



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลื่อนบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่
สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีในอาหาร

โดย รศ. ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย และคณะ

25 พฤษภาคม 2563

สัญญาเลขที่ RSA6080062

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเตรียมโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลื่อนบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่
สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีในอาหาร

ผู้วิจัย

สังกัด

1. รศ. ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย
2. ผศ.ดร. เสนอ ชัยรัมย์
3. ผศ. ดร. ปุริม จารุจรัส

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง (เมธีวิจัย สกว.) ทำให้ได้มีโอกาสได้สร้างงานวิจัยชิ้นนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ รศ. ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา และ Prof. Dr. Peter Lieberzeit นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัยเพื่อนำผลงานไปตีพิมพ์ ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ได้ช่วยเสนอความคิดและร่วมวิจัยในส่วนของการพัฒนาเซนเซอร์ทางไฟฟ้าด้วยวัสดุนาโน ขอขอบคุณนักศึกษาที่อยู่ในคณะวิจัยทุกคนที่ได้ทำงานอย่างเต็มที่ ทำให้งานวิจัยและการนำเสนอผลงานในระดับต่าง ๆ ประสบความสำเร็จด้วยดี

Abstract

Project Code: RSA6080062

Project Title: Novel composites of molecularly imprinted polymers (MIP)-coated nanoparticles for electrochemical sensing in food analysis

Investigator: Maliwan Amatatongchai Ubon ratchathani University
Sanoe Chairam Ubon ratchathani University
Purim Jarujamrus Ubon ratchathani University

E-mail address : maliwan.a@ubu.ac.th, amaliwan@gmail.com

Project period : 3 years (30 May 2017 - 29 May 2020)

This work consists of three approaches to create novel molecularly-imprinted amperometric sensors coupled in a flow-injection analysis (FIA) for pesticides determination in food. In the first part, a new approach for selective determination of carbofuran (CBF) in vegetables, based on a carbon-paste electrode decorated with carbon nanotubes and gold-coated magnetite (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) coated with a molecularly-imprinted polymer (MIP) was carried out. The MIP was synthesized on the electrode surface by electropolymerization using a supramolecular complex, namely 4-ter-butylcalix [8] arene-CBF (4TB[8]A-CBF), as the template and o-phenylenediamine as functional monomer. Secondly, a new and facile method for selective measurement of profenofos (PFF) using a three dimension molecularly-imprinted-polymer-coated carbon nanotube (3D-CNTs@MIP) amperometric sensor was proposed. The 3D-CNTs@MIP was synthesized by successively coating the surface of carboxylated CNTs with SiO₂ and vinyl end groups, then terminating with MIP shells to obtain 3D-CNTs@MIP. The 3D-CNTs@MIP was coated on a glassy carbon electrode (GCE) surface and the imprinting template was removed by solvent extraction. Finally, a novel sensitive and selective amperometric CBF sensor using an amino-containing molecularly imprinted polymer coated on magnetite-gold core (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂) was constructed. The Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ was synthesized by successively self-assembly of organic thiols, 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), on magnetite-gold (Fe₃O₄@Au) core surfaces then coupling with MIP-NH₂ shells. The developed imprinted pesticide sensors were successfully applied in vegetables and fruits.

Keywords : molecularly imprinted polymer (MIP), nano materials, gold-coat magnetite (Fe₃O₄@Au), amperometric sensor, organophosphate, carbofuran

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA6080062

ชื่อโครงการ: การเตรียมโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลื่อนบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่สำหรับ
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีในอาหาร

ชื่อนักวิจัย:	มะลิวรรณ อมตวงไชย	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
	เสนอ ชัยรัมย์	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
	ปรีม จารจำรัส	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

E-mail Address: maliwan.a@ubu.ac.th, amaliwan@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (30 พ.ค. 2560 - 29 พ.ค. 2563)

งานวิจัยนี้ประกอบด้วย 3 วิธีในการสร้างแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่ สำหรับตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในอาหารด้วยเทคนิคโพลีเมอร์เจตชันอะนาไลซิส วิธีแรกจะพัฒนาคาร์บอนไฟเบอร์เรซินซอร์โดยอาศัยการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคแมกนีไทต์-ทองนาโน บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพเลส (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลจะถูกสังเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันผ่านสารประกอบเชิงซ้อนซูปราโมเลกุลกับคาร์บอนไฟเบอร์ หรือ 4TB[8]A-CBF และออร์โทฟีแนลีนไดเอมีนเป็นฟังก์ชันโมโนเมอร์ วิธีที่สองสร้างโพรพีนอซอสแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์โดยสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวป์แบบ 3 มิติ (3D-CNTs@MIP) วิธีนี้จะสังเคราะห์โดยนำคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกมาเคลือบด้วยซิลิกอนไดออกไซด์ ตามด้วยการสร้างหมู่ไวนิลปิด และหุ้มด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล จากนั้นนำวัสดุที่สังเคราะห์ได้ไปเคลือบบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนและกำจัดโมเลกุลแม่แบบออกเพื่อให้เกิดรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีที่ 3 ในการสร้างแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่ จะอาศัยการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลของคาร์บอนไฟเบอร์เคลือบบนแกนของอนุภาคนาโนชนิดแมกนีไทต์-ทองนาโนโดยใช้โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่เอมีน (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂) จากนั้นอาศัยคุณสมบัติของ self-assembly ของอนุภาคแมกนีไทต์-ทองนาโนกับสารจำพวกออร์แกโนซัลโฟน เช่น 11- mercaptoundecanoic acid (MUA) เพื่อสร้างพันธะและนำ MIP-NH₂ มาเกาะติดเป็นเปลือกหุ้มแกนกลางที่เป็นอนุภาคแมกนีไทต์-ทองนาโน แอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทั้ง 3 วิธีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงในผักและผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก : โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล, วัสดุนาโน, อนุภาคแมกนีไทต์-ทอง (Fe₃O₄@Au), แอมเฟอร์โรเมทริกเซนเซอร์, ออร์กาโนฟอสเฟต, คาร์โบไพวแรน

1. บทนำ

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะพัฒนาเซนเซอร์ชนิดใหม่ โดยอาศัยการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ ควบคู่ไปกับการพัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในตัวอย่างอาหาร ซึ่งเทคนิคในการตรวจวัดปริมาณสารทั่วไป เช่น เทคนิคด้านสเปกโทรสโกปี หรือเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีจากการวัดด้วยขั้วไฟฟ้าแบบดั้งเดิม ยังมีข้อจำกัดของการตรวจวัด ในเรื่องสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในตัวอย่างอาหาร เนื่องจากในตัวอย่างอาหารมีองค์ประกอบต่างๆ จำนวนมากและมีสารที่วิเคราะห์ในปริมาณน้อย ทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องเลือกวัสดุที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และต้องมีความสามารถในการเพิ่มสภาพไวในการวิเคราะห์ และนำโพลิเมอร์ดังกล่าวมาเคลือบบนแกนของอนุภาคนาโน (core-shell nanoparticles) เพื่อเพิ่มสภาพไวในการวิเคราะห์ให้กับเซนเซอร์ เนื่องจากอนุภาคนาโนจะมีคุณสมบัติที่ดีในการนำส่งอิเล็กตรอน การนำไฟฟ้าและการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมี (electrocatalytic activity) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำองค์ความรู้ในการสังเคราะห์ MIP บน core-shell nanomaterials มาพัฒนาเป็นขั้วไฟฟ้าสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดแมลงพวกออร์แกโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมต โดยจะสังเคราะห์อนุภาคนาโนชนิดใหม่ของ pesticides-molecularly imprinted polymers-coated nanoparticles โดยอาศัย core-shell imprinted composites ที่มีวัสดุขนาดนาโนชนิด $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ หรือ carbon nanotubes (CNTs) มาเป็นแกน (core) และสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของสารกำจัดแมลงลงบนวัสดุขนาดนาโน จากนั้นนำอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มาประยุกต์ใช้ในการสร้างเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมีชนิดใหม่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดแมลงชนิดออร์แกโนฟอสเฟตหรือ คาร์บาเมตในตัวอย่างอาหาร เช่น สารสกัดจากพืช ผักและผลไม้

ในการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ จะแบ่งออกเป็น 3 วิธีดังนี้

1. Electropolymerization of supra MIP หรือการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่โดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันกับซูพราโมเลกุล โดยการสร้างขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเพลส นำมาเคลือบด้วยวัสดุนาโนของสารแม่เหล็กแมกนีไทต์-ทอง ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$) จากนั้นนำไปอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันโดยใช้ o-phenylenediamine เป็นฟังก์ชันโมโนเมอร์ ใช้ซูพราโมเลกุลชนิด 4TB[8]A และใช้คาร์โบฟิวแรนเป็นโมเลกุลแม่แบบ

2. Silica based core-shell MIP วิธีนี้จะสังเคราะห์ด้วยเทคนิคโซล-เจล โดยนำคาร์บอนนาโนทิวป์ (CNTs) มาเคลือบด้วยซิลิกอนไดออกไซด์เช่น tetraethyl orthosilicate จะได้ (CNTs@SiO₂) จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับ vinylmethoxysilane เพื่อทำให้ปลายของอนุภาคมีหมู่ vinyl จะได้ (CNTs@SiO₂-Vinyl) และสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลโดยใช้เมทาคริลิกแอซิด (MA) เป็นโมโนเมอร์ ใช้เอธาไลน์ไกลคอลไดเมทาคริลเลท (EGDMA) เป็นตัวครอสลิงค์ และใช้ 2,2'-azoisobutyronitrile (AIBN) เป็นอินิชิเอเตอร์ จะได้ (CNTs@SiO₂-Vinyl-MIP)

3. Direct blending หรือการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่โดยการสร้างแกนโพลิเมอร์ที่มี selective molecular binding site และสังเคราะห์เปลือกโพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่เอมีโน (MIP-NH₂) จากนั้นอาศัยคุณสมบัติของ self-assembly ของอนุภาคนาโน Fe₃O₄@Au กับสารจำพวกออร์แกโนไธออล เช่น 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) สร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่าง Au-S จากนั้นนำ MIP-NH₂ มาเกาะติดที่อนุภาคนาโน Fe₃O₄@Au โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ MIP-NH₂

ในส่วนของการพัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในตัวอย่างอาหาร จะนำโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้มาพัฒนาขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเฟลสและกลาสซีคาร์บอน เพื่อพัฒนาเป็นตัวตรวจวัดแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหล (Flow injection analysis; FIA) สำหรับตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงที่ง่าย สะดวก มีความจำเพาะเจาะจง และสภาพไวสูง อุปกรณ์ตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตริกบนเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดแมลงในตัวอย่างอาหาร เช่น สารสกัดจากผัก และผลไม้ ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพดี

2. วัตถุประสงค์

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีในการเตรียมโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ ควบคู่ไปกับการพัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีในตัวอย่างอาหาร เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากใช้โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนเป็นวัสดุในการจดจำสาร เมื่อนำมาใช้วิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมตริกในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหลจึงทำให้การวิเคราะห์มีความสะดวก รวดเร็วและเป็นแบบอัตโนมัติ

วัตถุประสงค์ย่อยของการวิจัยสามารถแบ่งเป็นข้อๆได้ดังนี้

1. สังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ที่เตรียมขึ้น

2. ออกแบบและสร้างแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะเจาะจง สภาพไว และมีความเที่ยงสูง สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงในตัวอย่างอาหาร โดยใช้โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ที่เตรียมขึ้น

3. ตรวจสอบและพัฒนาเซนเซอร์ ให้มีความจำเพาะเจาะจง สภาพไวและความเที่ยงสูง สำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดแมลง เช่น สารในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต หรือ คาร์บาริเมต ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีโดยใช้โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่มาดัดแปรเพื่อสร้างขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเฟลส หรือขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนชนิดใหม่

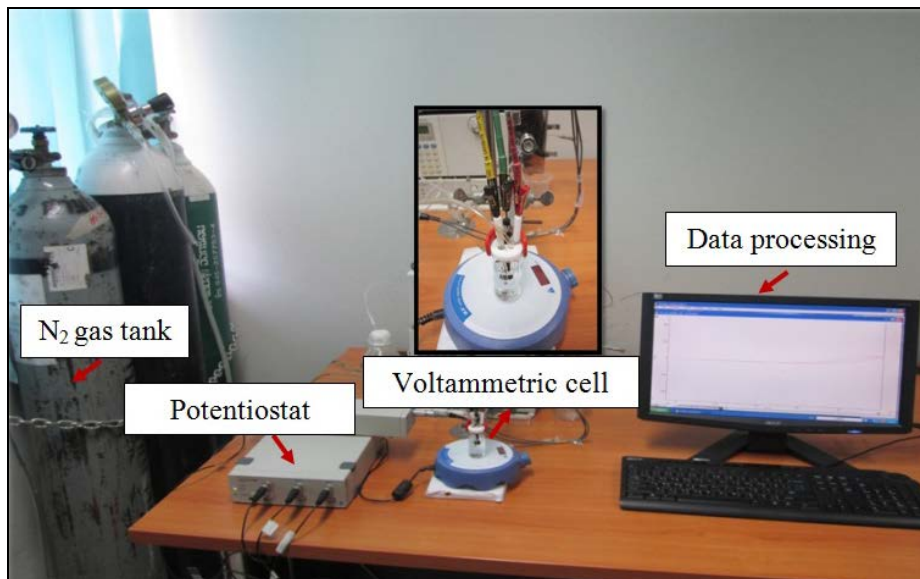
4. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ต่อการวัดสัญญาณของสารกำจัดแมลงด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีในระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่อาศัยการไหล เช่น องค์ประกอบของขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสม ช่วงตรวจวัดของสารกำจัดแมลง (dynamic range) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ตัวรบกวน (interferences) และทำการสอบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (method validation) โดยทดสอบกับตัวอย่างจริง เช่น สารสกัดจากผัก หรือผลไม้ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประเมินประสิทธิภาพของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3. วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วนด้วยกันคือ ส่วนแรกการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ โดยลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ที่เตรียมขึ้นได้ จะตรวจสอบและยืนยันด้วยเทคนิค Scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), UV-VIS spectroscopy และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ส่วนที่สองการสร้างเซนเซอร์ด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ และนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตริกในระบบโพลีอินเจคชันอะนาลิซิส จะตรวจสอบคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry) และแอมเพอร์โรเมตรี (amperometry)

Cyclic voltammetry

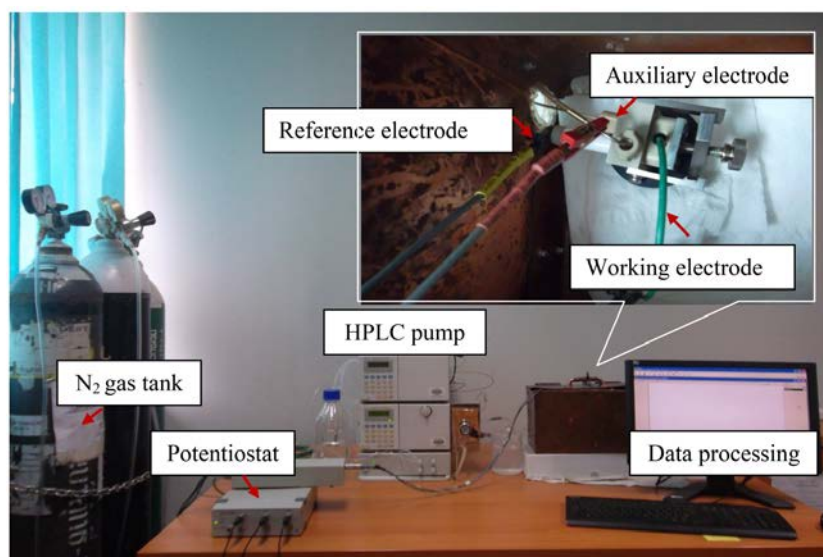
การทดลองไซคลิกโวลแทมแสดงดังรูปที่ 1 โดยใช้เครื่องโพเทนชิโอสเตท (e-DAQ) เซลล์โวลแทมเมตรี (ขวด 25 mL) ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode; WE) เช่น ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GCE) ธรรมดา หรือ ขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเฟลส (CPE) หรือขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode; RE) ใช้ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl และ ขั้วไฟฟ้าช่วย (auxiliary electrode; AE) ใช้ ลวด Pt



รูปที่ 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองไซคลิกโวลแทมเมตรี

Amperometry

การตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตรีที่ใช้ร่วมกับเทคนิคโพลีเมอร์เจกชันอะนาไลซิสหรือเอฟไอเอ (รูปที่ 2) โดยใช้เครื่องตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมีของ e-DAQ (โพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210) ที่มี thin layer flow cell ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GCE) ธรรมดา หรือ ขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเฟลส (CPE) หรือขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ ใช้ stainless steel เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ใช้ปั๊ม HPLC (Shimadzu, LC 10A) ในการขับเคลื่อนสารละลาย

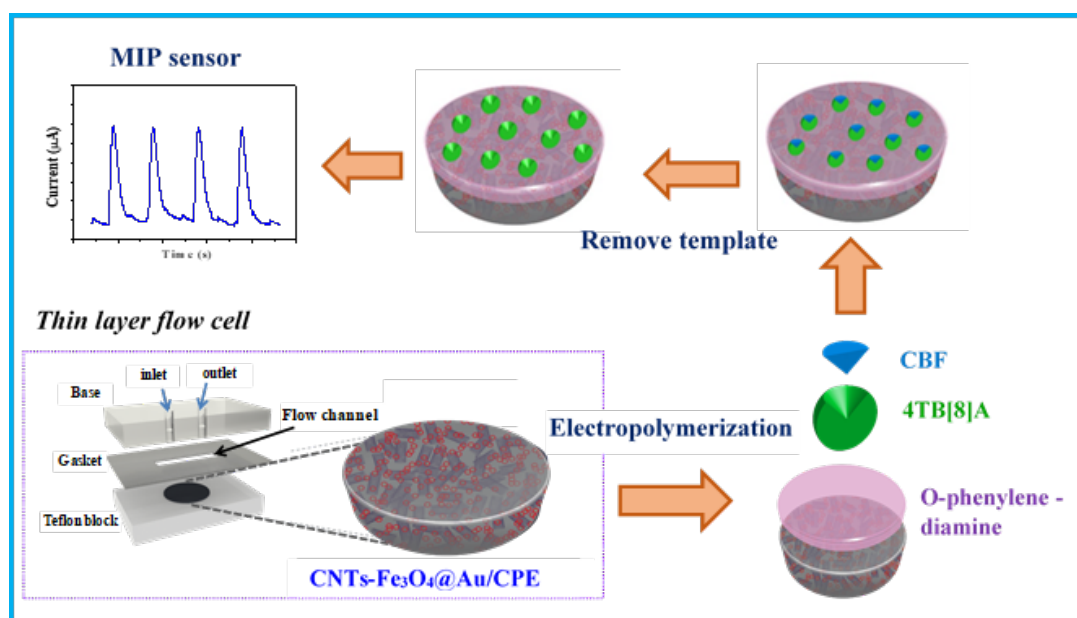


รูปที่ 2 ตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตรีที่ใช้ thin layer flow cell ในระบบเอฟไอเอ

3. ผลการทดลองและบทวิจารณ์

ส่วนที่ 1: การสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันกับซูพราโมเลกุล

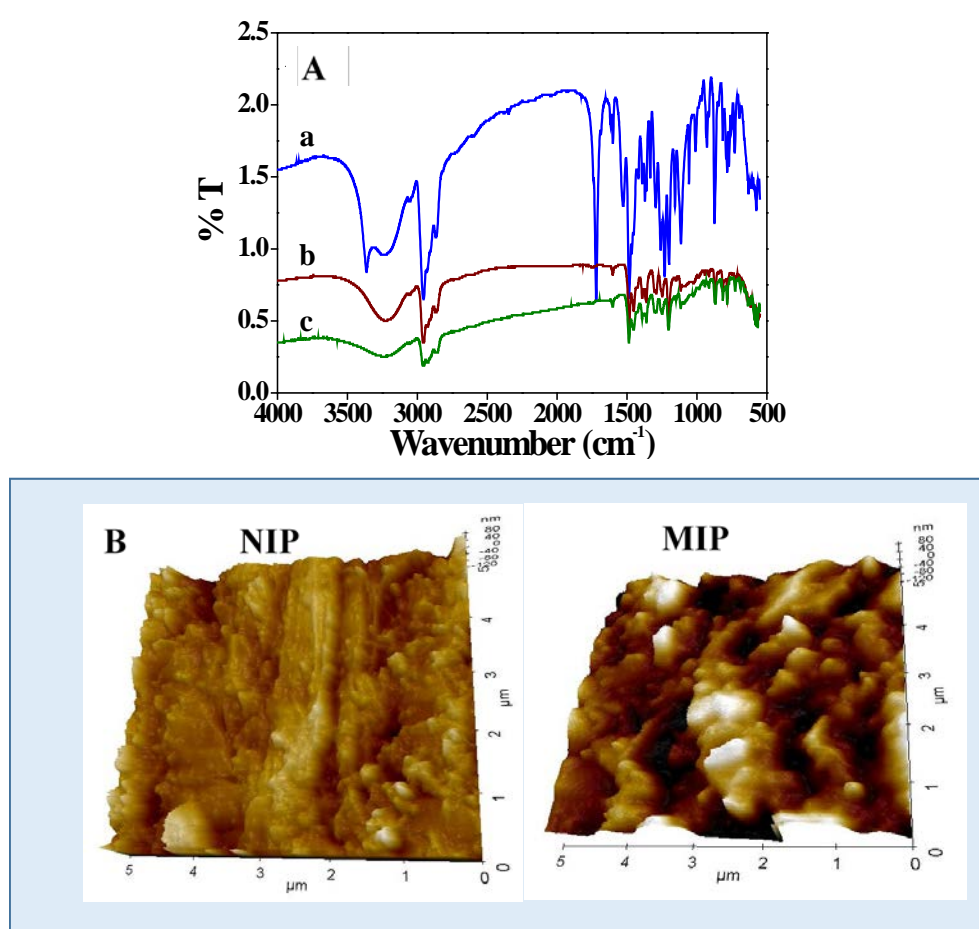
งานวิจัยในส่วนแรกนี้ได้พัฒนาแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่โดยใช้โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันกับซูพราโมเลกุล (Electropolymerization of supra MIP) พัฒนาเซนเซอร์โดยการสร้างขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนเพลสจากนั้นนำมาเคลือบด้วยวัสดุนาโนของสารแม่เหล็กแมกนีไทต์-ทอง ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) นำขั้วไฟฟ้าที่ได้ไปอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันโดยใช้ o-phenylenediamine เป็นฟังก์ชันโมโนเมอร์ ใช้ซูพราโมเลกุลชนิด 4TB[8]A และใช้คาร์โบไพแรน (CBP) เป็นเทมเพลต การสร้างเซนเซอร์แสดงดังแผนภาพในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การสร้าง MIP sensor โดยการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลือบบนขั้วไฟฟ้า CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันกับซูพราโมเลกุล จากนั้นนำขั้วไฟฟ้า MIP sensor ที่เตรียมได้ไปใช้เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานใน thin layer flow cell เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตริกในระบบเอฟไอเอ

โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลที่เคลือบบนขั้วไฟฟ้า CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันกับซูพราโมเลกุล 4TB[8]A ที่สังเคราะห์โดยใช้ o-phenylenediamine เป็นฟังก์ชันโมโนเมอร์ ใช้ซูพราโมเลกุลชนิด 4TB[8]A และใช้คาร์โบไพแรนเป็นเทมเพลตได้ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างด้วยเทคนิค atomic

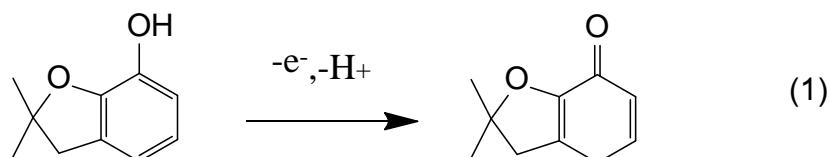
force microscopy (AFM) และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ผลการทดลองแสดง ดังรูปที่ 4 รูป (A) FTIR spectrum ของMIP films ก่อนการล้าง template (a) หลังจากการล้าง template (b) และ NIP (non-imprinted polymer) films ภาพ (B) แสดง AFM images ของ NIP และ MIP films ที่สังเคราะห์บน CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE ผลจากการวิเคราะห์ด้วย FTIR (รูป 4A) แสดงถึงความสำเร็จในการสังเคราะห์ MIP และการกำจัดโมเลกุลแม่แบบ ออกจากโครงสร้างของ MIP ผลของ AFM ในรูปที่ 4B ทำให้เห็นลักษณะทางกายภาพของที่แตกต่างกันระหว่าง NIP และMIP โดย MIP จะปรากฏช่องว่าง (cavities) บนพื้นผิว ในขณะที่ NIP ไม่เห็นช่องว่างบนพื้นผิว ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ MIP ได้



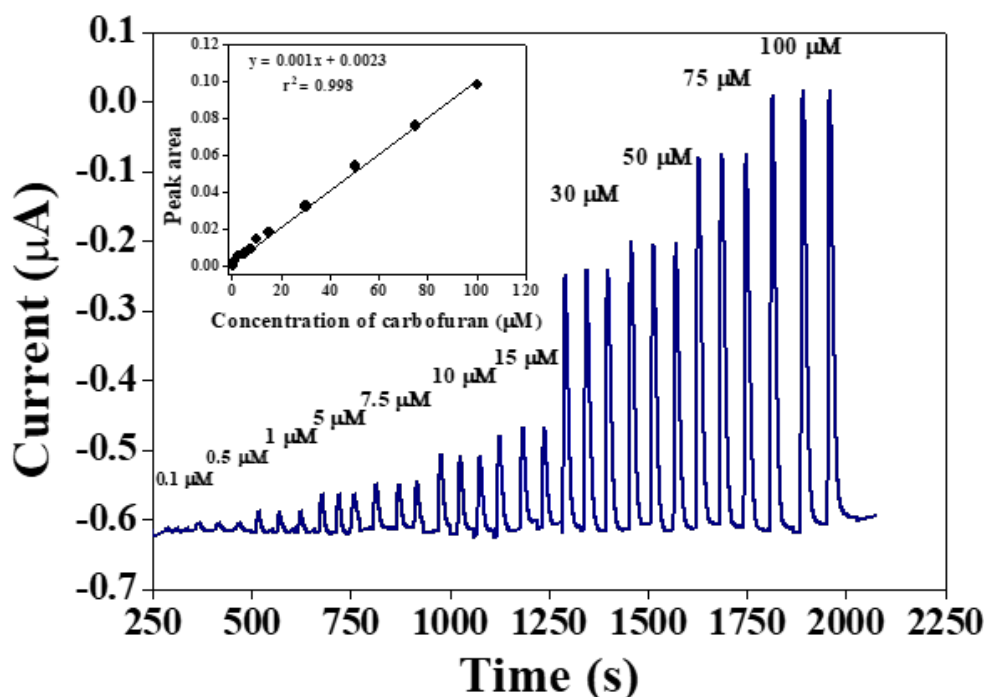
รูปที่ 4 (A) FTIR spectrum ของMIP films ก่อนการล้าง template (a) หลังจากการล้าง template (b) และ NIP films ภาพ (B) แสดง AFM images ของ NIP และ MIP films ที่สังเคราะห์บน CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE

ได้คาร์โบฟิวแรนเซนเซอร์ชนิดใหม่ (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูงที่อาศัยการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอพไอเอ เมื่อ

นำคาร์โบฟีวแรนเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของคาร์โบฟีวแรนพบว่าคาร์โบฟีวแรนเกิดออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้า +0.60 โวลต์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นไปดังสมการที่ 1



เมื่อนำคาร์โบฟีวแรนเซนเซอร์มาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอฟไอเอ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 8.0) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +0.50 โวลต์ พบว่าได้กราฟเส้นตรง (รูปที่ 5) ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.998$) และมีขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD; $3S_b$) ที่ 3.8 นาโนโมลาร์ และขีดจำกัดในการตรวจวัดปริมาณ (LOQ; $10S_b$) 12.7 นาโนโมลาร์

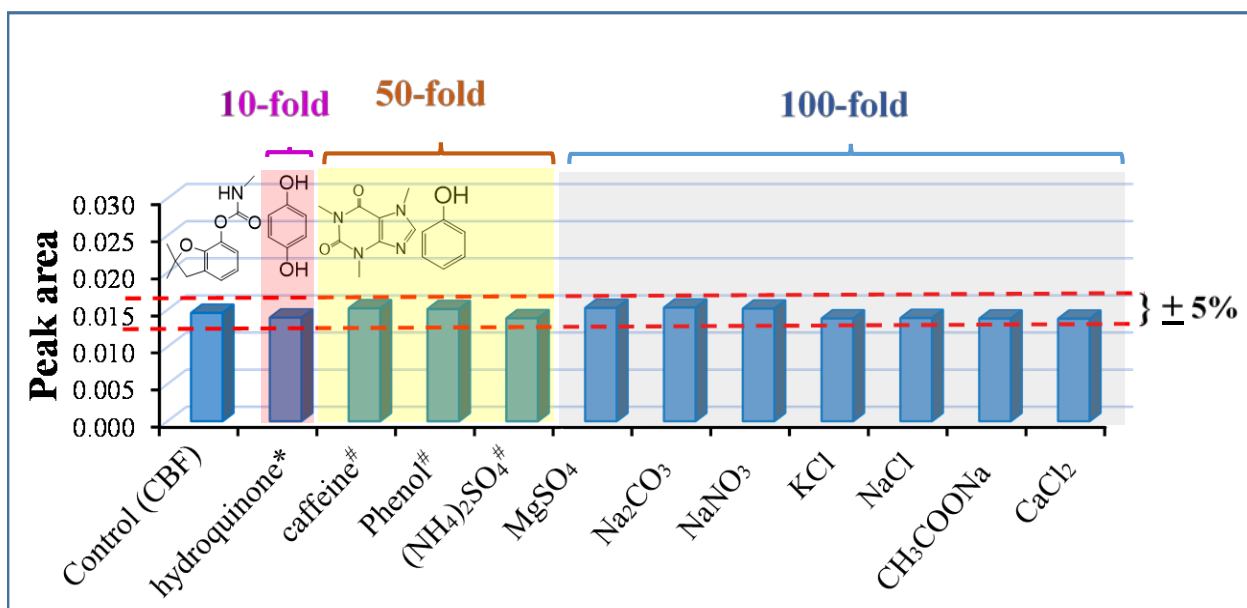


รูปที่ 5 สัญญาณและกราฟมาตรฐานของคาร์โบฟีวแรนเซนเซอร์ชนิดใหม่ (MIP-CNTs- Fe_3O_4 @Au/CPE) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอฟไอเอ

การศึกษาผลของตัวรบกวนและการประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริง

ในการศึกษาผลของตัวรบกวนที่มีผลต่อระบบการวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า MIP-CNTs- Fe_3O_4 @Au/CPE ที่พัฒนาขึ้น ตัวรบกวนที่ทำการศึกษาได้แก่ caffeine,

phenol, hydroquinone, สารอนินทรีย์ เช่น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , Na_2CO_3 , NaNO_3 , KCl , NaCl , CH_3COONa , และ CaCl_2 เมื่อนำผลการทดลองของเอพีไอแอมแกรมที่ได้จากการทดลองตรวจวัดสารละลายผสมที่เติมตัวรบกวนที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาเปรียบเทียบกับสัญญาณกระแสที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟิวแรนที่ไม่มีตัวรบกวน ถ้าสัญญาณกระแสที่ตรวจวัดได้มีความแตกต่างกัน $\pm 5\%$ แสดงว่ามีการรบกวนของสารตัวรบกวนที่เติมลงไปต่อระบบการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงผลการศึกษาผลของตัวรบกวน เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานคาร์โบฟิวแรนความเข้มข้น 10 μM

จากรูปที่ 6 พบว่าตัวรบกวนที่ทำการศึกษาทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ MgSO_4 , Na_2CO_3 , NaNO_3 , KCl , NaCl , CH_3COONa และ CaCl_2 ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบวิเคราะห์คาร์โบฟิวแรนที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นสูงถึง 1,000 μM (100-fold) ส่วน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, phenol และ caffeine ไม่รบกวนต่อระบบวิเคราะห์คาร์โบฟิวแรนที่ความเข้มข้นสูงถึง 500 μM (50-fold) และ hydroquinone ไม่รบกวนต่อระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 100 μM (10-fold)

ระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า CNTs- Fe_3O_4 @Au/CPE ที่ได้พัฒนาขึ้น เป็นระบบวิเคราะห์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบฟิวแรนในสารสกัดจากพืช เช่น กะหล่ำปลี คื่นช่าย พริก หัวหอม และสะระแหน่ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์วิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคมาตรฐาน (HPLC) พบว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน โดยค่า % Recovery ที่ได้จากทั้งสองเทคนิค

แตกต่างกันในช่วง 0.2-5.2 % แสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้า CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวัด ค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือ

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไพวเรน (CBF) ในตัวอย่างสารสกัดจากผัก ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE ที่พัฒนาขึ้น และการเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน

Samples	Concentration (μM)			Relative error (%)	Recovery (%)	RSD (%)
	Added	HPLC method [#]	Proposed method [#]			
Cabbage	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
	1.00	1.01	1.03	1.98	102.6	0.6
	5.00	5.30	5.29	-0.18	105.7	1.5
Celery	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
	1.00	0.99	1.03	4.01	107.9	1.8
	5.00	5.19	5.44	4.82	109.0	0.9
Chili	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
	1.00	0.97	1.02	5.15	102.8	3.5
	5.00	5.01	5.10	1.80	104.2	2.6
Onion	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
	1.00	1.06	1.05	-1.51	95.3	4.1
	5.00	5.24	5.08	-3.05	99.7	3.3
Peppermint	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
	1.00	1.01	1.03	1.98	103.7	1.9
	5.00	5.45	5.34	-2.02	104.9	2.7

[#] Each value is the mean average of three measurements.

