



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรล
และอนุพันธ์บนอิเล็กโทรดทองคำขนาดไมโคร

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

ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรล

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 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$

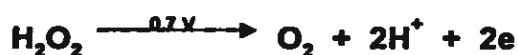
3. สำหรับการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ซึ่งจะให้ไอออนประจุบวกเมื่ออยู่ในน้ำ ดังนั้นวิธีดรีมบนอิเล็กโทรด จึงแตกต่างจากการเติมตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ บนอิเล็กโทรดขนาดไมโคร จำเป็นต้องใช้อิเล็กโทรดขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร) เพื่อจะได้มีพื้นที่มากพอที่จะยึด nafion ที่มีประจุลบ แล้วจึงยึด $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ที่มีประจุบวก แล้วจึงทำการโพลีเมอไรซ์ 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

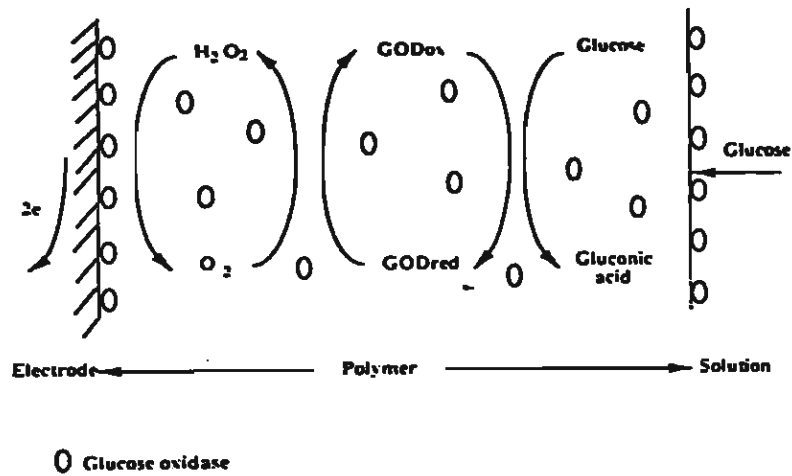
กลูโคสจัดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดส์ เช่น cupric hydroxide จึงสามารถนำไปตรวจสอบได้ด้วยวิธี Fehling's test และ Benedict's test ซึ่งวิธีการเหล่านี้ใช้ตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสที่มีปริมาณมาก ในการวิเคราะห์สารละลายที่มีปริมาณกลูโคสน้อยไม่สามารถใช้วิธีการเหล่านี้ได้ จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการตรวจสอบ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

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



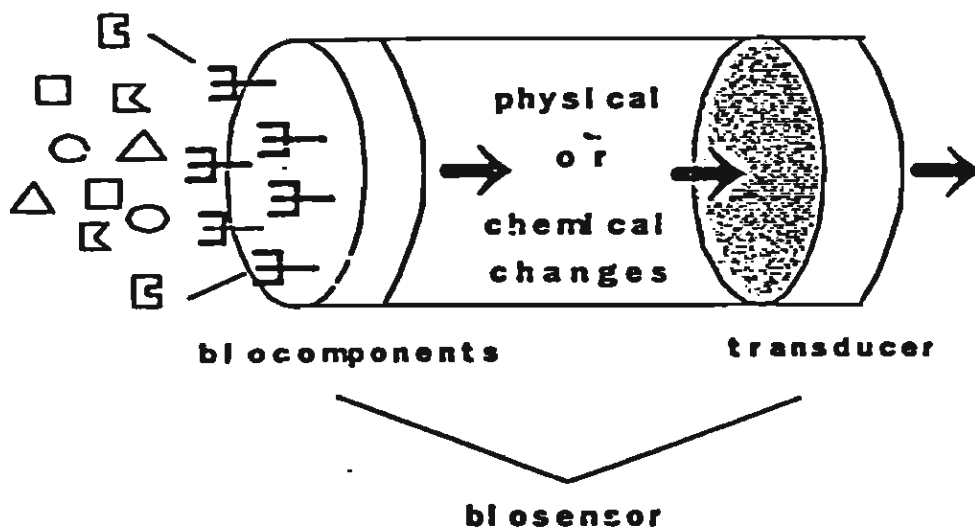
ในที่นี้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน (mediator) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ +0.7 V ค่าศักย์ไฟฟ้านี้เป็นค่าที่ตัวรบกวนต่าง ๆ เช่น ยูเรีย และกรดยูริก สามารถส่งสัญญาณกระแส เป็นผลให้เกิดความผิดพลาดทางบวกได้ ทำให้ได้ค่ามากกว่าที่เป็นจริง ตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนอื่น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

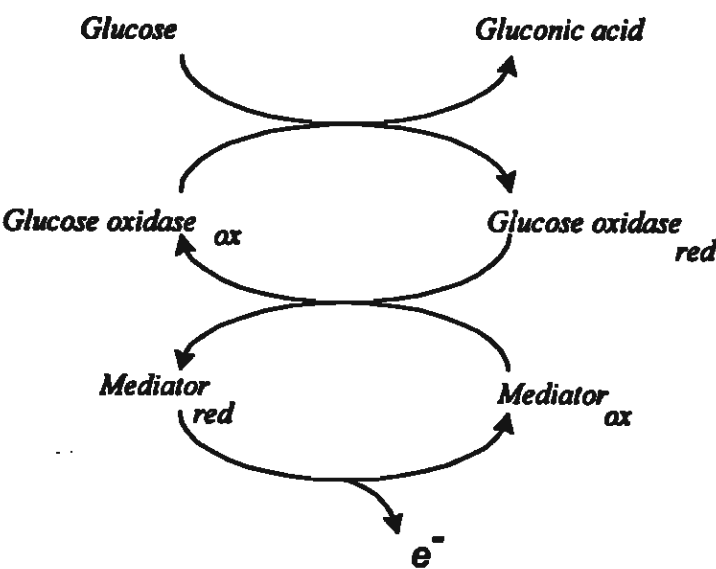
อิเล็กโทรเคมีคัลพอลิเมอร์ไรเซชันเป็นกระบวนการพอลิเมอร์ไรซ์โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตรึงเอนไซม์บนแผ่นฟิล์ม กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเคมีไฟฟ้าของ สารละลายมอนอเมอร์ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยและเกิดเป็นพอลิเมอร์ที่อาจนำไฟฟ้าได้หรือไม่ก็ได้ กระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันควรทำในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายและควรทำในช่วง 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 นอกจากนี้ภาวะที่ใช้ดริงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงในพอลิไพโรลเป็นภาวะที่ไม่ทำลายเอนไซม์ 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

