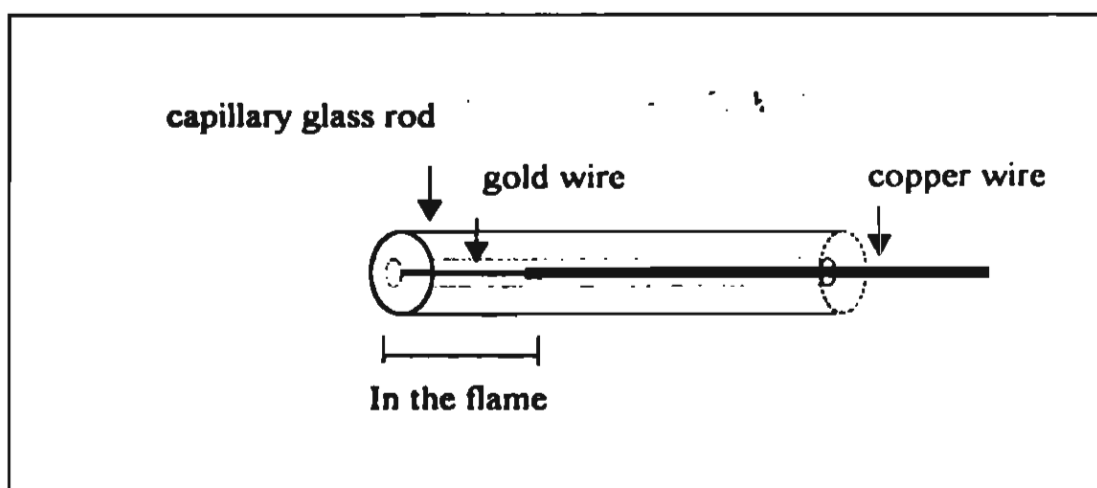
งานวิจัยนี้เป็นการเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และ เฟอริไซยาไนด์ลงในฟิล์มพอลิไพร์โรลบนอิเล็กโทรดทองคำขนาดไมโคร กลูโคสเซนเซอร์ดังกล่าวถูกเตรียมด้วยวิธีอิเล็กโตรเคมีคัลพอลิเมอไรเซชันที่ศักย์ไฟฟ้า 0.70 โวลต์ เทียบกับขั้วอิเล็กโทรดอ้างอิง Ag/AgCl ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส หรือเฟอริไซยาไนด์ที่จะถูกตรึงลงในฟิล์มพอลิไพร์โรล จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแต่ละสารที่มีอยู่ในสารละลายระหว่างที่ทำการพอลิเมอไรซ์ ในงานวิจัยนี้เฟอริไซยาไนด์จะถูกใช้เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนขณะที่ทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ 0.45 โวลต์เทียบกับขั้วอิเล็กโทรดอ้างอิง Ag/AgCl เพื่อเลี่ยงการถูกรบกวนจากตัวแทรกสอดที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์เทียบกับขั้วอิเล็กโทรดอ้างอิง Ag/AgCl นอกจากนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของฟิล์ม เฟอริไซยาไนด์ และปริมาณไฟฟ้าค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในการพอลิเมอไรซ์ จากการตรวจสอบความเสถียรของกลูโคสเซนเซอร์ พบว่าเมื่อเก็บไว้ในสารละลาย 100 นาโนโมลาร์ของเฟอริไซยาไนด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กลูโคสเซนเซอร์มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น

INDEX KEY WORDS : polypyrrole, glucose sensors, ferricyanide, Amperometry

Immobilized $K_3Fe(CN)_6$ and Glucose Oxidase in Polypyrrole on Au Microelectrode and Its Application as Glucose Sensors

PROCEDURES

Preparation of Gold Microelectrodes



Preparation of Glucose sensors: Electrochemical Polymerization of Pyrrole and Immobilization Glucose Oxidase and Ferricyanide



Study the Effects of Charge Passed during Polymerization, Pyrrole Concentration and Ferricyanide Concentration



Determination of Glucose, Study of Stability and Sensitivity

Immobilized $K_3Fe(CN)_6$ and Glucose Oxidase in Polypyrrole on Au Microelectrode and Its Application as Glucose Sensors