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE ที่พัฒนาขึ้น

ประสิทธิภาพในการตรวจวัดคาร์โบไพวแรนแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE ที่พัฒนาขึ้นกับระบบตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรด้วยวัสดุนาโนแบบอื่น ๆ แสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณลักษณะในการวิเคราะห์คาร์โบไพวแรน (CBF) ด้วยเซนเซอร์ชนิดต่าง ๆ

Electrode	Linearity range (μM)	LOD (nM)	Techniques	Ref.
CoPc/rGO/GCE	0.20—70	18.9	DPV, Batch	[1]
NiOPc/GO/CPE	5—140	1, 700	Amp, FIA	[2]
GO-AuNPs/SPCE	1—250	220	DPV, Batch	[3]
Hm/GO/CPE	5—95	9	SWV, Batch	[4]
Heated-SPCE	0.4—400	50	DPV, Batch	[5]
MIP/rGO@Au/GCE	0.05—20	20	DPV, Batch	[6]
MIP-CNTs-Fe ₃ O ₄ @Au/CPE	0.1—100	3.8	Amp, FIA	This work

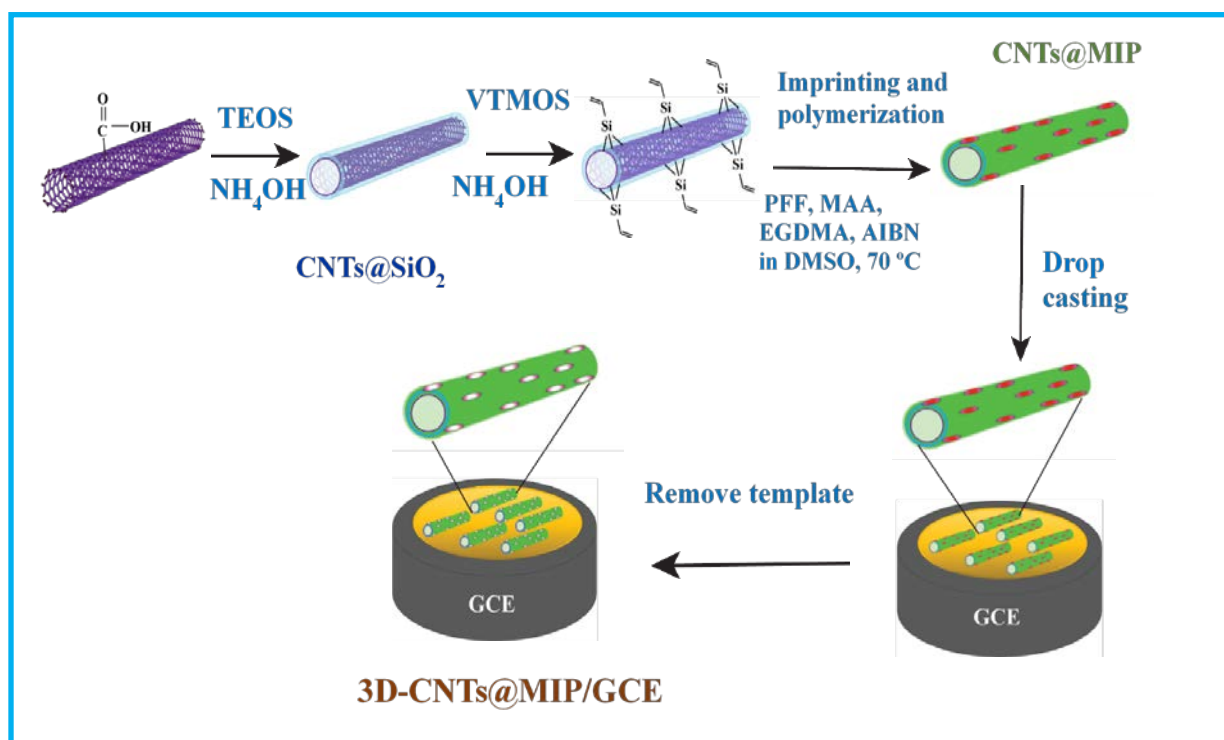
CoPc = cobalt phthalocyanine, rGO = reduce graphene oxide, NiOPc = nickel (II) 1,48,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H, 31H-phthalocyanine, GO = graphene oxide, AuNPs = gold nanoparticles, Hm = hemin, MIP = Molecularly Imprinted Polymer, MB = methylene blue, CNTs = Carbon nanotubes, Pd-Ir = palladium-iridium, GCE = glassy carbon electrode, CPE = Carbon-Paste Electrode, SPCE = Screen-printed Carbon Electrode, DPV = Differential Pulse Voltammetry, Amp = Amperometry, SWV = Square Wave Voltammetry

จากตารางจะเห็นว่าการตรวจวัดคาร์โบไพวแรนแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ MIP เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น ที่สร้างขึ้นสามารถตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาร์โบไพวแรนในช่วงความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นๆ และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ความเข้มข้นที่เทียบเท่าหรือดีกว่างานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสภาวะไวในการตรวจวัด ซึ่ง MIP เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับหรือดีกว่างานวิจัยที่นำมาเปรียบเทียบ ซึ่งอาจเป็นผล

เนื่องมาจากข้อได้เปรียบของ MIP เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีพื้นที่ผิวที่มากทำให้มีความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอน ระหว่าง CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE และผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าสูง แสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้า MIP เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพและการนำอนุภาคนาโน (CNTs-Fe₃O₄@Au) มาสร้างรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพทำให้การวิเคราะห์มีทั้งสภาพไวและความจำเพาะเจาะจง

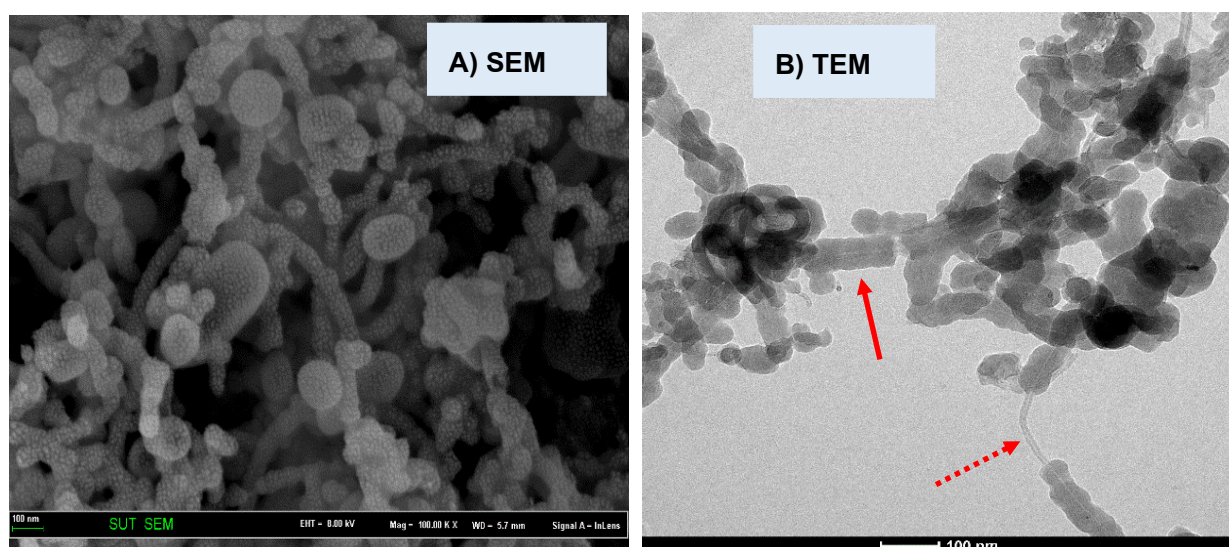
ส่วนที่ 2: การสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวป์แบบ 3 มิติ

การสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวป์แบบ 3 มิติ ใช้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค โซล-เจล โดยจะสังเคราะห์โพลิเมอร์ลงบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวป์แทน (CNTs) กระบวนการสังเคราะห์และการสร้างเซนเซอร์แสดงดังแผนภาพในรูปที่ 7 นำคาร์บอนออกซิดิลคาร์บอนนาโนทิวป์มาเคลือบด้วยซิลิกอนไดออกไซด์ชนิด tetraethoxysilane จะได้ (CNTs@SiO₂) จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับ vinylmethoxysilane (VTMOS) เพื่อให้ปลายของอนุภาคเป็นหมู่ vinyl (CNTs@SiO₂-Vinyl) ซึ่งจะสามารถเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันได้ และสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลโดยใช้โพर्फิโนสเป็นโมเลกุลแม่แบบ เมทาคริลิกแอซิด (MA) เป็นโมโนเมอร์ เอทาลีนไกลคอลไดเมทาคริเลท (EGDMA) เป็นตัวครอสลิงค์ และใช้ 2,2'-azoisobutyronitrile (AIBN) เป็นตัวริเริ่ม จะได้ (3D-CNTs@MIP) ในการสร้างเซนเซอร์จะนำขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนมาเคลือบด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้น (3D-CNTs@MIP/GCE) และล้างแม่แบบออกด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย การสร้างเซนเซอร์แสดงดังแผนภาพในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การสร้าง 3D-CNTs@MIP/GCE โดยการเคลือบ tetraethoxysilane (TEOS) และ vinylmethoxysilane (VTMOS) บนผิวของ CNTs และสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลโดยใช้โพรพิโนฟอสเป็นโมเลกุลแม่แบบ (CNTs@MIP) นำโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลเคลือบบนขั้วไฟฟ้าและล้างแม่แบบออกจะได้ 3D-CNTs@MIP/GCE

โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลที่เคลือบบนขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE ที่สังเคราะห์โดยการนำคาร์บอนซีกติกคาร์บอนนาโนทิวป์มาเคลือบด้วยสารประกอบออร์การโนไฮเซน เพื่อให้ปลายของอนุภาคเป็นหมู่ไวนิล (CNTs@SiO₂-Vinyl) และสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลโดยใช้โพรพิโนฟอสเป็นโมเลกุลแม่แบบ เมทาคริลิกแอซิด (MA) เป็นโมโนเมอร์ เอทาลีนไกลคอลไดเมทาคริลเลท (EGDMA) เป็นตัวเชื่อม ได้ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างด้วย Scanning electron microscopy (SEM) และ transmission electron microscopy (TEM) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 8

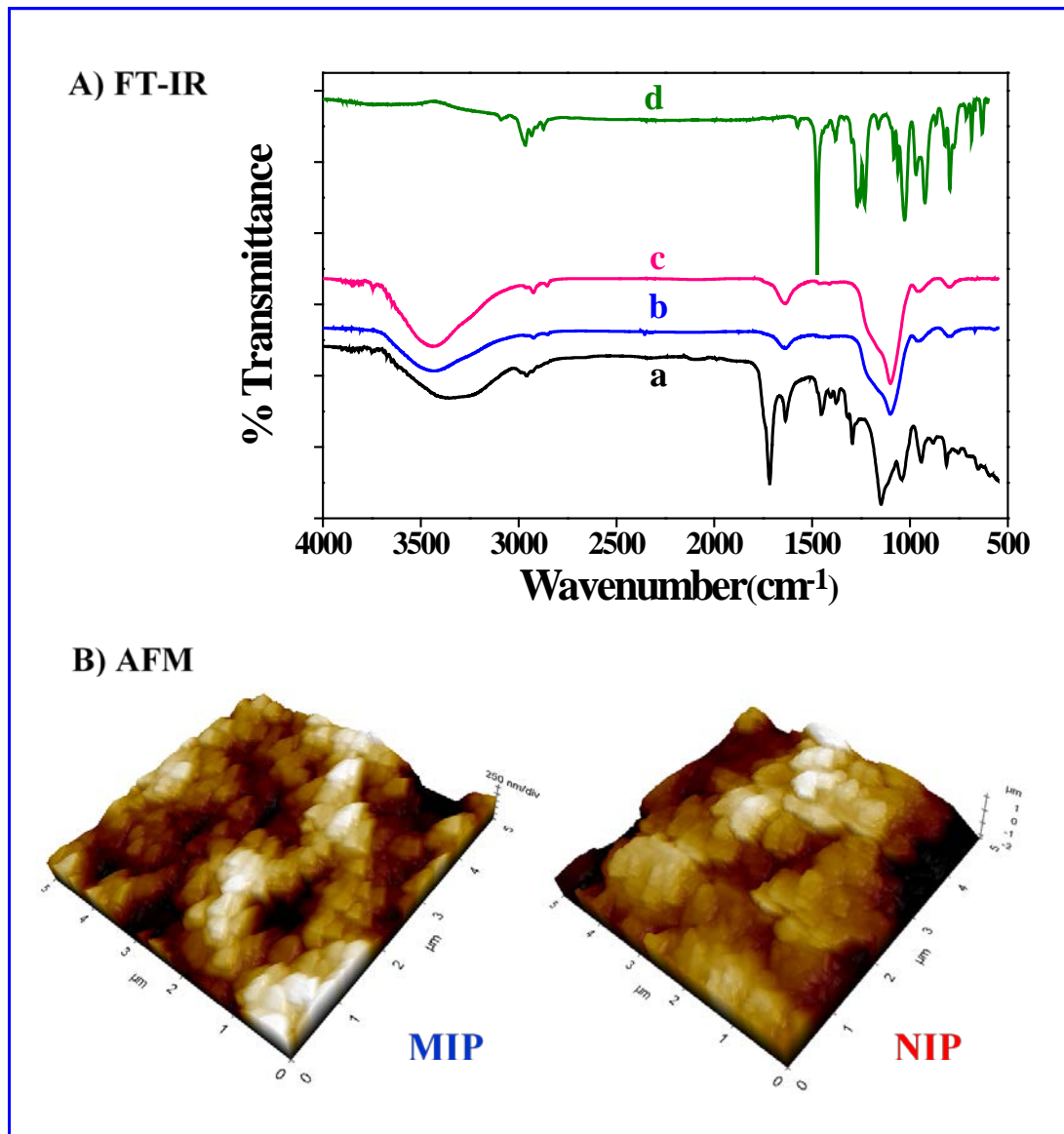


รูปที่ 8 ภาพ (A) SEM และ (B) TEM ของ 3D-CNTs@MIP ที่สังเคราะห์ได้

รูปที่ 8 ภาพ (A) SEM และ (B) TEM ของ 3D-CNTs@MIP ที่สังเคราะห์ได้ ภาพ SEM จากรูป 8A แสดงให้เห็นถึงรูพรุนของวัสดุที่เตรียมได้ซึ่งกระจายตัวอยู่ตามท่อ CNTs ส่วนภาพ 8B รูป TEM จะเห็นว่า ท่อ CNTs ส่วนที่ไม่ถูกเคลือบด้วย MIP จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ ~14.3 นาโนเมตร ขณะที่ส่วนที่มี MIP เคลือบอยู่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ ~78 นาโนเมตร

ผลจากการวิเคราะห์ด้วย FTIR (รูป 9A) แสดงถึงความสำเร็จในการสังเคราะห์ MIP และการกำจัดโมเลกุลแม่แบบ ออกจากโครงสร้างของ MIP ผลของ AFM ในรูปที่ 9B ทำให้

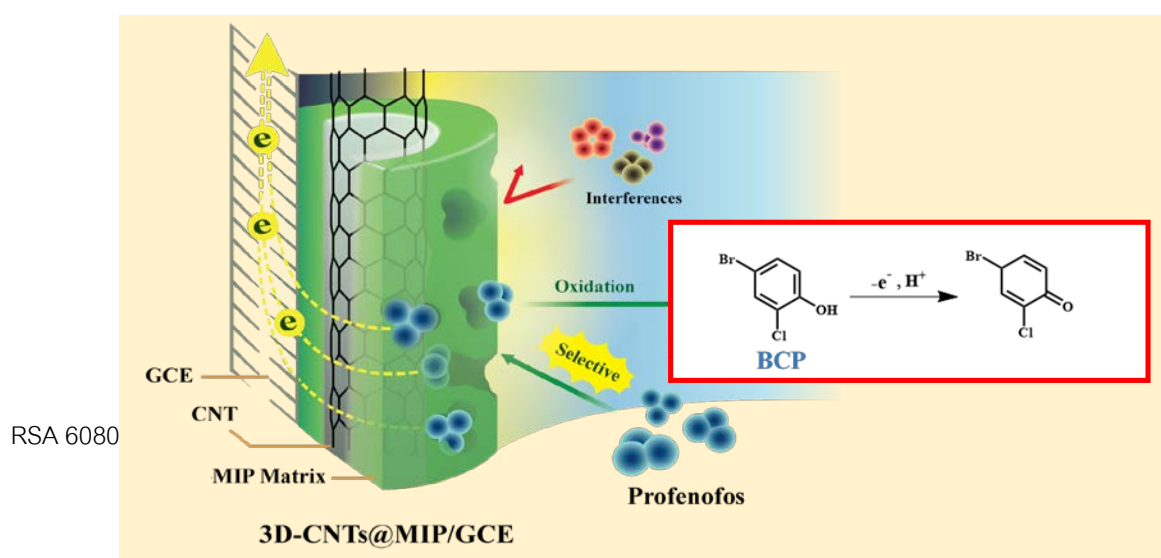
เห็นลักษณะทางกายภาพของที่แตกต่างกันระหว่าง 3D-CNTs@MIP และ 3D-CNTs@NIP โดย MIP จะปรากฏช่องว่าง (cavities) บนพื้นผิว ในขณะที่ NIP ไม่เห็นช่องว่างบนพื้นผิว ผลการ



ทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ MIP ได้

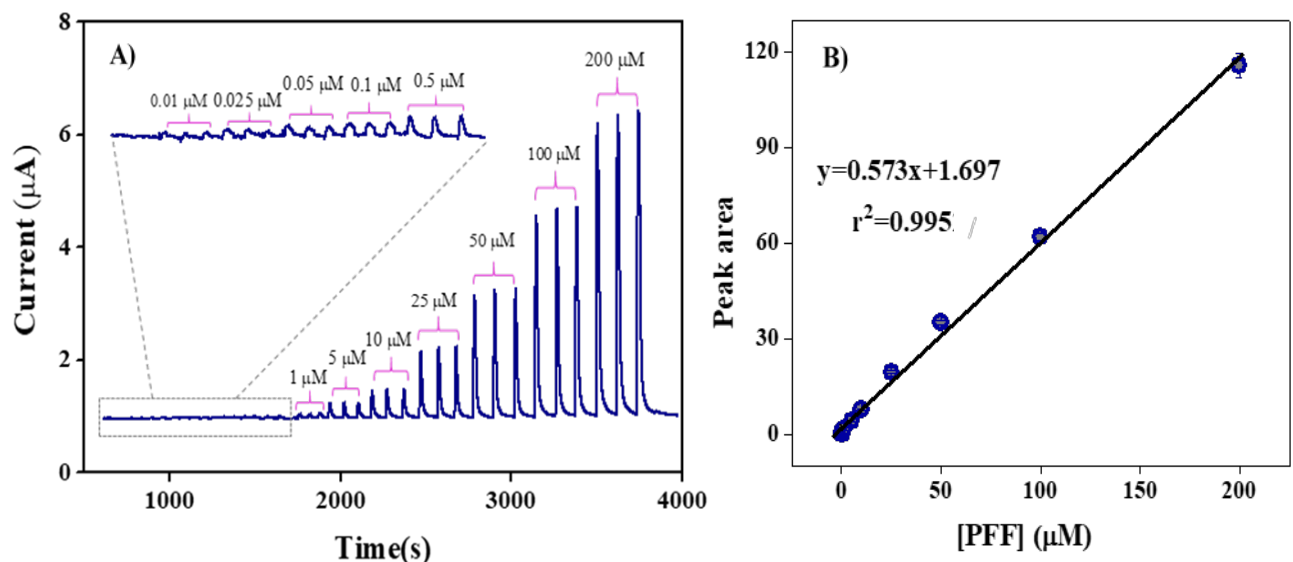
รูปที่ 9 (A) FTIR spectrum ของ 3D-CNTs@MIP ก่อนการล้าง template (a) หลังจากการล้าง template (b) และ non-imprinted polymer (3D-CNTs@NIP ภาพ (B) แสดง AFM images ของ MIP และ NIP films ที่สังเคราะห์บน 3D-CNTs@MIP/GCE

ได้โพรฟีโนฟอสเซนเซอร์ชนิดใหม่ (3D-CNTs@MIP/GCE) ที่มีสภาวะไวและความจำเพาะเจาะจงสูงที่อาศัยการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอพไอเอ เมื่อนำโพรฟีโนฟอสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของโพรฟีโนฟอส พบว่าโพรฟีโนฟอสเกิดออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้า +0.67 โวลต์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นไปตามรูปที่ 10



รูปที่ 10 กลไกการเกิดสัญญาณทางไฟฟ้าเคมีที่ขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE

เมื่อนำโพรฟีโนฟอสเซนเซอร์มาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอฟไอเอ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +0.70 โวลต์ พบว่าได้กราฟเส้นตรง (รูปที่ 11) ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 200 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.995$) และมีขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD; 3σ) ที่ 2.0 นาโนโมลาร์



รูปที่ 11 สัญญาณและกราฟมาตรฐานของโพรฟีโนฟอสเซนเซอร์ชนิดใหม่ (3D-CNTs@MIP/GCE) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอฟไอเอ

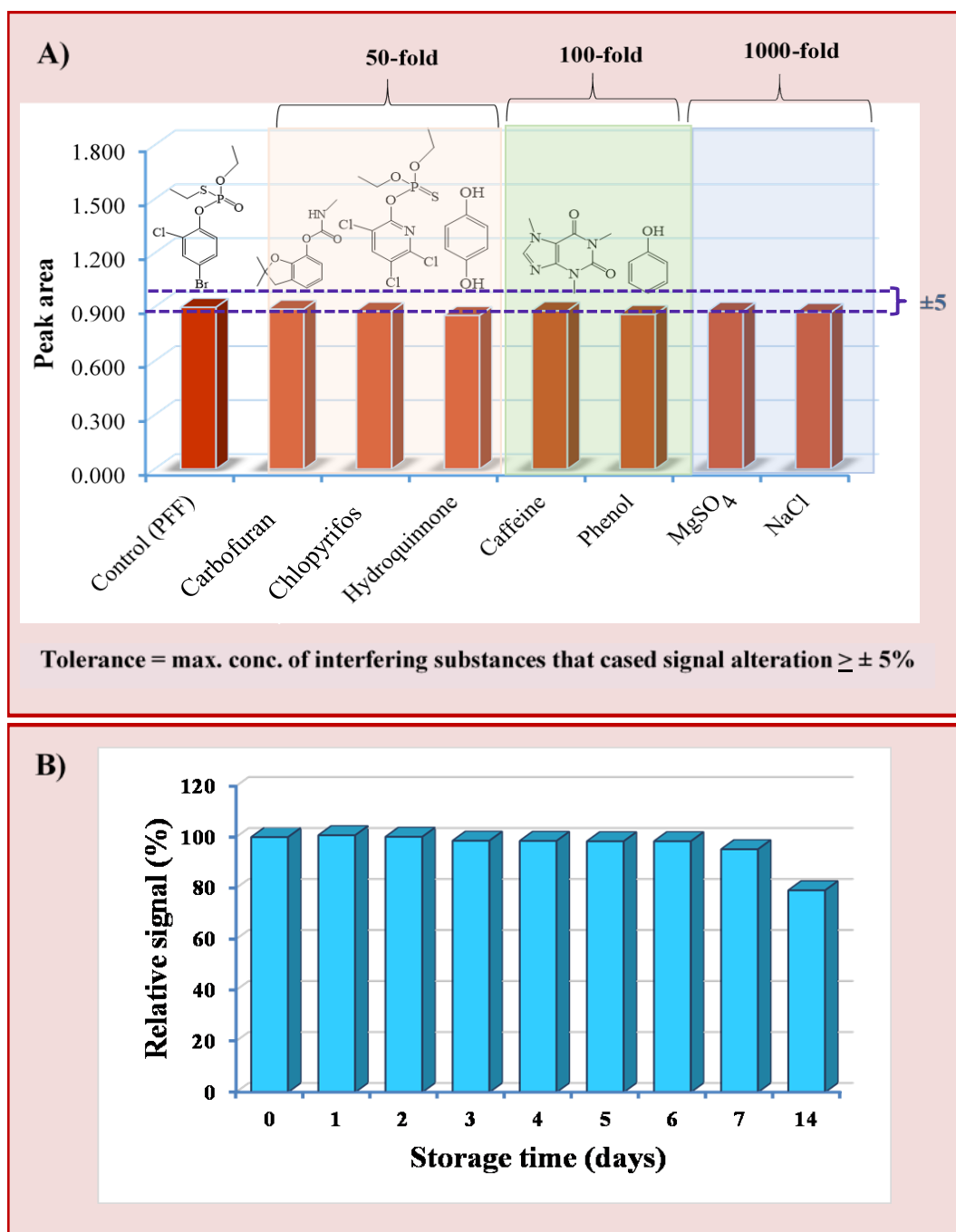
การศึกษาความจำเพาะเจาะจงและความเสถียร

ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจง (selectivity) และความเสถียร (stability) ของการวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE ที่พัฒนาขึ้น ความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ทำการศึกษาผลตัวรบกวนที่ทำการศึกษาได้แก่ chlorpyrifos (CPF), carbofuran (CBF), hydroquinone, caffeine, phenol รวมทั้งสารอนินทรีย์ได้แก่ $MgSO_4$ และ

NaCl เมื่อนำผลการทดลองของเอฟไอแอมแกรมที่ได้จากการทดลองตรวจวัดสารละลายผสมที่เติมตัวรบกวนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับสัญญาณกระแสที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานโพรฟีโนฟอสที่ไม่มีตัวรบกวน ถ้าสัญญาณกระแสที่ตรวจวัดได้มีความแตกต่างกัน $\pm 5\%$ แสดงว่ามีการรบกวนของสารตัวรบกวนที่เติมลงไปต่อระบบการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 A

จากรูปที่ 12A พบว่าตัวรบกวนชนิดเกลืออนินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ MgSO_4 และ NaCl ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบวิเคราะห์โพรฟีโนฟอสที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นสูงถึง 5,000 μM (1000-fold) ตัวรบกวน caffeine และ phenol ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบวิเคราะห์โพรฟีโนฟอสที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นสูงถึง 500 μM (100-fold) ส่วนตัวรบกวน 3 ชนิด ได้แก่ สารกำจัดแมลงชนิด chlorpyrifos (CPF), carbofuran (CBF) และสาร hydroquinone ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบวิเคราะห์โพรฟีโนฟอสที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นสูงถึง 250 μM (50-fold)

ผลการทดสอบความเสถียรของการวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE ที่พัฒนาขึ้นแสดงดังรูปที่ 12B โดยนำมาตรวจวัดค่ากระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโพรฟีโนฟอสความเข้มข้น 5 μM ทำการศึกษาทั้งหมดรวมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นให้การตอบสนองค่ากระแสที่ 95% ของค่าเริ่มต้น เมื่อเก็บขั้วไฟฟ้าไว้ 1 สัปดาห์ และยังให้ตอบสนองค่ากระแสที่สูงถึง 82% เมื่อเก็บขั้วไฟฟ้าไว้นานถึง 2 สัปดาห์ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเสถียรของขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE



รูปที่ 12 (A) ผลการศึกษาผลของตัวรบกวน เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานโพรพิโนฟอส (PFF) ความเข้มข้น 5 μM (B) storage stability ของขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE (สัญญาณของ 5 μM PFF)

เมื่อนำระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE ที่ได้พัฒนาขึ้น มาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณโพฟีนอฟอสในสารสกัดจากพืชและผลไม้ เช่น ต้นหอม มะเขือเทศ ผักกาดขาว กะหล่ำปลี พริกหยวก และพริก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพฟีนอฟอส (PFF) ในตัวอย่างสารสกัดจากผักและผลไม้ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE และการเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน

Samples	PFF (μM)			Recovery (%)	RSD (%)	^a Bias (%)
	Content	Added	Found			
Spring onion	n.d.	0.05	0.051	103.0	2.4	2.1
		0.1	0.104	103.6	2.3	3.6
Tomato	n.d.	0.05	0.050	101.0	2.4	3.0
		0.1	0.101	101.0	2.1	2.9
Chinese cabbage	n.d.	0.05	0.050	100.2	1.8	-1.0
		0.1	0.104	104.0	0.8	1.6
Cabbage	n.d.	0.05	0.050	100.1	1.2	1.2
		0.1	0.101	100.7	1.0	-0.9
Green pepper	n.d.	0.05	0.051	102.6	1.6	2.0
		0.1	0.104	103.8	1.1	1.8
Chili pepper	n.d.	0.05	0.050	100.9	1.5	0.9
		0.1	0.105	105.4	2.0	1.1

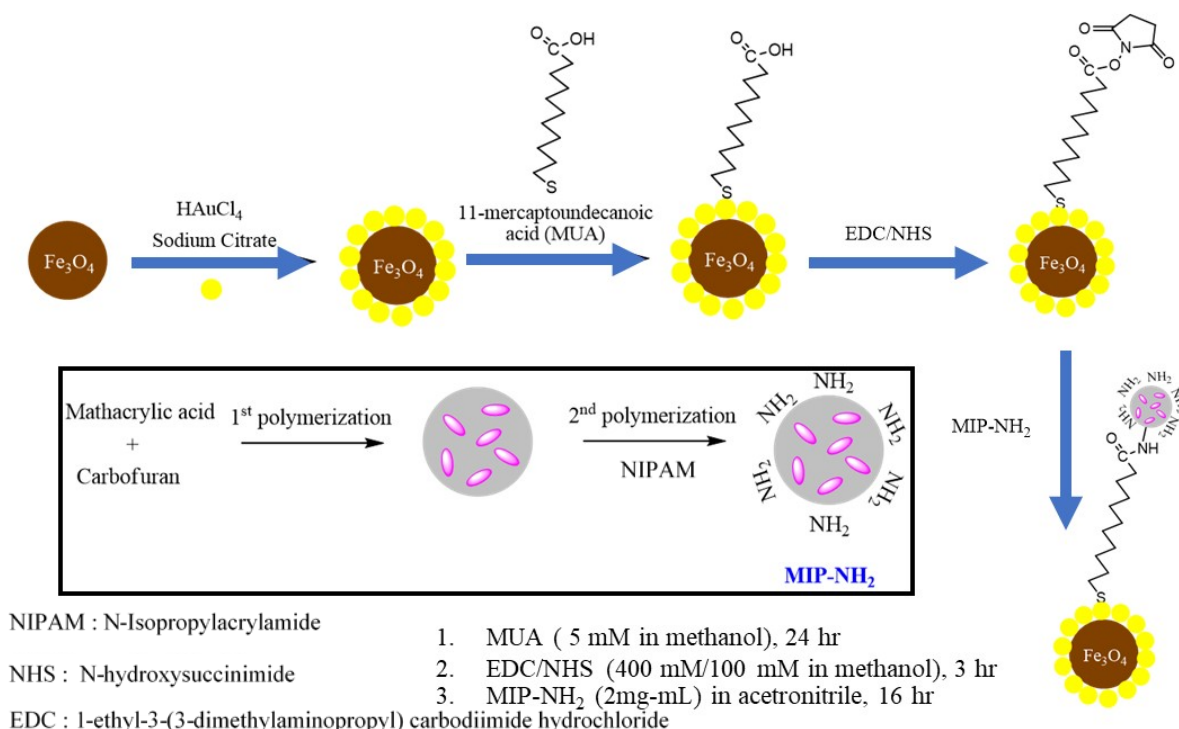
n.d. = not detection or the samples were contaminated with concentration below LOD.

^a bias calculated from the different between recovery measurement results and reference values from HPLC method.

ระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า 3D-CNTs@MIP/GCE ที่ได้พัฒนาขึ้น เป็นระบบวิเคราะห์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณโพฟีนอฟอสในสารสกัดจากพืชและผลไม้ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องสูง ให้ค่า %Bias อยู่ในช่วง 0.9-3.6%

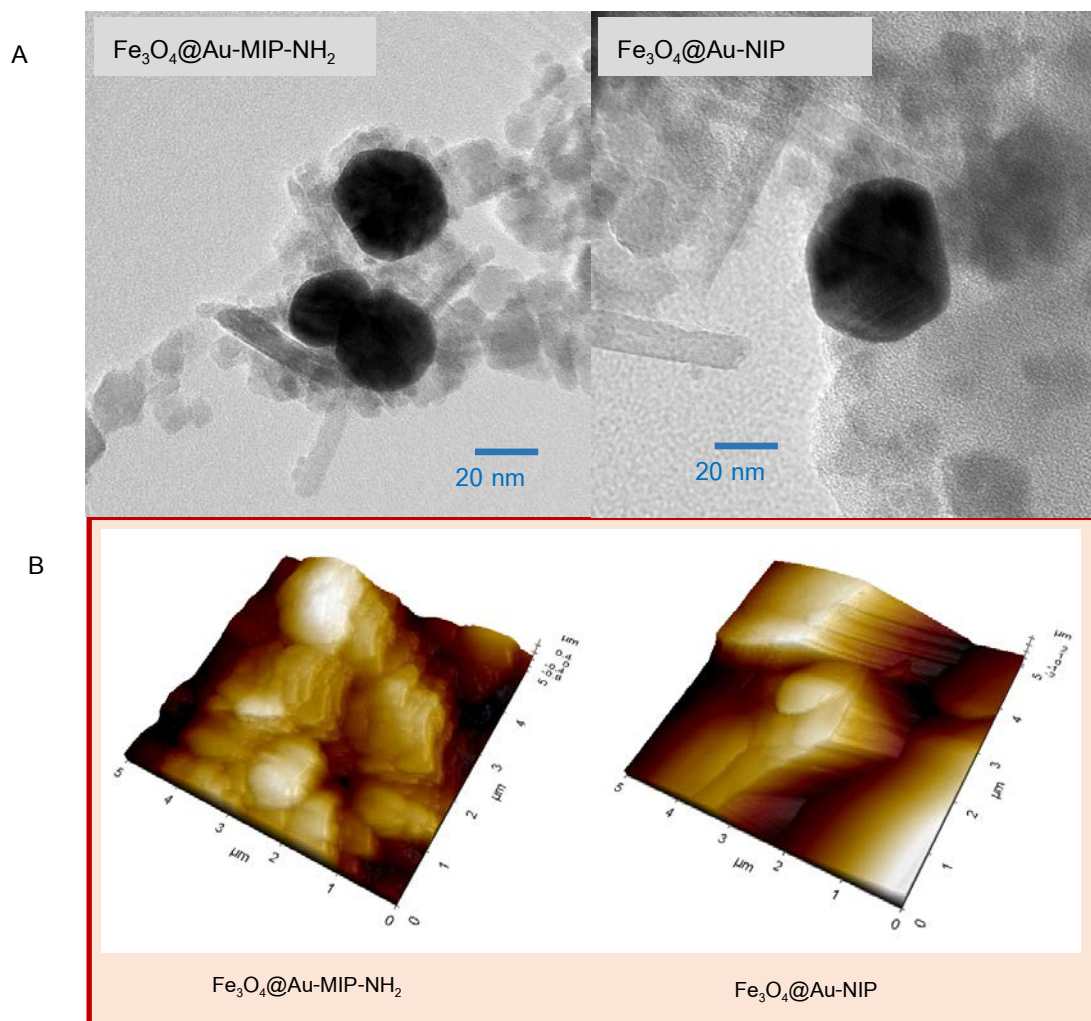
ส่วนที่ 3: การสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนแกนของอนุภาคนาโนชนิดแมกนีไทต์-ทองคำนาโนโดยใช้โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโน

การสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนแกนของอนุภาคนาโนชนิดแมกนีไทต์-ทองคำนาโนโดยใช้โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโนแสดงในรูปที่ 13 จะนำอนุภาคแมกนีไทต์มาเคลือบด้วยทอง โดยใช้โซเดียมไซเทรตเป็นตัวรีดิวซ์ จะได้อนุภาคแมกนีไทต์เคลือบทอง ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) เติม 11- mercaptoundecanoic acid (MUA) เพื่อสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่าง Au-S จากนั้นเติม EDC/NHS เพื่อให้ปลายของอนุภาคสามารถเกิดพันธะกับโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลได้ ในการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโนที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล (MIP- NH_2) จะใช้กรดเมทาคริลิก (MAA) และ เอ็น-ไอโซพโรพิลอะคริลาไมล์ (NIPAM) เป็นมอนอเมอร์ ไตรเมทธีลอลโพรเพน ไตรอะครีเลท (TRIM) และ เอ็นเอ็น-เมทิลลีนบิสอะคริลาไมด์ (MBA) เป็นตัวเชื่อมข้าม, 2,2-เอโซบิส-2-โพรไพโอไนโตรล์ (AIBN) เป็นตัวริเริ่ม และใช้คาร์โบฟูแรนเป็นโมเลกุลแม่แบบ และล้างแม่แบบออกด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย จะได้ ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$) ในการสร้างเซนเซอร์จะนำขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนมาเคลือบด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้น ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$)



รูปที่ 13 การสร้าง $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ ผ่านกระบวนการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโนที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล (MIP- NH_2) จากนั้นนำมาเคลือบบนแกนกลาง (core) ที่เป็นอนุภาคแมกนีไทต์เคลือบทอง

โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลที่เคลือบบนแกนกลางแมกนีไทต์เคลือบทอง ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$) ที่สังเคราะห์โดยใช้กรดเมทาคริลิก (MAA) และ เอ็น-ไอโซพรอพิลอะคริลาไมด์ (NIPAM) เป็นมอนอเมอร์ ไตรเมทิลอลโพรเพน ไตรอะครีเลท (TRIM) และ เอ็นเอ็น-เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (MBA) เป็นตัวเชื่อมข้าม และ 2,2-เอโซบิส-2-โพรไพโอไนไทรล์ (AIBN) เป็นตัวริเริ่ม นำวัสดุนาโนที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยเทคนิค transmission electron microscopy (TEM) และ atomic force microscopy (AFM) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 14

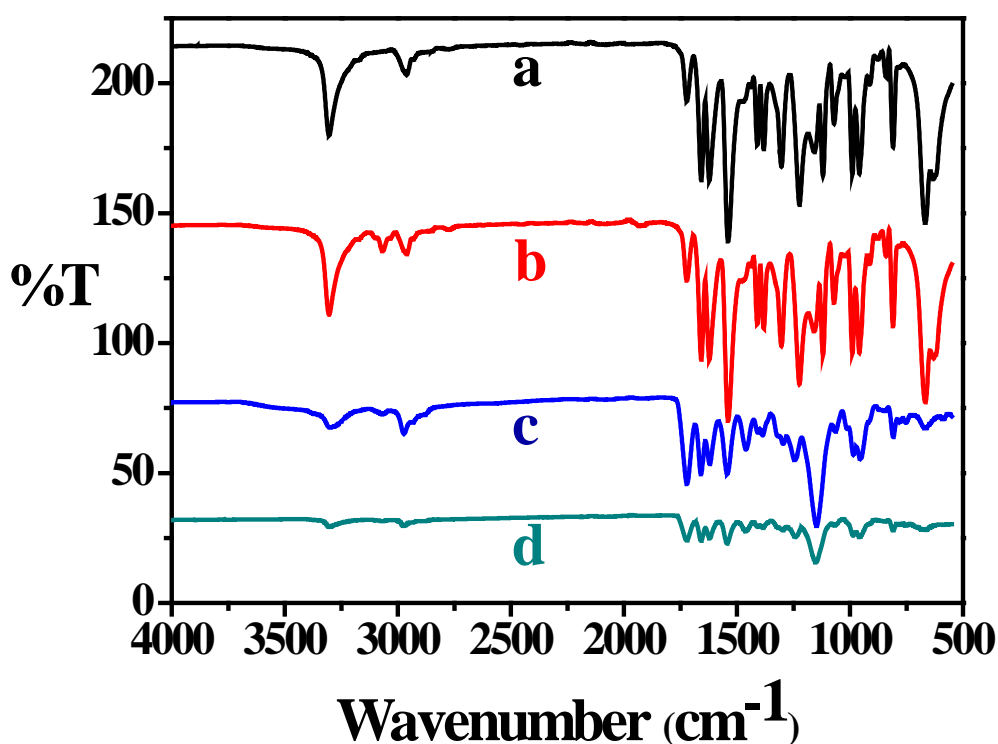


รูปที่ 14 (A) ภาพ TEM และ (B) AFM ของ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ และ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-NIP}$ ที่สังเคราะห์ได้

ภาพ TEM จากรูป 14A แสดงให้เห็นถึงอนุภาคนาโนที่มีแกนกลางเป็น $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ซึ่งมีลักษณะทรงกลม ขนาดอนุภาคมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ ~ 27.5 นาโนเมตร วัสดุที่เตรียมได้มีโพลิเมอร์เคลือบรอบแกนกลาง ส่วนภาพ AFM จากรูป 14B จะเห็นลักษณะทางกายภาพของ

แตกต่างกันระหว่าง $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ และ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-NIP}$ โดย MIP จะปรากฏช่องว่าง (cavities) บนพื้นผิว ในขณะที่ NIP ไม่เห็นช่องว่างบนพื้นผิว ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ MIP ที่เคลือบรอบแกนกลางของวัสดุนาโน ชนิด $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ได้เมื่อนำวัสดุที่สังเคราะห์ได้มาดัดแปรบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนจะได้คาร์โบไพวแรนเซนเซอร์ชนิดใหม่ ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$) ที่มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูง

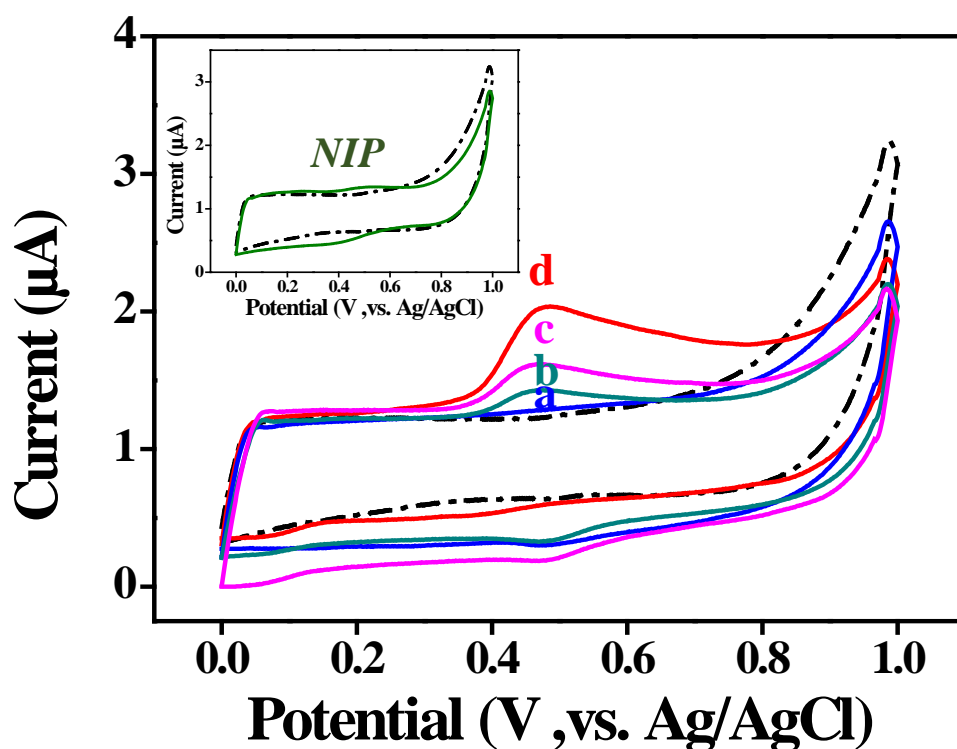
เทคนิค FT-IR ใช้ในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารที่สังเคราะห์ได้ เพื่อยืนยันการเกิดขึ้นของ MIP ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR แสดงดังรูปที่ 15 สเปกตรัมของวัสดุ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ ก่อนการกำจัดโมเลกุลแม่แบบ (b) พบพีกที่ตำแหน่ง 3300 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีกของ N-H stretching จาก CBF (a) ในขณะเดียวกัน $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ หลังล้างโมเลกุลแม่แบบ (c) และ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-NIP}$ (d) ไม่ปรากฏพีกที่ตำแหน่ง 3300 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าการกำจัดโมเลกุลแม่แบบ (CBF) หรือการล้างโมเลกุลแม่แบบออกจากโพลิเมอร์ประสบผลสำเร็จ



รูปที่ 15 FT-IR spectra ของ (a) CBF (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP}$ ก่อนล้างโมเลกุลแม่แบบ (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ หลังล้างโมเลกุลแม่แบบ และ (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-NIP}$

ส่วนผลการทดลองศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของ CBF จากขั้วไฟฟ้าใช้งาน GCE และขั้วไฟฟ้าที่ดัดแปรชนิด $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}/\text{GCE}$ และ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ รวมถึงขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-NIP}/\text{GCE}$ แสดงดังรูปที่ 16 พบว่าที่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน GCE

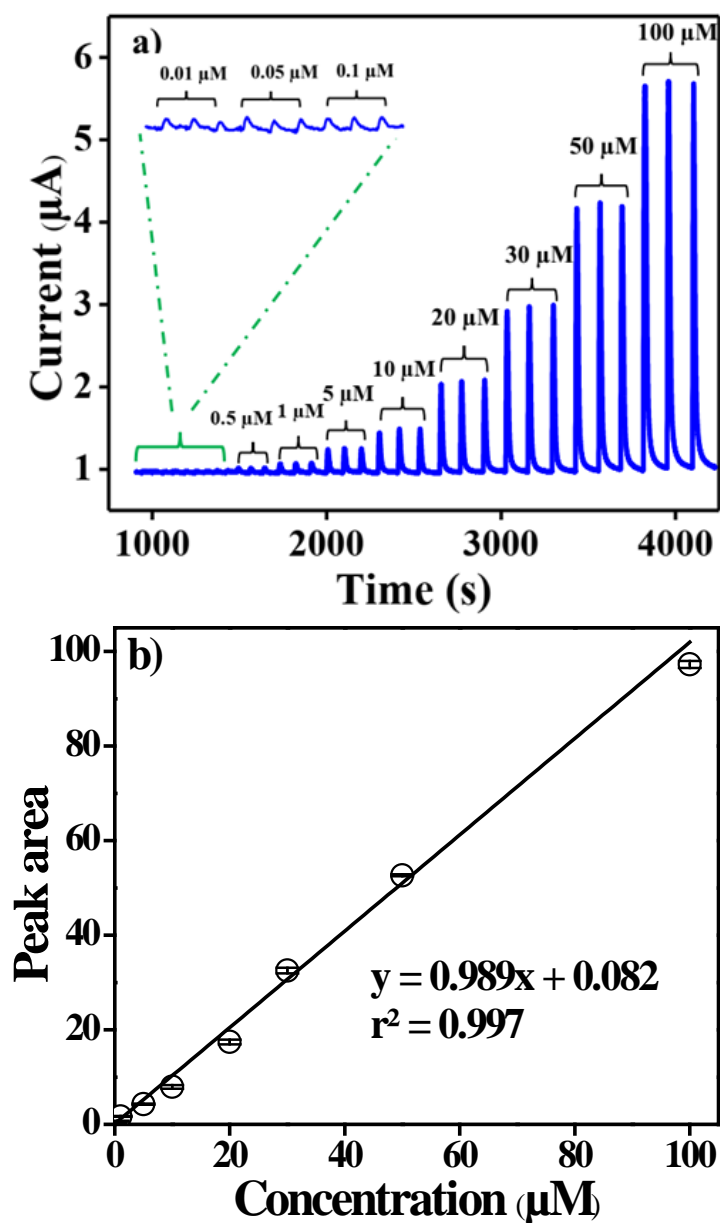
(กราฟ a) ไม่มีการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้า ส่วนออกซิเดชันของของ CBF บน $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$ (กราฟ b) และ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{GCE}$ (กราฟ c) สัญญาณค่ากระแสมีค่าต่ำ ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}-\text{MIP}-\text{NH}_2/\text{GCE}$ ให้กระแสออกซิเดชันสูงที่สุด CBF เกิดออกซิเดชันบนที่ศักย์ไฟฟ้า +0.45 V (รูปที่ 16 กราฟ d) แสดงให้เห็นว่าโพรง (cavity หรือ recognition site) ในโครงสร้างของ MIP เป็นจุดที่โมเลกุลของ CBF เข้ามาถ่ายโอนอิเล็กตรอนในเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในขณะที่ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}-\text{NIP}/\text{GCE}$ (รูปแทรก) ไม่มีการตอบสนองทางเคมีไฟฟ้า แสดงให้เห็นว่าโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น ไม่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล (non imprinted site) ทำให้โมเลกุลของ CBF ไม่สามารถแพร่เข้ามาถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้ โพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถป้องกันการแพร่กระจาย ของ CBF ไปยังพื้นผิวขั้วไฟฟ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 16 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ 5.0 μM CBF บน (a) bare GCE (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$ (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{GCE}$ (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}-\text{MIP}-\text{NH}_2/\text{GCE}$ และรูปแทรกแสดงสัญญาณที่ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}-\text{NIP}/\text{GCE}$ ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8) ที่อัตราการสแกน 0.05 V s^{-1}

เมื่อนำเซนเซอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของคาร์โบไพวแรนมาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอฟไอเอ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 8.0) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และ ให้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +0.50 โวลต์

พบว่าได้กราฟเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.997$) ดังรูปที่ 15 และมีขีดจำกัดในการตรวจวัด (3S/N) ที่ 1.7 นาโนโมลาร์

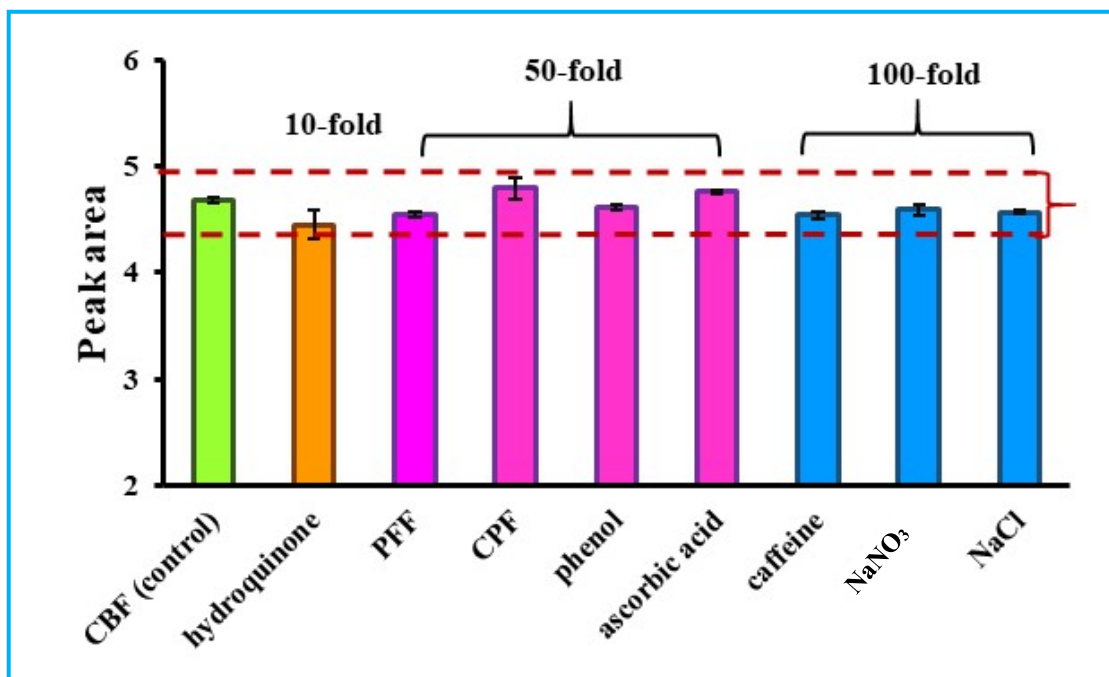


รูปที่ 15 สัญญาณของเซนเซอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของคาร์โบไพวแรนชนิดใหม่ ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-MIP-NH}_2$) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีในระบบเอฟไอเอ

การศึกษาความจำเพาะเจาะจงและการประยุกต์ใช้ในตัวอย่างผัก ผลไม้

ศึกษาผลตัวรบกวนในการวิเคราะห์แบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-MIP-NH}_2$ ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ ผลของ

ตัวรบกวนที่ศึกษาได้แก่ hydroquinone, profenofos, phenol, ascorbic acid, caffeine และสารประกอบอนินทรีย์เช่น NaNO_3 และ NaCl โดยการวัดสัญญาณค่ากระแสของสารละลายผสมระหว่าง CBF ความเข้มข้น $5.0 \mu\text{M}$ ที่มีตัวรบกวนในปริมาณต่าง ๆ เทียบกับสัญญาณค่ากระแสของสารละลายมาตรฐาน CBF ความเข้มข้น $5.0 \mu\text{M}$ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 ความจำเพาะเจาะจงของขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ ที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ CBF เปรียบเทียบระหว่างค่ากระแสออกซิชั่นที่ได้รับจากสารละลาย CBF ความเข้มข้น $5.0 \mu\text{M}$ (control) และค่ากระแสออกซิชั่นของสารละลายผสม CBF ความเข้มข้น $5.0 \mu\text{M}$ ที่มีตัวรบกวนความเข้มข้นต่าง ๆ

ผลการศึกษาผลของตัวรบกวนพบว่าตัวรบกวน caffeine, NaNO_3 และ NaCl ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบวิเคราะห์คาร์โบไพวแรน (CBF) ด้วยขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นสูงถึง $500 \mu\text{M}$ (100-fold) ตัวรบกวน profenofos (PFF), chlorpyrifos (CPF), phenol และ ascorbic acid ไม่แสดงการรบกวนต่อระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นสูงถึง $250 \mu\text{M}$ (50-fold) และตัวรบกวนชนิด hydroquinone ไม่รบกวนการวิเคราะห์ CBF เมื่อมีความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ (10-fold) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ มีความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ CBF

เมื่อนำระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ ที่ได้พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไพวแรนในสารสกัดจากผลไม้และผักเช่น องุ่น แก้วมังกร ผักคะน้า ผักกวางตุ้ง และกะหล่ำปลี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไพวแรน (CBF) ในตัวอย่างสารสกัดจากผลไม้ และผักด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ และการเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน

Samples	Added (μM)	Proposed method		HPLC method		Relative error (%)
		Found \pm S.D. (μM)	Recovery (%)	Found \pm S.D. (μM)	Recovery (%)	
Grape	-	<LOQ	-	<LOQ	-	-
	0.50	0.520 ± 0.007	104.0	0.522 ± 0.006	104.4	-0.4
	1.00	1.012 ± 0.006	101.2	1.011 ± 0.006	101.1	0.1
Dragon fruit	-	<LOQ	-	<LOQ	-	-
	0.50	0.502 ± 0.002	100.4	0.499 ± 0.001	99.8	0.6
	1.00	1.009 ± 0.001	100.9	1.004 ± 0.023	100.4	0.5
Chinese kale	-	0.309 ± 0.016	-	0.298 ± 0.001	-	3.7
	0.50	0.813 ± 0.003	100.8	0.797 ± 0.002	99.8	1.0
	1.00	1.282 ± 0.001	97.3	1.295 ± 0.005	99.7	-2.4
Cantonese Vegetable	-	0.303 ± 0.001	-	0.291 ± 0.010	-	4.1
	0.50	0.805 ± 0.005	100.4	0.813 ± 0.005	104.4	-4.0
	1.00	1.280 ± 0.020	97.7	1.310 ± 0.009	101.9	-4.2
Lettuce	-	0.255 ± 0.001	-	0.245 ± 0.002	-	4.1
	0.50	0.729 ± 0.012	92.8	0.739 ± 0.031	98.8	-4.0
	1.00	1.197 ± 0.020	94.2	1.226 ± 0.008	98.1	-3.9

ระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ ที่พัฒนาขึ้น เป็นระบบวิเคราะห์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไพวแรน (CBF) ในสารสกัดจากผลไม้และผักได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตรวจพบปริมาณของคาร์โบไพวแรนในตัวอย่างผักคะน้า ผักกวางตุ้ง และกะหล่ำปลี ในปริมาณ 0.309, 0.303 และ 0.255

μM ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องสูง ให้ค่า %ความคลาดเคลื่อน (relative error) อยู่ในช่วง 0.1-4.2% เมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐาน

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ ควบคู่กับการสร้างแอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในอาหารด้วยเทคนิคโพลีอิเล็กโทรดอสแกนนิ่ง วิธีแรกจะพัฒนาคาร์บอนไฟเบอร์เรซินซอร์โดยอาศัยการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคแมกนีไทต์-ทองนาโน บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเฟลส (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลจะถูกสังเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชันผ่านสารประกอบเชิงซ้อนซูปราโมเลกุลกับคาร์บอนไฟเบอร์ หรือ 4TB[8]A-CBF และออร์โทฟีแนลีนไดเอมีนเป็นฟังก์ชันโมโนเมอร์ เมื่อนำคาร์บอนไฟเบอร์เรซินซอร์มาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตริกในระบบเอฟไอเอ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 8.0) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +0.50 โวลต์ พบว่าได้กราฟเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.998$) และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ 3.8 นาโนโมลาร์ วิธีที่สองสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวป์แบบ 3 มิติ (3D-CNTs@MIP) วิธีนี้จะสังเคราะห์โดยนำคาร์บอนนาโนทิวป์ที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกมาเคลือบด้วยซิลิกอนไดออกไซด์ ตามด้วยการสร้างหมู่ไวนิลปิด และหุ้มด้วยโพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล จากนั้นนำวัสดุที่สังเคราะห์ได้ไปเคลือบบนผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน และกำจัดโมเลกุลแม่แบบออกเพื่อให้เกิดรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย เมื่อนำโพรพีโนฟอสเซนเซอร์มาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตริกในระบบเอฟไอเอ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +0.70 โวลต์ พบว่าได้กราฟเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 200 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.995$) และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ 2.0 นาโนโมลาร์ วิธีที่สามสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยประทับโมเลกุลของคาร์บอนไฟเบอร์เคลือบบนแกนของอนุภาคนาโนชนิดแมกนีไทต์-ทองนาโนโดยใช้โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโน (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂) จากนั้นอาศัยคุณสมบัติของ self-assembly ของอนุภาคแมกนีไทต์-ทองนาโนกับสารจำพวกออร์แกโนไธออล เช่น 11- mercaptoundecanoic acid (MUA) เพื่อสร้างพันธะและนำ MIP-NH₂ มาเกาะติดเป็นเปลือกหุ้มแกนกลางที่เป็นอนุภาคแมกนีไทต์-ทองนาโน เมื่อนำเซนเซอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของคาร์บอนไฟเบอร์มาใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมตริกในระบบเอฟไอเอ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 8.0) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และให้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +0.50 โวลต์

พบว่าได้กราฟเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ ($r^2 = 0.997$) และมีขีดจำกัดในการตรวจวัด (3S/N) ที่ 1.7 นาโนโมลาร์ แอมเพอร์โรเมทริกเซนเซอร์ชนิดใหม่ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทั้งสามวิธีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงตกค้างในสารสกัดจากผักและผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] M. Wang, J. Huang, M. Wang, D. Zhang, J. Chen, Electrochemical non-enzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables, Food chem.151 (2014) 191-197.
- [2] A. Wong, M. D. Pilar, T. Sotomayor, Determination of carbofuran and diuron in FIA system using electrochemical sensor modified with organometallic complexes and graphene oxide, J. Electroanal. Chem. 731 (2014) 163-171.
- [3] F. C. Moraes, L. H. Mascaro, S. A.S. Machado, C. M.A. Brett, Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode, Talanta 79 (2009) 1406-1411.
- [4] A. Jirasirichote, E. Punrat, A. Suea-Ngam, O. Chailapakul, S. Chuanuwatanakul, Voltammetric detection of carbofuran determination using screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide, Talanta 175 (2017) 331–337.
- [5] H. Wei, J. J. Sun, Y. M. Wang, X. Li, G. N. Chen, Rapid hydrolysis and electrochemical detection of trace carbofuran at a disposable heated screen-printed carbon electrode, Analyst 133 (2008) 1619-1624.
- [6] X. Tan, Q. Hu, J. Wu, X. Li, P. Li, H. Yu, X. Li, F. Lei, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of carbofuran, Sens. Actuators, B 220 (2015) 216-221.
- [7] X. Tang, D. Zhang, T. Zhou, D. Nie, Q. Yang, L. Jin, G. Shi, Fe₃O₄@Au sphere molecularly imprinting with self-assembled monolayer for the recognition of parathion-methyl, Anal. Methods 3 (2011) 2313-2321.
- [8] E. A. Songa, J. O. Okonkwo, Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review, Talanta 155 (2016) 289–304.

- [9] P. A. Baker, M. N. Goltz, A. M. Schrand, D. Y. Yoon, D. S. Kim. Organophosphate vapor detection on gold electrodes using peptide nanotubes, *Biosens Bioelectron.*, (2014) 19-23.
- [10] C. Malitesta, E. Mazzotta, R.A. Picca, A. Poma, I. Chianella, S.A. Piletsky, MIP sensors the electrochemical approach, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2012), 1827-1846.
- [11] N. Gao, J. Dong, M. Liu, B. Ning, C. Cheng, C. Guo, C. Zhou, Y. Peng, J. Bai, Z. Gao, Development of molecularly imprinted polymer films used for detection of profenofos based on a quartz crystal microbalance sensor, *Analyst* 137 (2012) 1252-1258.
- [12] E. B. Ozkutuk, S. E. Diltermiz, E. Ozalp, T. Gedikbey, A. Ersoz, Paraoxon imprinted biopolymer based QCM sensor, *Mater. Chem. Phys.* 139 (2013) 107-112.
- [13] S. Boulanouar, S. Mezzache, A. Combès, V. Pichon, Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples, *Talanta* 176 (2018) 465–478.
- [14] A. Munawar, M. A. Tahir, A. Shaheen, P. A. Lieberzeit, S. Khan, S. Z. Bajwa. Investigating nanohybrid material based on 3D-CNTs@Cu nanoparticle composite and imprinted polymer for highly selective detection of chloramphenicol, *J. Hazard Matter.* 342 (2018) 96-106.
- [15] J. Chen , H. Huang, Y. Zeng, H. Tang, L. Li., A novel composite of molecularly imprinted polymer-coated PdNPs for electrochemical sensing norepinephrine, *Biosensors and Bioelectronics* 65 (2015) 366–374.
- [16] P.E. Laibinis, G.M. Whitesides, D.L. Allara, V.T. Tao, A.N. Parikh, R.G. Nuzzo, Comparison of the Structures and Wetting Properties of Self-Assembled Monolayers of n- Alkanethiols on the Coinage Metal Surfaces, Cu, Ag, Au' *J Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7152–7167.
- [17] S. Chunta, R. Suedee and P. A. Lieberzeit, Low-Density Lipoprotein Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1419-1425.
- [18] T. Kamra, S. Chaudhary, C. Xu, L. Montelius, J. Schnadt, L. Ye, Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles on a gold surface using carbodiimide coupling for chemical sensing, *Journal of Colloid and Interface Science* 461 (2016)1-8.

Output ของโครงการ

1 Output ของโครงการในเรื่องของการตีพิมพ์สรุปได้ดังต่อไปนี้

- 1.1 M. Amatatongchai*, W. Sroysee, P. Jarujamrus, D. Nacapricha and P. A. Lieberzeit, Selective amperometric flow-injection analysis of carbofuran using a molecularly-imprinted polymer and gold-coated-magnetite modified carbon nanotube-paste electrode, Talanta 179 (2018) 700-709.
- 1.2 M. Amatatongchai*, W. Sroysee, P. Sodkrathok, N. Kesangam, S. Chairam, P. Jarujamrus, Novel three-Dimensional molecularly imprinted polymer-coated carbon nanotubes (3D-CNTs@MIP) for selective detection of profenofos in food, Analytica Chimica Acta 1076 (2019) 64-72.

Manuscript

-M. Amatatongchai*, S. Thimoonnee, P. Jarujamrus, D. Nacapricha and P. A. Lieberzeit "Novel Sensitive and Selective Amperometric Carbofuran Sensor Based on Amino-containing Molecularly Imprinted Polymer Coated on Magnetite-gold Nanoparticles." (manuscript in preparation and to be submitted either to Talanta or to Analytica Chimica Acta)

2 Output ของโครงการในเรื่องของผลการวิจัยสรุปได้ดังต่อไปนี้

- 2.1 ได้วิธีในการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลเคลือบบนอนุภาคนาโนชนิดใหม่ การนำอนุภาคนาโนมาใช้เป็นแกนกลางในการสังเคราะห์โพลิเมอร์ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสังเคราะห์ ทำให้สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวจดจำ (recognition sites) ทำให้มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลจำนวนมากขึ้นกว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีการเดิม ทำให้เซนเซอร์ที่ได้มีสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงสูง วิธีในการเตรียมไม่ยุ่งยาก มีความสามารถในการทำซ้ำสูง
- 2.2 ได้แอมเพอร์โรเมตริกเซนเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจวัดปริมาณสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในอาหารด้วยเทคนิคโพลีอิเล็กโทรไลซิส ใช้ปริมาณของรีเอเจนต์และสารตัวอย่างปริมาณน้อยมาก เป็นการลดปริมาณของเสียที่จะเกิดขึ้น (green chemistry) และให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือโดยเมื่อนำมาเทียบกับเทคนิคที่เป็นเทคนิคมาตรฐานอื่นๆ พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- 2.3 โครงการวิจัยนี้ได้เอื้อให้มีการผลิตมหาบัณฑิต ทางด้านเคมีจำนวน 1 คน และดุษฎีบัณฑิตด้านเคมีวิเคราะห์ จำนวน 1 คน

2.4 มีเครือข่ายความร่วมมือทั้งในและระดับชาติและนานาชาติ ระหว่างหน่วยงานของ
ราชการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีกับมหาวิทยาลัยมหิดลและมหาวิทยาลัย
อุบลราชธานีกับ University of Vienna, ประเทศออสเตรีย

3. Output อื่น ๆ ของโครงการ

International conference

-M. Amatatongchai*, W. Sroysee, P. A. Lieberzeit, P. Jarujamrus, D. Nacapricha
“Selective amperometric flow injection analysis for carbofuran based on molecular
imprinted polymer and gold-coated magnetite modified carbon nanotubes-paste
electrode” 21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related
Techniques (21st ICFIA), Saint Petersburg, Russia, 3-8 September 2017, as oral
contribution.