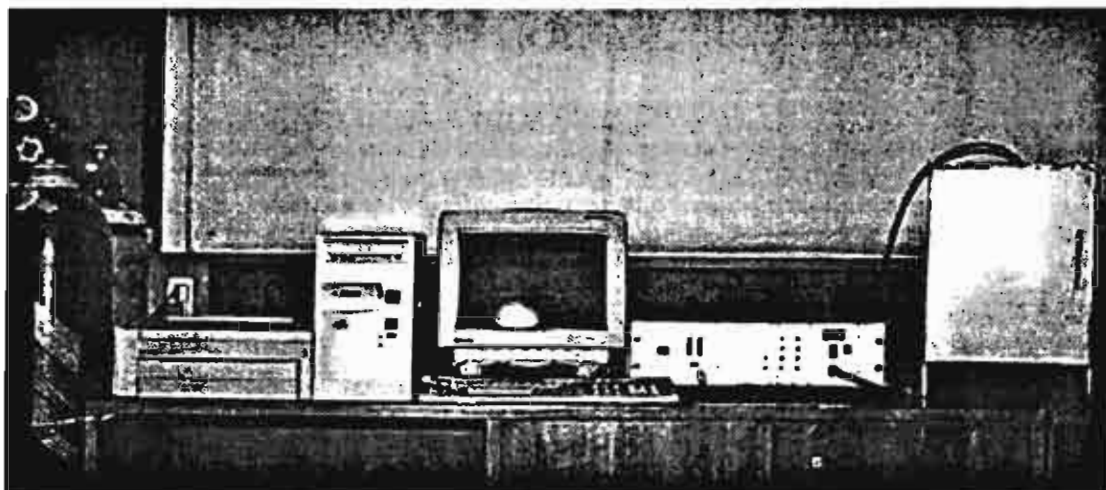
เครื่องมือและอุปกรณ์

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

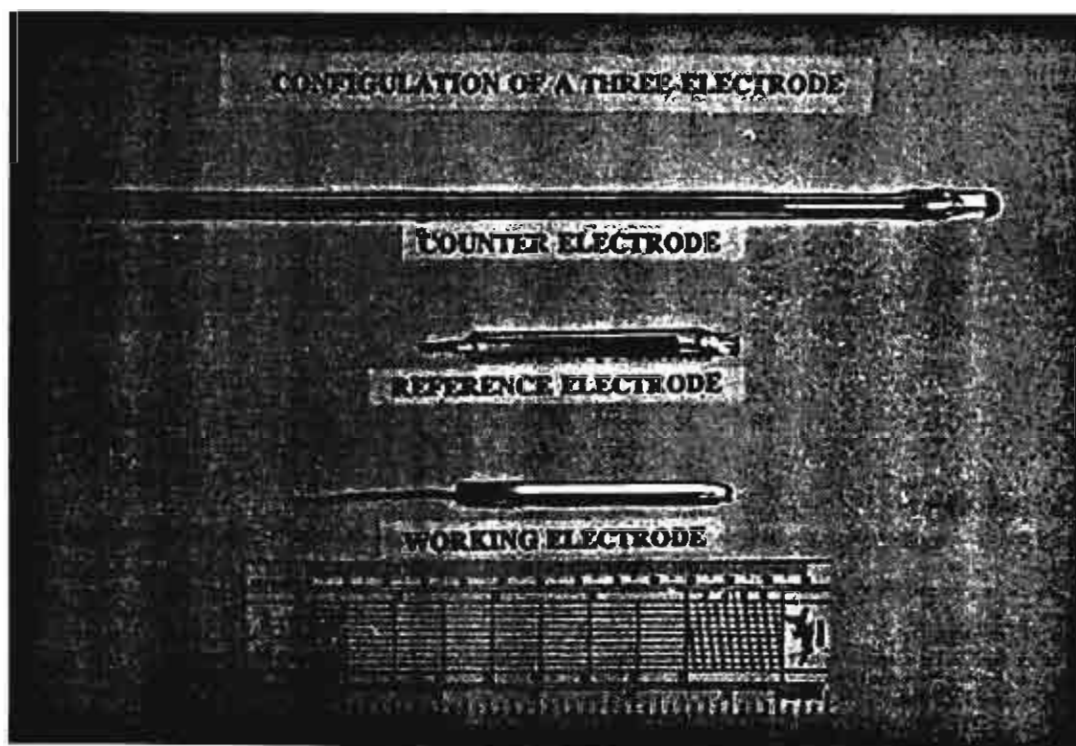
สารเคมี

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

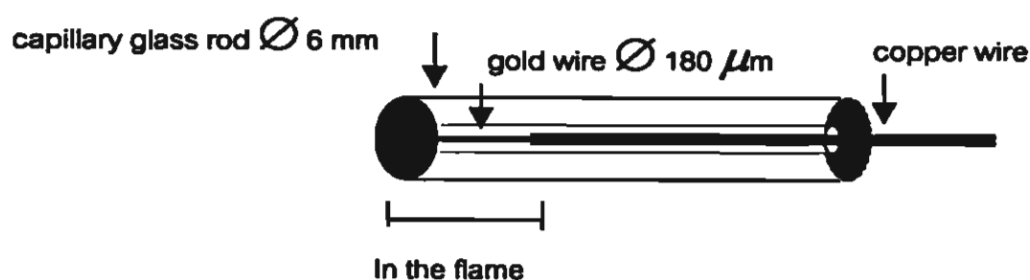
1. การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทองขนาดไมโคร
2. การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $Ru(NH_3)_6Cl_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง

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 โดยให้ศักย์ไฟฟ้า -0.1 V ถึง 1.6 V เทียบกับขั้ว Ag/AgCl และ โลหะแพลตทินัมเป็นเคาน์เตอร์อิเล็กโทรด ด้วยอัตราสแกน 0.1 V/sec. จนกระทั่งได้กราฟที่พลอตระหว่าง กระแสกับศักย์ไฟฟ้าคงที่

การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์ โดยใช้พอลิไพโรลเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เกิดกลไกการส่งผ่านแบบ คัตขนาด

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

การทดลองนี้ได้เตรียมฟิล์มพอลิไพโรลโดยเทคนิคโครโนคุลลอมเมทรี ในสารละลาย 43 mM ของไพโรลมอนอเมอร์ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 โดยเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลจากการให้ปริมาณไฟฟ้าค่าต่าง 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 ใช้อิเล็กโทรดซึ่งเตรียมจากไพโรล/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 ซึ่งมีเฟอร์ริไซยาไนด์ตรึงอยู่ด้วย การทดลองนี้จะใช้ปริมาณไฟฟ้าเป็นตัวแปร (ให้ปริมาณไฟฟ้าค่าต่าง ๆ 0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 24.0 μC) วัดกระแสแอโนดิกแล้วนำมาพลอตกราฟ

การศึกษาผลของความเข้มข้นของไฟโรลที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

การทดลองนี้ใช้

- ความเข้มข้นของเอนไซม์ 25 units/mL
- ความเข้มข้นของ เฟอร์ริไซยาไนด์ 50 มิลลิโมล/ลิตร
- ความเข้มข้นของไฟโรล 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
- ความเข้มข้นของไฟโรล 40 มิลลิโมลาร์
- ความเข้มข้นของ GOD 25 units/ลูกบาศก์เซนติเมตร และ
- ปริมาณไฟฟ้า 45 มิลลิคูลอมป์/ ตารางเซนติเมตร
- สารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์

การตรวจสอบคุณภาพ ของอิเล็กโทรดที่เตรียมได้

ความไว (Sensitivity)

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

นำอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไฟโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ $K_3Fe(CN)_6$ เรียบร้อยแล้ว มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.45 V โดยเทคนิคแอมเพอโรเมทรี 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 $K_3Fe(CN)_6$

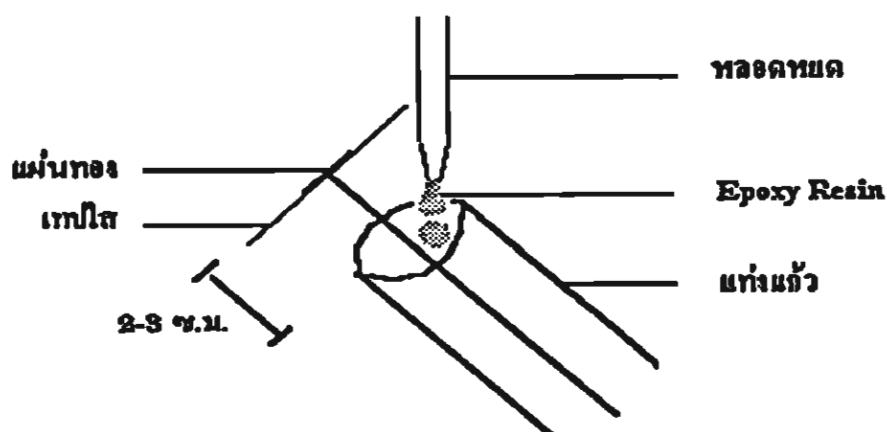
โครงการที่ 2: การเตรียมกลุโคสเซนเซอร์โดยวิธีรีดิงเอนไซม์กลุโคสออกซิเดสในพอลิไพโรล โดยใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง

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 $0.1\ \mu\text{m}$ 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 $+1.6\ \text{V}$ จำนวน 3 รอบ
- ทำการทดลองในสารละลาย $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 – 0.5 mmol/mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก 0.0 ถึง $+0.6\ \text{V}$ 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

การศึกษาความเข้มข้นของไพโรลและประจุไฟฟ้าที่ใช้ในการควบคุมการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรล

- 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 ในสารละลายไพโรลความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 M โดยเทคนิคกลูอมปีเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V
- ทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M 5 mL โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง $+0.7$ V จำนวน 2 รอบ
- บันทึกค่ากระแสที่ตอบสนอง จากไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้

การเตรียมฟิล์มพอลิไพโรล

- 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
- ทำการพอลิเมอร์ไรเซชันในสารละลายไพโรล 0.1 M ที่มี GOD 50 units/mL โดยเทคนิคกลูอมปีเมทรี 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]

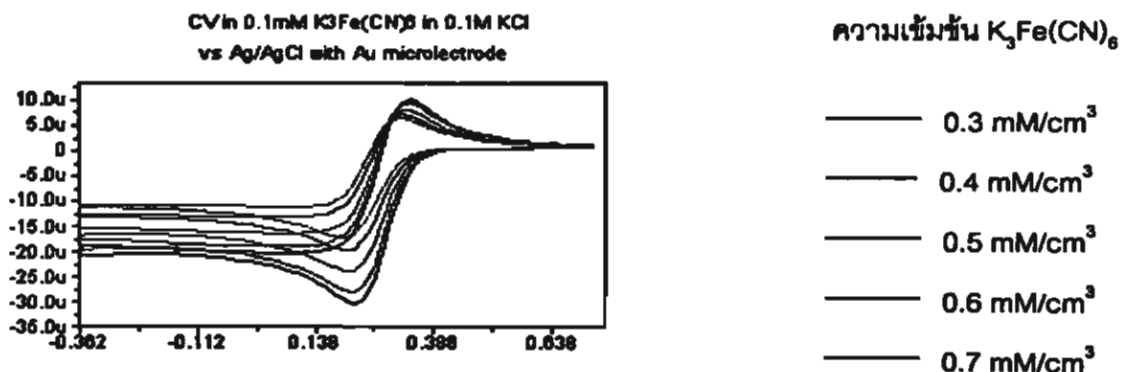
D_0 = Diffusion coefficient = 0.763×10^{-5} [cm^2/sec]

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.



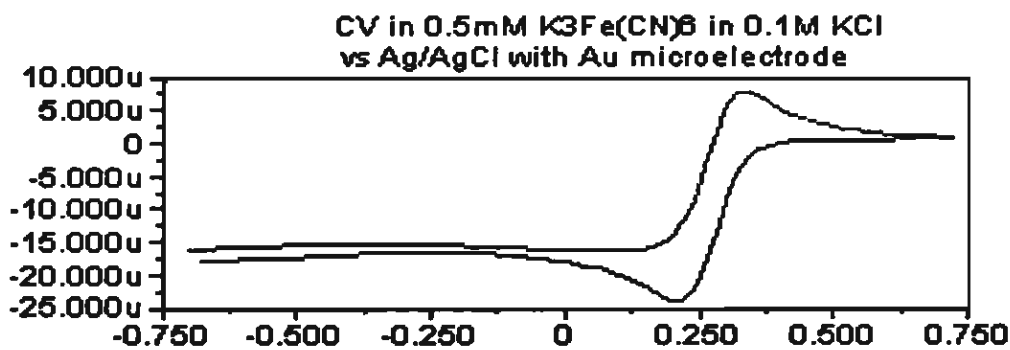
เมื่อพลอตกราฟเส้นตรงระหว่าง i_{pa} กับ C_0 ค่าความชันของเส้นตรงดังกล่าว i_{pa}/C_0 มีค่าเท่ากับ 2.985×10^{-2} ดังนั้น ไมโครอิเล็กโทรดที่ใช้มีพื้นที่เท่ากับ $1.27 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$

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.

