

การดัดแปลงอิเล็กทรอนิกส์ด้วยอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอลสำหรับฟีนอลไบโอเซนเซอร์



นายยุทธาน ดาโอะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GOLD NANOPARTICLES/ POLYPYRROLE MODIFIED ELECTRODE FOR PHENOL

BIOSENSOR



Mr. Yusran Daoa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การดัดแปลงอิเล็กทรอนิกส์ด้วยอนุภาคนาโนทอง/
พอลิไพโรลสำหรับฟีนอลไบโอเซนเซอร์

โดย

นายยุทธาน ดาโอ๊ะ

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


ดร. ชัญชนา ธนชยานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

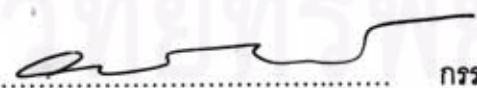

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศธีรวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เหมื่อนเดือน ทิศาลพงศ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. ชัญชนา ธนชยานนท์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วงศ์ ปวงราชารย์)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. มานพ สุพรรณธริกา)

ยุทธาน ตาโอ๊ะ : การดัดแปลงอิเล็กโทรดด้วยอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอลสำหรับฟีนอล
ไบโอเซนเซอร์(GOLD NANOPARTICLES/ POLYPYRROLE MODIFIED ELECTRODE
FOR PHENOL BIOSENSOR) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. สิริ้ง ปรีชานนท์,
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. ชัญชนา ธนชยานนท์, 117 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาเป็นการดัดแปลงพื้นผิวของอิเล็กโทรดด้วยอนุภาคนาโนทองด้วยวิธี
เคมีไฟฟ้า และนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยพอลิไพร์รอลโดยวิธีอิเล็กโทรพอลิ
เมอร์ไรเซชัน งานวิจัยส่วนแรกศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยใช้
เคมีไฟฟ้าบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ความเข้มข้นของ $AuCl_4^-$ ที่ 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร
และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า 5, 30 และ 60 วินาที พบว่า อนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็ก
โทรดช่วยเพิ่มการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้า สภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง
ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า 30 วินาที เส้นผ่าศูนย์กลางและ
ความสูงของอนุภาคนาโนทอง 56.22 และ 33.27 นาโนเมตร ตามลำดับ และมีจำนวนอนุภาคนาโนทอง
 4.05×10^8 อนุภาค/ cm^2 จากข้อมูลในส่วนแรกนำมาใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงรูป
เอนไซม์ด้วยพอลิไพร์รอลด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ
ไพร์รอลมอนอเมอร์ (0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 และ 0.13 โมลต่อลิตร) อิทธิพลของจำนวนรอบ
(5, 10, 15, 20 และ 25 รอบ) พบว่าความเข้มข้นของไพร์รอลมอนอเมอร์ที่เหมาะสมคือ 0.09 โมลต่อลิตร
และใช้จำนวนรอบ 10 รอบ มีค่าการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงสุด -1953 นาโนแอมแปร์ จาก
การศึกษาพบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงของฟีนอล 3.0×10^{-5} - 2.1×10^{-4} โมลต่อลิตร ความไวต่อการ
ตอบสนอง 7.277 nA/ μM ($R^2 = 0.992$) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ 2.54×10^{-5} โมลต่อลิตร ($n=5$),
($S/N=3$) และเวลาการตอบสนอง 50 วินาที นอกจากนี้การนำกลับมาใช้ใหม่ 10 ครั้ง มีประสิทธิภาพ
ลดลงเหลือ 67.45% จากการวัดครั้งแรก เมื่อการจัดเก็บเป็นเวลา 3 วัน มีประสิทธิภาพลดลงเหลือ
68.34% และการผลิตซ้ำมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 10.67

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อผู้นิสิต.....ยุทธาน ตาโอ๊ะ.....
ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....ดร. สิริ้ง.....
ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....ชัญชนา.....

5170607021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: GOLD NANOPARTICLES / POLYPYRROLE/ HORSERADISH PEROXIDASE
/ BIOSENSOR

YUSRAN DAOA: GOLD NANOPARTICLES/ POLYPYRROLE MODIFIED
ELECTRODE FOR PHENOL BIOSENSOR. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.
SEEROONG PRICHANONT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: CHANCHANA
THANACHAYANONT, Ph.D., 117 pp.

In this research, focused on electrodeposition gold nanoparticles modified glassy carbon electrode was used to immobilization of horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) with polypyrrole by electropolymerization process. In this study, the experiments were divided into two parts. Firstly, the optimum condition gold nanoparticles modified glassy carbon electrode were prepared for the electrodeposition by varying concentration of AuCl_4^- (0.1, 0.5 and 1 mM) and deposition times (5, 30 and 60 s). It was revealed that gold nanoparticles improve the current response of electrode. The optimal condition modified electrode were determined at 0.5 mM gold solution and 30 s for deposition times. The particle diameter and high were 56.22 and 33.27 nm, respectively and total surface area of 4.05×10^9 separate gold particles per cm^2 . Data from the first part were further applied to investigate with experimental design for optimum conditions of enzyme immobilization with polypyrrole. The optimum conditions for enzyme activity were determined at concentration of pyrrole (0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 and 0.13 M) and number of cycle for electropolymerization (5, 10, 15, 20 and 25 cycle). The optimum conditions for enzyme reaction were found at 0.09 M and 10 cycle. It was found that the response current of electrode were -1953 nA. The biosensor showed a linear range from 3.0×10^{-5} - 2.1×10^{-4} M, with sensitivity of 7.277 nA/ μM ($R^2 = 0.992$), detection limit 2.54×10^{-5} M ($n=5$), (S/N=3) and response time 50 s. However, the current response of this biosensor decreased to 67.45% of the initial current after 10 repeated tests, and lost 68.34% of the initial response on the third day of storage. Moreover, the R.S.D. of this electrode reproducibility was 10.67%.