-M. Amatatongchai*, P. Sodkrathok, W. Sroysee, N. Kesangam, S. Chairam
and P. Jarujamrus “Novel molecularly imprinted polymers (MIP)-coated nanomaterials
for amperometric sensing of pesticides in food analysis” 14th International Conference
on Flow Injection Analysis (Flow Analysis XIV), Bangkok, Thailand, 2-7 December 2018,
as oral contribution.

-M. Amatatongchai* , S. Thimoonnee, P. Jarujamrus, D. Nacapricha, P. A.
Lieberzeit “Novel Amino-containing Molecularly Imprinted Polymer Coated on Magnetite-
gold for Sensitive and Selective Amperometric Detection of Carbofuran in Food” 22nd
International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques (22nd
ICFIA), 31 May to 05 June, 2020, in Marseille, France, as poster contribution.

ภาคผนวก



Selective amperometric flow-injection analysis of carbofuran using a molecularly-imprinted polymer and gold-coated-magnetite modified carbon nanotube-paste electrode^{☆,☆☆}

Maliwan Amatongchai^{a,*}, Wongduan Sroysee^a, Purim Jarujamrus^a, Duangjai Nacapricha^b, Peter A. Lieberzeit^c

^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

^b Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^c University of Vienna, Faculty for Chemistry, Department of Physical Chemistry, 1090 Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:

Carbofuran sensor
Molecularly imprinted polymer
Carbon-paste electrode
Gold-coated magnetite (Fe₃O₄@Au)
Amperometry
Flow injection

ABSTRACT

Herein, we propose a new approach for selective determination of carbofuran (CBF) in vegetables, based on a simple flow-injection system using a molecularly-imprinted amperometric sensor. The sensor design is based on a carbon-paste electrode decorated with carbon nanotubes and gold-coated magnetite (CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) coated with a molecularly-imprinted polymer (MIP) for CBF sensing. The MIP was synthesized on the electrode surface by electropolymerization using a supramolecular complex, namely 4-ter-butylcalix [8] arene-CBF (4TB [8]A-CBF), as the template. We used *o*-phenylenediamine as the functional monomer. Our results demonstrate that incorporation of the MIP coating improves the electrochemical catalytic properties of the electrode, increases its surface area, and increases CBF selectivity by modulating the electrical signal through elution and re-adsorption of CBF. The imprinted sensor (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) was used in a flow-injection analysis (FIA) system. Experimental conditions were investigated in amperometric mode, with the following optimized parameters: phosphate buffer solution (0.1 M, pH 8.0) as the carrier, flow rate 0.5 mL min⁻¹, applied potential +0.50 V. When used in the FIA system, the designed imprinted sensor yields a linear dynamic range for CBF from 0.1 to 100 μM ($r^2 = 0.998$) with a detection limit of 3.8 nM (3S_b), and a quantification limit of 12.7 nM (10S_b). The sensor exhibits acceptable precision (%RSD = 4.8%) and good selectivity toward CBF. We successfully applied the electrode to detect CBF in vegetable samples.

1. Introduction

Carbofuran (CBF) is a broad-spectrum carbamate pesticide used worldwide by the agricultural industry to protect a wide variety of fruit, vegetables, and other crops [1,2]. However, its high toxicity and accumulation in living organisms has resulted in public concerns regarding food safety and human health [3,4]. Owing to its high toxicity, the Acceptable Daily Intakes (ADIs) of CBF as recommended by the Codex Alimentarius Commission is 0–0.002 mg.(kg of body weight)⁻¹ [5,6]. To monitor the safety of food supplies, government agencies of most countries have established maximum residue levels (MRLs) of pesticides and have set up crop pesticide-residue monitoring programs. The United States Environmental Protection Agency (EPA) set MRLs for CBF at 0.1 mg kg⁻¹ in selected agricultural product including green

bean, banana, coffee and rice [7,8]. Therefore, it is necessary to detect and monitor CBF residues in farm products and in the environment [9,10]. Detection of carbamate pesticides is generally carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) [11,12], gas chromatography (GC) [13], capillary electrophoresis (CE) [14], mass spectrometry [15], piezoelectric immunosensing [16] and amperometric immunosensor apparatus [3,17]. Although these techniques are sensitive and well-established, the methods somehow require expensive instrumentation as well as complex and time consuming clean-up procedures, which carry risks for analyte loss. This limits their application and makes them one way or another unsuitable for routine field operation [7,11–14]. Moreover, these methods do not easily allow continuous in situ analysis, and often require highly trained operators [11–15]. Consequently, electrochemical techniques are considered

[☆] Presented at 21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques, Saint-Petersburg, Russia (3–8 September 2017).

^{☆☆} This paper is dedicated to Prof. Gary D. Christian on the occasion of his 80th Birthday. In Honor of the 80th Birthday of Prof. G. Christian.

* Corresponding author.

E-mail addresses: maliwan.a@ubu.ac.th, amaliwan@gmail.com (M. Amatongchai).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.064>

Received 19 September 2017; Received in revised form 21 November 2017; Accepted 28 November 2017

Available online 05 December 2017

0039-9140/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

suitable complementary tools for real-time detection of CBF in real samples [2,3]. The use of electrochemical sensors coupled with flow-injection analysis (FIA) is a highly promising approach. It provides numerous advantages, including analysis of samples in real time, versatile instrumentation, low cost, high sample throughput, and offers high sensitivity with modest reagent consumption and waste generation.

Generally, electrochemical detection of pesticides in food analysis applications relies on enzyme bio- and chemical-sensors. Although these two sensor types can be sensitive and selective, they do have drawbacks. For example, biosensors, which normally use acetylcholinesterase (AChE) enzyme immobilized on electrode materials such as glassy carbon [18], gold [19], and platinum [20], are limited by their relatively high cost and by the inherent instability of the enzymes. Enzymes require particularly critical operational and storage conditions, including pH, ionic strength, and temperature requirements. Non-enzyme pesticide sensors provide an attractive alternative to enzymatic biosensors. However, they suffer problems with electrode fouling and lack of selectivity; non-enzyme systems require high potentials for analyte detection and suffer interference from the sample matrix [21]. The most important and challenging aspect in the development of CBF chemical sensors is the enhancement of sensitivity and selectivity [2,21]. Chemically modified nanomaterial-based electrodes have been reported for determination of carbaryl [2,22] and carbofuran [2,23,24]. These electrodes used carbon nanotubes (CNTs) with cobalt phthalocyanine [22], cobalt oxide decorated with reduced graphene oxide (rGO) [2], graphene oxide (GO) with gold nanoparticles (AuNPs) [23], and GO with hemin modified carbon electrodes [24]. Nano-materials play important roles in improving the performances of electrical communications and electrocatalytic activity, and have been applied to decrease surface fouling of electrodes [21,24]. However, analytical features, such as precision, sensitivity, and selectivity need further improvement.

Recently, molecularly-imprinted polymers (MIP) have seen wide application in electrochemical sensors. MIPs provide selective analysis due to their tailor-made affinity and specificity to a target analyte [25,26]. They are suitable to rapidly identify a template molecule, and are easily synthesized and incorporated into an electrode to provide a sensitive and selective electrochemical sensor with reproducible analytical results. However, as a sensing material, the rate of analyte diffusion across the MIP film needs improvement to reduce response time [25]. Furthermore, an efficient signal transducer is needed to effectively convert molecular recognition binding signals into detectable electrical signals, and so to enhance sensitivity of the sensing system [25,26]. The electroconductivity and recognition sites of MIPs are poor. Therefore, various nanomaterials have been extensively used in the development of MIP based sensors to promote electroconductivity, electron transfer and recognition sites owing to their unique properties of high conductivity and large specific surface area allowing for high density of chemical binding and large surface area to the synthesis of MIP [26–28]. In terms of improving the sensitivity of MIP sensors for pesticides and herbicides, nanomaterials such as CNTs [26,27], gold nanoparticles [28], AuPt alloy nanoparticles [29], and gold-coated magnetite ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanoparticles [30] were reported. These examples include CBF [26,28], carbaryl [29], diuron [27], and parathion-methyl [30], for glassy carbon (GC) [26,28,30] and carbon-paste [29] electrodes.

Herein, we report a novel CBF sensor, fabricated using nanomaterials comprising CNTs and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanoparticles to increase electrode sensitivity, and MIP to provide a specific binding site for the CBF target molecule. The MIP-sensor design is based on a carbon-paste electrode modified with CNTs and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ (CNTs- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{CPE}$). A MIP for CBF was synthesized at the electrode surface by electropolymerization with a 4-ter-butylcalix [8] arene-CBF (4TB[8]A-CBF) supramolecular complex as the template, and *o*-phenylenediamine as the functional monomer. Hybrids nanostructure formed with carbon

nanotubes (CNTs) and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ have exhibited a synergic effect leading to significant improvements in the electronic and mechanical characteristics of each single component. In this context, the use of CNTs- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ which possess unique properties including high electrical conductivity, good electrocatalytic activity and large surface area offers significant enhancement in the sensor performance. To our knowledge, this is the first report of using CNTs- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{CPE}$ to enhance conductivity and electron transfer to achieve the electropolymerization of 4TB[8]A-CBF supra molecule and selective of CBF detection. The synthesized MIP was characterized by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy and atomic force microscopy (AFM). The CBF imprint has a porous structure, with cavities formed on the surface of the polymer film during electrodeposition. We applied the imprinted sensor (MIP-CNTs- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{CPE}$) to on-line amperometric detection of CBF in a FIA system, and the sensor successfully quantified CBF in vegetable samples. The proposed method is highly feasible, and provides excellent sensitivity, selectivity, and stability with a sample throughput of 61 samples per hour.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All chemicals were analytical grade. Deionized-distilled water (WaterPro Ps, USA) was used for standard and reagent preparation. *o*-Phenylene diamine ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$), graphite powder, 4-ter-butylcalix [8] arene ($\text{C}_{88}\text{H}_{112}\text{O}_8$) (4TB [8]A, 97%), and hydrogen tetrachloroauric (III) acid trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) were purchased from Acros organics (Geel, Belgium). Carbofuran ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$, 98%), sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), acetic acid (CH_3COOH), sodium phosphate monobasic dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), and sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Carboxylated functionalized multiwall carbon nanotubes (CNTs-COOH, diameter: 15 ± 5 nm, length: $1\text{--}5 \mu\text{m}$, purity: $> 95\%$) were purchased from Nanolab Inc. (MA, USA). Poly(dimethylsiloxane) or PDMS (Sylgard® 184) were purchased from Dow Corning (Wiesbaden, Germany). A stock solution of 10 mM carbofuran (CBF) was prepared using methanol and then stored in the dark at 4°C . The hydrolysate of CBF was obtained by dissolving CBF in NaOH (0.1 M), and then placing in a water bath at 60°C for an hour to ensure complete hydrolysis [23,31,32].

2.2. Apparatus

2.2.1. Cyclic voltammetry

A cyclic voltammetry (CV) study was performed in batches using a self-assembled three-electrode cell, comprising a MIP-CNTs- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ carbon-paste working electrode, an Ag/AgCl (sat.) reference electrode, and a platinum wire counter-electrode. We performed CV measurements using an eDAQ potentiostat (model EA161, Australia) equipped with e-corder (model 210), and e-Chem software v2.0.13. The working electrode was built by packing the paste inside a glass tube (inner diameter 0.2 cm, length 7.5 cm) with a fixed copper wire for the electrical contact. The CPE active surface area was approximately 0.031 cm^2 . Phosphate buffer solution (0.1 M, pH 8.0) was used as a supporting electrolyte for all electrochemical measurements.

2.2.2. Amperometric detection using a simple flow-injection (FI) system

We employed a simple FI system for the amperometric detection of CBF [33,34], using the MIP sensor. The system comprised a Shimadzu pump (model LC-10AD, Japan), a Rheodyne injector (model 7725, USA), fitted with a 100 μL sample loop, and an electrochemical detector (ECD). Amperometric measurements were performed using an eDAQ potentiostat (EA161), equipped with e-corder 210, chart v.5.5.11 software, and an in-house three-electrode thin-layer flow cell. The MIP-CNTs- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{CPE}$ served as the working electrode, Ag/AgCl as the reference electrode, and a stainless-steel tube as the counter electrode.

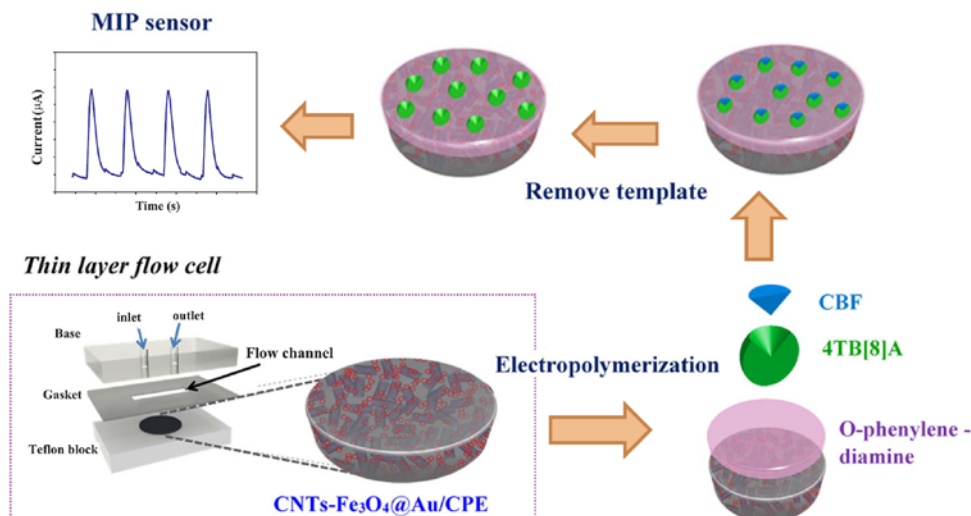


Fig. 1. The MIP sensor serves as the working electrode in a thin-layer flow cell for amperometric measurements in a simple FI system, and preparation of the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE sensor.

A silicone gasket (flow channel = 0.1 × 0.6 cm) served as a spacer in the ECD between the base of the cell, and the working electrode, to provide an electrode area of approximately 0.06 cm². Fig. 1 outlines the preparation of the MIP sensor (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE). CBF molecularly-imprinted polymers were fabricated on the CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE surface by using electrochemical polymerization.

2.2.3. Characterization

A thermogravimetric analyzer (TGA) model TG 8120 (Rigaku, Japan) and an X-ray diffractometer (X'Pert PAN, Philip, Finland) were used to study the behaviors of 4TB [8] CBF inclusion. Structure, composition, and morphology of the nanocomposites were evaluated by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy (Perkin Elmer, USA) and AFM; images were obtained using a scanning microscope probe (Park Systems Corp., Korea.) controlled by XEI software.

2.3. Preparation of the MIP sensor (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE)

2.3.1. Preparation of Fe₃O₄

Magnetite nanoparticles (Fe₃O₄) were prepared by co-precipitation as described in our previous report [33]. Fe(NO₃)₃·9H₂O (0.02 mol) and FeSO₄·7H₂O (0.01 mol) were dissolved in HCl (60 mL, 0.2 M) with vigorous stirring under nitrogen. NaOH solution (100 mL, 1.0 M) was then added dropwise to the suspension. Stirring was continued at 70 °C for another 2 h. The resulting brown precipitate (Fe₃O₄) was collected by magnetic decantation, washed three times with DI water, and then dried in a desiccator.

2.3.2. Preparation of Fe₃O₄@Au

Although Fe₃O₄ nanoparticles possess high surface-to-volume ratios, they are easily oxidized in air with the trend of highly aggregation, which could reduce conductivity. Therefore, we prepared gold coated magnetite (Fe₃O₄@Au) nanoparticles to avoid the aggregation or oxidation and plus further acquire excellent conductive of the combine nanocomposites. Moreover, gold nanoparticles also have been reported as excellent materials to fabricate MIP because of their catalytic activity, high stability, easy surface functionalization, and excellent conductivity [25,33].

Fe₃O₄ nanoparticles were coated with Au to obtain Fe₃O₄@Au as previously described [33]. Fe₃O₄ nanoparticles (30 mg) were dispersed in 10 mL deionized (DI) water in an ultrasonic bath for 30 min. The

dispersion was transferred to a 250-mL round-bottom flask containing 40 mL of water. Then, HAuCl₄ (20 mL, 0.1%) was added while stirring vigorously. Stirring was continued while the solution was brought to reflux. Tri-sodium citrate (4 mL, 1 wt%) was then added rapidly to the boiling solution. The mixture was kept at reflux for further 15 min. During this process, the added Au³⁺ ion was reduced to Au⁰ on the Fe₃O₄ surface, to form red-brown Fe₃O₄@Au. The synthesized Fe₃O₄@Au nanoparticles were separated by magnetic decantation, washed three times with DI water, and then dried in a desiccator.

2.3.3. Preparation of 4TB[8]A-CBF assemblies

4TB[8]A-CBF assemblies were prepared by self-assembly, as described by Li et al. [26], with some modification: Briefly, a stock solution containing CBF and 4TB[8]A in equal molar quantities in acetonitrile (2.2 mM) was prepared. A mixed solution of 0.1 mM CBF and 4TB[8]A solution was blended with 0.05 M phosphate buffered saline solution (pH 7.8) for 30 min in an ultrasonic bath. The solution was cooled, filtered, and washed with ethanol, to yield the 4TB[8]A-CBF assemblies. The solution was stored overnight in a refrigerator at 4 °C. Finally, the 4TB[8]A-CBF assemblies were purified by recrystallization in ethanol and dried at 60 °C for 2 h.

2.3.4. Preparation of CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE

The CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE was fabricated by thoroughly mixing graphite powder (0.900 g), CNTs-COOH (0.020 g), Fe₃O₄@Au nanoparticles (0.025 g), and PDMS (0.015 g) to homogeneous consistency using a mortar and pestle. The composite material was then heated to 60 °C and incubated for 30 min. Mineral oil (30 μL) was added and thoroughly mixed with the composite materials. CNTs-Fe₃O₄@Au paste was either packed inside a glass tube (inner diameter 0.2 cm, length 7.5 cm) fabricated in-house for cyclic voltammetric study, or packed inside the Teflon block (Fig. 1) of a thin-layer flow cell for amperometric study. The CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE surface was polished with weighing paper to a smooth finish before use.

2.3.5. Preparation of MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE

MIP was prepared on the CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE surface using electrochemical polymerization. Electropolymerized film was produced from a solution containing *o*-phenylenediamine (0.3 M), 4TB[8] A-CBF assemblies (0.1 mM), and acetate buffer (0.1 M, pH 4.5) by CV, in the range of 0.0–1.0 V for 25 cycles at a scan rate of 0.05 V s⁻¹. The

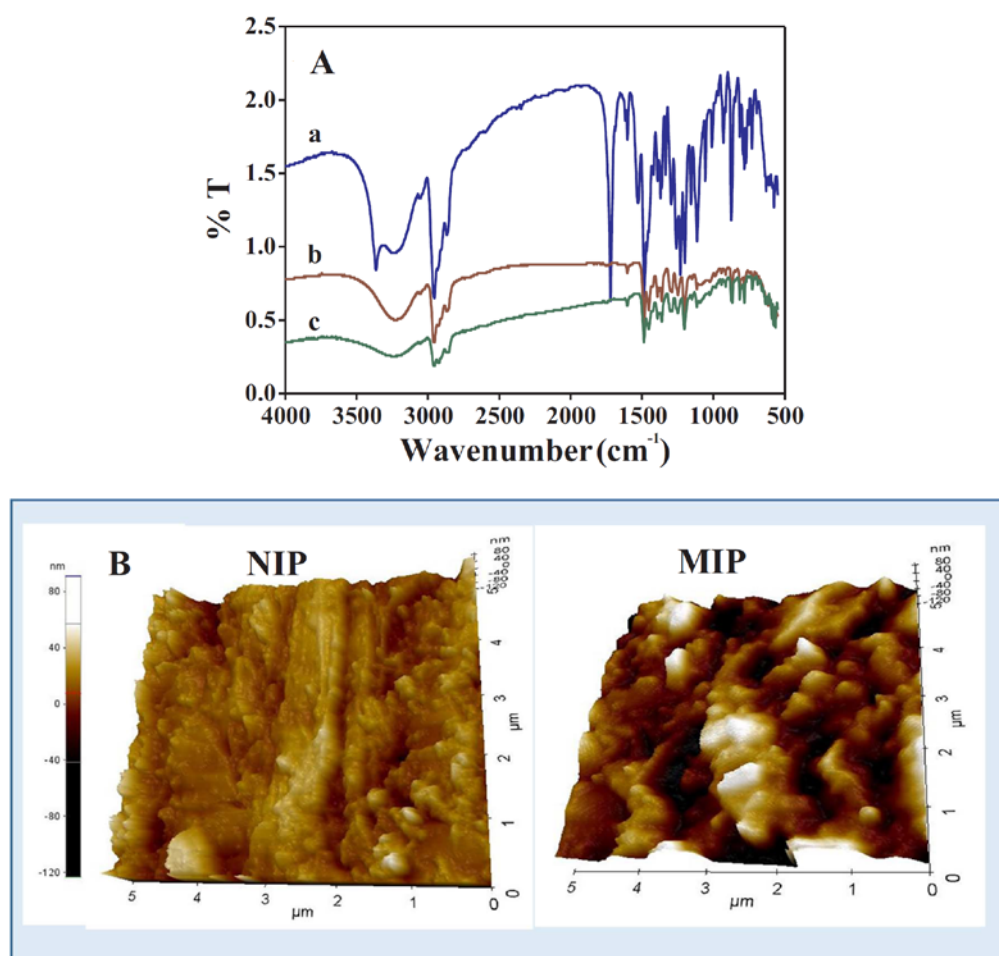


Fig. 2. Characterization of electropolymerized films: A) (a) FT-IR spectrum of MIP films before template removal and (b) MIP film after template removal, and (c) NIP film. B) AFM images of NIP and MIP film synthesized on the CNT-Fe₃O₄@Au/CPE.

electrode was washed with a mixture of formic acid and ethanol (1:1 (% v/v) ratio) for 9 min to remove remaining template molecules. Non-imprinted polymer (NIP) was prepared on the CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE using the same method, but without the CBF template.

2.4. Sample preparation

Vegetables were purchased from a local market in Ubon Ratchathani Province, Thailand. Five vegetables (cabbage, celery, chili, onion, and peppermint) were selected as samples for CBF analysis. We adopted an extraction scheme reported by Wang et.al., for fruits and vegetables [2]. Fresh vegetables were cut into small pieces. Samples were weighed into 40 g aliquots and then, each was added to 100 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0). Samples were then homogenized in a blender for 2 min. The homogenized samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min and the supernatant were collected and filtered (Whatman no. 1 filter paper). NaOH (5 mL, 1.0 M) was added to sample solution aliquots (45 mL) and then heated at 60 °C for one hour to hydrolyze any CBF present in the vegetables. Finally, the sample solution was filtered through a PTFE syringe filter (33 mm × 0.22 μm) prior to CBF determination.

2.5. Method validation

CBF concentration results obtained from the proposed FI-MIP sensor were compared to those obtained from a standard HPLC method [2]. Analysis was performed in triplicate using HPLC equipment, model CTO-10AC (Shimadzu, Japan), coupled to a SPD-20A UV/Vis detector. Separation was carried out at the following conditions: Inertsil ODS-3 (150 × 3.9 mm, 5 μm) separation column, isocratic elution with acetonitrile: water (70:30 v/v) mobile phase, 0.8 mL min⁻¹ flow rate, 20 μL injection volume, 213 nm absorbance detection, and column temperature of 25 °C.

3. Results and discussion

3.1. Characterization

3.1.1. 4TB[8] A-CBF assembly Study

Fig. S1 shows DSC curves and XRD spectra for the 4TB[8]A-CBF assemblies. The figure shows a sharp DSC endothermic peak for CBF (curve a) at 400 °C, and two sharp endothermic peaks, from 4TB[8] (curve b), at 156 and 225 °C. Endothermic peaks obtained from the physical mixture of CBF and 4TB[8]A mixture (curve c) are simply the

superposition of the CBF and 4TB[8] peaks. The assembly 4TB[8]A-CBF (curve d) produces two new endothermic peaks at 430 and 445 °C, indicating that a new state of matter is present. Fig. S1B shows XRD patterns. The main diffraction peaks for CBF (curve a) occur at 2θ angles of 10°, 12°, and 25°, and those for 4TB[8]A (curve b) occur at 8° and 20°. The main diffraction peaks for the physical mixture (curve c) appear as a superposition of the single component peaks. On the other hand, the expected peak for the 4TB[8]A-CBF assembly at a new 2θ value is not seen, because they are obscured by the CBF peaks at 10° and 12°. These DSC and XRD results indicate that inclusions were formed. The observed formation of the 4TB[8]A-CBF assembly is in good agreement with a report for 4TB[8]A-CBF imprinted polymer modified on an MWCNT/Pd-Ir coating on a glassy carbon electrode [26].

3.1.2. MIP polymerization

We investigated electropolymerization of MIP films on the CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE using CV over the range 0.0–1.0 V. Fig. S2 shows an irreversible oxidation peak present at +0.60 V. Oxidation peak current decreases with increasing numbers of cycles, because a non-conducting polymer film forms on the modified carbon-paste electrode surface. After 25 cycles, the oxidation peak current decreases to a very small value that indicates formation of MIP film on the surface of electrode [26]. Polymer film thickness increases with the number of cycles, blocking electron transfer to the electrode surface, and so the oxidation current decreases. Thus, we chose 25 cycles as optimal condition for film fabrication, because no reasonable amount of deposition occurred after that.

3.1.3. Evaluation of the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au carbon-paste electrode

Synthesized MIP and NIP films on the CNTs-Fe₃O₄@Au modified carbon-paste electrode were characterized by FTIR and AFM. Fig. 2A shows IR spectra obtained from MIP films before and after removal of the CBF template and NIP film. Fig. 2A, curve a shows the FTIR spectrum for MIP films before removal of the CBF template; we assigned bands at 3370 cm⁻¹ and 1760 cm⁻¹ to C-N and C=O stretching vibrations, respectively. Curve b in the figure shows the spectrum after removal of CBF. The two absorption bands we assigned to CBF in curve (a) are no longer present. Furthermore, the NIP film (curve c) does not show adsorption bands at 3370 cm⁻¹ or 1760 cm⁻¹. These results indicated the successful removal of CBF from the MIP film.

Surface morphology was imaged using AFM. Fig. 2B shows 3-D topographical AFM images of NIP film and MIP film. There are significant differences between CBF-imprinted and non-imprinted films. After removal of the template, the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE exhibits larger surface roughness compared to NIP/CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE, indicating that the CBF imprinted polymer has a more porous structure, with cavities formed on the surface of the film during electrodeposition of o-phenylenediamine. These cavities are not present on the NIP surface. Moreover, topography of the imprinted surface features distinct cavities formed by CBF template molecules. These observations are in good agreement with the previous reports [28,35], that increased roughness of the MIP layer increases surface area, and facilitates adsorption of template molecules.

3.2. Cyclic voltammetry of CBF

3.2.1. Electrochemical behavior of CBF at the modified electrode

The electrochemical behavior of CBF at (a) MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE and (b) NIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE were studied using CV. Fig. 3 shows a well-defined oxidation peak at the MIP sensor (curve a), while there is no obvious electrochemical response for the NIP sensor (curve b). The CBF oxidation peak at the MIP sensor appears at +0.60 V, implying that cavities formed in the MIP provide electron transfer sites for CBF molecules in the electrode surface, which then modulate the

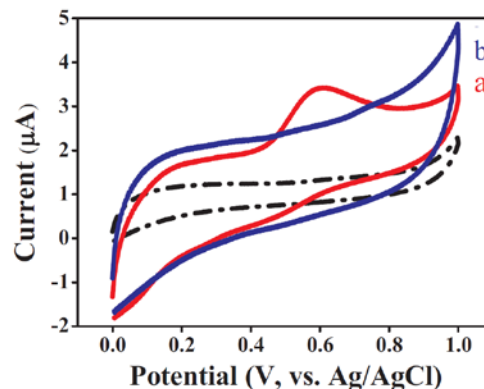
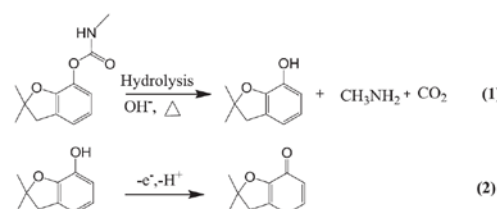


Fig. 3. CV plots obtained from 2 µM CBF in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) on the (a) MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE and (b) NIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE, using a scan rate of 0.05 V s⁻¹ (solid line); the background voltammogram is shown as a dotted line.



Scheme 1. (1) Hydrolysis of CBF and (2) Oxidative reaction of carbofuran phenol.

electrochemical signal. The oxidation current arose from diffusion of CBF molecules from binding sites on MIP to the surface of the electrode. The NIP sensor shows no peak, implying the polymer effectively prevents CBF diffusion to the electrode surface.

According to previous reports [23,31,32], alkaline solution can hydrolyze CBF at high temperatures to form carbofuran phenol (Scheme 1, Eq. (1)), which shows good electrochemical response (Scheme 1, Eq. (2)). Hence, CBF can be directly determined by electrochemical detection of its hydrolysate, carbofuran phenol. Eq. (2) illustrates the reaction mechanism associated with the observed oxidation peak on MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE at 0.60 V (Fig. 3 curve a).

3.2.2. Time required for template removal and the effect of buffer pH on the CBF signal current

We investigated the time required for template removal and the effect of buffer pH on CBF detection using CV to ensure sufficient time for complete removal of the template from the imprinted polymer film. Imprinted electrodes were immersed in formic acid: ethanol solution (10 mL, 1:1 v/v) followed by measuring the current every 3 min (Fig. 4A shows the CBF signal increasing with elution time, and then remaining constant after 9 min. We thus chose 9 min as the optimal time for CBF removal and applied this value to all further experiments.

The pH of the supporting electrolyte is a key factor in achieving an excellent electrochemical response from the MIP sensor, as pH plays an important role in interactions between template molecules and of MIP-sensor binding sites [30,35]. We investigated the effect of buffer pH on the current signal of 2 µM CBF over the range of pH 6.0–9.0. The results shown in Fig. 4B reveal that the CBF current increases with pH, and reaches a maximum at pH 8.0. Further increase in pH results in weaker signals. Therefore, we used phosphate buffer at pH 8.0 to determine CBF to achieve the maximum sensitivity.

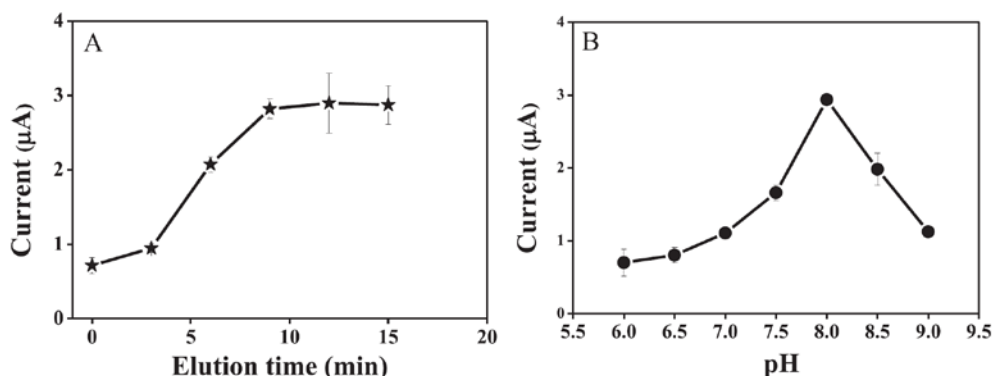


Fig. 4. Effect of A) elution time and B) pH of working solution on the MIP-sensor peak current.

3.3. Amperometric detection of CBF in an FI system

3.3.1. Optimization for CBF analysis

The FIA system was coupled with amperometric detection on the modified CPE working electrode, as previously described [33,34]. In this present work, the proposed amperometric sensor measured the CBF oxidation response at the MIP sensor (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) (Fig. 1). We investigated how the MIP and NIP sensors, the applied potential, and the flow rate affect the sensitivity and repeatability of the CBF determination. Fig. 5A shows the amperometric detection results at the NIP (curve a) and MIP (curve b) sensors over a potential range of 0.0 V to +1.0 V. The MIP sensor produces a much stronger current responses than the NIP sensor does. Over the range 0.0–1.0 V (versus Ag/AgCl), current responses increase dramatically with increasing detection potential between 0.0 and 0.50 V, and then remain constant. Thus, we chose an optimal detection potential of 0.50 V for the FIA experiment.

The CBF detection performances of NIP and MIP sensors were compared by amperometry at +0.50 V. Fig. 5B shows amperometric responses to CBF standard solutions (100 μL and 10 μM) by (a) NIP and (b) MIP sensors. The observed very low current signal for the NIP-modified CPEs indicates the presence of a compact polymer film with good blocking efficiency on the electrode surface. Sensitivity of MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE is much larger than that of the NIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE; we ascribe this superior performance to the larger surface area and excellent adsorption characteristics of cavities in the polymer film. These factors increase the rate of interaction between CBF molecules and the MIP binding sites. We investigated selectivity for MIP by calculating the peak area ratio (I_p/I_0 , where I_p and I_0 are the oxidation peak areas of MIP- and NIP- sensor, respectively). The greater ratio for MIP indicated a much greater capacity for substrate adsorption by the template formed cavities in MIP [36] compared to NIP. The peak area ratio of 14.70 for CBF (Fig. 5B) indicates that our sensor possesses a strong affinity toward CBF, because of the CBF matched cavities in the MIP sensor.