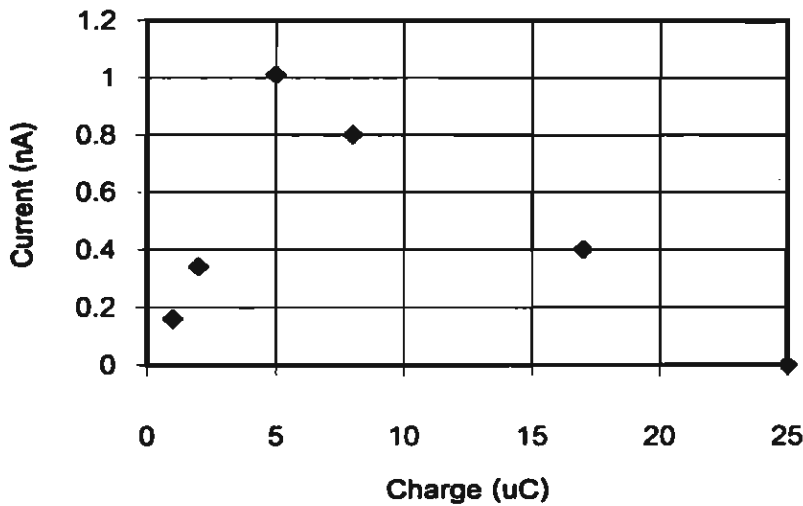
การเตรียมกลุโคสเซนเซอร์ โดยใช้พอลิไพโรลเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ที่เกิดกลไกการส่งผ่านแบบคัตขาด

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

สำหรับกิจกรรมนี้ จะต้องเตรียมกลุโคสเซนเซอร์ โดยใช้พอลิไพโรล และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้าและความหนาของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

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

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการสร้างฟิล์มพอลิไพโรลโดยวัดกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการวัดปริมาณกลูโคส เมื่อใช้ free GOD จากเทคนิคแอมเพอโรเมทรี



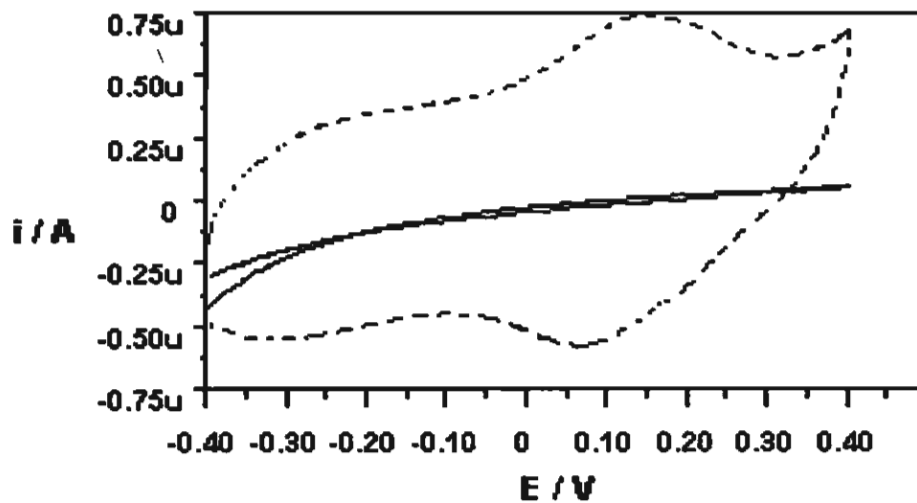
รูป ที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (charge) และปริมาณกระแสไฟฟ้า (i) ที่ได้การวัดสารละลาย 10 mM กลูโคส + free GOD 25 Uni/ลูกบาศก์เซนติเมตร 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7

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

การตรวจสอบ เฟอร์ริไซยาไนด์ที่ตรึงอยู่ในฟิล์มพอลิไพโรลโดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10 จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างระหว่าง อิเล็กโทรดทั้งสอง อิเล็กโทรดที่ตรึงด้วย ไพโรล/เฟอร์ริไซยาไนด์ จะให้ electrochemical reversibility ของสารประกอบเฟอร์ริไซยาไนด์ แสดงให้เห็นว่ามีสารประกอบรีดอกซ์นี้ ตรึงอยู่ในฟิล์มโพลีเมอร์สำหรับอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไพโรลอย่างเดียว จะไม่สังเกตเห็นการถ่ายเทอิเล็กตรอนของเฟอร์ริไซยาไนด์ 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 $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ ซึ่งเป็นยืนยันว่ามี $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ ตรึงอยู่ในพอลิไพโรฟิล์ม

การศึกษาปริมาณไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในขณะเตรียมอิเล็กโทรด

รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสัญญาณแอมเพอโรเมตริกและปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ถ้าให้ปริมาณไฟฟ้าในการสร้างฟิล์มเพิ่มมากขึ้น กระแสแอมเพอโรเมตริกที่แสดงว่ามี เฟอร์ไรเซชันในฟิล์มก็จะมากขึ้นด้วย ตามที่คาดไว้ จากข้อมูลที่ได้ทำการสืบค้น สามารถประมาณได้ว่าปริมาณไฟฟ้าที่ใช้ในการสร้างฟิล์ม 45 mC /ตารางเซนติเมตร จะให้ฟิล์มที่มีความหนา 0.1 μm ดังนั้นถ้าให้ปริมาณไฟฟ้าเพิ่มมากขึ้น ความหนาของฟิล์มจะเพิ่มมากยิ่งขึ้นด้วย

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

เมื่อให้ X_r คือ ระยะทางเฉลี่ยของกลูโคสโมเลกุลที่เคลื่อนที่ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดส และมีความสัมพันธ์กับค่าคงที่ต่าง ๆ ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

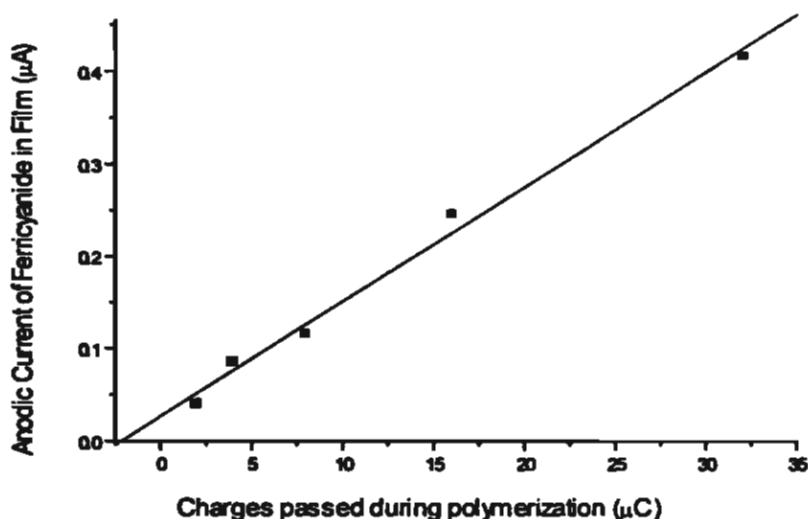
$$X_r = \sqrt{D_s K_m / K_{cat} \theta_T}$$

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

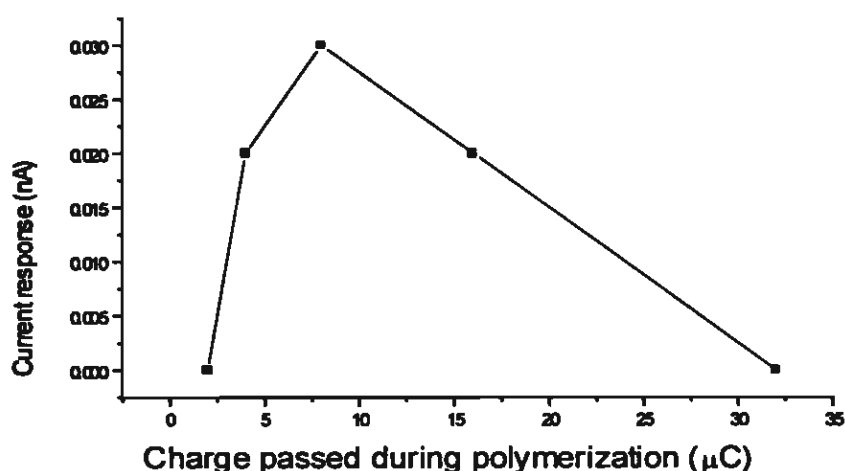
เมื่อระยะทาง X_p มีค่ามากกว่าความหนาของฟิล์ม จะมีการสูญเสียปริมาณของกลูโคสในระหว่างทาง ก่อนที่กลูโคสจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