Department : Chemical Engineering

Field of Study : Chemical Engineering

Academic Year : 2009

Student's Signature :^{ยศวรณ}.....^{ดาอา}.....

Advisor's Signature :^{ศว}.....

Co-Advisor's Signature :^{ชชชชช}.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ ที่ได้ให้คำแนะนำวิธีการทำงานวิจัย ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

อาจารย์ ดร. ชัญชนา ธนชยานนท์ ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับความรู้ในเชิงวัสดุศาสตร์และการใช้โปรแกรมที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์การทำการทดลอง

อาจารย์บัญชา อุนพานิช ภาควิชาวิศวกรรมเทคโนโลยีที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับความรู้ ตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์การทำการทดลอง

คุณวรรณวิมล เมฆบุญส่งลาภ และคุณสิริวัชร แซ่หนึ่ง นักวิทยาศาสตร์จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการให้คำปรึกษาในการทำงานใช้เครื่องโพเทนชิออสแตทและอุปกรณ์ต่างๆ ในศูนย์เครื่องมือฯ และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเกี่ยวกับข้อมูลเครื่อง scanning probe microscope (SPM)

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลงไม่ได้ถ้าขาดบุคคลเหล่านี้ นางสาวเลิศลักษณ์ แก้ววิมล (พี่ลักษณ์) และนางสาว ปานใจ รุจิสมนภา (กิม) สำหรับการให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัย และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อนพ้องทั้งหลายสำหรับกำลังใจและ ให้ความสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎี.....	7
2.1 เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส.....	7
2.2 วิธีการตรึงเอนไซม์.....	9
2.3 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูป.....	12
2.4 ไบโอดีเซนเซอร์.....	13
2.5 วิธีวิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้า.....	14
2.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอดีเซนเซอร์.....	18
บทที่ 3 วารสารปริทรรศน์.....	20
3.1 เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สำหรับตรวจวัดฟีนอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	20
3.2 พอลิเมอร์นำไฟฟ้าและอิทธิพลที่มีผลต่อพอลิเมอร์ต่อการตรึงเอนไซม์.....	24
3.3 อนุภาคนาโนของโลหะและอิทธิพลที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะ...30	
3.4 การนำอนุภาคนาโนของโลหะมาประยุกต์ใช้กับไบโอดีเซนเซอร์.....	40
บทที่ 4 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	43
4.1 สารเคมี.....	43
4.2 วิธีการทดลอง.....	44

หน้า

บทที่ 5	ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง.....	50
	5.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองโดยใช้เคมีไฟฟ้าบนพื้นผิวของอิเล็กโทรดใช้งาน.....	50
	5.1.1 การศึกษากลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง.....	50
	5.1.2 การศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง.....	51
	5.1.3 การศึกษาคูณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง.....	60
	5.2 สภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP)/	
	ไพรอล.....	64
	5.2.1 อิทธิพลของความเข้มข้นของไพรอล.....	71
	5.2.2 อิทธิพลของจำนวนรอบ.....	76
	5.2.3 การศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคทอง/ พอลิไพรอล/	
	เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส	79
	5.2.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์.....	83
บทที่ 6	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	89
	6.1 สรุปผลการทดลอง.....	89
	6.2 ข้อเสนอแนะ.....	90
	รายการอ้างอิง.....	91
	ภาคผนวก.....	100
	ภาคผนวก ก ข้อมูลผลการทดลอง.....	101
	ภาคผนวก ข.....	111
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	117

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย จำนวนอนุภาคนาโนทอง
และค่าพื้นที่ผิว.....56

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไปโอเซนเซอร์88



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล สำหรับพีนอลไปโอเซนเซอร์.....6

รูปที่ 2.1 เอนไซม์ทริปซินที่ถูตรึงอยู่ในวัสดุพอร์ที่มีประจุ12

รูปที่ 2.2 หลักการทำงานของไปโอเซนเซอร์13

รูปที่ 2.3 ลักษณะของ cyclic voltammogram15

รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่มีตัวกลางเป็นตัวถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่าง
 เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสและอิเล็กโทรด.....21

รูปที่ 3.2 กลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer)
 ระหว่าง เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส และอิเล็กโทรด.....21

รูปที่ 3.3 การตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนอิเล็กโทรด.....24

รูปที่ 3.4 กระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันพอลิไพรอล.....25

รูปที่ 3.5 AFM ของอนุภาคทองบน GCE.....32

รูปที่ 3.6 ลักษณะพื้นผิวของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยใช้เทคนิค AFM.....34

รูปที่ 3.7 ภาพ SEM อนุภาคเงินเกาะแพลทินัมอิเล็กโทรด.....38

รูปที่ 4.1 แสดงกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดแท่งเล็กที่ทำการเชื่อมต่อกับสายไฟ.....49

รูปที่ 5.1 ภาพ SEM ของอนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด
 โดยใช้ความเข้มข้น $AuCl_4^-$ 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร และให้ศักย์ไฟฟ้า
 -0.2 โวลต์เป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามลำดับ53