Flow rate is an important parameter in FIA-amperometric detection because it defines duration of the reaction time between electrode and analyte. We investigated the effect of flow rate on the analytical signal, in the range 0.1–1.5 mL min⁻¹. Our measurements reveal that sensitivity decreases with increasing flow rate (Fig. 5C). High flow rates result in shorter reaction times and consequently, weaker signal responses. However, increasing flow rate increases sample throughput. So, we chose an optimal flow rate of 0.5 mL min⁻¹ for satisfactory sensitivity and sample throughput.

3.4. Analytical features

We performed CBF determination using the designed MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE sensor, with amperometric detection in an FIA system, and under the optimal conditions listed in Table 1. The proposed system provides well-defined and reproducible peak profiles (Fig. 6), with a sample throughput of 61 samples per hour. Furthermore, we obtained linear calibration graph over the range of 0.1–100 μM ($r^2 = 0.998$), with a sensitivity of 0.001 μA (μM)⁻¹. The detection limit and quantification limit values were calculated based on ten consecutive measurement of the lowest concentration of the analyte in the analytical curve (0.1 μM) to estimate the standard deviation (S_b). The detection limit, determined by three times of the standard deviation of the blank ($3S_b$), is 3.8 nM for CBF. The limit of quantification, estimated by ten times of the standard deviation of the blank ($10S_b$) according to ISO11843 [33,37] is 12.7 nM.

For comparison, Table 2 compares analytical characteristics of the designed MIP sensor to those of related modified electrodes from literature. Linearity range and detection limit of the new MIP sensor are comparable with, and even exceed those obtained by other modified electrodes. Outstanding features of the developed MIP sensor are its robustness, high sensitivity, and excellent selectivity. We can generally increase the sensitivity of an electrochemical sensor by coating the electrode surface with nanomaterials; the large surface areas of these materials help to improve electron transfer. We used hybrid nanomaterials, comprising CNTs-Fe₃O₄@Au, to enhance electron transfer efficiency, and synthesized MIP on the electrode surface to create binding sites specific to the CBF molecule. Our strategy of applying CNTs-Fe₃O₄@Au nanomaterials in the sensor increases the electrode surface area, increasing the number of imprinted sites available for electron transfer, and improves sensitivity and selectivity for CBF determination.

The MIP sensor exhibits good precision (4.8% R.S.D. for 30 injections of 10 μM CBF) and good stability for CBF. Repeatability of the MIP sensors was satisfied (4.1% R.S.D. for 10 μM CBF peak-current response obtained from six different MIP electrodes). Stability of the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE was investigated by measuring the current signal for 10 μM CBF at various intervals. Fig. 7A shows that the MIP sensor retains 99% of the initial current response after repeated use for one week, when stored at ambient temperatures. These results indicate that the MIP sensor is highly stable.

3.5. Interference and application to real samples

CBF, a carbamate pesticide, is frequently used in many areas,

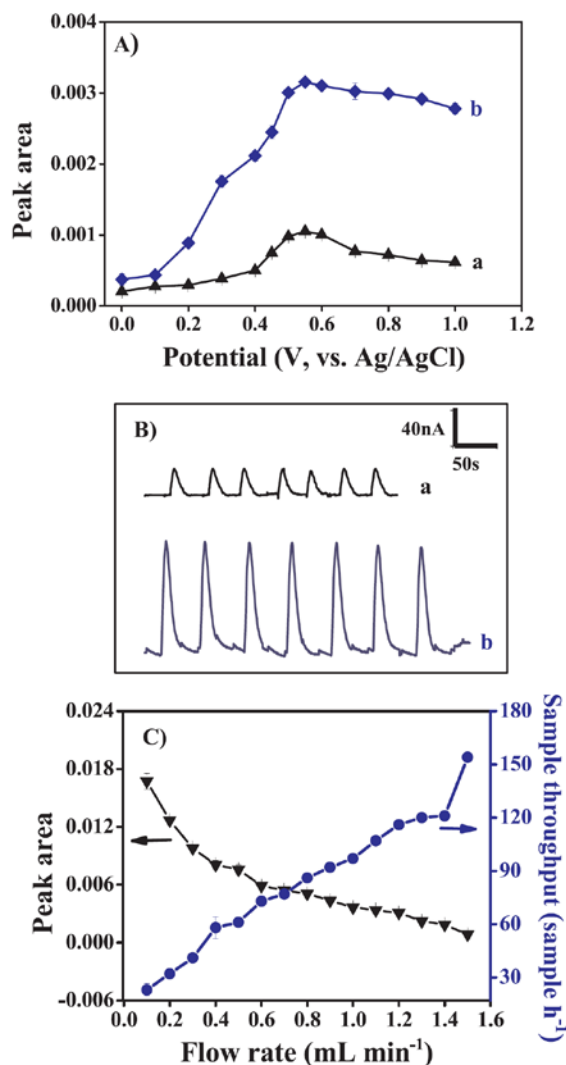


Fig. 5. A) The effect of an applied potential on (a) NIP- and (b) MIP- modified CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. B) Comparison of CBF response at the (a) NIP- and (b) MIP-modified CNTs-Fe₃O₄@Au/CPEs. C) The effect of flow rate on CBF response, at the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE; 10 μ M CBF; applied potential +0.50 V; flow rate 0.5 mL min⁻¹.

Table 1
Optimal condition for amperometric detection in our FIA system for determination of CBF.

Parameter	Optimum condition
Carrier solution	0.1 M phosphate buffer (pH8.0)
Flow rate	0.5 mL min ⁻¹
Sample volume	100 μ L
Working electrode	MIP-CNTs-Fe ₃ O ₄ @Au/CPE
Silicone gasket	Flow channel = 0.1 \times 0.6 cm
Reference electrode	Ag/AgCl
Auxiliary electrode	Stainless steel
Applied potential	+0.50 V

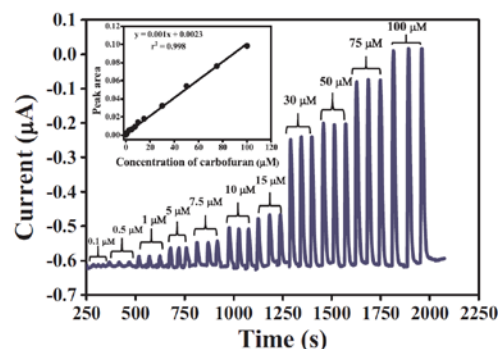


Fig. 6. Amperometric response of the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE for successive CBF injections in the FIA system with phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) at 0.50 V, flow rate 0.5 mL min⁻¹. The Inset shows a linear relationship between concentration of CBF and peak area.

Table 2
Comparison of analytical methods for the detection of CBF.

Electrode	Linearity range (μ M)	LOD (nM)	Techniques	References
CoPc/rGO/GCE	0.20–70	18.9	DPV, Batch	[2]
NiOPc/GO/CPE	5–140	1,700	Amp, FIA	[38]
GO-AuNPs/SPCE	1–250	220	DPV, Batch	[22]
Hm/GO/CPE	5–95	9	SWV, Batch	[23]
Heated-SPCE	0.4–400	50	DPV, Batch	[31]
MIP/rGO@Au/GCE	0.05–20	20	DPV, Batch	[28]
MIP-CNTs-Fe ₃ O ₄ @Au/CPE	0.1–100	3.8	Amp, FIA	This work

CoPc = cobalt phthalocyanine, rGO = reduce graphene oxide, NiOPc = nickel (II) 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H, 31H-phthalocyanine, GO = graphene oxide, AuNPs = gold nanoparticles, Hm = hemin, MIP = Molecularly Imprinted Polymer, MB = methylene blue, CNTs = Carbon nanotubes, Pd-Ir = palladium-iridium, GCE = glassy carbon electrode, CPE = Carbon-Paste Electrode, SPCE = Screen-printed Carbon Electrode, DPV = Differential Pulse Voltammetry, Amp = Amperometry, SWV = Square Wave Voltammetry.

particularly in Southeast Asia, in leaf vegetables and fresh herbs production [39]. The developed MIP sensor was designed for quantification of carbofuran in vegetable samples acquired locally. Selective recognition of the template molecule is an important benefit of the MIP sensor. To evaluate selectivity of the proposed MIP sensor, we investigated the effect of other organic compounds, including caffeine, phenol, and hydroquinone, and inorganic compounds such as (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, Na₂CO₃, NaNO₃ KCl, NaCl, CH₃COONa, and CaCl₂, on the FI signals obtained from 10 μ M CBP. These foreign compounds were selected to study their effect because they could be found in vegetable extracts or similar food product. Apparently, MIP provide selective analysis due to their recognition or binding site that specific for target molecule. The binding sites were formed during the polymerization process and the cavities revealed after removal of the template. The foreign compounds that selected for interference study should have the chemical structure similar to carbofuran phenol (the product of reaction in Eq. (1)). The analogs organic compounds were tested due to its electrochemical activity and structural similarity. We therefore did not investigate the effect of other pesticides which the chemical structures are not similar to carbofuran phenol. The tolerance limit is defined as the maximum concentration of a substance that causes a variance greater than $\pm 5\%$. Fig. 7B shows the tolerance limits of interfering substances. The results reveal that a 100-fold excess of MgSO₄, Na₂CO₃, NaNO₃ KCl, NaCl, CH₃COONa, or CaCl₂ have no obvious effects on the oxidation response to CBF. Fifty-fold excess concentrations of (NH₄)₂SO₄, phenol, or caffeine, or a 10-fold excess of

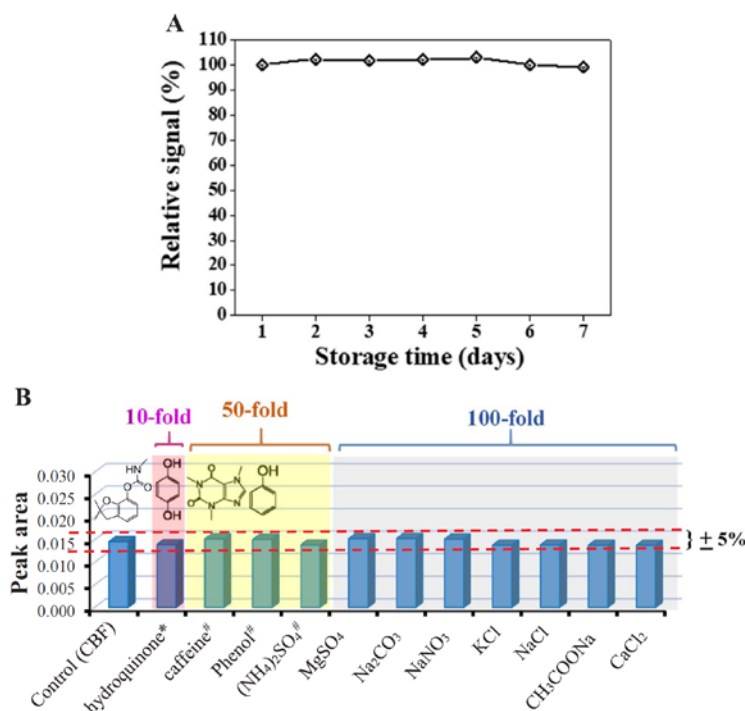


Fig. 7. A) The storage stability of the MIP/CNT-Fe₃O₄@Au/CPE using 10 μM CBF. B) Selectivity of the developed MIP sensor for CBF determination; comparison between the peak area obtained from 10 μM CBF (control) and the peak areas of 10 μM CBF with interfering substances. Dotted lines show the ± 5% signal alteration range.

Table 3
Comparison of CBF determination in vegetables between the developed MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE and the reference HPLC method.

Samples	Concentration (μM)			Relative error (%)	Recovery (%)	RSD (%)
	Added	HPLC method ^a	Proposed method ^a			
Cabbage	–	< LOQ	< LOQ	–	–	–
	1.00	1.01	1.03	1.98	102.6	0.6
	5.00	5.30	5.29	–0.18	105.7	1.5
Celery	–	< LOQ	< LOQ	–	–	–
	1.00	0.99	1.03	4.01	107.9	1.8
	5.00	5.19	5.44	4.82	109.0	0.9
Chili	–	< LOQ	< LOQ	–	–	–
	1.00	0.97	1.02	5.15	102.8	3.5
	5.00	5.01	5.10	1.80	104.2	2.6
Onion	–	< LOQ	< LOQ	–	–	–
	1.00	1.06	1.05	–1.51	95.3	4.1
	5.00	5.24	5.08	–3.05	99.7	3.3
Peppermint	–	< LOQ	< LOQ	–	–	–
	1.00	1.01	1.03	1.98	103.7	1.9
	5.00	5.45	5.34	–2.02	104.9	2.7

^a Each value is the mean average of three measurements.

hydroquinone, do not interfere with CBF determination. We conclude that our designed MIP sensor provides good selectivity for amperometric determination of CBF.

The MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE was applied to determine CBF in vegetable samples (cabbage, celery, chili, onion, and peppermint) and thus to evaluate the practical application of the sensor. The respective experiments were carried out by FIA with amperometric detection under optimized conditions, using a standard addition method. As shown in Table 3, all samples were either contaminated with CBF concentrations below the limit of quantification (< LOQ) or absolutely free of CBF. The determined values obtained from our sensor compared well with measurements obtained using the reference HPLC method. The relative differences between data obtained from the sensor and that

obtained using the HPLC method fall in the range 0.2–5.2%.

In this work, simple liquid extraction was performed using blender and centrifuge to separate and phosphate buffer as the extractant. The method can be carried out easily and does not require further pre-concentration or clean up step. Whereas the sample preparation in the other works, for example, in the previous report [14] using acetonitrile as extractant and the extract need to purge with N₂ gas to dryness prior to re-dissolved in acetonitrile and determined by CE. The sample preparation for GC [13] and HPLC [11,12] are often required clean-up step or pre-concentration after extracted by using the organic solvent. On the other hand, our sample preparation needs only extraction with no further clean up or pre-concentration step and trends to reducing the amount of organic solvent wastes generated in the sample procedure.

From the sample preparation, 40 g of vegetable was extracted using 100 mL buffer followed by mixing 45 mL of the extracted solution with 5 mL of 1.0 M NaOH to hydrolyze CBF. After filtration, this solution was analyzed by the MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE sensor. Suppose the vegetable sample contains CBF at the MRLs (0.1 mg kg⁻¹) and the extraction is completed. The amount of CBF in the resulting extraction is ~0.036 mg or ~0.16 μM whereas our calibration linear ranged from 0.1 to 100 μM. Therefore, this preliminary result clearly demonstrated that our method is sensitive enough for measuring CBF in vegetables. These results reveal that our MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE sensor is sufficiently accurate, and is suitable for the quantification of CBF in vegetable samples.

4. Conclusion

We propose a simple FI system with a novel molecularly-imprinted amperometric sensor (MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) for sensitive and selective determination of CBF in vegetables. The MIP sensor was successfully fabricated by polymerization on the surface of a carbon-paste electrode, decorated with carbon nanotubes and gold-coated magnetite (CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE). The CBF MIP-sensor was fabricated in a solution of *o*-phenylenediamine in the presence of 4TB[8]A-CBF inclusion as the template molecule. Incorporating CNTs-Fe₃O₄@Au nanomaterials in the sensor significantly increases its surface area, and increases the number of available imprinted sites, resulting in improved sensitivity and electron transfer. Thus, our designed MIP-CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE is well suited for sensitive and selective CBF determination. CBF was quantified using amperometric measurements at the MIP sensor, which was assembled within an in-house flow cell at an applied potential of +0.50 V and flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The proposed MIP provides a linear range of 0.1–100 μM and a detection limit of 3.8 nM. The MIP sensor exhibits high stability, and provides reproducibility with good performance when applied to CBF determination in vegetables.

Acknowledgments

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF: RSA6080062), the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education (OHEC), Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST), and the Faculty of Science at Ubon Ratchathani University (UBU) are gratefully acknowledged. The authors would also like to thank the ASEA-UNINET Staff Exchange Program.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.064>.

References

- [1] W. Gui, M. Jin, L. Sun, Y. Guo, G. Zhu, Residues determination of carbafuran in vegetables based on sensitive time-resolved fluorescence immunoassay, *Food Agric. Immunol.* 20 (2009) 49–56.
- [2] M. Wang, J. Huang, M. Wang, D. Zhang, J. Chen, Electrochemical non-enzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbafuran and carbaryl in fruits and vegetables, *Food Chem.* 151 (2014) 191–197.
- [3] X. Sun, Y. Zhu, X. Wang, Amperometric immunosensor based on deposited gold nanocrystals/4,4'-triobisbenzene thiol for determination of carbafuran, *Food Control.* 28 (2012) 184–191.
- [4] G.F. Grawe, T.R. Oliveira, E.A. Narciso, S.K. Moccelini, A.J. Terezo, M.A. Soares, M. Castilho, Electrochemical biosensor for carbafuran pesticide based on esterases from *eupeccillium shearii* FREI-39 endophytic fungus, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 407–413.
- [5] S. Wanwimolruk, O. Kanchanamayoon, K. Phopin, V. Prachayasittikul, Food safety in Thailand 2: pesticide residues found in Chinese kale (*Brassica oleracea*), a commonly consumed vegetable in Asian countries, *Sci. Total Environ.* 532 (2015) 447–455.
- [6] Pesticide residues in food, *Evaluation* 1994 (131/1, 131/2) FAO/WHO.
- [7] Y. Dai, T. Wand, X. Hu, S. Liu, M. Zhang, C. Wang, Highly sensitive micocantilever-based immunosensor for the detection of carbafuran in soil and vegetable samples, *Food Chem.* 229 (2017) 432–438.
- [8] Q. Zhang, Q. Qu, S. Chen, X. Liu, P. Li, A double-label time-resolved fluorescent strip for rapidly quantitative detection of carbafuran residues in agro-product, *Food Chem.* 231 (2017) 295–300.
- [9] S. Li, X. Wu, C. Yin, J. Luo, Z. Xu, Application of DNA aptamers as sensing layers for detection of carbafuran by electrogenerated chemiluminescence energy transfer, *Anal. Chim. Acta* 941 (2016) 94–100.
- [10] M.I. Pinto, G. Sontag, R.J. Bernardino, J.P. Noronha, Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques, *Microchem. J.* 96 (2010) 225–237.
- [11] A. Abad, M.J. Moreno, R. Pelegri, M.I. Martinez, A. Saez, M. Gamon, A. Montoya, Determination of carbaryl, carbafuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection—An analytical comparison, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 3–12.
- [12] Y. Guo, R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 137–147.
- [13] L.J. Han, L.M. Wang, Determination of methamidophos, flolimat and carbafuran by GC method in two vegetables, *Chin. J. Pestic. Sci.* 3 (2001) 84–92.
- [14] X. Lin, Q. Hong, X. Wu, L. Guo, Z. Xie, Analysis of phenoxyl-type N-methylcarbamate pesticide residues in vegetables by capillary zone electrophoresis with pre-column hydrolysis and amperometric detection, *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 615.
- [15] H. Li, I. Rlcorde, L. Tong, L.M. Schopfer, F. Baud, B. Megarbane, E. Maury, P. Masson, O. Lochridge, Carbafuran poisoning detected by mass spectrometry of butyrylcholinesterase adduct in human serum, *J. Appl. Toxicol.* 29 (2009) 149–155.
- [16] C. March, J.J. Manclus, Y. Jimenez, A. Arnau, A. Montoya, A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices, *Talanta* 78 (2009) 827–833.
- [17] X. Sun, S. Du, X. Wang, Amperometric immunosensor for carbafuran detection based on gold nanoparticles and PB-MWCNTs-CTS composite film, *Eur. Food Res. Technol.* 235 (2012) 469–477.
- [18] T. Jayapragasam, R. Saraswathi, Electrochemical biosensing of carbafuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide-chitosan nanocomposite, *Sens. Actuators B* 191 (2014) 681–687.
- [19] D. Du, M. Wang, J. Cai, Y. Tao, H. Tu, A. Zhang, Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing, *Analyst* 133 (2008) 1790–1795.
- [20] H. Yin, S. Ai, J. Xu, W. Shi, L. Zhu, Amperometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase on gold nanoparticles and silk fibroin modified platinum electrode for detection of methyl paraoxon, carbafuran and phoxim, *J. Electroanal. Chem.* 637 (2009) 21–27.
- [21] B. S.-Rodriguez, J. G.-Salamo, J. H.-Borges, M.A. R.-Delgado, Recent applications of nanomaterials in food safety, *Trends Anal. Chem.* 96 (2017) 172–200.
- [22] F.C. Moraes, L.H. Mascaró, S.A.S. Machado, C.M.A. Brett, Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode, *Talanta* 79 (2009) 1406–1411.
- [23] A. Jirasrichote, E. Punrat, A. Suea-Ngam, O. Chailapakul, S. Chuanwatanakul, Voltammetric detection of carbafuran determination using screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide, *Talanta* 175 (2017) 331–337.
- [24] A. Wong, E.M. Materon, M.D. Pilar, T. Sotomayor, Development of a biomimetic sensor modified with hemin and graphene oxide for monitoring of carbafuran in food, *Electrochim. Acta* 146 (2014) 830–837.
- [25] J. Wackerlig, P.A. Lieberzeit, Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing synthesis, characterization and application, *Sens. Actuators, B* 207 (2015) 144–157.
- [26] S. Li, G. Yin, X. Wu, C. Liu, J. Luo, Supramolecular imprinted sensor for carbafuran detection based on a functionalized multiwalled carbon nanotube-supported Pd-Ir composite and methylene blue as catalyst, *Electrochim. Acta* 188 (2016) 294–300.
- [27] A. Wong, M.V. Foguel, S. Khan, F. Midori de Oliveira, C.R.T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, Development of an electrochemical sensor modified with MWCNT-COOH and MIP for detection diuron, *Electrochim. Acta* 182 (2015) 122–130.
- [28] X. Tan, Q. Hu, J. Wu, X. Li, P. Li, H. Yu, X. Li, F. Lei, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of carbafuran, *Sens. Actuators, B* 220 (2015) 216–221.
- [29] L. Zhao, F. Zhao, B. Zeng, Electrochemical determination of carbaryl by using a molecularly imprinted polymer/graphene-ionic liquid-nano Au/chitosan-AuPt alloy nanoparticles composite film modified electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 1366–1377.
- [30] X. Tang, D. Zhang, T. Zhou, D. Nie, Q. Yang, L. Jin, G. Shi, Fe₃O₄@Au sphere molecularly imprinting with self-assembled monolayer for the recognition of parathion-methyl, *Anal. Methods* 3 (2011) 2313–2321.
- [31] H. Wei, J.J. Sun, Y.M. Wang, X. Li, G.N. Chen, Rapid hydrolysis and electrochemical detection of trace carbafuran at a disposable heated screen-printed carbon electrode, *Analyst* 133 (2008) 1619–1624.
- [32] M.R. Jan, J. Shah, H. Khan, Investigation of new indirect spectrophotometric method for the determination of carbafuran in carbamate pesticides, *Chemosphere* 52 (2003) 1623–1626.
- [33] W. Sroysee, K. Ponlakheth, S. Chairam, P. Jarujamrus, M. Amatatongchai, A sensitive and selective on-line amperometric sulfite biosensor using sulfite oxidase

- immobilized on a magnetite-gold-folate nanocomposite modified carbon-paste electrode, *Talanta* 156–157 (2016) 154–162.
- [34] M. Amatatongchai, W. Sroysee, S. Chairam, D. Nacapricha, Amperometric flow injection analysis of glucose using immobilized glucose oxidase on nano-composite carbon nanotubes-platinum nanoparticles carbon paste electrode, *Talanta* 166 (2017) 420–427.
- [35] M. Arvand, M. Zamani, M.S. Ardaki, Rapid electrochemical synthesis of molecularly imprinted polymers on functionalized multi-walled carbon nanotubes for selective recognition of sunset yellow in food samples, *Sens. Actuators, B* 243 (2017) 927–939.
- [36] Y. Zheng, Y. Zhou, T. Zhou, G. Shi, A novel composite of reduced graphene oxide and molecularly imprinted polymer for electrochemical sensing 4-nitrophenol, *Electrochim. Acta* 130 (2014) 504–511.
- [37] ISO 1, 1843 Capability of Detection, Part 1/II, Geneva, 19.
- [38] A. Wong, M.D. Pilar, T. Sotomayor, Determination of carbofuran and diuron in FIA system using electrochemical sensor modified with organometallic complexes and graphene oxide, *J. Electroanal. Chem.* 731 (2014) 163–171.
- [39] L.G. Skretting, B. Lyrén, B. Holen, A. Jansson, P. Fohgelberg, K. Siivinen, J.H. Andersen, B.H. Jensen, Pesticide residues in food of plant origin from Southeast Asia-A Nordic project, *Food Control* 51 (2015) 225–235.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Novel three-Dimensional molecularly imprinted polymer-coated carbon nanotubes (3D-CNTs@MIP) for selective detection of profenofos in food

Maliwan Amatatongchai ^{a, b, *}, Wongduan Sroysee ^{a, b}, Porntip Sodkrathok ^{a, b}, Nuttapol Kesangam ^{a, b}, Sanoe Chairam ^{a, b}, Purim Jarujamrus ^{a, b}

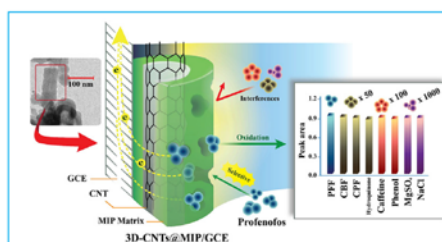
^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

^b Nanomaterials Science, Sensors & Catalysis for Problem-Based Projects, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

HIGHLIGHTS

- 3D-CNTs@MIP was synthesized by successively coated the CNTs-COOH with SiO₂, vinyl end groups and terminated with MIP shells.
- The proposed 3D-CNTs@MIP exhibits high accuracy, sensitivity, selectivity and fast response for PFF detection in vegetable samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2019

Received in revised form

14 April 2019

Accepted 18 April 2019

Available online 24 May 2019

Keywords:

Profenofos

Molecularly imprinted polymers

Carbon nanotubes

Amperometry

Sensor

ABSTRACT

A new and facile method for selective measurement of profenofos (PFF) using a simple flow-injection system with a molecularly-imprinted-polymer-coated carbon nanotube (3D-CNTs@MIP) amperometric sensor is proposed. The 3D-CNTs@MIP was synthesized by successively coating the surface of carboxylated CNTs with SiO₂ and vinyl end groups, then terminating with molecularly imprinted polymer (MIP) shells. MIP was grafted to the CNT cores using methacrylic acid (MAA) monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross linker, and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator. We constructed the PFF sensor by coating the surface of a glassy carbon electrode (GCE) with 3D-CNTs@MIP and removed the imprinting template by solvent extraction. Morphological and structural characterization reveal that blending of the MIP on the CNT surface significantly increases the selective surface area, leading to greater numbers of imprinting sites for improved sensitivity and electron transfer. The 3D-CNTs@MIP sensor exhibits a fast response with good recognition when applied to PFF detection by cyclic voltammetry and amperometry. The PFF oxidation current signal appears at +0.7 V vs Ag/AgCl using 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) as the carrier solution. The designed 3D-imprinted sensor provides a

* Corresponding author. Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand.

E-mail address: maliwan.a@ubu.ac.th (M. Amatatongchai).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.075>

0003-2670/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

linear response over the range 0.01–200 μM ($r^2 = 0.995$) with a low detection limit of 0.002 μM (3σ). The sensor was successfully applied to detection of PFF in vegetable samples.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A simple flow-injection system based on on-line amperometric detection at the MIP sensor was developed for selective and sensitive determination of profenofos (PFF), a moderately toxic and common organophosphate insecticide used in agriculture in Asia [1]. It is extensively used in many countries, such as Thailand, Vietnam, and India, and in other countries, including Australia, China, and Korea [2–5]. The World Health Organization (WHO) classifies PFF as a moderately hazardous (toxicity class II) pesticide [6,7]. Therefore, its detection is necessary for farm-produced products. Quantitative analysis of PFF generally uses gas chromatography coupled with a nitrogen-phosphorus detector [8], or mass spectroscopy [9] coupled with high-performance liquid chromatography [10] or biosensors with acetylcholinesterase (AChE) enzyme [11,12]. Although these techniques provide high selectivity and sensitivity, and are suitable for PFF analysis, the methods are somewhat time consuming, require expert operators, require expensive instrumentation [8–10], and are subject to denaturation of the AChE enzyme and consequent loss of enzyme activity [11,12].

Non-enzymatic electrochemical sensors using chemically modified electrodes are an alternative method for the sensitive determination of organophosphate compounds. Molecularly imprinted polymers (MIP) have attracted increasing attention in recent years. MIP is an ideal material for artificial receptor design, and offers high analyte selectivity [13,14]. Generally, MIP is used to create recognition sites in synthetic polymers, that are chemically and sterically complementary to a target molecule. MIP-based sensors offer many benefits, including mechanical, chemical, and thermal stability, short synthesis times, cost effectiveness, and high selectivity. MIP sensors have the potential to replace enzyme- or antibody-based detection methods [14–17].

Although using MIPs as recognition elements can improve selectivity, there are limitations, including long response times, uneven distribution of binding sites, slow diffusion of target molecule across the imprinted film, and low sensitivity, and these problems remain unsolved. To improve sensitivity, researchers have reported new materials, including graphene-chitosan composite [18], TiO_2 /carbon aerogel [19], mesoporous silica-coated CNTs [20], carbon nanotubes (CNTs) [21], CNTs@Cu nanoparticles [22], and CNTs/silica coaxial nano cables [23] to enhance imprinting sites and electron transfer efficiency. Introducing nano-sized structures by using CNTs to imprint sites offers several advantages, including significant increases in the respective selective surface area, which leads to greater numbers of imprinted sites and consequent improvements in selectivity, sensitivity, and electron transfer, while providing straightforward synthesis and low costs [20–23].

Several MIP were proposed for PFF detection, such as using quartz crystal microbalance (QCM) [15] and surface plasmon resonance (SPR) on thin films [24] and fiber optics [7]. PFF-MIP sensors using QCM and SPR, were synthesized using MAA/EGDMA [15] and MAA/trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) [7,24]. To the best of our knowledge, there are no reports of using PFF-MIP in an electrochemical sensor. Moreover, this is the first reported application of grafting PFF-MIP to a CNT surface and using the designed electrode as an amperometric sensor in an FIA system.

Herein, silica was selected to encapsulate the CNTs (CNTs@ SiO_2) to improve dissolution and electro catalytic properties. Functionalizing CNTs with SiO_2 alters the exposed CNT surface without disrupting CNT structure. Encapsulation endows a synergistic catalytic effect between the porous silica and CNT electrical conductivity. We report fabrication of a novel PFF sensor, based on a glassy carbon electrode (GCE) modified with MIP coated 3D-CNTs (3D-CNTs@MIP/GCE). The synthesis was performed by coating carboxylated CNTs with tetraethoxy silane (TEOS) to afford CNTs- SiO_2 . Addition of vinyltrimethoxy silane (VTMOS) forms polymerizable vinyl end groups, and finally, MIP is grafted to the CNTs- SiO_2 -vinyl surface. To construction of the PFF sensor, a 3D-CNTs@MIP dispersion is coated on the GCE surface and the PFF template is removed to furnish the imprinted 3DCNTs@MIP/GCE device. The proposed imprinted sensor exhibits high stability, reproducibility, and good performance for PFF determination in vegetables.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals were analytical grade. Deionized-distilled water (Water Pro-Ps, USA) was used for standard and reagent preparation. Carboxylated functionalized multiwall-carbon-nanotubes (CNTs-COOH, diameter: 15 ± 5 nm, length: 1–5 μm , purity: >95%) were purchased from Nanolab Inc. (MA, USA). Tetraethoxysilane (TEOS) and ammonia (25%) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA). Methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), vinyltrimethoxysilane (VTMOS), and profenofos (PFF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A stock solution of PFF (5 mM) was prepared by hydrolysis and then stored in darkness at 4 °C. The hydrolysate of PFF was obtained by dissolving in NaOH-methanol (3:1 ratio).

2.2. Apparatus

2.2.1. Cyclic voltammetry (CV)

Cyclic voltammetric measurements were performed using an eDAQ potentiostat (model EA161, Australia) equipped with an e-corder 210 and e-Chem v2.0.13 software. The active surface area for the GCE (diameter 3 mm, CH Instruments, USA) was approximately 0.07 cm^2 . A conventional three-electrode cell assembly, consisting of a working electrode (3D-CNTs@MIP/GCE electrode), a reference electrode (Ag/AgCl), and a counter electrode (stainless steel) was used. The cyclic voltammograms were recorded at a scan rate of 50 mV s^{-1} and a potential range between –1.0 and 1.0 V using a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) as the supporting-electrolyte solution.

2.2.2. Amperometric detection using a simple flow-injection (FI) system

An in-house fabricated electrochemical cell was used for the amperometric detection of PFF [25]. MIP sensor amperometric measurement was performed using a Shimadzu pump (model LC-10AD, Japan), a Rheodyne injector (model 7725, USA) fitted with 100 μL sample loop. An eDAQ potentiostat (EA161), equipped with

an e-corder 210, Chart v5.5.11 software, and with a three-electrode thin-layer flow cell (CH Instruments, USA). The 3D-CNTs@MIP/GCE served as the working electrode, Ag/AgCl as the reference electrode, and a stainless steel tube as the counter electrode. The active surface area was separated by a silicone rubber spacer (flow channel, 0.1×0.6 cm) that covered the GCE surface (electrode area, ca. 0.06 cm²).