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



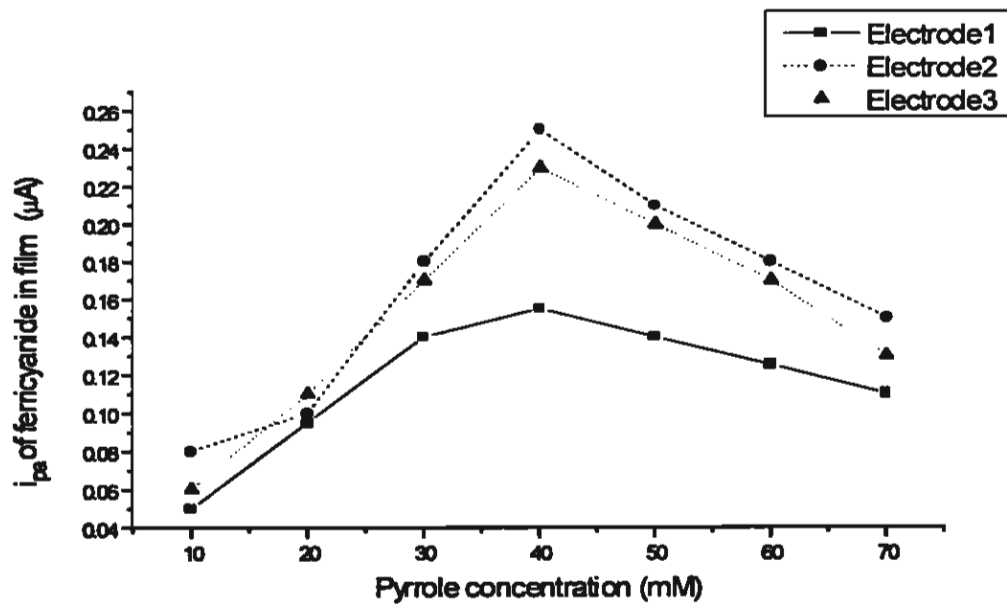
รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สัญญาณตอบสนองที่มีต่อสารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์และปริมาณไฟฟ้าที่ผ่านอิเล็กโทรดในสารละลายของ 40 มิลลิโมลาร์ของไฟโรล GOD ล 25 unit/ลูกบาศก์ เซนติเมตรของ และ 50 มิลลิโมลาร์เฟอริไซยาไนด์

การศึกษาผลของความเข้มข้นของไฟโรลที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

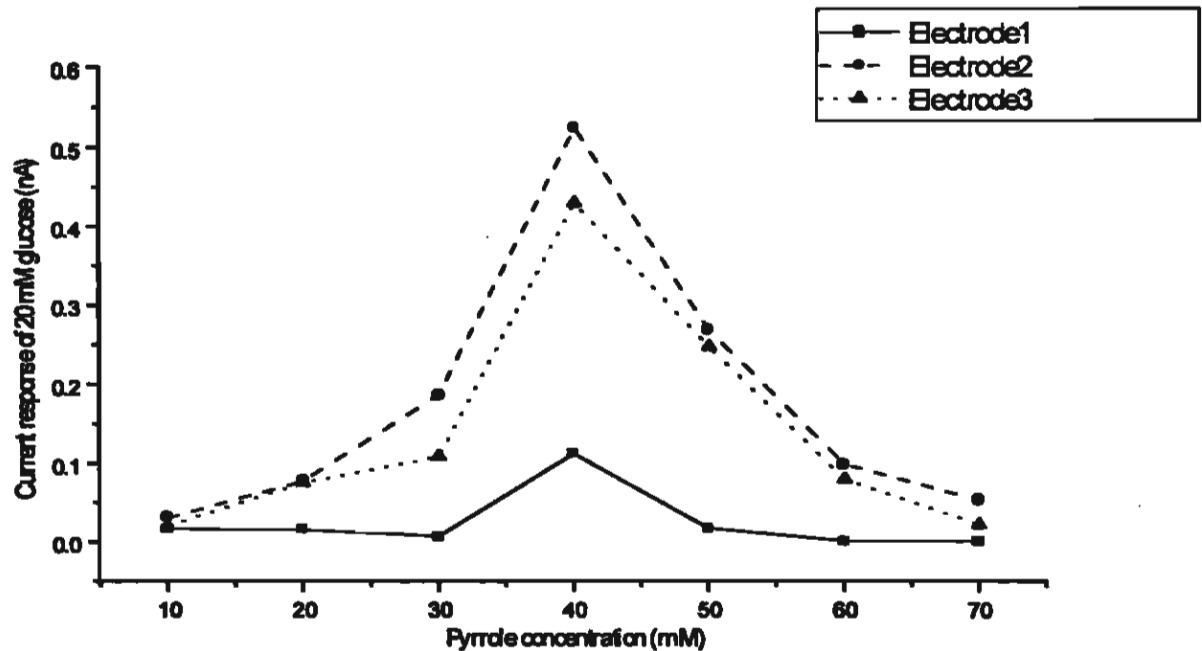
จากการตรวจสอบเมื่อใช้ไฟโรลที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อสัญญาณตอบสนองในขณะที่ทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 13

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

สำหรับผลของความเข้มข้นของไฟโรลในสารละลายที่ใช้สร้างฟิล์ม PPy/Ferri/GOD บนอิเล็กโทรดทอง ที่มีต่อสัญญาณแอมเพอโรเมทริก 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

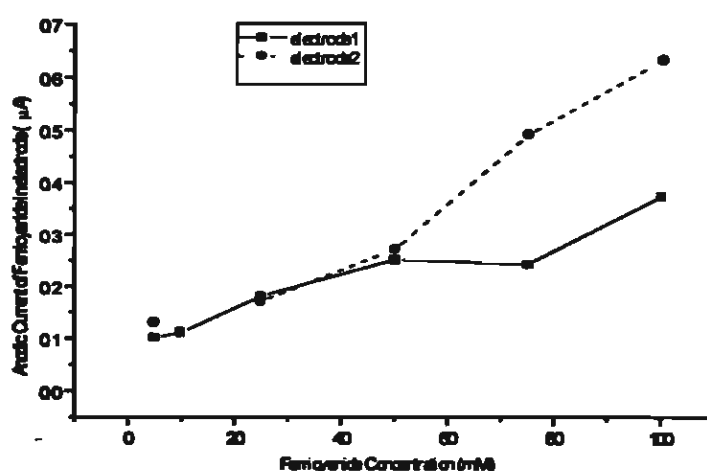
การศึกษาผลของความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์ ที่มีต่อสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด

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

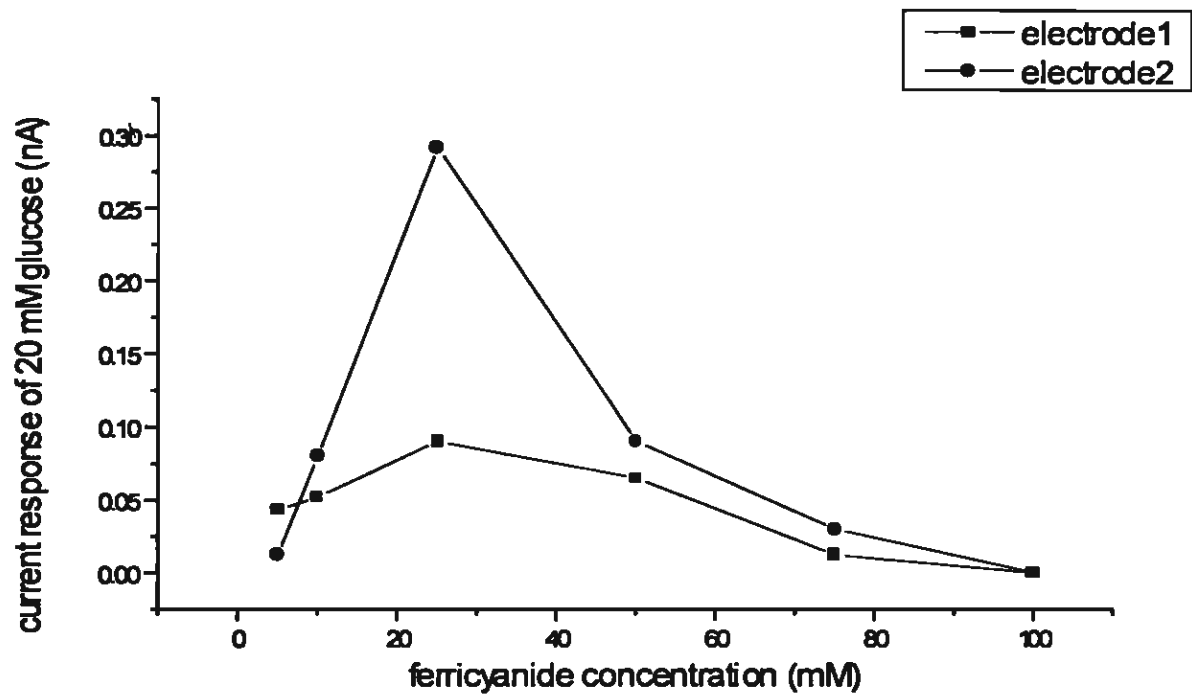
ในระหว่างที่ทำการอิเล็กโทรโพลีเมอร์ไรซ์เซชัน ที่ 0.7 V กลูโคสออกซิเดส ซึ่งมีประจุลบเมื่อมี pH สูงกว่า 6 สามารถจะเข้าไปอยู่ในฟิล์มได้เพราะ พอลิไพโรลมีประจุบวกกลูโคสออกซิเดส มีประจุลบ จึงยึดติดได้เพราะเป็น counter ion

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

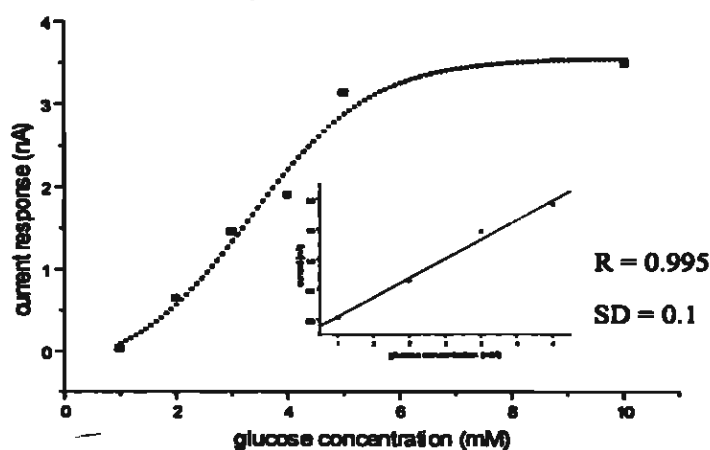


รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สัญญาณกระแสที่มีต่อสารละลายกลูโคส 20 มิลลิโมลาร์และความเข้มข้นของเฟอริไซยาไนด์ ในสารละลายของ 40 มิลลิโมลาร์ของไฟโรล 25 units ของ GOD/ลูบาสก์ เซนติเมตร และปริมาณไฟฟ้า 45 มิลลิคูลอมป์/ ตารางเซนติเมตร

การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์อิเล็กโทรด

ความไว (Sensitivity)

ความไวของกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้จากการทดลองนี้ พบว่าเท่ากับ 0.05 มิลลิโมลาร์ / แอมแปร์ ดังแสดงในรูปที่ 13

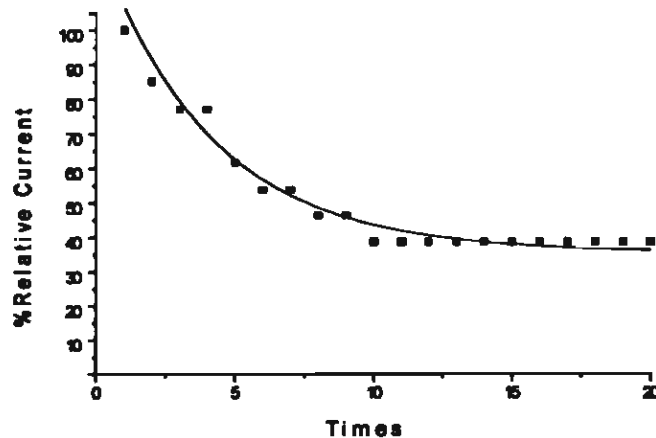


รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแส และความเข้มข้นของกลูโคส

ความเสถียร (Stability)

1. ความเสถียรต่อการใช้งาน (Operational Stability)

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



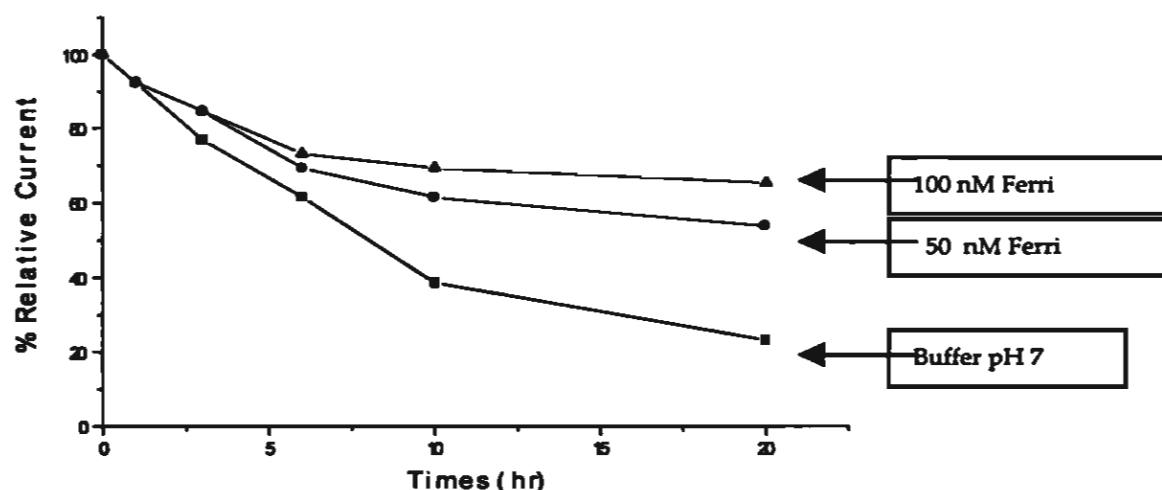
รูปที่ 18 แสดงความเสถียรต่อการใช้งานของอิเล็กโทรดที่ทำการวัดกลูโคส 20 mM ที่ 0.45 โวลท์

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 สำหรับอิเล็กโทรดที่เก็บอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มีเฟอริไซยาไนด์ความเข้มข้นมากกว่า 100 mM พบว่าจะไม่สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากสูญเสียแอกทีวิตีของเอนไซม์ โดยเฟอริไซยาไนด์ที่มีมากเป็นตัวทำลาย



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

ตัวรบกวน

ตัวรบกวนที่ทำการศึกษา คือ ascorbic acid อิเล็กโทรดที่ใช้มี 2 ชนิดคือ อิเล็กโทรดทองที่ไม่ได้ทำการพอลิเมอร์ไรซ์ และตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $K_3Fe(CN)_6$ กับอิเล็กโทรดทองที่ได้ทำการพอลิเมอร์ไรซ์ และตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $K_3Fe(CN)_6$

Ascorbic acid

ตารางที่ 1 แสดงกระแสของ ascorbic acid ความเข้มข้น 40 μM เมื่อใช้อิเล็กโทรดทองที่ไม่ได้ทำการตรึงกลูโคสออกซิเดส/ $K_3Fe(CN)_6$ ในฟิล์มพอลิไพโรล (PPy/GOD/Ferri electrode) และตารางที่ 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

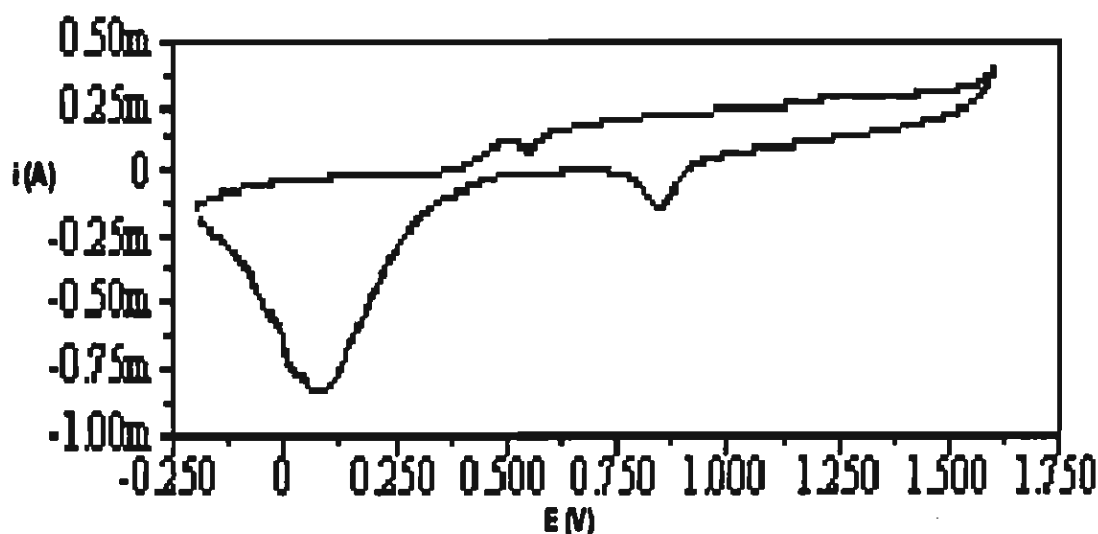
งานวิจัยนี้ สามารถสร้างไมโครอิเล็กโทรด ที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส/เฟอริไซยาไนด์ ลงในพอลิไพโรล พบว่ามีไซยาไนด์ตรึงอยู่ในฟิล์มจริง นอกจากนี้ยังสามารถใช้เฟอริไซยาไนด์นี้เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน สามารถนำอิเล็กโทรดชนิดนี้มาหาปริมาณกลูโคส โดยเทคนิค แอมเพอโรเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.45 V ซึ่งสามารถลดตัวรบกวนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้ามากกว่า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

โครงการที่ 2: การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยวิธีดริ้งเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในพอลิไพโรลโดยใช้ $Ru(NH_3)_6Cl_3$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง

การสร้างอิเล็กโทรดทอง

1. อิเล็กโทรดแบบฝัง

นำอิเล็กโทรดแบบฝังมาทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่าอิเล็กโทรดแบบฝังเกิดการรั่วของอีพอกซี เรซิน (Epoxy resin) ทำให้ได้โวลแทมโมแกรมดังรูปที่ 20 ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลสำหรับกลูโคสเซนเซอร์ได้

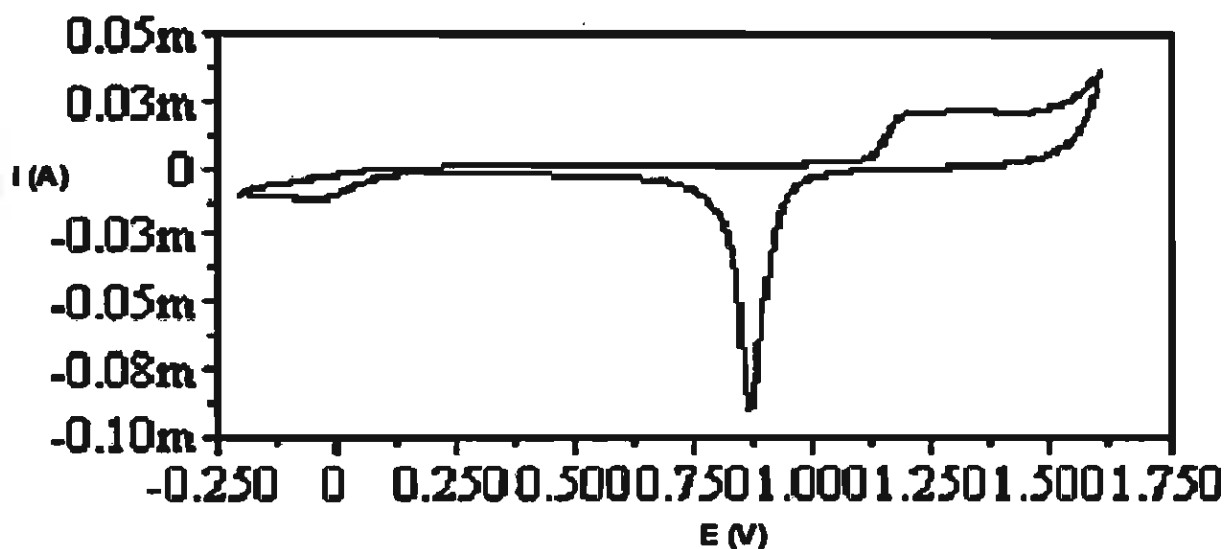


รูปที่ 20 โวลแทมโมแกรมของสารละลาย 0.1 M H_2SO_4 ที่ได้จากอิเล็กโทรดแบบฝัง แสดงการทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้าพบว่าการรั่วของอีพอกซีเรซิน