รูปที่ 5.2 ภาพ AFM และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทอง
 บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความเข้มข้น $AuCl_4^-$ 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร.....57

รูปที่ 5.3 ภาพ AFM และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทอง
 บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความเข้มข้น $AuCl_4^-$ 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร.....58

รูปที่ 5.4 ภาพ AFM และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทอง
 บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความเข้มข้น $AuCl_4^-$ 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร.....59

รูปที่ 5.5 Cyclic voltammetry ของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด
 ที่ถูกดัดแปลงด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยใช้ความเข้มข้น $AuCl_4^-$
 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร 63

รูปที่ 5.6 แสดงภาพการเปรียบเทียบการดัดแปลงอิเล็กโทรดชนิดต่างๆ	
(ก) กลาสส์คาร์บอนอิเล็กโทรด (bare) (ข) อนุภาคนาโนทอง (Gold)	
(ค) พอลิไพร์รอล (PPy) (ง) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล (Gold/ PPy)	
(จ) พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (PPy/ HRP)	
และ (ฉ) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส	
(Gold/ PPy/ HRP) ตามลำดับ.....	66
รูปที่ 5.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่มีตัวกลางเป็นตัวถ่ายโอนอิเล็กตรอน	
(mediated electron transfer) ระหว่างเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส	
และอิเล็กโทรด	68
รูปที่ 5.8 กลไกการการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer)	
ระหว่างเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสและอิเล็กโทรด.....	68
รูปที่ 5.9 แสดงภาพกระบวนการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ HRP.....	69
รูปที่ 5.10 การเปรียบเทียบกลาสส์คาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการดัดแปลง (bare)	
อนุภาคนาโนทอง (Gold) พอลิไพร์รอล (PPy) อนุภาคนาโนทอง/พอลิไพร์รอล	
(Gold/ PPy) พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (PPy/ HRP)	
และอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส	
(Gold/ PPy/ HRP) ตามลำดับ.....	70
รูปที่ 5.11 ภาพ SEM (30 องศา) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/	
เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่มีไพร์รอลมอนอเมอร์	
ความเข้มข้นของต่างๆ (ก) 0.03 (ข) 0.05 (ค) 0.07 (ง) 0.09 (จ) 0.11	
และ (ฉ) 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ.....	74
รูปที่ 5.12 ค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี	
ความเข้มข้นพอลิไพร์รอล 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11	
และ 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ.....	75
รูปที่ 5.13 ภาพ SEM (30 องศา) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/	
เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่มี จำนวนรอบต่างๆ (ก) 5 (ข) 10	
(ค) 15 (ง) 20 (จ) 25 รอบตามลำดับ.....	77

รูปที่ 5.14 ค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรี ของจำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอัสเรดิซเปอร์ออกซิเดส 5, 10, 15, 20 และ 25 รอบ ตามลำดับ.....	78
รูปที่ 5.15 ภาพ SEM โครงสร้างของฟิล์มชนิดต่างๆ (ก) พอลิไพรอล (ข) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล (ค) เอนไซม์ฮอัสเรดิซเปอร์ออกซิเดส/ พอลิไพรอล (ง) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอัสเรดิซเปอร์ออกซิเดส.....	80
รูปที่ 5.16 ภาพ AFM โครงสร้างของฟิล์มชนิดต่างๆ (ก) พอลิไพรอล (ข) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล (ค) เอนไซม์ฮอัสเรดิซเปอร์ออกซิเดส/ พอลิไพรอล (ง) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอัสเรดิซเปอร์ออกซิเดส.....	82
รูปที่ 5.17 (ก) calibration curve ความเข้มข้นของฟีนอล (ข) ช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์.....	83
รูปที่ 5.18 เวลาการตอบสนองด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอล ความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร.....	84
รูปที่ 5.19 การวัดกระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดจากแท่งเดิมซ้ำจำนวน 10 ครั้ง ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร.....	85
รูปที่ 5.20 การวัดกระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดที่ผลิตซ้ำ จำนวน 5 ครั้ง ด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร.....	86

รูปที่ 5.21 การวัดกระแสไฟฟ้าของอิเล็กทรอนิกส์ที่จัดเก็บเป็นเวลา 30 วัน ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร.....	87
--	----



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย

การศึกษาระบบการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะบนอิเล็กโทรดใช้งานในการวิเคราะห์ไบโอเซนเซอร์ จะมีข้อดีหลายประการเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแมคโครอิเล็กโทรดที่ไม่มีการดัดแปลงคือ สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรด ความว่องไวและเวลาในการตอบสนองทางสัญญาณทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดได้ดีขึ้น การสังเคราะห์อนุภาคของโลหะต่างๆ สามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้กันมากวิธีหนึ่งคือ การสังเคราะห์ด้วยเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) วิธีนี้มีข้อดีคือ อนุภาคโลหะที่สังเคราะห์มีความบริสุทธิ์ และสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคได้เป็นอย่างดี อนุภาคโลหะที่นิยมสังเคราะห์ได้แก่ ทอง เงิน คาร์บอนนาโนทิวบ์ เป็นต้น อนุภาคของโลหะเหล่านี้มีคุณสมบัติที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) คตะไลติก (catalytic) และการนำไฟฟ้า (conductivity) ซึ่งช่วยในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนบริเวณพื้นผิวของอิเล็กโทรด

ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาวិธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเซนเซอร์ โดยจากการศึกษาของ Dai และคณะ(2004) ทำการศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยเคมีไฟฟ้าในสารละลายโดยศึกษาถึงความเข้มข้นและเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดสารหนู (arsenic) โดยใช้เทคนิคสทริปปิงโวลแทมเมตรีใน ส่วน Simm และคณะ (2005) ได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยเปรียบเทียบกัน 2 วิธี คือวิธีอัลตราซาวด์ (ultrasound) และวิธีเคมีไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของฮาโลเทน นอกจากนี้ Dai และคณะ(2006) ได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนอินเดียมทินออกไซด์อิเล็กโทรด โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าในสารละลายโดยศึกษาถึงความเข้มข้น และเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า เพื่อศึกษาการตรวจวัดสารหนู และจากกลุ่มวิจัยเดียวกัน Ward-Jones และคณะ (2006) ศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของอนุภาคโลหะต่างๆ คือ บิสมัท เงิน คอปเปอร์และทังสแตนโดยใช้วิธีอัลตราซาวด์ พบว่า บิสมัท เงิน คอปเปอร์ และทังสแตนสามารถเกาะติดบนอิเล็กโทรดได้

การศึกษานำอนุภาคนาโนของโลหะที่มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับสารชีวภาพร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ สามารถปรับปรุงปัญหาในเรื่องความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) และความไวต่อการตอบสนองไม่มากของไบโอเซนเซอร์ ซึ่งมีการนำอนุภาคนาโนของโลหะใช้กันอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาของ Wu และคณะ (2006) ได้ศึกษาการนำอนุภาคนาโนเงินและดีเอ็นเอปรับปรุงกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดโดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้า เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อตรวจวัดกลูโคส และจากการศึกษา Du และคณะ (2007) ศึกษาการใช้ไบโอเซนเซอร์ที่มีอนุภาคนาโนทอง และโคโตะ-ซานโดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้าบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดเพื่อตรวจวัดกลูโคส ส่วนจากงานวิจัยของ Kim และคณะ (2008) ศึกษาการนำอนุภาคนาโนทอง ปรับปรุงกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดโดยวิธีเคมีไฟฟ้า และตรึงเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลง การศึกษาของ Zeng และคณะ (2009) ศึกษาการสังเคราะห์นาโนอิเล็กโทรดของทองด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า และตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อตรวจวัดกลูโคส และจากการศึกษาของ Yang และคณะ (2009) ศึกษาการสังเคราะห์นาโนอิเล็กโทรดของทอง โดยการสังเคราะห์คาร์บอนนาโนทิวบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด แล้วสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนคาร์บอนนาโนทิวด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า และตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสเพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ Orozco และคณะ (2009) ได้มีการศึกษาการปรับปรุงอัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ โดยการใช้วิธีเคมีไฟฟ้านำอนุภาคทองสังเคราะห์บนซิลิกอน/ซิลิกอนออกไซด์ (Si/SiO₂) อิเล็กโทรดแล้วตรึงรูปเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส เพื่อตรวจวัดแคทาซอล (catechol)

ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า และตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP, EC 1.11.1.7) ร่วมกับพอลิไพร์รอลซึ่งเป็นพอลิเมอร์นำไฟฟ้าด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน เพื่อใช้เป็นฟีนอลไบโอเซนเซอร์ ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมายังไม่พบรายงานการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/พอลิไพร์รอล/เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสสำหรับตรวจวัดฟีนอล นอกจากนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากฟีนอลเป็นสารเคมีที่มีพิษซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรม เมื่อฟีนอลรั่วไหลจะสามารถแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว ฟีนอลจึงเป็นสารอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำกับพอลิไพร์โรลสำหรับใช้เป็นฟีนอลไบโอเซนเซอร์

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

การทดลองใช้อิเลคโทรด 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบคือใช้กลาสคาร์บอนเป็นอิเลคโทรดใช้งาน (working electrode) ส่วน Ag/AgCl เป็นอิเลคโทรดอ้างอิง (reference electrode) และแพลทินัมเป็นอิเลคโทรดเคาท์เตอร์ (counter electrode)

1.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำโดยใช้เคมีไฟฟ้าบนอิเลคโทรดใช้งาน

ตามรูปที่ 1.1

1.3.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำบนอิเลคโทรดใช้งาน

ใช้สารละลายไฮโดรเจน เตตระคลอโรอูเรต ไตรไฮไดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.1 โมลต่อลิตร ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลท์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 0-60 วินาที ตามลำดับ

1.3.1.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองคำบนอิเลคโทรดใช้งาน

1.3.1.2.1 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองคำโดยใช้เทคนิค scanning electron microscopy (SEM) เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิว

1.3.1.2.2 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองคำโดยใช้เทคนิค atomic force microscopy (AFM) เพื่อศึกษาความขรุขระ (roughness) ของพื้นผิว

1.3.1.3 ศึกษาสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทองคำบนอิเลคโทรดใช้งาน

ใช้เทคนิค cyclic voltammetry ทดสอบในสารละลาย 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / 0.1 \text{ M } \text{K}_2\text{SO}_4$ ความต่างศักย์ระหว่าง -1.0 ถึง 1.0 โวลท์ และใช้อัตราการสแกน (scan rate) 50 มิลลิโวลท์/วินาที

1.3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนอิเล็กโทรดใช้งานสำหรับฟีนอลไบโอเซนเซอร์