2.2.3. Characterization

Nanocomposite structure and composition were examined by Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy, recorded with a spectrum II spectrometer (PerkinElmer, USA) over the range of 4000 – 500 cm⁻¹ (KBr pellet). Morphology and sizes of 3D-CNTs@MIP nanocomposites were investigated using a JEM-1230 transmission electron microscope (TEM; JEOL, Japan) and scanning electron microscope (SEM, JEOL, JSM-6460LV, Japan), operated under vacuum at an accelerating voltage of 20 kV. Surface roughness of the 3D-CNTs@MIP and CNTs@NIP were determined by atomic force microscopy (AFM; Park Systems Corp., Korea).

2.3. Preparation of the PFF sensor

2.3.1. Synthesis of SiO₂-coated CNTs (CNTs@SiO₂)

CNTs@SiO₂ nanomaterials were synthesized by a method adopted from Yang et al. [26] and Fan et al. [27]. Briefly, carboxylated carbon nanotubes (CNTs-COOH) were functionalized with silica by dispersion of 40 mg CNTs-COOH in 30 mL ethanol in an ultrasonic bath for 30 min. Next, 2 mL NH₃ was slowly added to the dispersion under vigorous mechanical stirring before 800 μ L TEOS was dropped into the solution. Stirring was continued for 3 h at room temperature and finally, the CNTs-SiO₂ nanomaterials were centrifuged, washed with water, and dried at 50 °C in an oven.

2.3.2. Preparation of CNTs@SiO₂-vinyl nanocomposites

The CNTs@SiO₂ nanocomposite surfaces were grafted with vinyl end groups using the following procedure. A 40 -mg mass of CNTs@SiO₂ was dispersed into 30 mL ethanol, then NH₃ (2 mL) and VTMS (1000 μ L) were sequentially added to the suspension under continuous stirring, and stirring was continued a further 8 h at room temperature. The suspension was centrifuged then washed with water and methanol. Finally, the obtained particles were soaked in 1 M HCl for 12 h to remove any remaining particles uncoated with silica. The vinyl-functionalized CNTs@SiO₂ particles (CNTs@SiO₂-vinyl) were centrifuged, rinsed repeatedly with water, and then dried at 50 °C 1 h.

2.3.3. Preparation of CNTs@SiO₂-MIP

CNT@MIP particles were prepared by a method adopted from Fan et al. [27]. First, 40 mg of CNTs@SiO₂-vinyl were dispersed into 25 mL of chloroform in a 50 -mL round-bottomed flask. Then, PFF template (0.26 mmol) and the functional monomer, MAA, (1.20 mmol) were added to the solution. The mixture was sonicated for 10 min and then stood for 6 h at room temperature to ensure thorough mixing. EGDMA cross linker (1.20 mmol) and AIBN initiator (0.02 mmol) were added. The mixture was purged with nitrogen for 5 min to remove oxygen, then the flask was sealed and the mixture magnetically stirred at 60 °C for 24 h. The resulting product (CNT@SiO₂-MIP) was collected by centrifugation and washed thoroughly with ethanol to remove excess reagent. The CNTs@MIP particles were dried under vacuum for 12 h. For comparison purposes, we grafted non-molecularly imprinted polymer to the CNTs@SiO₂-vinyl surface (CNTs@NIP) by following the same procedure, without the PFF template.

2.3.4. 3D-CNTs@MIP/GCE

Prior to modification, the GCE was polished using 1.0 and then 0.05 μ m alumina slurries and rinsed with DI water, then sonicated in DI water for 5 min to remove residual abrasive particles. After washing, 40 μ L of the CNT@SiO₂-MIP dispersion (1 mg mL⁻¹) in DMF was dropped onto the GCE surface and then dried at room temperature. Finally, the PFF template was removed by immersing CNT@SiO₂-MIP/GCE into a solution of acetic acid and methanol ($1:9$ ratio) for 1 h.

2.4. Sample preparation and method validation

To evaluate the practical applicability of the prepared sensor, vegetable samples were assayed using a spiked recovery experiment. Spring onion, tomato, Chinese cabbage, cabbage, green pepper, and chili pepper were purchased from a local market in Ubon Ratchathani Province, Thailand. Samples were prepared following an extraction method described by Wang et al. [28]. Briefly, 50 g samples of various vegetables were weighed and 45 mL of 0.1 M PBS (pH 7.0) and 5 mL of a solution mixture of methanol and NaOH were added. The mixture was homogenized in a blender for 2 min, then centrifuged at $10,000$ rpm for 5 min, filtered through a PTTE syringe filter (33 mm \times 0.22 μ m), and the obtained supernatant collected for PFF detection. PFF concentration results obtained from the proposed MIP sensor were compared to those obtained from a HPLC method. Analysis was performed using HPLC equipment, model CTO-10AC (Shimadzu, Japan), coupled to a SPD-20A UV/Vis detector [29].

3. Results and discussion

3.1. Characterization

Fig. 1 shows a schematic representation of the synthesized 3D-CNTs@MIP. Tetraethoxysilane (TEOS) was coated on the surface of CNTs-COOH using a sol-gel technique, to afford CNTs@SiO₂. Polymerizable vinyl end groups were then added to the CNTs@SiO₂ surface to create CNTs@SiO₂-vinyl. Finally, MIP was grafted to the CNTs@SiO₂-vinyl surface, forming CNTs@MIP. MIP was successfully attached to the surface using PFF as template, MAA as a monomer, EGDMA as a cross linker, and AIBN as an initiator, to form CNTs@MIP. The CNTs@MIP product was washed thoroughly with a solution of acetic acid and methanol to remove PFF, leaving behind imprinted cavities in the CNTs@MIP nanocomposite surface, thus, 3D-CNTs@MIP was obtained.

SEM and TEM micrographs show the morphology of 3D-CNTs@MIP (Fig. S1). The SEM image in Fig. S1A shows that 3D-CNTs@MIP has a rough surface with uniformly distributed pores. The TEM image in Fig. S2B shows the diameter of the tubular uncoated CNTs to be approximately 14.3 nm, whereas the thickness of the 3D-CNTs@MIP coating is about 78 nm. The CNTs are covered with an MIP lamella throughout the CNT tubular structure.

To confirm the formation of 3D-CNTs@MIP, structure and nanocomposites morphology were investigated by FT-IR spectroscopy and AFM. FT-IR spectra of 3D-CNTs@MIP (Fig. 2A) before (curve a) and after (curve b) removal of PFF template molecules. Also, CNTs@NIP (curve c) were compared with PFF (curve d). Before template removal, MIP film shows absorption bands at 1456 , 1293 , 1044 , and 958 cm⁻¹ (Fig. 3A, curve a), which we attribute to C–H, P=O, P–O–C and P–S stretching in PFF, respectively. After template removal, the MIP (curve b) and NIP film (curve c) exhibit absorption bands at 1640 , 1092 , and 798 cm⁻¹, which we assign to C=O, Si–O–Si, and Si–OH vibrations, respectively. These spectra indicate successful silane coating of the CNTs and the subsequent polymerization of MIP. The absence of any adsorption bands

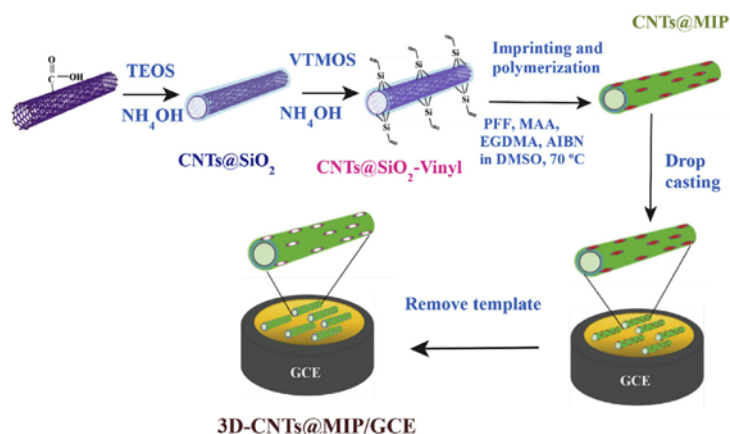


Fig. 1. Preparing 3D-CNTs@-MIP and the fabrication of the MIP sensor for PFF.

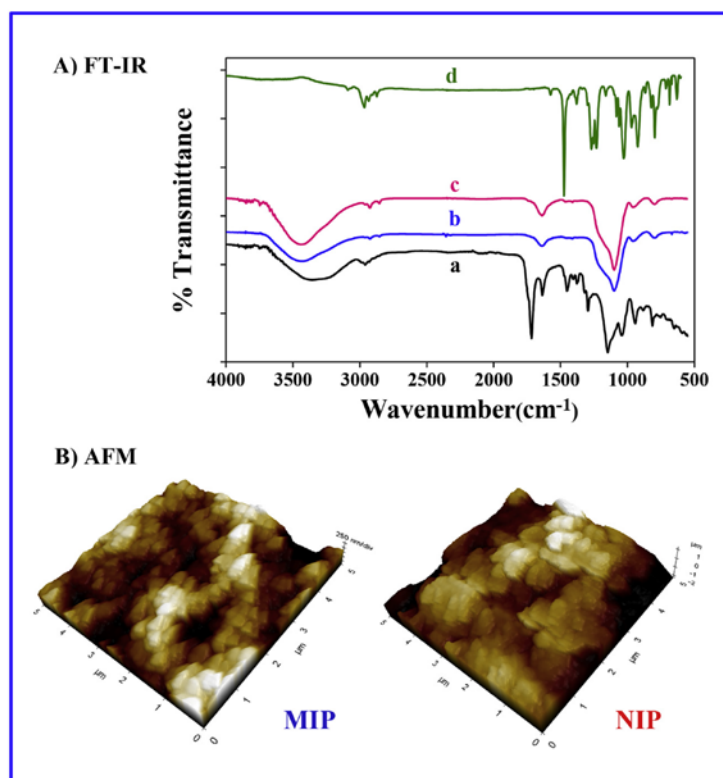


Fig. 2. (A) FT-IR spectra of a) 3D-CNTs@-MIP template before template removal, b) the MIP after template removal and c) 3D-CNTs@-NIP, and d) PFF. B) AFM images of 3D-CNTs@-MIP and 3D-CNTs@-NIP.

characteristic of PFF as seen in curve c (MIP film after template removal) indicates successful removal of PFF from the MIP film. Our observations are in good agreement with previous reports [20,22,26], that CNTs@MIP forms via an organo-silane linkage.

Surface roughness of the as-prepared 3D-CNTs@MIP (MIP) and CNTs@NIP (NIP) were imaged by AFM (Fig. 2B). The MIP film shows

greater roughness and depth than the NIP. Moreover, the MIP-film topography exhibits porous features, with well-defined cavities and a rugged structure, while cavities are not present on the NIP surface. We attribute the porous MIP morphology to the PFF imprinted cavities formed on the surface, left after template removal by solvent washing. These results indicated that the 3D-CNTs@MIP

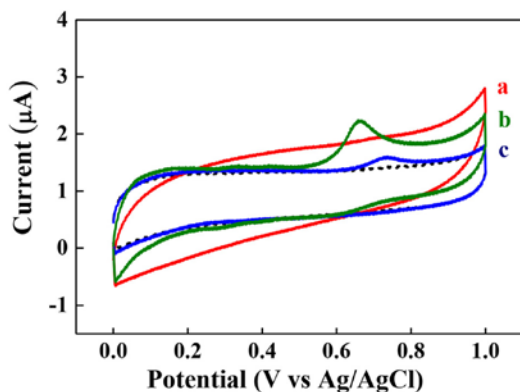
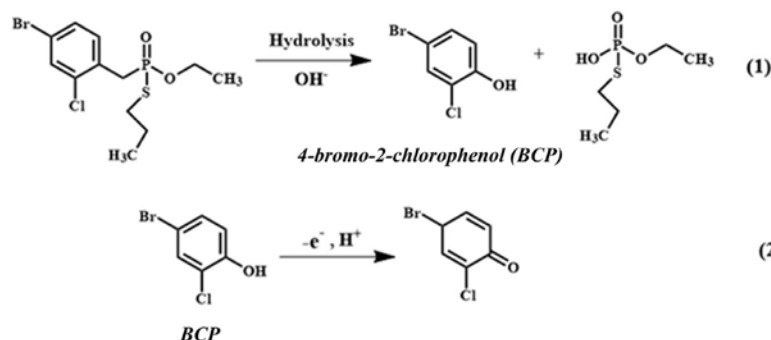


Fig. 3. CVs plots obtained from 5 μ M of PFF in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0 at (a) CNTs@SiO₂/GCE, (b) 3D-CNTs@MIP/GCE, and (c) 3D-CNTs@NIP/GCE electrodes. Scan rate = 0.05 V s⁻¹, the dotted line shows the background voltammogram.

for PFF via π - π and p- π , interactions and toward hydrogen bonding between the functional monomer, template, and matrix. The observation that MIP has a stronger affinity for analyte molecules is in good agreement with previous reports [20,22,26,29].

Solution pH affects both electron transfer rate and rebinding of the template molecule [18,29]. The effect of buffer pH on oxidation peak current and the peak potential was investigated for pH 5–9 using 0.1 M phosphate buffer as the supporting-electrolyte (Fig. S2A). Fig. S2B shows that the PFF anodic peak current increases with pH, reaching a maximum at pH 7.0. Further increase in pH result in weaker signals. Thus, phosphate buffer at pH of 7.0 was chosen for all further tests. Fig. S2C shows that the PFF anodic peak potential ($E_{p,a}$) shifts toward less positive values with increasing electrolyte pH. The linear dependency ($r^2 = 0.994$) observed over the pH range of 5–9 has a slope of 47.7 mV/pH. This slope value reflects an exchange of one electron during oxidation of the BCP redox couple at 3D-CNTs@MIP/GCE.

The 3D-CNTs@MIP/GCE electrode produces an oxidation peak of approximately +0.67 V (Fig. 3 curve b). The reaction mechanism may be as follows: (step 1) PFF hydrolyzes in alkaline solution, to produce 4-bromo-2-chlorophenol (BCP) and dialkylphosphoric acid (Eqn. 1) [2,30,31].



formed with binding sites complementary to the PFF target molecules.

3.2. Electrochemical behavior of PFF at the 3D-CNTs/GCE

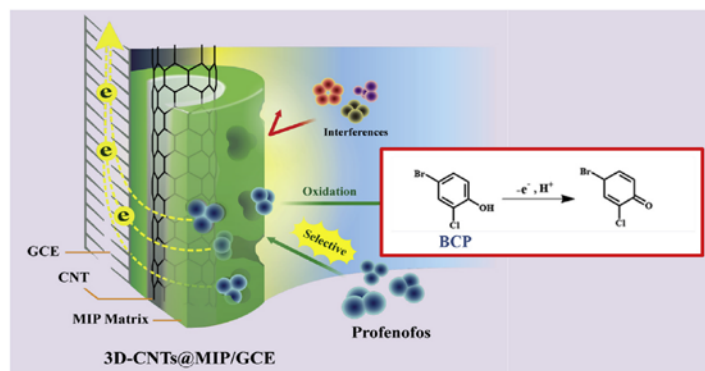
Cyclic voltammetry is initially used to study the electrochemical behavior of PFF at (a) CNTs@SiO₂/GCE, (b) 3D-CNTs@MIP/GCE, and (c) CNTs@NIP/GCE (Fig. 3). The figure clearly shows that the sensor without polymer encapsulation (CNTs@SiO₂, curve a) has no electrochemical peak current. Whereas the 3D-CNTs@MIP sensor exhibits a well-defined oxidation peak (curve b) at a potential of +0.67 V ($i_p = 0.79 \mu$ A). The CNTs@NIP sensor produces a very low signal (curve c) at +0.74 V ($i_p = 0.20 \mu$ A). This enhanced signal response can be attributed to good electrical conductivity by the polymer and the resulting improvement in electron transfer between PFF and the electrode surface. The oxidation current arises from PFF molecules that diffuse from the solution via binding sites on the MIP film, to the electrode surface. In case of CNTs@SiO₂ (red line, curve a) the lack of an oxidation peak indicates that this sensor does not feature PFF binding sites at its surface. The MIP sensor enhances the current response by a factor of four over that of NIP. The greater electrochemical response seen for the MIP sensor has two causes: (i) MIP coated on CNTs@SiO₂ enhances electrical conductivity and electrocatalytic activity toward PFF redox activity and (ii) MIP provides molecular recognition sites and a greater affinity

(step 2) BCP, which produces a strong electrochemical response at +0.67 V, undergoes electro-oxidation at 3D-CNTs@MIP/GCE (Eqn. 2). Therefore, PFF can be directly determined by electrochemical detection of its hydrolysate, BCP. Scheme 1 shows the reaction mechanism associated with sensitive detection by the 3D-CNTs@MIP/GCE. The 3D-CNTs@MIP has good electrical conductivity and a large surface area that enhance the PFF signal response. The observation that MIP coated nanocomposites possess high electrical conductivity and surface areas that enhance the signal response are in accordance with previous reports [21,22,26,29,32].

3.3. Amperometric detection of PFF in FIA system

3.3.1. Optimization of detection potential and flow rate

We propose the selective amperometric sensor (3D-CNTs@MIP/GCE) for determination of PFF. PFF detection is based on the electrochemical monitoring of the BCP oxidation signal generated by PFF hydrolysis at the 3D-CNTs@MIP sensor. Amperometric detection was achieved using a home-made flow cell, coupled with a simple FI system set up, as previously described [25,29]. We investigated the effect of applied potentials ranging from 0 to 1.0 V to determine the oxidation potential at which the MIP sensor is most sensitive. Fig. S3A shows that the current response obtained



Scheme 1. The mechanism of electrochemical response at the 3D-CNTs@MIP/GCE. PFF signal generated by electrochemical detection of its hydrolysate, BCP.

from 10 μM of PFF increases dramatically with increasing detection potential, from 0.50 to 0.70 V and then remains at a steady state. Therefore, we chose a potential of +0.70 V as optimal for detection in our FIA experiments.

To optimize sensitivity and sample throughput, we examined the effect of flow rate (0.2–2.0 mL min^{-1}) on the analytical signal obtained from a standard PFF solution (20 μL , 10 μM). Fig. S3B shows that sensitivity decreases with increasing flow rate. Higher

flow rates generally result in a decreased signal response because of the shorter contact time between PFF molecules and the MIP binding sites. This behavior is in accordance with previous amperometric FI studies on a sulfite chemical sensor [25] and an MIP-based carbofuran sensor [29]. However, increasing the flow rate increases sample throughput. We selected a flow rate of 0.8 mL min^{-1} as a compromise between sensitivity and sample throughput. It should be noted that the high specific surface area of the 3D-CNTs@MIP sensor provides good diffusion and adsorption rates between the PFF analyte and binding sites, providing shorter response times, and a throughput of 200 samples h^{-1} could be achieved.

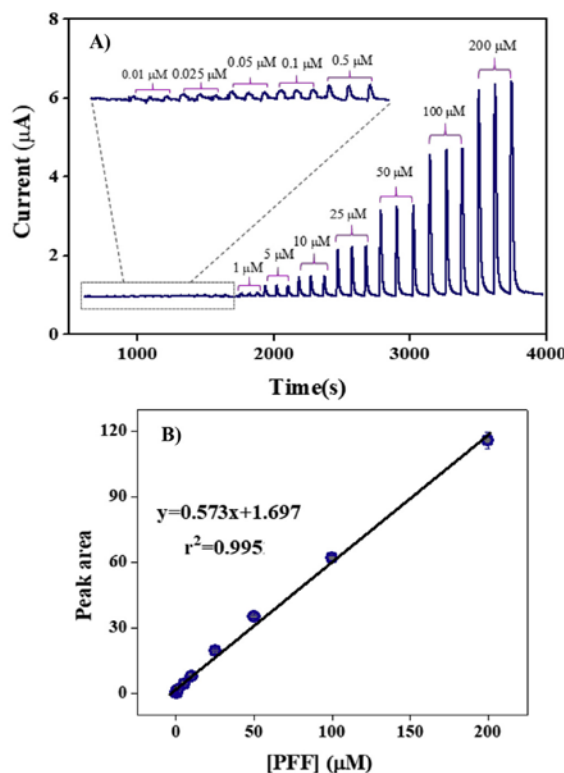


Fig. 4. Amperometric response of 3D-CNTs@MIP/GCE (A) in the FIA system with 0.1 M phosphate buffer at 0.7 V and a flow rate of 0.8 mL min^{-1} and (B) the linear relationship between PFF concentration and peak area.

3.3.2. Analytical performance

We evaluated the performance of the 3D-CNTs@MIP sensor under the optimized conditions discussed above by using amperometric detection in an FIA system. The sensor exhibits well defined and reproducible peak profiles (Fig. 4A). The calibration plot is linear over the range 0.01–200 μM (Fig. 4B). The linear regression equation is $0.573 \pm 0.017 x + 1.697 \pm 0.007$, with a determination coefficient (r^2) of 0.995. The slope of the equation is corresponding to linear sensitivity of $0.573 \mu\text{A} (\mu\text{M})^{-1}$. The calculated limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation of the blank ($3S_b$, $n = 7$) is 0.002 μM . The limit of quantification (LOQ) estimated ($10S_b$) according to ISO11843 [33] is 0.007 μM . Moreover, the MIP sensor provides good precision (4.8% RSD for 20 injections of 0.5 μM PFF). We compared the analytical performance of the 3D-CNTs@MIP sensor with related modified electrodes for the determination of pesticides (Table 1). The 3D-CNTs@MIP sensor exhibits the greatest linear range for PFF detection (0.01–200 μM) among all of the referenced methods [36,37]. Additionally, the LOD for our sensor (2 nM) is equal to the LOD for the biosensor using tyrosinase immobilized on PtNPs/graphene/GCE [36] and is less than that for DNA aptasensor [37]. These literature comparisons demonstrate that our 3D-CNTs@MIP sensor offers a lower detection limit and wider linear range for PFF detection than previously reported sensors do. We attribute these advantages to the large number of CNT imprinted sites, which significantly increase the selective surface area, leading to greater selectivity, sensitivity, and electron transfer rates between 3D-CNTs@MIP and the GCE surface.

3.3.3. Selectivity and stability

We investigated the interference effects of substances such as pesticides, compounds with similar structures, and ions to assess

Table 1
Performance comparison of the proposed MIP sensor with other pesticide-detection sensors.

Analyte	Sensor	Detection method	Linearity range (μM)	LOD (μM)	Ref.
Parathion-methyl	CNTs-MIP/GCE	DPV	0.001–0.034	0.0002	[34]
Triazophos	PHP/AuNPs/CNTs-MIP/GCE	CV	0.2–10	0.093	[35]
PFF	Tyr/PtNPs/Graphene/GCE	Amp	0.003–0.03	0.002	[36]
PFF	AuNPs/PANI/GSPE	DPV on DNA aptasensor	0.1–10	0.27	[37]
PFF	CNTs@SiO ₂ -MIP/GCE	Amp	0.01–200	0.002	This work

CNTs = Carbon Nanotubes, SiO₂ = Silicon dioxide, PHP = polyhydroxyphenol, AuNPs = Gold nanoparticles, Try = Tyrosinase, PtNPs = Platinum nanoparticles, MIP = Molecular Imprinted Polymer, GCE = Glassy Carbon Electrode, GSPE = Graphite Screen Printed Electrode, DPV = Differential Pulse Voltammetry, HPLC = High Performance Liquid Chromatography, CV = Cyclic Voltammetry, Amp = Amperometry

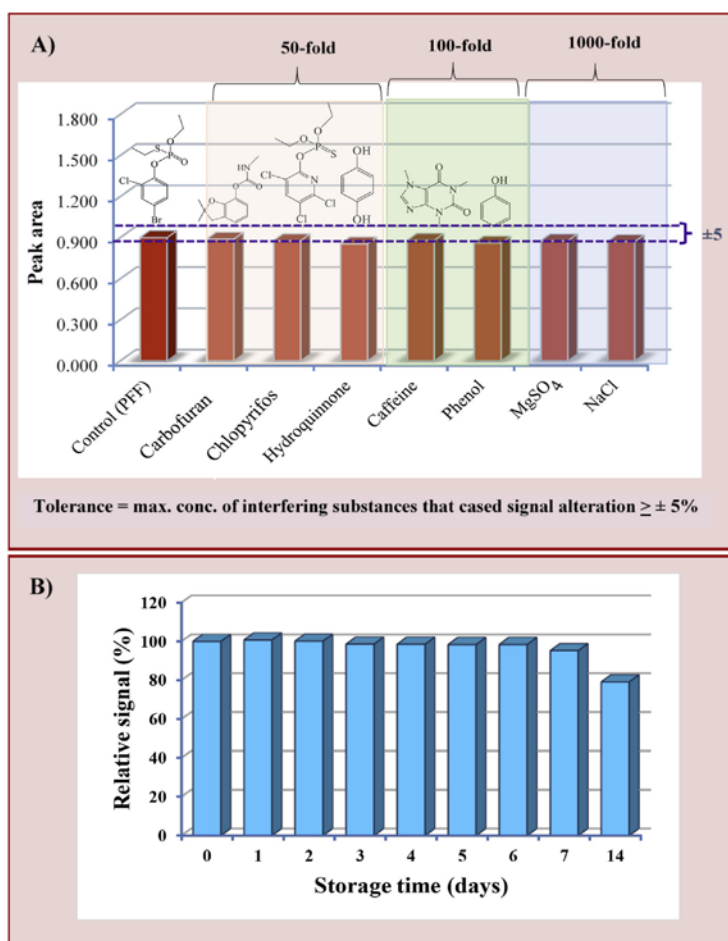


Fig. 5. (A) Selectivity of the proposed MIP sensor for PFF detection; comparison between the peak area obtained from 5 μM PFF (control) and the peak area of 5 μM PFF with interfering substances and (B) storage stability of the CNTs@SiO₂-MIP/GCE (signal from 5 μM PFF). The dotted line shows the $\pm 5\%$ signal alteration range.

the selectivity of the 3D-CNTs@MIP sensor toward the detection of PFF. Pesticides chlorpyrifos (CPF) and carbofuran (CBF), frequently used in many areas of Thailand [38,39], were used to evaluate tolerance limits. The effects of hydroquinone, caffeine, and phenol, and of ionic compounds MgSO₄ and NaCl, which are commonly found in food products or vegetable extracts, were tested on the FIA signal obtained from 1 μM PFF. Fig. 5A shows there are no obvious effects on the PFF oxidation response when including up to 50-fold excess concentration of CBF or CPF pesticides, or hydroquinone,

100-fold excess of caffeine or phenol, or a 1000-fold excess of MgSO₄ or NaCl. These results confirm that the MIP sensor provides high selectivity and specificity. The excellent selectivity is a consequence of the molecularly imprinted polymer film. We ascribe the specificity by the successful of the imprinted cavity form on the polymer film, which has cavities within the polymer matrix that are complementary in size, conformation, and shape to the target PFF molecule. These candidate interference molecules have different structures from PFF and cannot diffuse or bind strongly to

Table 2
PFF determination in vegetable samples (n = 3) obtained from the proposed MIP-sensor.

Samples	PFF (μM)			Recovery (%)	RSD (%)	^a Bias (%)
	Content	Added	Found			
Spring onion	n.d.	0.05	0.051	103.0	2.4	2.1
		0.1	0.104	103.6	2.3	3.6
Tomato	n.d.	0.05	0.050	101.0	2.4	3.0
		0.1	0.101	101.0	2.1	2.9
Chinese cabbage	n.d.	0.05	0.050	100.2	1.8	-1.0
		0.1	0.104	104.0	0.8	1.6
Cabbage	n.d.	0.05	0.050	100.1	1.2	1.2
		0.1	0.101	100.7	1.0	-0.9
Green pepper	n.d.	0.05	0.051	102.6	1.6	2.0
		0.1	0.104	103.8	1.1	1.8
Chili pepper	n.d.	0.05	0.050	100.9	1.5	0.9
		0.1	0.105	105.4	2.0	1.1

n.d. = not detection or the samples were contaminated with concentration below LOD.

^a bias calculated from the different between recovery measurement results and reference values from HPLC method.

recognition sites and thus produce a very weak response. We conclude that 3D-CNTs@MIP/GCE provides high selectivity for amperometric determination of PFF.

Stability is an important characteristic for the feasibility of real-life applications of the modified electrode. We investigated the 3D-CNTs@MIP/GCE stability by measuring the current signal from 5 μM PFF at various intervals. Fig. 5B shows that the MIP sensor retains 95% of its initial current response after repeated use for one week and 80% after 2 weeks, when stored at 4 °C. These results confirm that the MIP sensor exhibits satisfactory stability.

3.3.4. Analytical application

The proposed 3D-CNTs@MIP sensor was applied to the determination of PFF in vegetable samples (spring onion, tomato, cabbage, Chinese cabbage, green pepper, and chili pepper) to demonstrate a practical application. PFF determinations of vegetable extracts were performed using the standard addition method. Table 2 summarizes results PFF and calculated recovery values in vegetable samples. As shown in the Table, all samples were either contaminated with PFF concentrations below the detection limit (n.d.) or remained absolutely free of PFF. Detection limit of our MIP sensor (0.002 μM) is lower than Codex maximum residual level (MRL) for PFF residues in/on several food samples ranged from 0.05 to 2 mg kg^{-1} (0.13–53.5 μM) [40], indicating that the method is suitable for quantitative analysis of PFF in food samples. The results of non-contamination of PFF in the samples were confirmed with HPLC (Fig. S4). The concentrations of PFF found by the developed method and by the conventional HPLC were not significantly different. The accuracy of the analytical process, evaluated using percent recovery data for spiked PFF standards (0.05 and 0.1 μM), falls in the range of 100.1%–105.4%. Our developed method provides good precision (%RSD ranging from 0.8 to 2.4). We then compared these measured recovery values with the reference value from HPLC to estimate the bias according to Ref. [41]. The calculated bias ranged from 0.9 to 3.6%, indicating that there are no significant matrix interferences present in the analytical samples. These results indicate that our proposed amperometric system is sufficiently accurate, precise, and is suitable for quantifying PFF in vegetable samples.

4. Conclusion

We report the successful fabrication of 3D-CNTs@MIP, a PFF imprinted CNT coating polymer, with recognition sites formed on

the surfaces of tubular CNTs core nanostructures as a new highly sensitive and selective electrochemical sensor for PFF detection. A simple FIA system with a novel and facile method for selective measurement of profenofos based on the 3D-CNTs@MIP amperometric sensor was designed. The 3D-CNTs@MIP was synthesized by coating the carboxylated CNT surfaces with SiO_2 vinyl end groups, and MIP shells to allow blending of the MIP with the CNT surface. The synthesized CNTs@ SiO_2 -MIP was coated on the surface of a GCE and the template was removed by solvent extraction. Incorporating 3D-CNTs@MIP in the sensor significantly increases its electrical conductivity, and increases the electrocatalytic properties of the electrode, resulting in enhancement of the sensitivity for PFF detection. MIP printing on the CNT surface significantly increases the selectivity selective surface area by providing large numbers of imprinted sites for improved, sensitivity, and electron transfer from PFF and the electrode surface. On-line amperometric detection with the MIP sensor demonstrates very high sensitivity and selectivity toward PFF at an applied potential of +0.70 V and flow rate of 0.8 mL min^{-1} . As a consequence of the large specific surface area, the sensing system provides a linear range of 0.01–200 μM and a detection limit of 0.002 μM . The MIP sensor also provides fast responses (200 samples h^{-1}) and high diffusion and adsorption rates between the PFF analyte and binding sites.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF: RSA6080062), the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), The Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, and the Faculty of Science at Ubon Ratchathani University (UBU) are gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.075>.