2. อิเล็กโทรดแบบเสมอ

จากการสร้างอิเล็กโทรดแบบฝังไม่สามารถนำมาใช้ในโครงการนี้ได้ จึงมีการสร้างอิเล็กโทรดอีกชนิดหนึ่ง คือแบบเสมอ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นโลหะทองปิดแท่งแก้วอย่างสนิทเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการรั่วของอีพอกซี เรซิน ออกมาสู่ภายนอกขณะทำการทดลอง

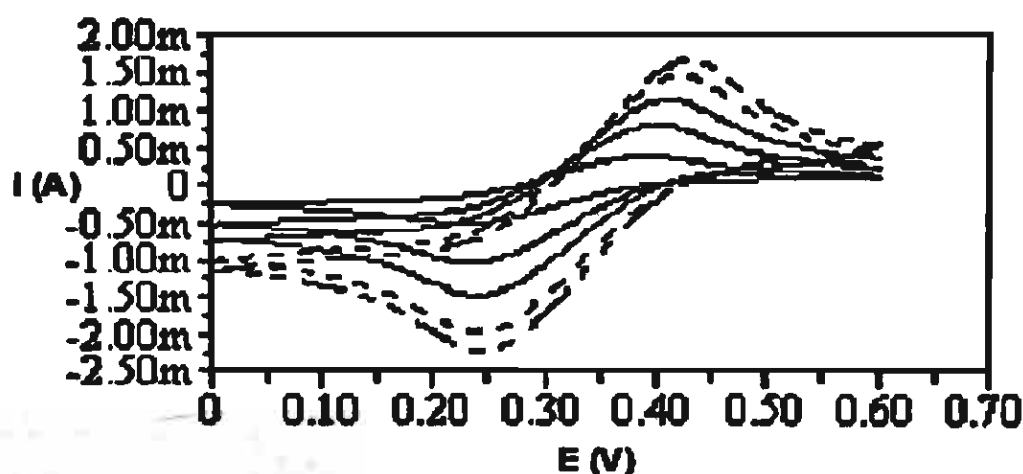
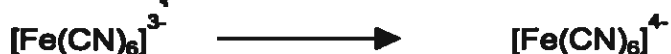
จากการทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า พบว่าโวลแทมโมแกรมที่ได้จากอิเล็กโทรดแบบเสมอไม่เกิดการรั่วของอีพอกซีเรซิน (Epoxy resin) ดังโวลแทมโมแกรมรูปที่ 21



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 cm^2 จึงให้ปริมาณไฟฟ้าในการเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล 8.8 mC

สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของโพโรลได้ใช้สองความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโพโรล

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

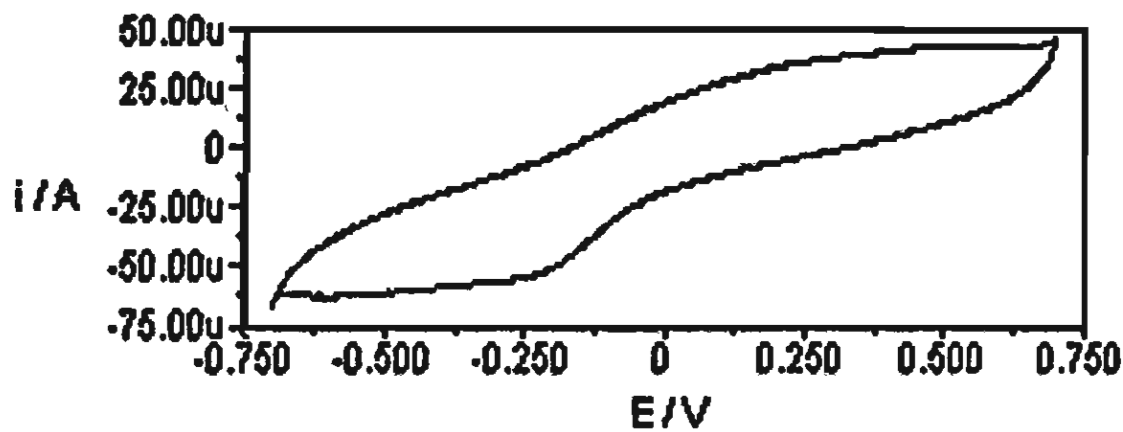
จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าความเข้มข้นของโพโรลที่ให้สัญญาณกระแสมากที่สุดคือความเข้มข้น 0.3 M แต่เมื่อนำความเข้มข้นนี้ไปเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล พบว่าแผ่นฟิล์มไม่เรียบ และไม่ปกคลุมทุกส่วนของพื้นผิวอิเล็กโทรด อาจเกิดจากความเข้มข้นของโพโรลมากเกินไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโพโรล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

การเตรียมฟิล์มพอลิโพโรล

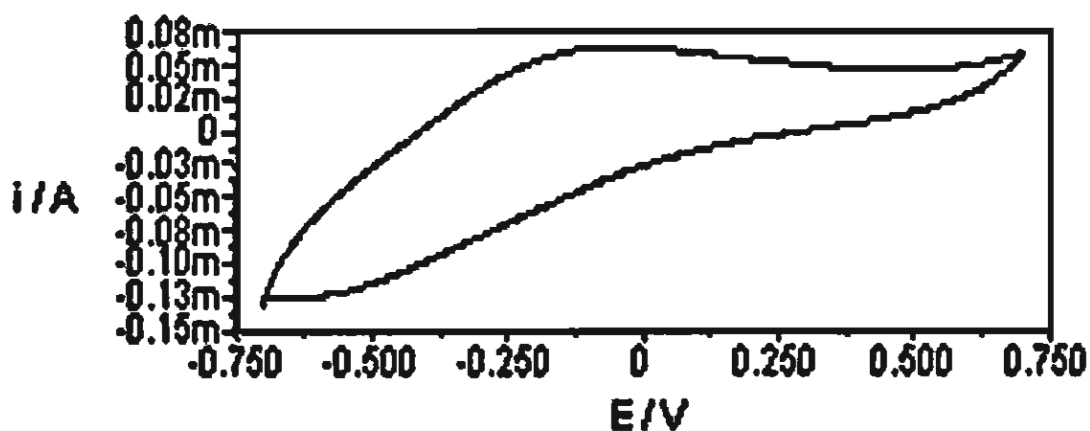
เมื่อใช้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

การตรวจสอบอิเล็กโทรด ก่อนและหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

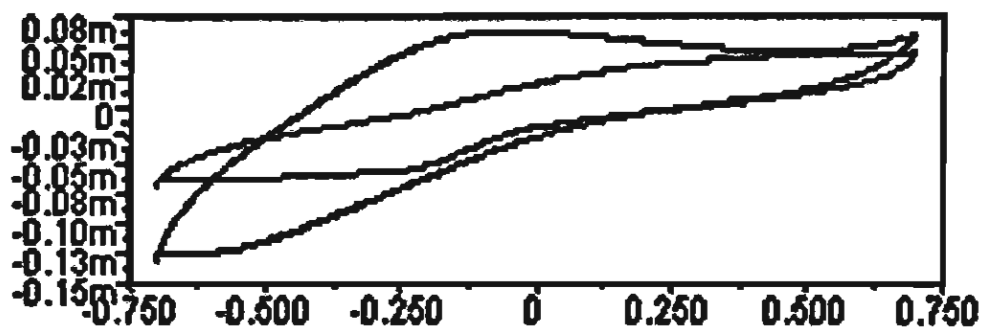
ทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเปรียบเทียบไซคลิก โวลแทมโมแกรมก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชันที่พื้นผิวอิเล็กโทรดดังรูปที่ 23 และหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ดังรูปที่ 24 ซึ่งจากโวลแทมโมแกรมที่แสดงการเปรียบเทียบดังรูปที่ 25 ภายหลังจากทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน มีกระแสเพิ่มสูงขึ้นกว่าก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน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



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



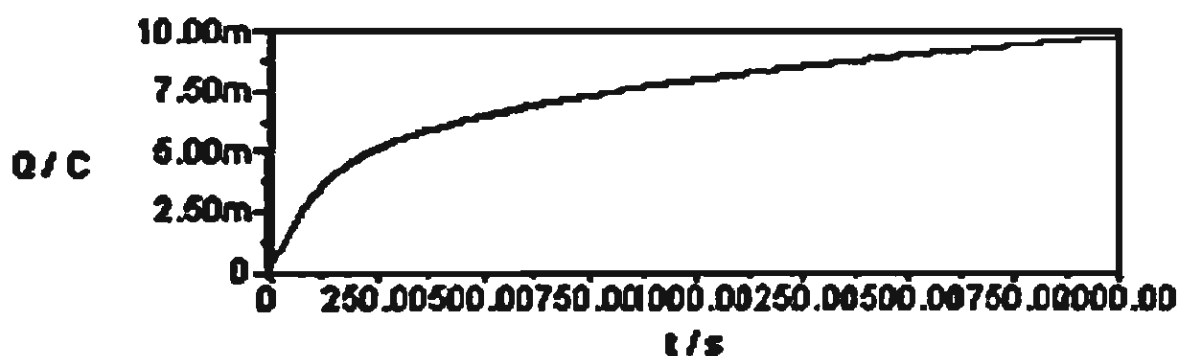
รูปที่ 24 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V หลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