1.3.2.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนอิเล็กโทรดใช้งาน

โดยกำหนดตัวแปรคงที่ของปริมาณเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 250 ยูนิต/ มิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ตลอดการทดลอง

การทดลองจะใช้วิธีการอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันระหว่างพอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งกำหนดใช้ความต่างศักย์ระหว่าง 0.0 ถึง 1.0 โวลต์ โดยใช้อัตราการสแกน (scan rate) 10 มิลลิโวลต์/ วินาที และตัวแปรที่ต้องการศึกษาคือ ความเข้มข้นของไพรอล และจำนวนรอบการสังเคราะห์

1.3.2.1.1 ความเข้มข้นของไพรอลมอนอเมอร์ 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, และ 0.13 โมลต่อลิตร

1.3.2.1.2 จำนวนรอบของการสังเคราะห์ 5, 10, 15, 20, 25 รอบ

1.3.2.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนอิเล็กโทรดใช้งาน

1.3.2.2.1 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยใช้เทคนิค scanning electron microscopy (SEM) เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิว

1.3.2.2.2 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยใช้เทคนิค atomic force microscopy (AFM) เพื่อศึกษาความขรุขระ (roughness) ของพื้นผิว

1.3.2.3 ศึกษาลักษณะทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/
เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนอิเล็กโทรดใช้งาน

ใช้เทคนิค Amperometry วิเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยใช้ความเข้มข้นของฟีนอลระหว่าง 1×10^{-6} - 1×10^{-3} โมลต่อลิตร เพื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) เวลาการตอบสนอง (response time) เข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (detection limit)

1.3.2.4 ศึกษาค่าการผลิตรซ้ำ (reproducibility)

1.3.2.5 ศึกษาค่าการนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability)

1.3.2.5 ศึกษาค่าการจัดเก็บ (storage stability)



รูปที่ 1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล สำหรับฟีนอลไปโอเซนเซอร์

บทที่ 2

ทฤษฎี

ในบทนี้จะเป็นการอธิบายถึงทฤษฎีและหลักการต่างๆ ประกอบด้วยการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) ที่เกิดขึ้นซึ่งใช้ในการทดลองครั้งนี้ รวมถึงวิธีการตรึงรูปของเอนไซม์ วิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้า การศึกษาทฤษฎีรวมถึงหลักการทํางานของส่วนต่างๆ และการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์

2.1 เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase)

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยานั้นๆ ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นได้เมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระ (free energy) หรือค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยาเอนไซม์ การทํางานของเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในทํางานกล่าวคือ เมื่อมีการจับกับสารตั้งต้นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์และสารตั้งต้นขึ้น โดยแรงที่ยึดระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นเป็นเพียงแรงอ่อนๆ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์หรือพันธะไฮโดรเจน โดยสารตั้งต้นจะจับกับเอนไซม์ได้ที่ตำแหน่งกัมมันต์ (active site) ซึ่งเป็นเพียงส่วนย่อยๆ ของโมเลกุลเอนไซม์เท่านั้น ความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นนั้นอาจมีมากน้อยแตกต่างกันเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากอาจมีสารตั้งต้นได้เพียงชนิดเดียว แต่เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงน้อยอาจจะมีสารตั้งต้นที่มีพันธะเคมีหรือหมู่ที่เหมือนกันได้หลายตัว เช่น เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงโดยเด็ดขาด (absolute specificity) เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของหมู่ธาตุ (group specificity) เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของปฏิกิริยาหรือชนิดของพันธะ (reaction or linkage specificity) และเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะการวางตัวของหมู่ธาตุ (stereochemical specificity) การที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เนื่องจากความสามารถของเอนไซม์ในการจับโมเลกุลของสารตั้งต้นให้ส่วนที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้มีโอกาสใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์ได้

เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มออกซิเดส ซึ่งมีการทํางานของเอนไซม์เพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน โดยการเคลื่อนย้ายอะตอมของออกซิเจนไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอน จากสารตั้งต้นตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง เป็นเอนไซม์ที่สกัดแยกจาก horseradish roots (*Amoracia rusticana*) มีน้ำหนักโมเลกุล 44,000 ดัลตัน (dalton) (Xu และ

คณะ 2006) เอนไซม์ชนิดนี้จะเป็นสายโซ่เดี่ยวโพลีเปปไทด์ประกอบไปด้วย 4 สายของสารประกอบไดซัลไฟด์ ซึ่งจะเป็นไกลโคโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรต 18 % และในคาร์โบไฮเดรตจะมีองค์ประกอบย่อยๆ เช่น กาแลคโตส อะราบินอส ไสโรส แมสโนส ฟูโคส แมนโนสซามีน และกาแลคโตสซามีน เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยเอนไซม์นี้จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้น เช่น ไพโรแกลลอล ฟีนอล เป็นต้น สภาวะความเป็นกรดที่เหมาะสมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.5-8.0 (Fernades และคณะ 2003) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์หาสารเคมีที่ปนเปื้อนในอาหาร ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย (Cheng และคณะ 2006) เป็นต้น

เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสารตั้งต้นซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถอธิบายได้ตามสมการดังนี้ (Rosatto และคณะ 1999)



โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส HRP (Fe^{3+}) ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 (สมการที่ 1) โดยที่ HRP (Fe^{3+}) จะเป็นตัวรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอนแก่ H_2O_2 ซึ่งจะได้เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส อยู่ในรูป HRP (Fe^{5+}) หรือ (oxidation state +5) และ H_2O ต่อจากนั้นสมการที่ 2 HRP (Fe^{5+}) จะอยู่ในรูปของตัวออกซิไดซ์ซึ่งจะได้รับอิเล็กตรอนจากผู้ให้อิเล็กตรอน AH_2 ทำให้เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส อยู่ในรูปฟอร์ม HRP (Fe^{4+}) หรือ (oxidation state +4) และขั้นตอนสุดท้ายสมการที่ 3 เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่อยู่ในรูป HRP (Fe^{4+}) จะรับอิเล็กตรอนจากผู้ให้อิเล็กตรอน AH_2 อีกครั้งทำให้เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสกลับมาในรูปเดิมของเอนไซม์คือ HRP (Fe^{3+}) (Ruzgas และคณะ 1995; Ruzgas และคณะ 1996)

2.2 วิธีการตรึงเอนไซม์

กระบวนการศึกษาการตรึงเอนไซม์มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อความสะดวกและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในการใช้งาน การนำเอนไซม์มาเกาะหรือฝังตัวอยู่ในวัสดุที่อยู่คนละวัฏภาคกับสารละลายปฏิกิริยา จึงทำให้สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายเป็นการลดต้นทุนการดำเนินงาน (operating cost) เพราะเอนไซม์มักมีราคาแพงนอกจากนี้การที่เอนไซม์อยู่คนละวัฏภาคกับสารละลายปฏิกิริยา และผลิตภัณฑ์ทำให้สามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น การตรึงเอนไซม์ในหลายๆ กรณียังช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น ทั้งในแง่ของความเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา (operating stability) เสถียรภาพในการเก็บรักษา (maintenance/ storage stability) และเสถียรภาพต่อพลังงานภายนอก เช่น พลังงานความร้อน เป็นต้น นอกจากนี้ในบางกรณีการตรึงรูปเอนไซม์ยังสามารถทำให้เราควบคุมพฤติกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้ แต่ข้อเสียที่พบโดยทั่วไปคือการตรึงรูปเอนไซม์มีผลทำให้เร่งปฏิกิริยาได้ช้าลง โดยอาจมีสาเหตุมาจากการสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ หรือมาจากปัญหาด้านการถ่ายเทมวลสารซึ่งเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการเกิดปฏิกิริยา

เอนไซม์สามารถถูกตรึงรูปอยู่ในหรือบนวัสดุตรึงที่อยู่คนละวัฏภาคกับน้ำได้หลายวิธี เช่น วิธีการดูดซับทางกายภาพ (adsorption) การยึดเหนี่ยวกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding) และการกักขัง (entrapment) การจัดจำพวกวิธีการตรึงเอนไซม์ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 กรณี คือการตรึงรูปเอนไซม์โดยการยึดจับด้วยแรงทางกายภาพหรือพันธะเคมี (immobilization by binding) และการกักเก็บเอนไซม์ภายในวัสดุตรึง (physical retention)

2.2.1 การตรึงเอนไซม์ด้วยการยึดเหนี่ยว (immobilization by binding)

2.2.1.1 การดูดซับ (adsorption)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับเอนไซม์บนวัสดุตรึงถือเป็นการเทคนิคการตรึงเอนไซม์ที่ง่ายที่สุด ซึ่งสามารถทำได้โดยอาศัยแรงระหว่างประจุ เช่น พันธะอิออนิก แรงแวลเดอรัวาลส์ พันธะไฮโดรเจนหรือการดูดซับด้วยแรงทางกายภาพซึ่งเป็นแรงอ่อนๆของการยึดเหนี่ยว วิธีการตรึงเอนไซม์สามารถทำได้โดยการนำเอาสารละลายกับเอนไซม์ไปสัมผัสกับวัสดุตรึงที่จะใช้ดูดซับภายใต้สภาวะที่เหมาะสม บ่มทิ้งเอนไซม์ไว้จะทำให้เกิดกระบวนการย้ายวัฏภาคของเอนไซม์ขึ้น เอนไซม์บางส่วนในวัฏภาคของเหลวจะย้ายไปยึดบนวัสดุตรึงในวัฏภาคของแข็ง และจะสิ้นสุดการย้ายวัฏภาคเมื่อเกิดปริมาณสมดุลของเอนไซม์ในวัฏภาคทั้งสองซึ่งจะได้เอนไซม์ที่สามารถยึดติดกับวัสดุตรึงได้ การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับมีข้อเสียคือแรงยึดจับระหว่างเอนไซม์และวัสดุตรึงเป็นแรงอย่างอ่อนๆ ทำให้เกิดการหลุดของเอนไซม์จากวัสดุตรึงได้ง่าย

2.2.1.2 การยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการยึดเหนี่ยวพันธะโคเวเลนต์เป็นการนำโมเลกุลของเอนไซม์ถูกยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ กับวัสดุตรึงโดยอาศัยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ของเอนไซม์ เช่น หมู่อะมิโน คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล และซัลไฮดริล ซึ่งจะทำให้เกิดการยึดเหนี่ยวกันอย่างเหนียวแน่นมากขึ้น ทำให้ปัญหาเกี่ยวกับการหลุดของเอนไซม์น้อยลงสามารถใช้งานได้ในระยะเวลายาวนานมากขึ้น โดยมีข้อแม้ว่าหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ต้องไม่อยู่ในตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์ ซึ่งอาจป้องกันได้โดยการบล็อกตำแหน่งกัมมันต์ด้วยการใส่สารยับยั้งชนิดแข่งขันเข้าไปก่อนการตรึงเอนไซม์ ในการตรึงโดยอาศัยพันธะโคเวเลนต์นี้วัสดุตรึงต้องมีการเติมหมู่ฟังก์ชันด้วยการทำปฏิกิริยากับสารบางชนิด เช่น ไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr) และกลูเตอรัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นต้น