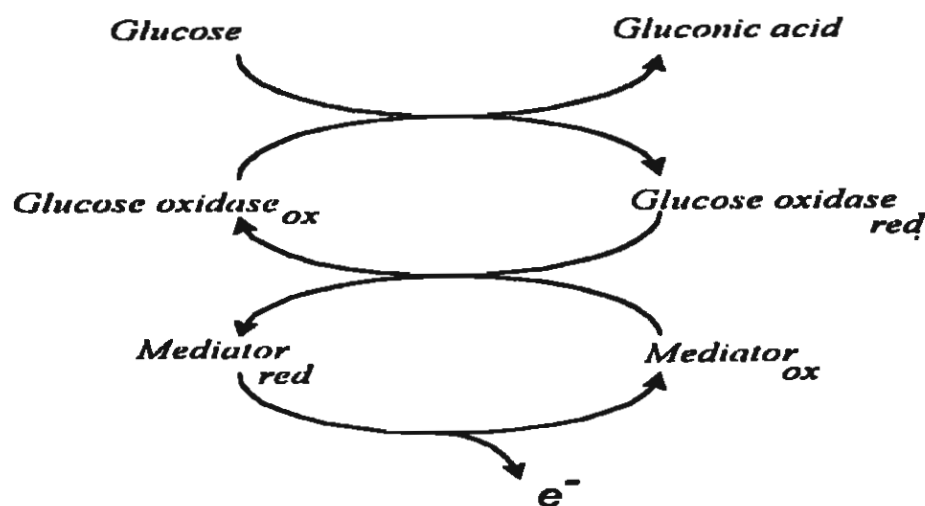


Fig. 1 Scheme reaction pathway utilizing a redox enzyme linked amperometric measurement via a redox mediator.

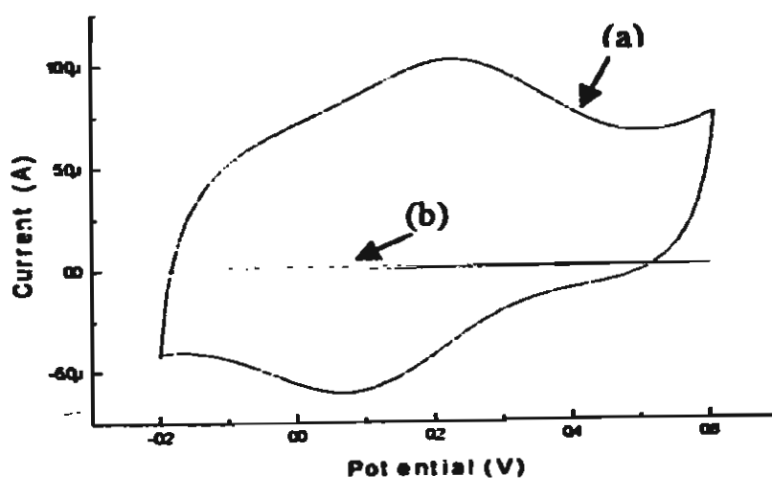


Fig. 2 A typical cyclic voltammograms for oxidation-reduction of ferricyanide in films (a) compared with that of the background (b)

Immobilized $K_3Fe(CN)_6$ and Glucose Oxidase in Polypyrrole on Au Microelectrode and Its Application as Glucose Sensors

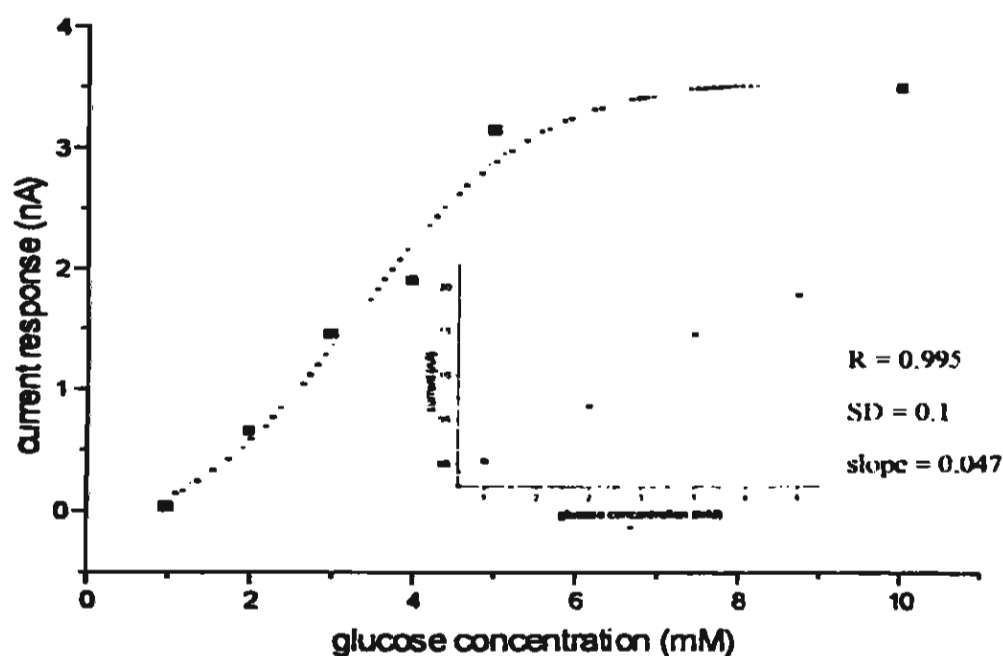


Fig. 3 Calibration curve of glucose sensor at 0.45 V using ferricyanide as mediator

References

1. Holdcroft, S.; Funt, B.L. (1988) *J. Electroanal. Chem.* , 240, 89 - 95
2. Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. (1987) *J. Electroanal. Chem.* , 224, 27-35