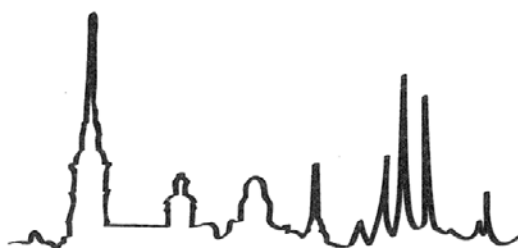
References

- [1] W. Li, Y. Hua, S. Hong-Qing, W. Dan-Dan, Aptamer-based fluorescence assay for detection of isocarbophos and profenofos, *Chin. J. Anal. Chem.* 44 (5) (2016) 799–803.
- [2] S.S. Ratpukdi, A.S. Vangnai, P. Sangthean, S. Singkibut, Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (1) (2015) 320–328.
- [3] A. Kumar, J.C. Chapman, Profenofos residues in wild fish from cotton-growing areas of New South Wales, Australia, *J. Environ. Qual.* 30 (2001) 740–750.
- [4] L. Hong-Yan, Z. Shi-cui, J. Ming, W. Min, In vitro study on cytotoxic effects of the organophosphorus pesticide profenofos on the gill cell line, FG-9307, the flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 19 (2001) 57–62.
- [5] K.J. Min, C.G. Cha, Determination of the bioconcentration of phosphamidon and profenofos in zebrafish (*Brachydanio rerio*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65 (2000) 611–617.
- [6] The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 1990–1991, WHO/PCS/90.1, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1990.
- [7] A.M. Shrivastav, S.P. Usha, B.D. Gupta, Fiber optic profenofos sensor based on surface plasmon resonance technique and molecular imprinting, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 150–157.
- [8] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 51 (24) (2003) 6915–6921.
- [9] J.W. Wong, M.K. Hennessy, D.G. Hayward, A.J. Krynitsky, I. Cassias, F.J. Schenck, Analysis of organophosphorus pesticides in dried ground ginseng

- root by capillary gas chromatography–mass spectrometry and–flame photometric detection, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 1117–1128.
- [10] F. Ahmadi, Y. Assadi, S.M.R. Milani-Hosseini, M. Rezaee, Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop micro extraction and gas chromatography–flame photometric detector, *J. Chromatogr. A* 1101 (2016) 307–312.
 - [11] E.A. Songa, J.O. Okonkwo, Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review, *Talanta* 155 (2016) 289–304.
 - [12] P.A. Baker, M.N. Goltz, A.M. Schrand, D.Y. Yoon, D.S. Kim, Organophosphate vapor detection on gold electrodes using peptide nanotubes, *Biosens. Bioelectron.* (2014) 19–23.
 - [13] G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5908–5945.
 - [14] C. Malitesta, E. Mazzotta, R.A. Picca, A. Poma, I. Chianella, S.A. Piletsky, MIP sensors the electrochemical approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1827–1846.
 - [15] N. Gao, J. Dong, M. Liu, B. Ning, C. Cheng, C. Guo, C. Zhou, Y. Peng, J. Bai, Z. Gao, Development of molecularly imprinted polymer films used for detection of profenofos based on a quartz crystal microbalance sensor, *Analyst* 137 (2012) 1252–1258.
 - [16] E.B. Ozkutuk, S.E. Diltermiz, E. Ozalp, T. Gedikbey, A. Ersoz, Paraoxon imprinted biopolymer based QCM sensor, *Mater. Chem. Phys.* 139 (2013) 107–112.
 - [17] S. Boulanour, S. Mezzache, A. Combès, V. Pichon, Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples, *Talanta* 176 (2018) 465–478.
 - [18] B. Liu, H.T. Lian, J.F. Yin, X.Y. Sun, Dopamine molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene chitosan composite, *Electrochim. Acta* 75 (2012) 108–114.
 - [19] C. Zhanga, S. Sia, Z. Yan, Design of molecularly imprinted TiO₂/carbon aerogel electrode for the photo electrochemical determination of atrazine, *Sens. Actuators, B* 211 (2015) 206–212.
 - [20] M. Zhang, Y. Wu, X. Feng, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Fabrication of mesoporous silica-coated CNTs and application in size-selective protein separation, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 5835–5842.
 - [21] H. Dai, D. Xiao, H. He, H. Li, D. Yuan, C. Zhang, Synthesis and analytical applications of molecularly imprinted polymers on the surface of carbon nanotubes: a review, *Microchim. Acta* 182 (2015) 893–908.
 - [22] A. Munawar, M.A. Tahir, A. Shaheen, P.A. Lieberzeit, S. Khan, S.Z. Bajwa, Investigating nanohybrid material based on 3D-CNTs@Cu nanoparticle composite and imprinted polymer for highly selective detection of chloramphenicol, *J. Hazard Matter.* 342 (2018) 96–106.
 - [23] S.J. Guo, J. Li, W. Ren, D. Wen, S.J. Dong, E.K. Wang, Carbon nanotube/silica coaxial nano cable as a three-dimensional support for loading diverse ultra-high-density metal nanostructures: facile preparation and use as enhanced materials for electrochemical devices and SERS, *Chem. Mater.* 21 (2009) 2247–2257.
 - [24] J. Dong, N. Gao, Y. Peng, C. Guo, Z. Lv, Y. Wang, C. Zhou, B. Ning, M. Liu, Z. Gao, Surface plasmon resonance sensor for profenofos detection using molecularly imprinted thin film as recognition element, *Food Control* 25 (2012) 543–549.
 - [25] M. Amatatongchai, W. Sroysee, S. Chairam, D. Nacapricha, Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles, *Talanta* 133 (2015) 134–141.
 - [26] W. Yang, F. Jiao, L. Zhou, X. Chen, X. Jiang, Molecular imprinted polymer coated on multi-walled carbon nanotubes through a simple indirect method for the determination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in environmental water, *Appl. Surf. Sci.* 284 (2013) 692–699.
 - [27] J.P. Fan, X.-K. Xu, R. Xu, X.-H. Zhang, J.-H. Zhu, Preparation and characterization of molecular imprinted polymer functionalized with core/shell magnetic particles (Fe₃O₄@SiO₂/MIP) for the simultaneous recognition and enrichment of four taxoids in *Taxus X* media, *Chem. Eng. J.* 279 (2015) 567–577.
 - [28] M. Wang, J. Huang, M. Wang, D. Zhang, J. Chen, Electrochemical non-enzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables, *Food Chem.* 151 (2014) 191–197.
 - [29] M. Amatatongchai, W. Sroysee, P. Jarujamrus D. Nacapricha, P.A. Lieberzeit, Selective amperometric flow-injection analysis of carbofuran using a molecularly-imprinted polymer and gold coated magnetite modified carbon nanotube-paste electrode, *Talanta* 179 (2018) 700–709.
 - [30] N. A. Silva, W. G. Birololi, M. H. R. Selegim, A. Luiz, M. Porto, Biodegradation of the Organophosphate Pesticide Profenofos by Marine Fungi.
 - [31] N. Kaur, N. Prabhakar, Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors, *Trends Anal. Chem.* 92 (2017) 62–85.
 - [32] X. Tang, D. Zhang, T. Zhou, D. Nie, Q. Yang, L. Jin, G. Shi, Fe₃O₄@Au sphere molecularly imprinting with self-assembled monolayer for the recognition of parathion-methyl, *Anal. Methods* 3 (2011) 2313–2321.
 - [33] ISO 11843, capability of detection, Part 1/IL, Genève, 19
 - [34] L. Zhao, F. Zhao, B. Zeng, Electrochemical determination of methyl parathion using a molecularly imprinted polymer–ionic liquid–graphene composite film coated electrode, *Sensor. Actuator. B* 176 (2013) 818–824.
 - [35] H. Li, C. Xie, S. Li, K. Xu, Electropolymerized molecular imprinting on gold nanoparticle-carbon nanotube modified electrode for electrochemical detection of triazophos, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 89 (2012) 175–181.
 - [36] T. Liu, M. Xu, H. Yin, S. Ai, X. Qu, S. Zong, A glassy carbon electrode modified with graphene and tyrosinase immobilized on platinum nanoparticles for sensing organophosphorus pesticides, *Microchim. Acta* 175 (2011) 129–135.
 - [37] G. Selvolin, I. Bajan, O. Hosu, C. Cristea, R. Sandulescu, G. Marrazza, DNA-based sensor for the detection of an organophosphorus pesticide: Profenofos, *Sensors* 18 (2018) 2035.
 - [38] L.G. Skretteberg, B. Lyran, B. Holen, A. Jansson, P. Fohgelberg, K. Siivinen, J.H. Andersen, B.H. Jensen, Pesticide residues in food of plant origin from Southeast Asia-A Nordic project, *Food Control* 51 (2015) 225–235.
 - [39] A. Tawatsin, U. Thavara, P. Siriwasatien, Pesticides used in Thailand and toxic effects to human health, *Medical Research Archives* 3 (2015) 1–10.
 - [40] Anonymous, List of Codex Maximum Residue Limits, vol. 31, WHO/FAO, 1999, August.
 - [41] T.P.J. Linsinger, Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution, *Trac. Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 916–923.



Saint Petersburg State University
Russian Foundation for Basic Research
Scientific Council of Analytical Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Japanese Association for Flow Injection Analysis



Book of Abstracts

21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques

*In Honor of the 80th Birthday of
Prof. G. Christian*

September 3–8, 2017
Saint Petersburg, Russia



Selective amperometric flow injection analysis for carbofuran based on molecular imprinted polymer and gold-coated magnetite modified carbon nanotubes-paste electrode

Maliwan Amatatongchai^{1,2}, Wongduan Sroysee¹, Peter A. Lieberzeit³, Purim Jarujamrus¹, Duangjai Nacapricha^{2,4}

¹ Department of Chemistry and Center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand.

² Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs).

³ University of Vienna, Faculty of Chemistry, Department of Physical Chemistry, 1090 Vienna, Austria.

⁴ Department of Chemistry and Center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand.

E-mail: maliwan.a@ubu.ac.th or amaliwan@gmail.com

A new approach is proposed for selective measurement of carbofuran (CBF) in vegetables based on simple flow injection system with molecularly imprinted amperometric sensor. The sensor was fabricated based on carbon nanotubes-paste electrode (CNTsPE) decorated by gold coated magnetite ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$). $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanoparticles were synthesized and used to modify the surface of a CNTsPE. Then a molecularly imprinted polymer (MIP) for CBF was prepared by electropolymerization. The MIP was prepared on the electrode surface with 4-ter-butylcalix[8] arene-CBF(4TB[8]A-CBF) supramolecular complex as the template and o-phenylenediamine as the functional monomer. Incorporated of the MIP to this electrode improves the template selectivity via the controlled electrical signal through the elution and re-adsorption of CBF. The imprinted sensor ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -MIP/CNTsPE) was used in a flow injection analysis (FIA) arrangement. The experimental conditions were investigated in amperometric mode with the following optimized parameters: phosphate buffer solution (0.1 M, pH8.0) as a carrier, flow rate 0.5 mL min⁻¹, applied potential +0.50 V. The designed imprinted sensor in FIA arrangement yielded a linear dynamic range for CBF from 0.1 to 100 μM ($r^2 = 0.998$) with a detection limit of 3.8 nM (S/N=3). The sensor exhibited acceptable precision (%RSD = 4.8%) and good selectivity for CBF. This method was successfully applied to detect CBF in vegetable samples.

Keywords: carbamate sensor; gold-coated magnetite; molecularly imprinted polymer; amperometry; flow injection

Acknowledgements:

Financial supports from the National Research Council of Thailand (NRCT) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education are gratefully acknowledged.

References:

1. X. Tan, Q. Hu, J. Wu, X. Li, P. Li, H. Yu, X. Li, F. Lei, Sens. Actuator B 220 (2015) 216-221.
2. S. Li, G. Yin, X. Wu, C. Liu, J. Luo, Electrochim. Acta 188 (2016) 294-300.

Abstract book

วิธีวิเคราะห์สมัยใหม่ biological ๒๐๑๘ Gas diffusion
FIA UPAD 14th อาหาร ๒๐๑๘ GC MBLVP
CE SIA quantitative Flow Analysis การวิเคราะห์
SIEMA MSFIA HPLC ตัวอย่าง analysis
Sample การเตรียมตัวอย่าง spectroscopy ๑๔
สเปกโทรสโกปี SIA CIA สิ่งแวดล้อม เคมีไฟฟ้า
Electrochemistry ๒๐๑๘



Novel molecularly imprinted polymers (MIP)-coated nanomaterials for amperometric sensing of pesticides in food analysis

Maliwan Amatatongchai*, Porntip Sodkrathok, Wongduan Sroysee, Nuttapol Kesangam, Sanoe Chairam and Purim Jarujamrus

Department of Chemistry and Center of Excellent for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand.

Nanomaterials Science, Sensors & Catalysis for Problem-Based Projects, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand.

**E-mail: maliwan.a@ubu.ac.th or amaliwan@gmail.com*

Abstract

Molecularly imprinting polymer (MIP) is used to create recognition sites that are chemically and sterically complementary to the target molecules in synthetic polymer. Applying nano-sized structured or blending the MIP with nanomaterials can significantly increase the respective selective surface area leading to larger numbers of imprinted sites for improved sensitivity and electron transfer. In this work, a new and facile method is proposed for selective measurement of profenofos (PFF) based on simple flow injection system with 3D-MIP coated on carbon nanotubes (CNTs) amperometric sensor. The CNTs@SiO₂-vinyl-MIP was synthesized by successive coating of the CNTs surface with SiO₂, vinyl end groups and MIP shells. The sensitive and highly selective amperometric PFF sensor was fabricated by coating of CNTs@SiO₂-vinyl-MIP onto the surface of glassy carbon electrode. This modified electrode was applied to detect PFF by cyclic voltammetry and amperometry. The PFF oxidation current signals were detected at +0.7 V vs Ag/AgCl using 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) as carrier solution. The designed 3D-imprinted sensor exhibits the linearity over the range of 0.01 -200 μ M ($r^2 = 0.995$) with a low detection limit of 0.002 μ M (3σ). This method was successfully applied to detect PFF in vegetable samples.

Keywords: Profenofos; Carbon nanotubes coated with silicon dioxide (CNT@SiO₂); Molecularly imprinted polymers, Electrochemical sensor

References

- [1] N. Gao, J. Dong, M. Liu, B. Ning, C. Cheng, C. Guo, C. Zhou, Y. Peng, J. Bai, Z. Gao, *Analyst* 137 (2012) 1252-1258.
- [2] M. Amatatongchai, W. Sroysee, P. Jarujamrus, D. Nacapricha, P. A. Lieberzeit, *Talanta* 179 (2018) 700-709.
- [3] J-P. Fan, X-K. Xu, R. Xu, X-H. Zhang, J-H. Zhu, *Chem Eng. J.* 297 (2015) 567-577.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (RSA6080062) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education.

Novel Amino-containing Molecularly Imprinted Polymer-Coated on Magnetite-gold Core for Sensitive and Selective Carbofuran Detection in Food

Maliwan Amatatongchai ^{1,2*}, Suphatsorn Thimoonnee ¹, Purim Jarujamrus ¹,
Duangjai Nacapricha ^{2,3} and Peter A. Lieberzeit ⁴

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,
Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand.

²Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs).

³Department of Chemistry and Center of Excellent for Innovation in Chemistry,
Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

⁴University of Vienna, Faculty for Chemistry, Department of Physical Chemistry,
1090 Vienna, Austria.

*Corresponding author: Tel.; +66 45-353401 ext. 4576, fax; +66 45-288379.

E-mail: maliwan.a@ubu.ac.th (M. Amatatongchai)

Abstract

A novel and facile method for synthesis of amino-containing molecularly imprinted coated on magnetite-gold nanoparticles core ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$) for construction of robust and sensitive carbofuran (CBF) sensors was reported. The $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ was synthesized by successively self-assembly of organic thiols, 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), on magnetite-gold ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) core surfaces then coupling with amino-containing molecularly imprinted polymer (MIP- NH_2) shells. The MIP- NH_2 nanocomposite was synthesized by two polymerization steps to form CBF imprinted pre-polymer nanoparticles and then terminating the surface with amino-containing polymer. The synthesized pre-polymer nanoparticles possess a large surface-to-volume ratio for increasing the number of CBF template molecule accessed into the polymer surface and leading the larger recognition sites formation. We constructed the highly sensitive and selective CBF amperometric sensor by coating the surface of a glassy carbon electrode (GCE) with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ coupled with a simple flow injection system. Morphological and structural characterization reveal that coupling of the MIP- NH_2 on the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ core surface significantly increases the recognition surface area and electron transfer efficiency for improved selectivity and sensitivity. The MIP- NH_2 modified electrode enhances the CBF current response by a factor of about twenty time over that of non-imprinted polymer (NIP) electrode. The $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ exhibits a fast response with good selectivity when applied to CBF detection by amperometry. The CBF oxidation current signal appears at +0.50 V vs Ag/AgCl using 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) as the carrier solution. The designed $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ sensor provides a linear response over the range 0.05 - 100 μM ($r^2 = 0.995$) with a low detection limit of 2 nM ($S/N = 3$). The sensor was successfully applied to detection of CBF in vegetable samples.

Keywords: amino-containing molecularly imprinted polymers (MIP- NH_2), carbofuran, magnetite-gold ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$), core-shell nanocomposites, amperometry.

1. Introduction

Carbofuran (CBF) is a carbamate pesticide widely applied to help increase agricultural products in many field crops including potatoes, corn and soybeans, fruits and vegetables [1, 2]. The use and exposure of CBF have been associated with endocrine-disrupting activity, reproductive disorders, negative effects on cellular metabolic mechanisms and mitochondria function [3, 4]. Its high toxicity and accumulation in living organism have results in public concerns regarding food safety and human health. China set its maximum residue limit (MRL) at 0.1 or 0.2 mg kg⁻¹ in grain and oilseeds and United State Environmental Protection Agency (EPA) set its MRL at 0.1 mg kg⁻¹ (~0.45 μM) in selected agricultural products including green bean, banana, coffee and rice [5]. Hence, the detection of CBF in farm products and in the environment is crucial with regards to issues of consumer health and environmental quality [1, 6]. Various analytical methods to carbofuran detection have been developed, including methods based on chromatography including GC [7], HPLC [8], immunochromatographic assay [9] and CE [10], mass spectrometry [11], piezoelectric immunosensor [12], and amperometric immunosensor [13, 14]. However, despite the fairly sensitivity and selectivity of these methods, they are relatively time-consuming, expensive instrument, complexity of the assay and limitation by high cost and stability of the used antigen/ antibody.

Development of the methods that can provide time-saving, low-cost, or even on-site, portable and household testing kits are undoubtedly needed to assess for food safety analysis and the better quality of life. In this case, electrochemical techniques are considered suitable complementary tools for fulfill the needs. Nanomaterial-based sensor for CBF detection have been developed to improve sensitivity and selectivity as well as reduced cost and analysis time [2, 4, 5]. These sensors used CoO decorated on reduced graphene oxide (rGO) [2], nano carbon black [4] and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/polystyrene sulphonate/GO (PEDOT/PSS/GO) [5]

modified on screen printed electrode (SPE) [4, 5] and glassy carbon electrode (GCE) [2]. However, sensitivity and selectivity somehow need further improvement.

Recently, molecularly imprinted polymers (MIP) demonstrated wide application in electrochemical sensors due to their tailor-made affinity and specificity to a target analyte [6, 15, 16]. Their synthetic recognition sites appear to be a better option that compared to biological antibodies. In addition, MIP is straightforward to synthesis and significantly reduce costs when compared with natural antibodies. Hence, MIP-based electrochemical sensors have some great advantages such as simplicity, provide high selectivity and sensitivity, low cost, mechanical/chemical stability and long-term storage. Our previous works [6, 16-18] report the use of nanocomposites coated with MIP to enhance the electroconductivity and recognition sites of MIP-based sensors. Nanocomposites coated with MIPs exhibit a synergic effect leading to significant improvements in the electronic and mechanical characteristics of each single component of selective sensors for CBF [6], profenofos (PFF) [16], creatinine [17] and serotonin (Ser) [18]. Imprinting of CBF molecules on the carbon-paste electrode modified with carbon nanotubes and magnetite-gold (CNTs-Fe₃O₄@Au/CPE) was firstly reported via the electropolymerization with a 4-ter-butylcalix [8] agene- CBF (4TB[8]A-CBF) supramolecular complex as the template, and o-phenylenediamine as the functional monomer [6]. Although, this developed MIP sensor is sufficiently accurate sensitive and specific, it still required 4TB[8] supra molecules to form 4TB[8]A-CBF complexes and buried in the polymer and left the recognition sites after CBF template removal. Despite the abovementioned promising characteristics, the remaining challenges in MIP based sensor is that the target analytes are difficult to be buried in the interiors of the MIPs to form binding sites.

Herein, we report a strategy to improve the sensitivity and selectivity of MIP sensors for CBF using a novel amino-containing molecularly imprinted polymer coated on magnetite-gold core (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂). As the selective adsorption and recognition abilities of MIP

depend primarily on the recognition sites or cavities formed during the imprinting process, which is controlled by the non-covalent interactions leading to template-monomer aggregates [15, 19]. In terms of improving the sensitivity and selectivity of MIP sensors for CBF, we proposed a new method for imprinting CBF template molecule on the surface of amino-
 100 containing molecularly imprinted polymer (MIP-NH₂). MIP-NH₂ was synthesized using 2 polymerization steps. The pre-form polymer nanoparticles were synthesized using CBF as template, methacrylic acid (MAA) as monomer, trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) as cross-linker and AIBN as initiator. This process led to the formation of CBF imprinted nanoparticles that possess a large surface-to-volume ratio to enhance the accessibility of a large
 105 fraction of template sites into the polymer surface area. The second polymerization was synthesized using N-isopropylacrylamide (NIPAM) as monomer and N, N-methylene-bis-acrylamide (MBA) as cross-linker to afford NH₂-end group coted on the surface for further activation and coupling with Fe₃O₄@Au core. We constructed the imprinted sensor by coating the surface of a glassy carbon electrode (GCE) with Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ coupled with a
 110 simple flow injection system for highly sensitive and selective determination of carbofuran (CBF). The synthesized Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ was characterized by transmission electron microscope (TEM), atomic force microscopy (AFM) and attenuated total reflectance Fourier transformed infrared (ATR FT-IR) spectroscopy. CBF-imprinted on the surface of amino-polymer film coated on the Fe₃O₄@Au core was successfully created. Coupling of MIP-NH₂
 115 onto the Fe₃O₄@Au core improves both sensitivity and selectivity. Sensitivity was enhanced from the outstanding features of Fe₃O₄@Au, including high electrical conductivity, good electrochemical catalyst and highly specific surface area. Whereas selectivity arises from the permit ability of MIP-NH₂ that allowed only CBF molecules diffuse from the solution via binding sites on the MIP-NH₂ film to the electrode surface. The proposed imprinted sensor

120 exhibits high stability, reproducibility, accuracy and good performance for CBF determination in vegetables and fruits.

2. Experimental

2.1. Chemicals and Reagents

125 All chemicals were analytical grade. Deionized-distilled water (Water Pro-Ps, USA) was used for standard and reagent preparation. Hydrogen tetrachlorauric (III) (HAuCl₄·3H₂O), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), N, N'-methylenebisacrylamide (MBA) and N-isopropylacrylamide (NIPAM) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA).
 130 Methacrylic acid (MAA), 2,2-azobis(2-methyl-propionitrile) (AIBN), 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), Nafion and carbofuran (CBF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A stock solution of CBF (5 mM) was prepared by hydrolysis and then stored in darkness at 4 °C. The hydrolysate of PFF was obtained by dissolving in NaOH-methanol (3:1 ratio).

135

2.2 Apparatus

2.2.1 Electrochemical measurements

Cyclic voltammetric measurements were performed using an eDAQ potentiostat (model EA161, Australia) equipped with an e-corder 210 and e-Chem v2.0.13 software. The
 140 active surface area for the GCE (diameter 3 mm, CH Instruments, USA) was approximately 0.07 cm². A conventional three-electrode cell assembly, consisting of a working electrode (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE electrode), a reference electrode (Ag/AgCl), and a counter electrode (stainless steel) was used. The cyclic voltammograms were recorded at a scan rate of

50 mV S⁻¹ and a potential range between -1.0 and 1.0 V using a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) as the supporting-electrolyte solution.

A simple flow-injection (FI) system was employed for the amperometric detection of CBF using the MIP sensor. Amperometric measurement was performed using a Shimadzu pump (model LC-10AD, Japan), a Rheodyne injector (model 7725, USA) fitted with 100 µL sample loop. An eDAQ potentiostat (EA161), equipped with an e-corder 210, Chart v5.5.11 software, and with a three-electrode thin-layer flow cell (CH Instruments, USA). The Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE served as the working electrode, Ag/AgCl as the reference electrode, and a stainless steel tube as the counter electrode. The active surface area was separated by a silicone rubber spacer (flow channel, 0.1 × 0.6 cm) that covered the GCE surface (electrode area, ca. 0.06 cm²).

2.2.2 Characterization

Nanocomposite structure and composition were examined by attenuated total reflectance Fourier transformed infrared (ATR FT-IR) spectroscopy, recorded with a spectrum II spectrometer (Perkin Elmer, USA) over the range of 4000—500 cm⁻¹. Morphology and sizes of Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ nanocomposites were investigated using a JEM-1230 transmission electron microscope (TEM; JEOL, Japan) and scanning electron microscope (SEM, JEOL, JSM-6460LV, Japan), operated under vacuum at an accelerating voltage of 20 kV. Surface roughness of the Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ and Fe₃O₄@Au-NIP were determined by atomic force microscopy (AFM; Park Systems Corp., Korea).

2.3 Preparation of the CBF sensor

2.3.1 Synthesis of Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂

The synthesis strategy for novel amino-containing molecularly imprinted polymer-coated on magnetite-gold core (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂) employed three fundamental steps. The method was firstly started with i) synthesis of carboxyl-terminated on Fe₃O₄@Au surface and ii) synthesis of amino-containing molecularly imprinted polymer (MIP-NH₂) and then iii) coupling of the MIP-NH₂ on the Fe₃O₄@Au core. **Scheme 1** illustrates the preparation of Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ via immobilization of MIP-NH₂ nanoparticles on the Fe₃O₄@Au core.

i) Preparation of carboxylated Fe₃O₄@Au

In the first step, Fe₃O₄@Au core were synthesized using a process as described in detail in our previous reports [6, 18]. First, Fe₃O₄ particles were synthesized by co-precipitation and then Au³⁺ ion was reduced to Au⁰ on the Fe₃O₄ surface using tri-sodium citrate, to form red-brown Fe₃O₄@Au. The obtained Fe₃O₄@Au core nano particles were separated by magnetic decantation, washed three times with deionized (DI) water, and then dried in a desiccator. The synthesized Fe₃O₄@Au nanoparticle was coated with MUA via a self-assembly method [20] to form a carboxyl-terminated surface. For this purpose, 20 mg of Fe₃O₄@Au was immersed in 1 mL of ethanolic solution of 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) (2mM) for 24 h, followed by washing with ethanol and then drying under nitrogen flow for further activation and coupling with MIP-NH₂.

ii) Preparation of MIP-NH₂

Amino-containing imprinted core nanoparticles was synthesized using the procedure described by S. Hajizadeha et al. [21] and T. Kamra et al. [20] with appropriate modifications. The MIP-NH₂ nanocomposite was prepared by using carbofuran (CBF) as template, methacrylic acid (MAA) and N-isopropylacrylamide (NIPAM) as a monomer, trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) and N, N-methylene-bis-acrylamide (MBA) as cross-linkers and 2,2'-azoisobutyronitrile (AIBN) as an initiator. CBF (137 mg, 0.6 mmol),

MAA1 (110 μL , 1.3 mmol), TRIM (610 μL , 1.9 mmol) AIBN (25 μL , 0.2 mmol) were firstly dissolved in 5 mL of acetonitrile in a 50 mL- round bottom flask equipped with screw cap. The solution was purged with a gentle flow of nitrogen for 5 min and then sealed and sonicated for 5 min in an ultrasonic bath. The reaction was refluxed at 65 °C while gentle stirred continuously for 24 h under nitrogen atmosphere. The first polymerization step led to the formation of CBF imprinted core particles. In the second polymerization step, NIPAM (566 mg, 5.0 mmol), MBA (77.2 mg, 0.5 mmol) and AIBN (22 μL , 0.1 mmol) were added into the resulting mixture from the first step and sonicated for 5 min. The mixture was then purged with nitrogen for 5 min and refluxed at 60 °C while gentle stirred continuously for 48 h under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was centrifuged for 15 min to collect the polymer particles. Finally, the template was removed by soaking the polymer particles in 50 mL of methanol containing 10% acetic acid (v/v) and sonicating for 1 h. Non-imprinted polymer (NIP) particles were prepared by the same procedure but without addition of CBF template molecules in the pre-polymerization mixture.

iii) Coupling of the MIP-NH₂ on the Fe₃O₄@Au core

In the final step, the carboxyl-terminated on Fe₃O₄@Au surface is exposed to a solution of amino-containing imprinted core nanoparticles to form the covalent amide bond. 20 mg of carboxyl-terminated on Fe₃O₄@Au particles was immersed in a 1 mL solution mixture of 400 mM EDC and 100 mM of NHS (1:1, v/v) in methanol for 3 h. The activated surfaces were washed with methanol and then immersed in a 1 mL of MIP suspension (10 mg mL⁻¹) in a mixture of acetonitrile: water (1:1, v/v). The mixture was sonicated for 10 min and left at room temperature for 24 h. The obtained product (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂) were separated by magnetic decantation, washed with deionized water, and then dried in an oven at 45 °C for 3 h.

2.3.2 Preparation of Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE

Prior to modification, the GCE was polished using 1.0 and then 0.05 μm alumina slurries and rinsed with DI water, then sonicated in DI water for 5 min to remove residual abrasive particles. After washing, 20 μL of the Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ dispersion (4 mg mL⁻¹) in 0.5% Nafion solution was dropped onto the GCE surface and then dried at room temperature. Finally, the CBF imprinted sensor (Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE) was obtained.

2.4 Sample preparation and method validation

Practical applicability of the prepared sensor was evaluated by CBF determination in vegetable and fruit samples using a spiked recovery experiment. Chinese kale, Cantonese vegetable, lettuce, grape and dragon fruit were purchased from a local market in Ubon Ratchathani Province, Thailand. Samples were prepared following an extraction method described by Li et al. [21]. Briefly, 20 g samples of various vegetables and fruits were weighed and 50 mL of acetonitrile and 10 g of sodium chloride were added. The mixture was homogenized in a blender for 2 min, then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, collected in a conical flask and filtered. The filtrate was concentrated to dryness by rotary evaporation. The final residue was re-dissolved with 3 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 8). CBF concentration results obtained from the proposed Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ sensor were compared to those obtained from a HPLC method. Analysis was performed using HPLC equipment, model CTO-10AC (Shimadzu, Japan), coupled to a SPD-20A UV/Vis detector [6].

3. Results and discussion

3.1 Characterization

Fe₃O₄@Au core particles were prepared by co-precipitation followed chemical reduction of gold, and the surface was interlayered with MUA to terminate with polymerizable end-group and further coupling with MIP-NH₂ nanoparticles. MIP-NH₂ nanoparticles was synthesized using the pre-formed polymer nanoparticle core that possess a large surface-to-

volume ratio to enhance the larger numbers of imprinted sites. The amino groups on the MIP particles grafting on the pre-formed nanoparticle enhances the porous surface area, resulting in better effective adsorption, shorter response times, and tuning the MIP into suitable surfaces to immobilize on the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ core particles. Morphology and surface roughness of the as-prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-NIP}$ nanocomposites were studied by TEM and AFM. **Fig. 1a** confirmed that $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-NIP}$ are core-shell particle structures. The low-contrast dark cores of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ particles, with an average diameter of about 34.8 ± 6.1 nm (count = 4), were coated with lighter shaded shell of polymer. Topography and surface roughness of MIP and NIP films investigated by AFM were shown in **Fig. 1b**. The $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$ film displays surface roughness and a bulky film layer, while the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-NIP}$ film exhibits a slick and plane surface. The MIP film shows porous character with cavities and a jagged structure. Cavities are not present in the NIP film. MIP porous morphology is attributed to CBF imprinted cavities formed on the surface film following template removal by solvent washing. These results suggest that the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$ formed with binding sites complementary to the CBF target molecules. ATR FT-IR spectroscopy provides direct evidence of MIP- NH_2 coating on the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nano-core surface. **Fig. 2** shows FTIR spectra of CBF molecule (curve a) MIP films before (curve b) and after (curve c) CBF template removal and NIP film (curve d). There are significant differences between MIP films before and after template removal. FT-IR spectrum for MIP films before template removal (curve b) shows bands at 3300, 1541 and 810 and 666 cm^{-1} which are attributed to C-N stretching vibration, C=O stretching, C-H bending, and =C-H bending from CBF molecules adsorbed within the polymer layer. Whereas the MIP film after template removal (curve c) does not present these adsorption bands, indicating that CBF template is successfully removed from the film. Both MIP film after template removal and NIP film (curve c and d, respectively) show C=O stretching bands at around 1725 cm^{-1} from MAA and NIPAM

monomers or MBA cross-linker, and C-N stretching bands at around 1154 cm^{-1} from amino containing in NIPAM and MBA, respectively. These results indicate successful removal of CBF from $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ and the formation of imprinted sites in the polymer layer. Our observances are in good agreement with previous reports [6, 23, 24], that CBF molecules were successfully removed from the polymer film [i] and the facilitate of imprinting sites on the polymer matrix [23, 24].

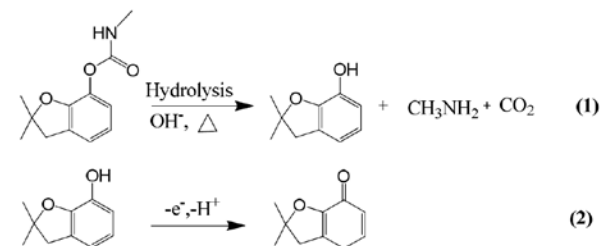
3.2 Electrochemical behavior of CBF at the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$

Electrochemical behavior of CBF is initially investigated using the cyclic voltammetry (CV) at bare GCE and modified GCE. **Fig. 3** shows the comparison of the response of the bare GCE, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au/GCE}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ toward electro-oxidation of CBF at pH 7.0. CV responses obtained from non-imprinted polymer modified GCE ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-NIP/GCE}$) are also shown as inset in **Fig.3**. CBF oxidation is an electrochemically quasi-reversible process. Bare GCE (curve a) shows no obvious oxidation signal while $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au/GCE}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ show well-defined oxidation peaks for CBF at a potential of +0.45 V ($i_p = 0.98 \mu\text{A}$). This suggested that both Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ are electro active. The electrode modified with $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ is more sensitive whereas the electrode modified with $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$ is the most sensitive. The highest signal for CBF is observed for the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$. Thus coupling of MIP- NH_2 onto the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ core enhanced the redox response. The oxidation current arises from CBF molecules that diffuse from the solution via binding sites on the MIP- NH_2 film, to the electrode surface. On the other hand, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-NIP/GCE}$ produces a very low signal (inset, **Fig 3**) at +0.48 V ($i_p = 0.05 \mu\text{A}$). The lack of an oxidation peak in NIP modified electrode indicates that this electrode does not feature CBF binding sites at its surface. The MIP- NH_2 modified electrode enhances the current response by a factor of about twenty time over that of NIP

electrode. The greater electrochemical response seen for the MIP-NH₂ modified electrode has two causes: (i) MIP-NH₂ coated on Fe₃O₄@Au core enhances electrical conductivity and electrocatalytic activity toward CBF redox activity and (ii) MIP-NH₂ provides molecular recognition sites and a greater affinity for CBF via electrostatic interactions and toward hydrogen bonding between the NH₂ containing functional monomer, template, and matrix. The stronger affinity of MIP for analyte molecules in this current work is accordant with previous reports [6, 16-18]. This confirmed that the sensitivity and selectivity of analyte could be promoted because the superior performance to the larger surface area and a strong affinity toward CBF of the binding sites located on the electrode surface and the blocking efficiency of the polymer matrix to other constituents.