2.2.1.3 การครอสลิงค์เอนไซม์ (cross-linking)

การตรึงด้วยวิธีการครอสลิงค์เอนไซม์ เป็นการเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์เข้าด้วยกันโดยอาศัยการจับด้วยพันธะโคเวเลนต์ของเอนไซม์กับหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีเชื่อมโยงต่อกันไปเรื่อยๆ จนเกิดเป็นร่างแหของพอลิเมอร์ของเอนไซม์ซึ่งเมื่อขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นจึงไม่สามารถละลายน้ำได้ สารเคมีที่ใช้ในการครอสลิงค์ เช่น กลูเตอรัลดีไฮด์ บิส-ไดอะโซเบนซิไดน์ (bis-diazobenzidine) และกรด 2,2 ไดซัลโฟนิค (2,2 disulfonic acid) เป็นต้น

ข้อดีที่ชัดเจนของการยึดเหนี่ยวเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ไม่ว่าจะเป็นการยึดเหนี่ยวกับวัสดุตรึง หรือการทำครอสลิงค์เอนไซม์ คือเป็นวิธีการที่ง่ายและสามารถควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพ และขนาดของรูหรือช่องว่างระหว่างพันธะของสารชีวภาพกับสารที่ใช้เชื่อมขวางได้ รวมทั้งมีความคงตัวสูง ความแข็งแรงของการยึดเหนี่ยวทำให้การหลุดของเอนไซม์จากวัสดุตรึงหรือจากโมเลกุลอื่นเป็นเรื่องยากมาก แต่ข้อเสียที่สำคัญที่ละเลยไม่ได้คือ การที่เอนไซม์ต้องทำปฏิกิริยาเคมีเพื่อสร้างพันธะโคเวเลนต์ขึ้นนั้นอาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ง่าย และพบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการสร้างพันธะโคเวเลนต์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้มากกว่าการตรึงรูปด้วยวิธีการทางกายภาพอย่างชัดเจนส่งผลต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ต่ำลง และเอนไซม์เสื่อมสภาพไปบางส่วน

2.2.2 การกักเก็บเอนไซม์ภายในวัสดุตั้ง (physical retention)

การกักเก็บเอนไซม์ทำได้โดยการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในที่จำกัด อาจทำได้โดยการกักเก็บไว้ในเมทริกซ์ (matrix) ของวัสดุตั้ง หรือกักเก็บไว้ด้วยแผ่นเยื่อ (membrane) ที่เอนไซม์ไม่สามารถหลุดลอดออกไปได้ เมทริกซ์ที่ใช้ในการกักเก็บเอนไซม์มักเป็นวัสดุประเภทพอลิเมอร์ เช่น แคลเซียมอัลจีเนต (Ca-alginate) วุ้น (agar) แคปป์-คาร์ราจีนิน (K-carrageenin) และคอลลาเจน (collagen) เป็นต้น

2.2.2.1 การกักขัง (entrapment)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการกักขังมีความแตกต่างจากวิธีการดูดซับและวิธีการตรึงด้วยพันธะโคเวเลนต์ เนื่องจากโมเลกุลเอนไซม์เป็นอิสระแต่ถูกจำกัดด้วยโครงสร้างของวัสดุที่กักขังไว้ โครงสร้างรูพรุนของเจลจะป้องกันไม่ให้เอนไซม์หลุดออกมาได้แต่ขณะเดียวกันสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ การตรึงรูปเอนไซม์ไว้ในเมทริกซ์ของพอลิเมอร์ ทำได้โดยการนำสารละลายเอนไซม์ไปผสมกับสารละลายพอลิเมอร์ แล้วอาจเติมสารเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเกิดขึ้น จนในที่สุดเมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดเกิดเป็นโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลของเอนไซม์ถูกบรรจุอยู่ในช่องว่างภายในที่ไม่สามารถแพร่ออกจากรูที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดของเอนไซม์ แต่รูนี้ยอมให้สารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลที่มีรูขนาดเล็กกว่ารูแพร่ผ่านเข้าไปได้ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นของการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการกักขังคือ วัสดุตั้งจะทำให้การถ่ายเทมวลเกิดได้ไม่ดี ทำให้การแพร่เข้ามาเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นเกิดขึ้นได้ยาก

2.2.2.2 การหุ้มห่อ (encapsulation)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการหุ้มห่อเป็นการนำเอนไซม์มาตรึงไว้ในแผ่นเยื่อ หรือในไมโครแคปซูล ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับวิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการกักขัง คือโมเลกุลเอนไซม์มีความอิสระแต่ถูกจำกัดอยู่ในพื้นที่ โดยการกักเก็บนี้จะใช้แผ่นเยื่อที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้สามารถกักเก็บเอนไซม์ไว้ภายในแต่ในขณะเดียวกันสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์สามารถถ่ายเทเข้าและออกผ่านแผ่นเยื่อได้ ดังนั้นในกรณีนี้จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ยังอยู่ในวัฏภาคน้ำ เป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาการหลุดของเอนไซม์จากวัสดุตั้งในกรณีของวิธีดูดซับ และการเสื่อมสภาพของเอนไซม์อันเนื่องมาจากการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับวัสดุตั้งในวิธีการยึดจับพันธะโคเวเลนต์หรือการครอสลิงค์เอนไซม์