รูปที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และหลังพอลิเมอร์ไรเซชัน

การพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล

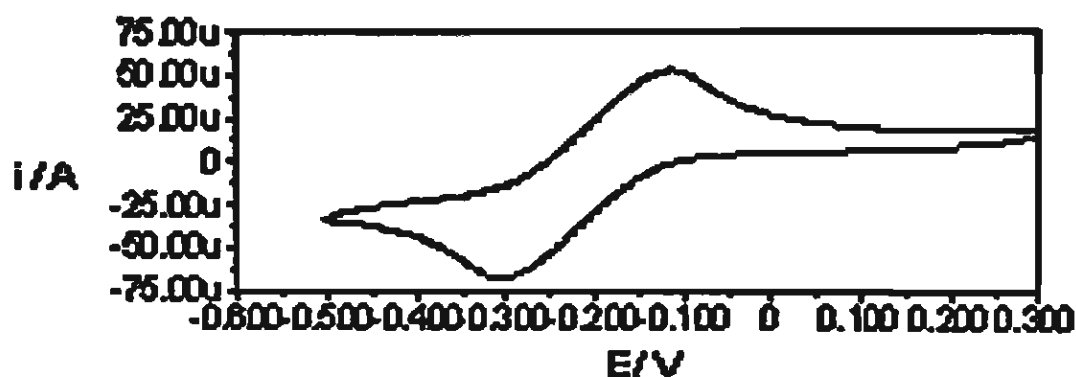
ใช้เทคนิคคูลอมป์เมตรีในการพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.7 V ในสารละลาย 50 Units/mL GOD และ 0.1 M ไพโรล โดยมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ทำการควบคุมปริมาณไฟฟ้าที่ให้ จะเกิดปฏิกิริยาการพอลิเมอร์ไรเซชันดังแสดงในรูปที่ 26 ซึ่งเมื่อเวลาที่ใช้ในการพอลิเมอร์ไรเซชันมากขึ้น ปริมาณกระแสไฟฟ้าก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย



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

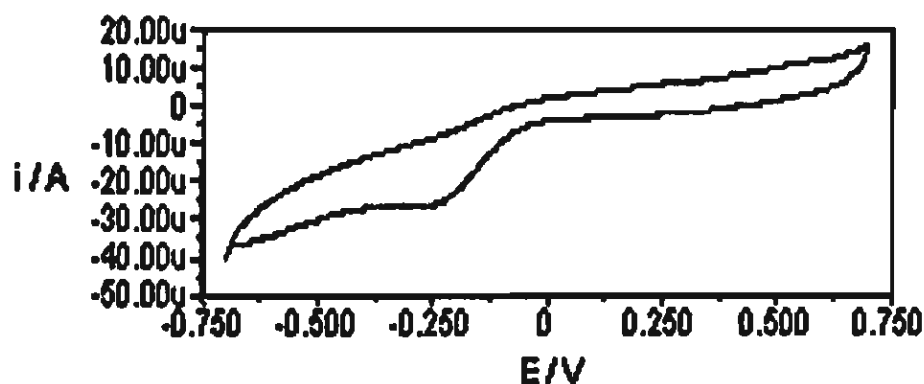


รูปที่ 27 แสดงโวลแทมโมแกรมของ 5 mM สารละลาย $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ โดยเทคนิคทางไซคลิก โวลแทมเมตรีโดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก 0.3 ถึง -0.5 V

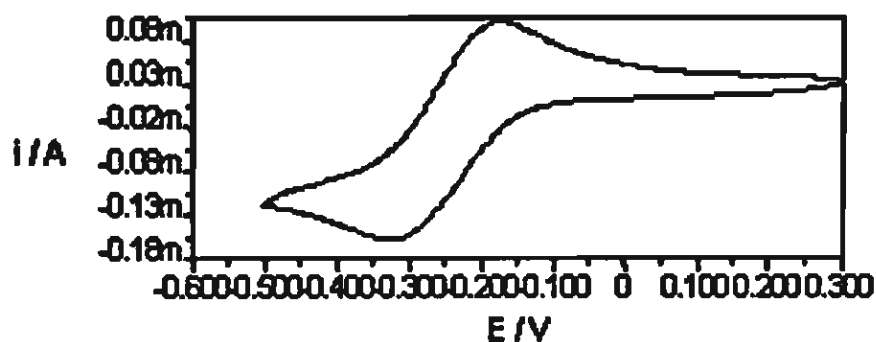
การตรวจสอบอิเล็กโทรด ก่อนและหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

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

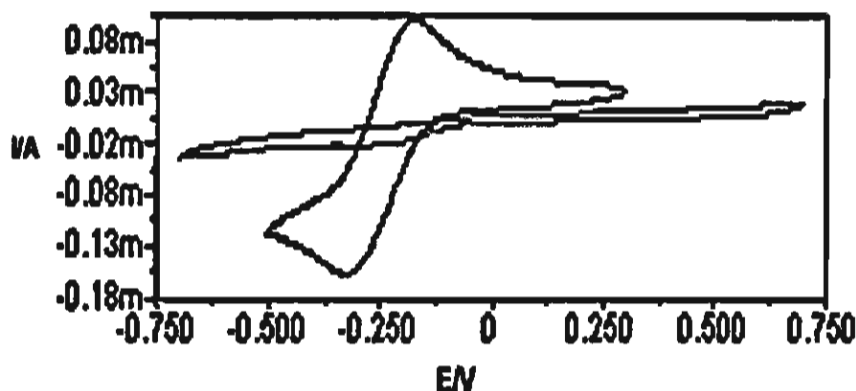


รูปที่ 28 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน สารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



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

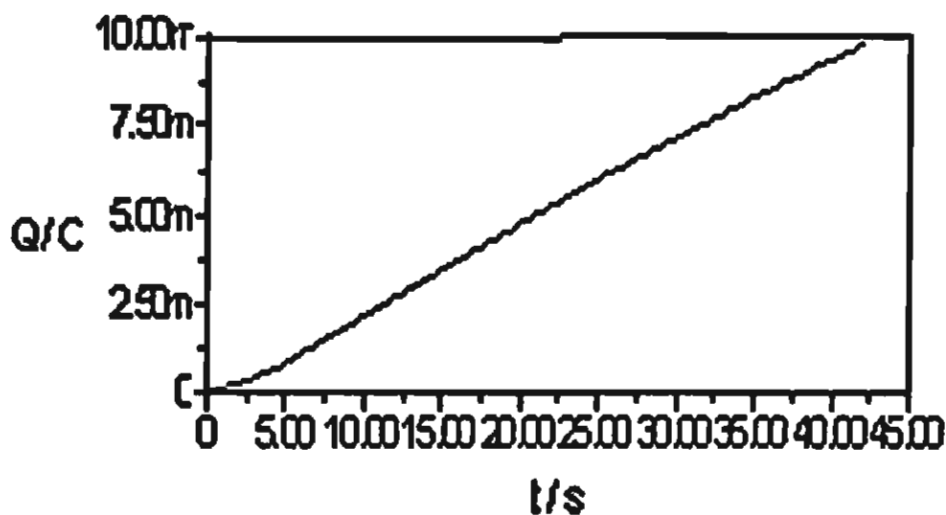
เมื่อนำไซคลิก โวลแทมโมแกรม ของรูปที่ 28 และ 29 มาเปรียบเทียบจะได้ โวลแทมโมแกรม ดังแสดงในรูปที่ 30 จะเห็นได้ว่าโวลแทมโมแกรมที่ได้ก่อน และหลัง ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ บนอิเล็กโทรด มีความแตกต่าง โวลแทมโมแกรมหลัง ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ แสดงฟีก ของ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$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

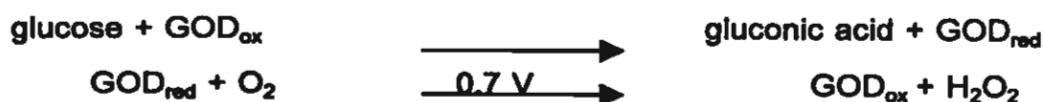
นอกจากนี้ขั้นตอนใน การตรึงกลูโคสออกซิเดส ผู้ทำการวิจัยได้ทดลองทำการจุ่มอิเล็กโทรดที่ตรึง $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ แล้ว ในสารละลายกลูโคสออกซิเดสก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน เพื่อต้องการให้มีการตรึง GOD อยู่ในอิเล็กโทรดปริมาณมาก แต่เมื่อนำไปใช้ตรวจวัดสำหรับหาปริมาณกลูโคส ไม่สามารถวัดสารละลายกลูโคสมาตรฐานได้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

การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

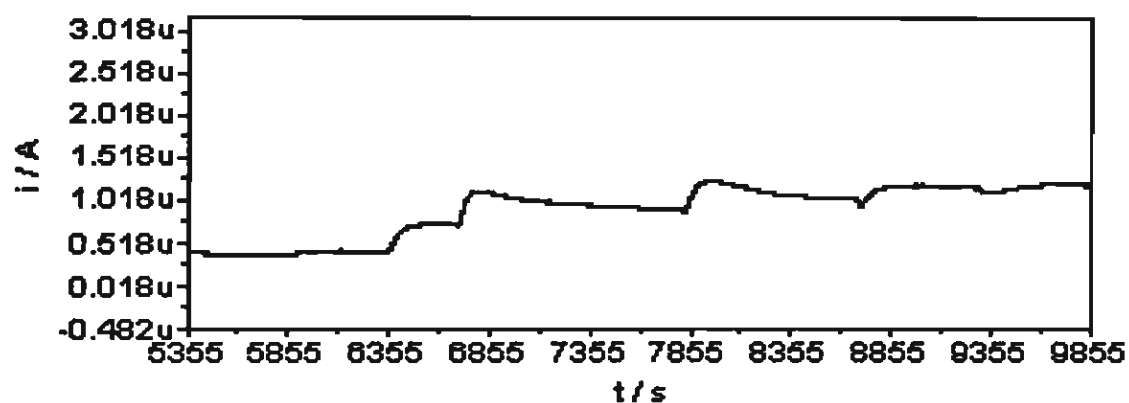
ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