We investigated solution pH that could be affected rebinding of the template molecule and electrode transfer. The effect of pH (5-9) on the oxidation peak potential and peak current of CBF investigated using 0.1 M phosphate buffer as the supporting-electrolyte is shown in Fig. S1a. The CBF anodic peak current increases with pH, reaching a maximum at pH 8.0 (Fig. S1b). Further increase in pH result in weaker signals. Thus, phosphate buffer at pH of 8.0 was chosen as the optimum pH. Furthermore, the CBF anodic peak potential ($E_{p,a}$) shifts toward less positive values with increasing electrolyte pH (Fig. S1c). The linear dependency ($r^2 = 0.999$) over 5-9 pH range has a slope of 54 mV pH⁻¹ which close to the value (59 mV pH⁻¹) for the same number of electron and proton. This study shows that the oxidation of CBF at Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE involves one electron and one proton.

The reaction mechanism may be as follows: (step 1) CBF hydrolyzes in alkaline solution, to produce carbofuran phenol (Eqn. 1) [1, 6, 25].



(step 2) Carbofuran phenol, which produces a strong electrochemical response at +0.45 V (Fig.3, curve d), undergoes electro-oxidation at Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE (Eqn. 2). The Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE has a large surface area and good electrocatalytic activity that enhance the CBF signal response. The observation that MIP coated nanocomposites possess high surface areas and specific binding sites with strong affinity toward target molecules that enhance the signal response are in accordance with previous reports [16-18, 26-27].

3.3 Amperometric detection of CBF in FIA system

3.3.1 Effect of detection potential and flow rate

The effect of applied potential on the sensitivity for amperometric detection in FIA system was studied for voltages 0.0 to 1.0 V. Fig. S2a shows that the current response obtained from 5 μM of CBF increases dramatically with increasing detection potential, from 0.00 to 0.50 V and then remains at a steady state. Therefore, we chose a potential of +0.50 V as optimal for detection in our FIA experiments.

In order to lower the analysis time, flow rate of the reaction zone to the thin-layer detection cell was explored. Experiments were carried out at flow rate ranging of 0.2 to 1.5 mLmin⁻¹ with injection of 5 μM of CBF and applied potential of +0.50 V. Fig. S2b shows that sensitivity decreases with increasing flow rate. Higher flow rates generally result in a decreased

signal response because of the shorter contact time between CBF molecules and the MIP-NH₂ binding sites. This behavior is in accordance with previous amperometric FI studies on a supra molecular complex MIP-based CBF sensor [6], 3D-CNTs@MIP of profenofos sensor [16] and an CuO@MIP-based creatinine sensor [17]. However, increasing the flow rate increases sample throughput. Thus, compromise between sensitivity and sample throughput could be achieved at flow rate of 0.8 mL min⁻¹, with analysis time of 60 sample h⁻¹.

3.3.2 Analytical performance

The amperometric response of standard CBF was measured under the optimum condition at room temperature (25 °C). The MIP-NH₂ sensor exhibits well defined and reproducible peak profiles (Fig. 4a). The calibration plot is linear over the range 0.01–100 μM (Fig. 4b). The linear regression equation is $0.989x + 0.082$, with a determination coefficient (r^2) of 0.997. The calculated limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation of the blank ($3S_b$, $n = 7$) is 1.7 nM. The limit of quantification (LOQ) estimated ($10S_b$) [6, 28] is 5.7 nM. Moreover, the MIP-NH₂ sensor provides excellent precision (2.8% RSD for 20 injections of 0.05 μM CBF). We compared the analytical performance of the Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE sensor with related modified electrodes for the determination of CBF pesticides (Table 1). Our proposed Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE sensor exhibits the widest linear range for CBF detection (0.01–100 μM) among all of the referenced methods [2, 4–6, 29–31]. Additionally, the LOD of the new MIP-NH₂ sensor (1.7 nM) is comparable with the LOD for the GCE modified with iron-carboxylated nano metal organic framework combined with graphene oxide (MOF-MIL(Fe)@GO) [31], and even exceed those obtained by other modified electrodes [2, 4–6]. Outstanding features of the developed MIP-NH₂ sensor are its robustness, high sensitivity, and excellent selectivity. We can increase the sensitivity and selectivity of CBF amperometric sensor by coating the electrode surface with Fe₃O₄@Au-MIP-

NH₂ nanoparticles that possess the large surface area and good electrocatalytic activity and synergetic help to improve electron transfer. The synthesized Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ nanoparticles covered on the electrode surface have a large surface area and cavities or binding sites with a strong affinity toward the CBF target molecules and a high blocking efficiency to the other constituents. This observation is in accordance with previous reports [6, 16–18].

3.3.3 Selectivity and stability

The selectivity of MIP based sensors depends on their binding sites that allow specific recognition of the template molecules. To investigate that whatever the analogues or other compounds can bind the polymer and cause a current response or not. We investigated the interference effects of substances such as pesticides, ions and compounds with similar structures, which are commonly found in food products or vegetable extracts to assess the selectivity of the Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE toward the detection of CBF. The effects of foreign compounds including profenofos (PFF) and chlorpyrifos (CPF) pesticides, ionic compounds of NaNO₃, and NaCl, ascorbic acid, hydroquinone, caffeine, and phenol were tested on the FIA current signal obtained from 5 μM CBF in the presence and absence of these foreign compounds. Fig. 5a shows there are no obvious effects on the CBF current response when including up to 10-fold excess concentration of hydroquinone, 50-fold excess of PFF or CPF pesticides, or phenol, or ascorbic acid, 100-fold excess of caffeine or NaNO₃ or NaCl. These results confirm that the MIP sensor provides high selectivity and specificity. We ascribe the specificity by the successful of the imprinted cavity form on the polymer film, which has an excellent capturing ability and selectivity for the target CBF molecule. Therefore, these candidate interference molecules which have different structures from CBF cannot diffuse or bind strongly to recognition sites and thus produce a very weak effect. We conclude that Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE provides high selectivity for amperometric determination of CBF.

The MIP modified electrode provides an impressively good precision (%R.S.D. = 2.8) for 20 peak current values of 0.05 μM CBF as shown in **Fig 5b**. Reproducibility of the electrode-to-electrode estimated from the current responses of three modified electrodes was 3.8%. Stability was also investigated to demonstrated the feasibility of the MIP modified electrode by measuring the current signal from 0.05 μM CBF at various intervals. Fig. S3 shows that the MIP sensor retains 94% of its initial current response after repeated use for one week when stored at 4°C. These results confirm that the MIP sensor exhibits good reproducibility and stability.

3.3.4 Analytical application

The proposed $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ sensor for the determination of CBF was applied to the fruits (grape and dragon fruit) and vegetables samples (Chinese kale, Cantonese vegetable and lettuce). CBF determinations of fruit and vegetable extracts were performed using the standard addition method. Each type of sample was spiked with each of the following: 0.5 and 1.0 μM of CBF. The validity of the proposed method was investigated by recovery determinations. The results were compared with a reference HPLC method as shown in **Table 2**. As shown in the Table, all fruit samples were either contaminated with CBF concentrations below the limit of quantification (<LQD) or remained absolutely free of CBF, while vegetable samples found CBF in the range of 0.255 to 0.309 μM . Results of CBF content in the samples were confirmed with HPLC (Fig. S4). The results show that the analytical recoveries for spiked CBF standards (0.5 and 1.0 μM) were in acceptable range of 92.8% to 104.0% [32, 33]. The relative differences between data obtained from the MIP-NH₂ sensor and that obtained using the HPLC method fall in the range 0.1 - 4.2%. It is to be emphasized that results obtained from all samples were in good agreement with the values obtained from the reference HPLC method. The results also indicated that there are no significant matrix interferences in the analyzed

samples and that the proposed method is sufficiently accurate, precise, and suitable for the quantifying CBF in the mentioned samples. The limit quantification (LOQ) of our MIP-NH₂ sensor (5.7 nM) is lower than Codex Alimentarius Commission's maximum residual levels (MRL) for CBF residues in/on several food samples including green bean, banana, coffee and rice at 0.1 mg kg⁻¹ (45 nM) [34, 35], indicating that the method is suitable for quantitative analysis of CBF in food samples.

4. Conclusion

A novel amino-containing molecularly imprinted polymer (MIP-NH₂) coated on magnetite-gold nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$), which is excellent catalytic activity, inexpensive and easy to synthesis, was used to modify glassy carbon electrode (GCE) to be a new highly sensitive, selective and robust amperometric sensor for carbofuran (CBF) detection. The MIP-NH₂ nanocomposite was characterized by TEM, AFM and ATR FT-IR. Printing of CBF on the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ core surface significantly increases the specific surface area by providing large numbers of imprinted sites for improving selectivity and electron transfer from target CBF molecule and the electrode surface. Incorporating $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2$ in the sensor significantly increases its electrical conductivity, and increases the electrocatalytic properties of the electrode, enhancing of the sensitivity for CBF detection. On-line amperometric detection with the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-MIP-NH}_2/\text{GCE}$ was successfully applied to determine CBF concentration in fruits and vegetables. The MIP sensor is promising as an alternative and highly sensitive and selective electrochemical method.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support from the Thailand Research fund (TRF: RSA6080062) and the support from Center of Excellence for Innovation in Chemistry

(PERCH-CIC), The Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education (OHEC), and the Faculty of Science at Ubon Ratchathani University (UBU).

References

- [1] A. Jirasirichote, E. Punrat, A. Suea-Engam, O. Chailapakul, S. Chuanwatanakul, Voltammetric detection of carbofuran determination using screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide, *Talanta* 175 (2017) 331–337.
- [2] M. Wang, J. Huang, M. Wang, D. Zhang, J. Chen, Electrochemical non-enzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables, *Food chem.* 151 (2014) 191–197.
- [3] P. Nocolopoulou Stamti, S. Maipas, C. Katampsi, P. Stamatis, L. Hens, Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture, *Front. Oublic Heal.* 4 (2016) 1–8.
- [4] F. D. Pelle, C. Angelini, M. Sergi, M. D. Carlo, A. Pepe, D. Compagnone, Nano carbon black-based screen printed sensor for carbofuran, isoprocarb, carbaryl and fenobucarb detection: application to grain samples, *Talanta* 186 (2018) 389–396.
- [5] F. Chekol, S. Mehretie, F. A. Hailu, T. Tolcha, N. Megersa, S. Admassie, Roll-to-roll printed PEDOT/PSS/GO plastic film for electrochemical determination of Carbofuran, *Electroanalysis* 31 (2019) 1–9.
- [6] M. Amatongchai, W. Sroysee, P. Janjamsrus, D. Nacapricha, P. A. Lieberzeit, Selective amperometric flow-injection analysis of carbofuran using a molecularly-imprinted polymer and gold-coated-magnetite modified carbon nanotube-paste electrode, *Talanta* 179 (2018) 700–709.

- [7] E.-Y. Yang, H.-S. Shin, Trace level determinations of carbamate pesticides in surface water by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with 9-xanthidrol, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 328–332.
- [8] W.-ji Zhang, D. Li, Y. Xu, Z. Jiang, Y. Chen, P. Wang, Synthesis and application of novel molecularly imprinted solid phase extraction materials based on carbon nanotubes for determination of carbofuran in human serum by high performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 5105–5112.
- [9] Y.-R. Guo, S.-Y. Liu, W.-J. Gui, G.-N. Zhu, Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples, *Anal. Biochem.* 389 (2009) 32–39.
- [10] H. Y. Xie, Y. Z. He, W. E. Gan, G. N. Fu, L. Li, F. Han, Y. Gao, One-column liquid-liquid microextraction coupled with base stacking as a dual preconcentration method for capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1216 (15) (2009) 3353–3359.
- [11] H. Li, I. Ricordel, L. Tong, L. M. Schopfer, F. Baud, B. Mégarbane, E. Maury, P. Massone, O. Lockridge, Carbofuran poisoning detected by mass spectrometry of butyrylcholinesterase adduct in human serum, *J. Appl. Toxicol.* 29 (2009) 149–155.
- [12] C. March, J.J. Manclús, Y. Jiménez, A. Arnau, A. Montoya, A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices, *Talanta* 78 (2009) 827–833.
- [13] X. Sun, S. Du, X. Wang, Amperometric immunosensor for carbofuran detection based on gold nanoparticles and PB-MWCNTs-CTS composite film, *Eur Food Res Technol* 253 (2012) 469–477.
- [14] Y. Zhu, Y. Cao, X. Sun, X. Wang, Amperometric Immunosensor for Carbofuran Detection Based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPs-Antibody Conjugate, *Sensors* 13 (2013) 5286–5301.

- [15] J. Wackerlig, P. A. Lieberzeit, Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing- Synthesis, characterisation and application, *Sensors and Actuators B* **2015**, *207*, 144–157.
- [16] M. Amatongchai, W. Sroysee, P. Sodkrathok, N. Kesangam, S. Chairam, P. Jarujamrus, Novel three-Dimensional molecularly imprinted polymer-coated carbon nanotubes (3D-CNTs@MIP) for selective detection of profenofos in food, *Analytica Chimica Acta* **1076** (2019) 64-72.
- [17] N. Nontawong, M. Amatongchai, S. Thimoonnee, S. Laosing, P. Jarujamrus, C. Karuwan, S. Chairam, Novel amperometric flow-injection analysis of creatinine using a molecularly-imprinted polymer coated copper oxide nanoparticle-modified carbon-paste-electrode, *J. Pharmaceut. Biomed.* **175**(2019) 112770.
- [18] M. Amatongchai, J. Sitanurak, W. Sroysee, S. Sodanatt, S. Chairam, P. Jarujamrus, D. Nacapricha, P. A. Lieberzeit, Highly sensitive and selective electrochemical paper-based device using a graphite screen-printed electrode modified with molecularly imprinted polymers coated $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{SiO}_2$ for serotonin determination, *Analytica Chimica Acta* **1077**(2019) 255- 265.
- [19] K. K. Kotova, M. Hussain, G. Mustafa and P. A. Lieberzeit, MIP sensors on the way to biotech applications: Targeting selectivity, *Sens. Actuator B.* **2013**, *189*, 199-202.
- [20] T. Kamra, S. Chaudhary, C. Xu, L. Montelius, J. Schnadt, L. Ye, J. of Colloid Interface Sci. **461** (2016) 1–82.
- [21] S. Hajizadeh, C.G. Xu, H. Kirsebom, L. Ye, B. Mattiasson, J. Chromatogr. A **1274** (2013) 6–12.
- [22] S. Li, G. Yin, X. Wu, C. Liu, J. Luo, Supramolecular imprinted sensor for carbofuran detection based on a functionalized multi-walled carbon nanotube-supported Pd-Ir composite and methylene blue as catalyst, *Electrochimica Acta* **188** (2016) 294–300

- [23] A. K. M. M. Islam, J.-I. Hwang, S.-E. Lee, J.-E. Kim, Comparative study of carbon black and activated carbon adsorbents for removal of carbofuran from aqueous solution, *Desalin Water Treat* **57** (2015) 1–12.
- [24] A. K. Saikia, S. Aggarwal, U. K. Mandal, Preparation and Controlled Drug Release Characteristics of Thermo-responsive PEG/Poly (NIPAMco-AMPS) Hydrogels, *Int J. Polym Mater* **62** (2012) 39–44.
- [25] H. Wei, J. J. Sun, Y. M. Wang, X. Li, G. N. Chen, Rapid hydrolysis and electrochemical detection of trace carbofuran at a disposable heated screen-printed carbon electrode, *Analyst* **133** (2008) 1619-1624.
- [26] A.-L. Gopalan, S. Komathi, N. Muthuchamy, K.-P. Lee, M. J. Whitcombe, L. Dhana, G. S.-A., Functionalized conjugated polymers for sensing and molecular imprinting applications, *Progress in Polymer Science* **88** (2019) 1- 129.
- [27] S. Farooq, J. Nie, Y. Cheng, Z. Yan, S. A. S. Bacha, J. Zhang, R. A. Nahiyyoon , Q. Hassain, Synthesis of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer for the selective determination of imidacloprid in apple samples, *J. Sep. Sci* **42** (2019) 2455-2465.
- [28] ISO 11843, Capability of Detection, Part I/II, Geneva, 19
- [29] S. Li, J. Li, J. Luo, Z. Xu, X. Ma, A microfluidic chip containing a molecularly imprinted polymer and a DNA aptamer for voltammetric determination of carbofuran, *Microchim. Acta* **185** (2018) 295.
- [30] Y. Li, Y. Li, X. Yu, Y. Sun, Electrochemical determination of carbofuran in tomatoes by a concanavalin A (Con A) polydopamine (PDA)-reduced graphene oxide (RGO)-gold nanoparticle (GNP) glassy Carbon Electrode (GCE) with immobilized acetylcholinesterase (AChE), *Anal. Lett.* **52** (2019) 2283–2299.
- [31] M. S.-Shahrivar, N. Karimian, H. Fakhri, A. Hajian, A. Atkhami, H. Bagheri, Design and Application of a Non-enzymatic Sensor Based on Metal-organic Frameworks for the

- Simultaneous Determination of Carbofuran and Carbaryl in Fruits and Vegetables,
Electroanalysis 2019, 31, 1– 12.
- [32] A. G. González, M. Á.Herrador, A. G. Asuero, Intra-laboratory assessment of method
accuracy (trueness and precision) by using validation standards, Talanta 82 (2010) 1995-
1998.
- [33] T.P.J. Linsinger, Use of recovery and bias information in analytical chemistry and
estimation of its uncertainty contribution, Trac. Trends Anal. Chem. 27 (2008) 916-923.
- [34] Y. Dai, T. Wand, X. Hu, S. Liu, M. Zhang, C. Wang. Highly sensitive microcantilever-
based immunosensor for the detection of carbofuran in soil and vegetable samples, Food
chem. 229 (2017) 432-438.
- [35] Q. Zhang, Q. Qu, S. Chen, X. Liu, P. Li. A double-label time-resolved fluorescent strip
for rapidly quantitative detection of carbofuran residues in agro-product, Food chem. 231
(2017) 295-300.

Table 1. Performance comparison of the proposed Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ sensor with other CBF-detection sensors.

Electrode	Modifier	Techniques	Monomer/ Cross-linker	Linearity range (μ M)	LOD (nM)	Ref.
SPE	Nano carbon back PEDOT/PSS/GO	DPV	-	0.1 - 100	49	[4]
		LSV	-	1 - 90	100	[5]
CPE	4-TB[8]A-CBF-MIP-CNTs- Fe ₃ O ₄ @Au	FIA-AMP	o-phenylenediamine	0.1 - 100	3.8	[6]
μ -Chip	MIP/GO-AuNPs/DNA aptamer	DPV	MAA/ N,N'- methylene diacrylamide	0.002 - 0.05	0.07	[29]
GCE	AChE/Con A/PDA-rGO-AuNPs	AMP	-	0.02 – 0.18	0.05	[30]
	CoO/rGO	DPV	-	0.2 – 70	190	[2]
	MOF-MIL(Fe)@GO	DPV	-	0.005 – 0.2	0.5	[31]
	Fe ₃ O ₄ @Au-MIP-NH ₂	FIA-AMP	MAA/ NIPAM and TRIM/MBA	0.01 - 100	1.7	This work

Electrode

SPE = Screen printed electrode

CPE = Carbon paste electrode

μ -Chip = microfluidic chip

GCE = glassy carbon electrode

Modifier

PEDOT/PSS = poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/polystyrene sulphonate, GO = graphene oxide.

4-TB[8]A-CBF= supra molecular complex 4-ter-butylcalix [8] arene-carbofuran, MIP = molecularly imprinted polymers, CNTs = carbon nanotubes, Fe₃O₄@Au = gold-coated magnetite.

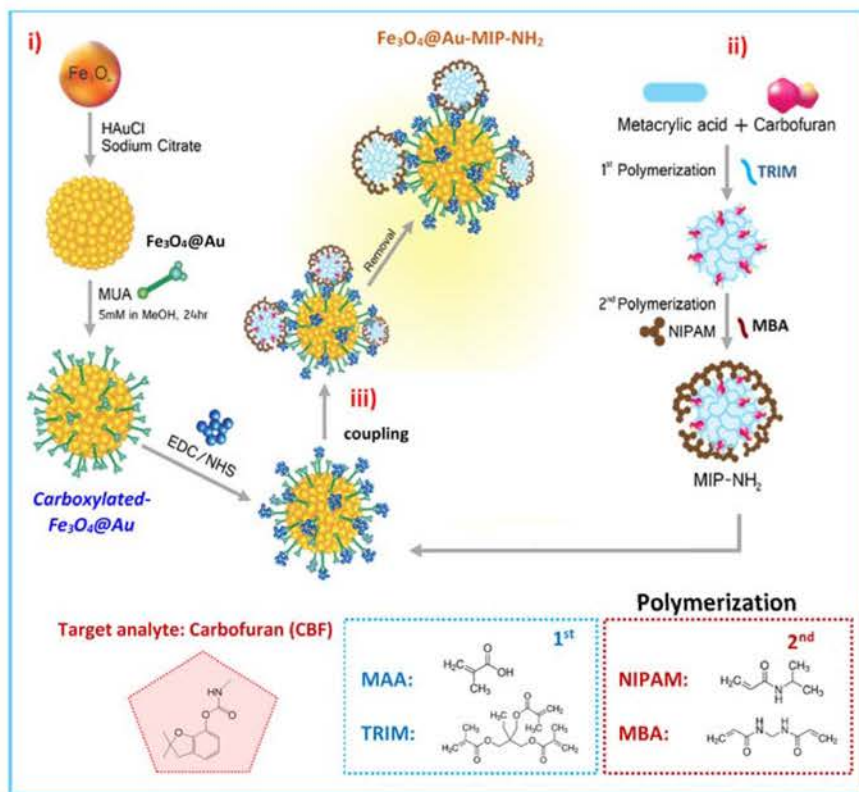
GO-AuNPs = graphene oxide supported gold nanoparticles, DNA aptamer = Carbofuran DNA aptamer

AChE = acetylcholinesterase, Con A = Concanavalin A, PDA-rGO = Polydopamine-reduced graphene oxide, AuNPs = gold nanoparticles, CoO = cobalt (II) oxide, MOF-MIL(Fe)@GO = Iron-carboxylate nano metal organic framework combined with graphene oxide.

Table 2. Comparison of CBF determination in vegetables and fruits between the developed Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂ and the reference HPLC method.

Samples	Added (μM)	Proposed method		HPLC method		Relative error (%)
		Found ± S.D. (μM)	Recovery (%)	Found ± S.D. (μM)	Recovery (%)	
Grape	-	<LOQ	-	<LOQ	-	-
	0.50	0.520 ± 0.007	104.0	0.522 ± 0.006	104.4	-0.4
	1.00	1.012 ± 0.006	101.2	1.011 ± 0.006	101.1	0.1
Dragon fruit	-	<LOQ	-	<LOQ	-	-
	0.50	0.502 ± 0.002	100.4	0.499 ± 0.001	99.8	0.6
	1.00	1.009 ± 0.001	100.9	1.004 ± 0.023	100.4	0.5
Chinese kale	-	0.309 ± 0.016	-	0.298 ± 0.001	-	3.7
	0.50	0.813 ± 0.003	100.8	0.797 ± 0.002	99.8	1.0
	1.00	1.282 ± 0.001	97.3	1.295 ± 0.005	99.7	-2.4
Cantonese Vegetable	-	0.303 ± 0.001	-	0.291 ± 0.010	-	4.1
	0.50	0.805 ± 0.005	100.4	0.813 ± 0.005	104.4	-4.0
	1.00	1.280 ± 0.020	97.7	1.310 ± 0.009	101.9	-4.2
Lettuce	-	0.255 ± 0.001	-	0.245 ± 0.002	-	4.1
	0.50	0.729 ± 0.012	92.8	0.739 ± 0.031	98.8	-4.0
	1.00	1.197 ± 0.020	94.2	1.226 ± 0.008	98.1	-3.9

Each value is the mean average of three measurements.



Scheme 1. Preparing $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ via the fabrication of the MIP-NH_2 for CBF.

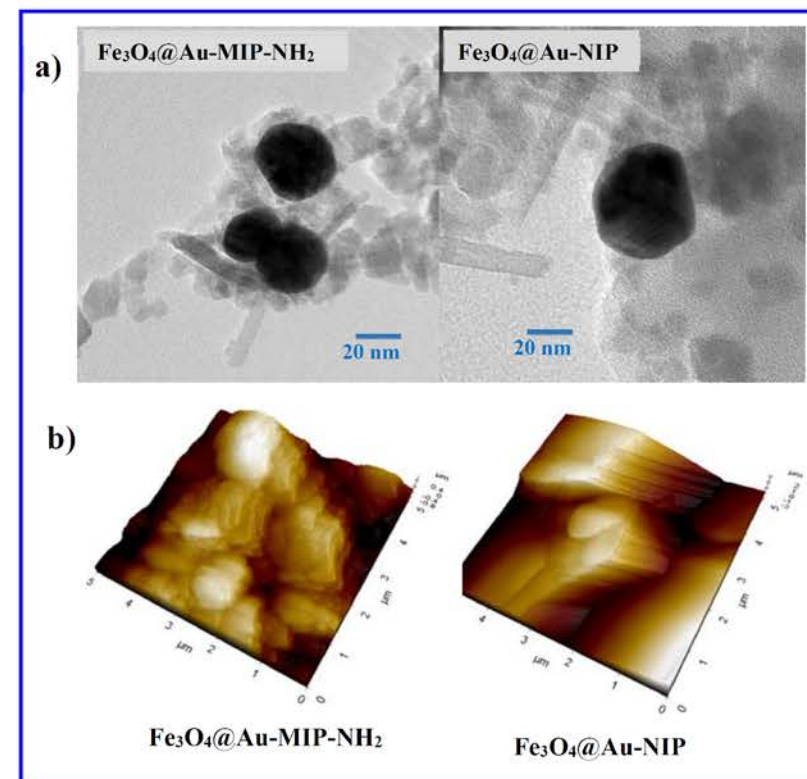


Fig. 1 (a) TEM images of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-MIP-NH}_2$ and non-imprinted (NIP) films synthesized on the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ core ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-NIP}$). (b) AFM images of MIP and NIP films synthesized on the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ core.

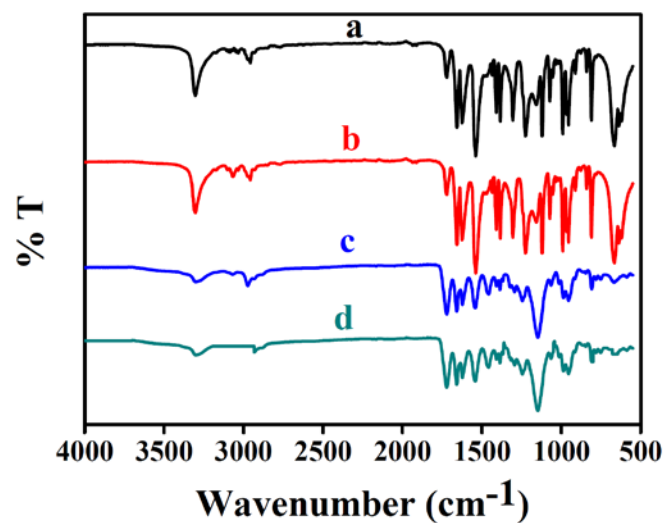


Fig. 2 FT-IR spectrum of (a) carbofuran (b) Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE films before template removal (c) Fe₃O₄@Au-MIP/GCE film after template removal and (d) Fe₃O₄@Au-NIP/GCE.

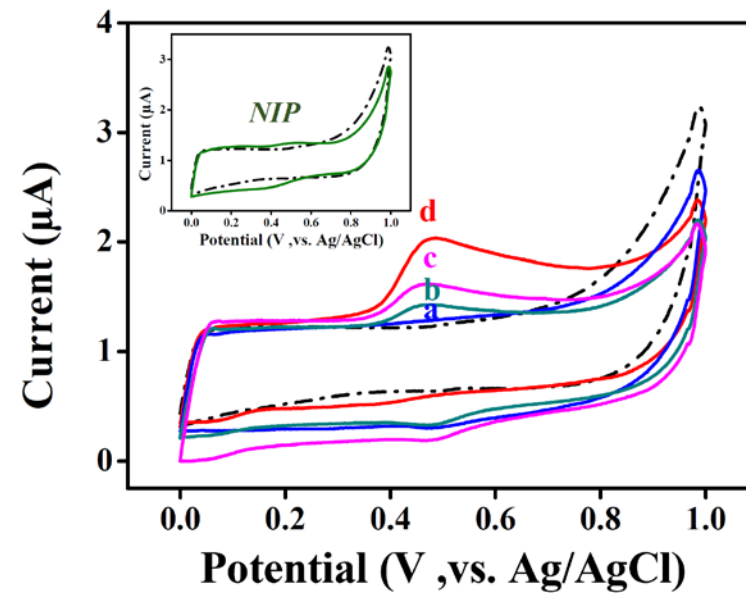


Fig. 3 CVs plots obtained from 5 μM of CBF in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) at (a) bare GCE, (b) Fe₃O₄/GCE, (c) Fe₃O₄@Au/GCE and (d) Fe₃O₄@Au-MIP-NH₂/GCE, using a scan rate of 0.05 V s⁻¹, the dotted line shows the background voltammogram.

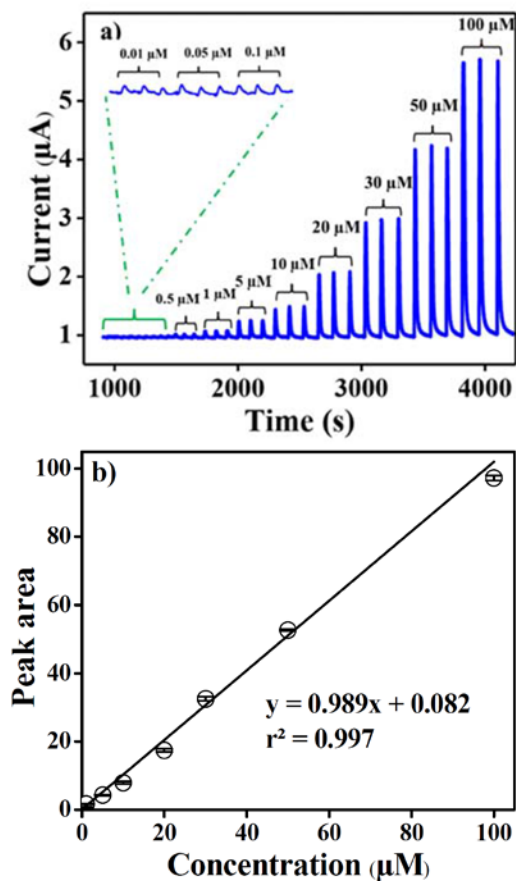


Fig. 4 Amperometric response of the Fe₃O₄@Au-MIP/GCE (a) in the FIA system with 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) at +0.50 V and a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and (b) the linear relationship between CBF concentration and peak area.

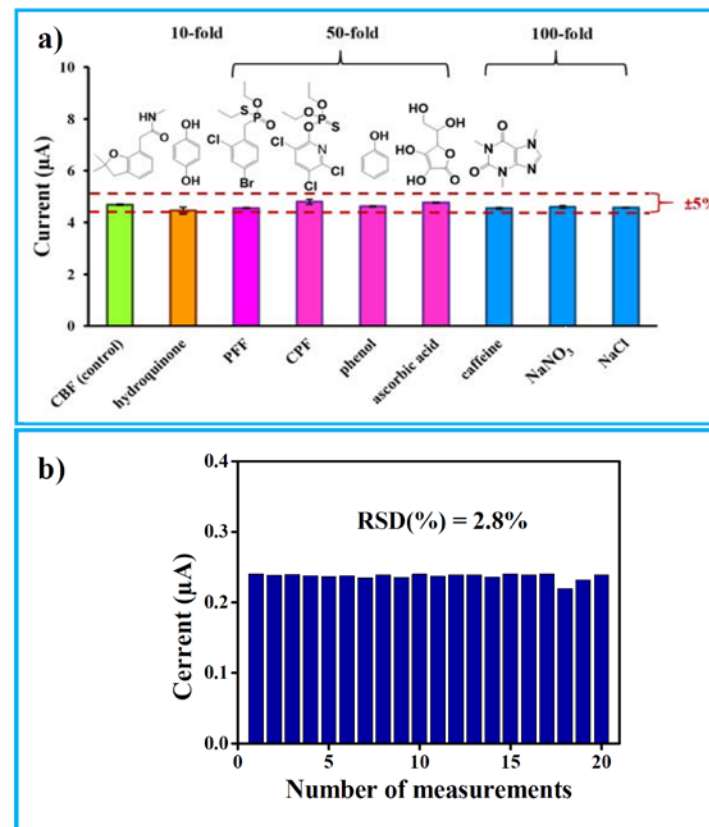


Fig. 5 (a) Selectivity of the proposed Fe₃O₄@Au-MIP/GCE for CBF detection; comparison between the peak area obtained from 5 μM CBF (control) and the peak area of 5 μM CBF with interfering substances. (b) Current response of the twenty determinations (0.05 μM CBF) on the modified electrode.