เมื่อนำอิเล็กโทรดที่ได้ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไฟโรลและตรึง GOD แล้ว มาตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 V โดยมีออกซิเจนซึ่งอิ่มตัวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน

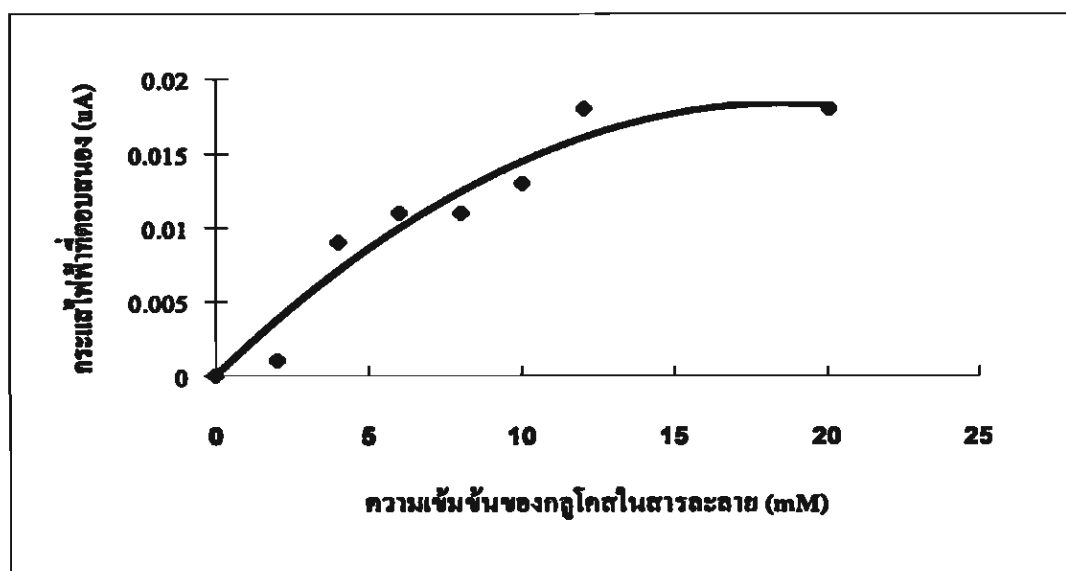
กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วทำงาน คือ



สามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสได้ดังรูปที่ 32



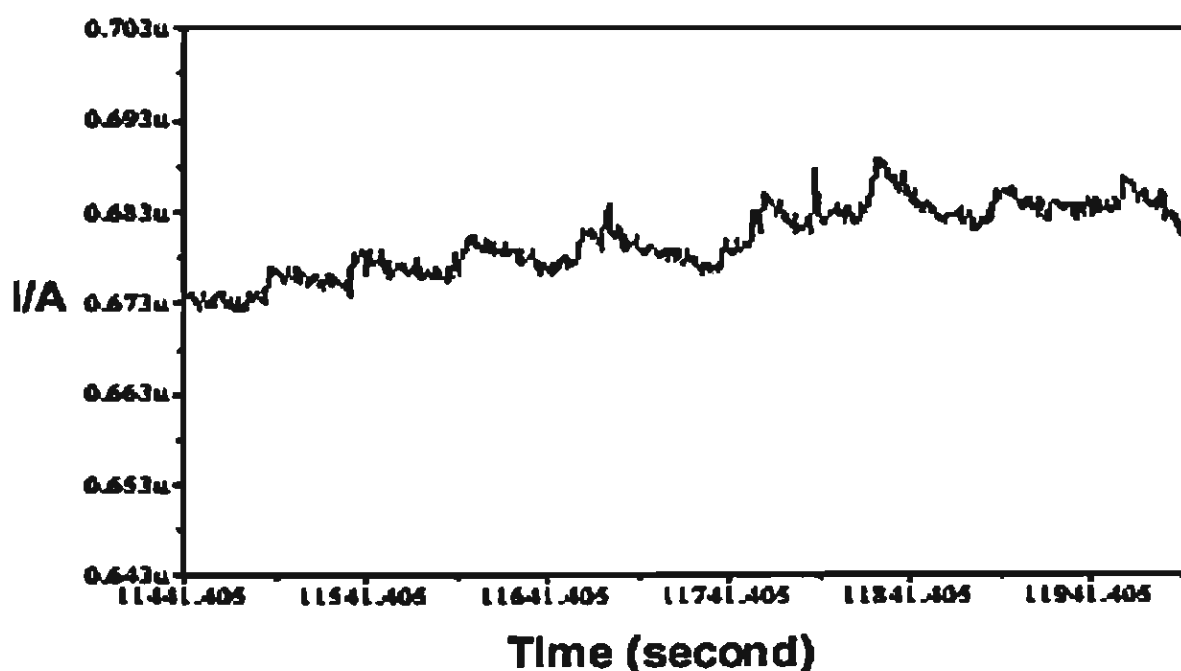
รูปที่ 32 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V



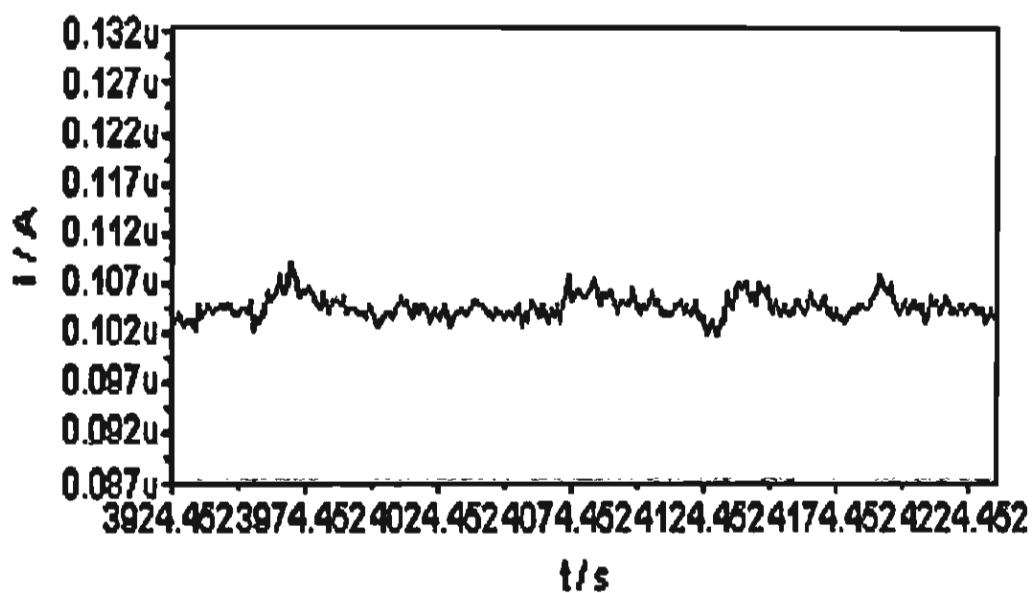
รูปที่ 33 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนอง ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4, 0.2 , 0.0 V

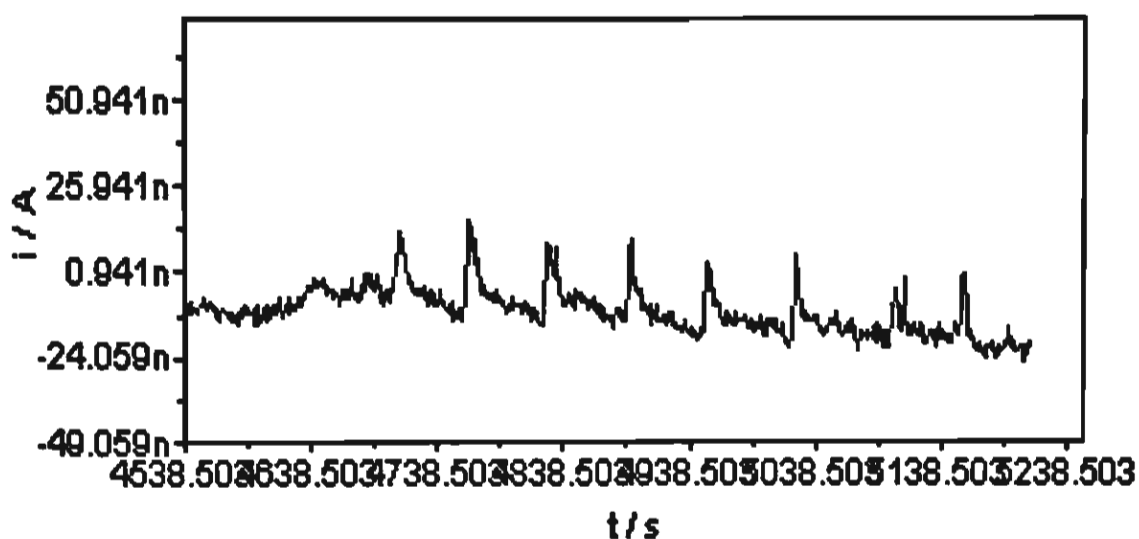
การพัฒนาไกลโคส ไบโอเซนเซอร์ ในงานวิจัยนี้ต้องการปรับปรุงเพื่อให้สามารถวัดปริมาณไกลโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า 0.7 V ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงตัวรบกวน และสามารถวัดค่าได้ถูกต้อง โดยใช้ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ดังรูปที่ 34, 35 และ 36 แสดงให้เห็นว่าที่ศักย์ไฟฟ้า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



รูปที่ 34 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลไกลโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V



รูปที่ 35 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.2 V



รูปที่ 36 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.0 V