2.3 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูป

ความรู้จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปเป็นพื้นฐานสำคัญ สำหรับออกแบบถังปฏิกรณ์ที่ใช้เอนไซม์ในการตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเราไม่สามารถนำความรู้ของจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อิสระชนิดเดียวกันนี้มาใช้ได้ ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์อาจทำให้เกิดความแตกต่างในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระดังประเด็นดังต่อไปนี้

ผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ การตรึงรูปเอนไซม์อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ ทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปแตกต่างจากเอนไซม์อิสระ

ผลจากแรงทางไฟฟ้า และการกระจายตัวระหว่างวัฏภาคของสารตั้งต้น เนื่องจากในระบบของเอนไซม์ตรึงรูปปรากฏมีวัฏภาคมากกว่า 1 วัฏภาค ทำให้สารตั้งต้นของปฏิกิริยามีการกระจายตัวอยู่ในแต่ละวัฏภาคตามสมดุลทางเทอร์โมไดนามิกส์ ดังนั้นความเข้มข้นของสารตั้งต้น ณ ตำแหน่งของการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อาจมีค่าแตกต่างจากค่าความเข้มข้นในสารละลายสายป้อน ทั้งนี้ขึ้นกับสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของวัสดุตรึง

ผลจากการแพร่ หรือการถ่ายเทมวลสาร เนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปอยู่คนละวัฏภาคกับสารตั้งต้น ดังนั้นปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยการถ่ายเทมวลของสารตั้งต้นจากสารละลายในสายป้อนมายังตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นอัตราการถ่ายเทมวลสารอาจเป็นขั้นตอนในการกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาแทนจลนพลศาสตร์ที่แท้จริงของเอนไซม์ได้

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของเอนไซม์ที่ถูกตรึง รูปในวัสดุพอร์น ที่มีประจุ ซึ่งสารตั้งต้นจะต้องมีการถ่ายเทมวลจากสารละลายภายนอก ผ่านเข้าไปในรูพอร์นของวัสดุตรึง และเข้าจับกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายใน

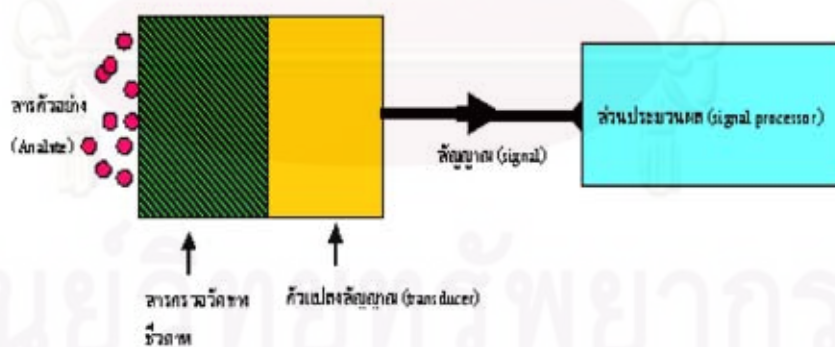


รูปที่ 2.1 เอนไซม์ทริปซินที่ถูกตรึงอยู่ในวัสดุพอร์นที่มีประจุ (Blanch และ Clark, 1997)

2.4 ไบโอสเซนเซอร์

ไบโอสเซนเซอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารเคมีโดยใช้หลักการทางชีวเคมี ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างเฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด องค์ประกอบของไบโอสเซนเซอร์ที่ใช้โมเลกุลที่ได้จากสารชีวภาพ (biological substance) เป็นส่วนประกอบ เช่น เอนไซม์ แอนติเจน แอนติบอดี ออร์แกนัลล์ เซลล์หรือเนื้อเยื่อ สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์ หรือดีเอ็นเอ เป็นต้น นำมาตรึงกับตัวตรวจจับของไบโอสเซนเซอร์

สารเคมีที่นำมาวิเคราะห์จะสามารถตรวจวัดได้ต่อเมื่อเซนเซอร์ ประกอบด้วยองค์ประกอบสองส่วนคือส่วนแรก คือสารชีวภาพ เป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง และส่วนที่สองคือ ตัวแปลงสัญญาณ (transducer) เป็นอุปกรณ์สำหรับแปลงสัญญาณเฉพาะต่างๆ และตรวจจับสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ เช่น อิเล็กตรอน โปรตอน อีออน หรือแสง เป็นต้นที่เหมาะสมกับชนิดและรูปของสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา หรือการจับกันระหว่างสารชีวภาพกับสารตัวอย่าง เพื่อเป็นดัชนีระบุถึงปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ และประมวลผลต่อไปดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 หลักการทำงานของไบโอสเซนเซอร์

(ที่มา: www.il.mahidol.ac.th/web/Eanal)

2.5 วิธีวิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้า (Electrochemical method)

วิธีการทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้าเป็นส่วนที่ทำหน้าที่แปลงสัญญาณซึ่งนำที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หรือการจับกันระหว่างสารชีวภาพกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ตัวแปลงสัญญาณที่ดีจะต้องมีความไว มีความจำเพาะเจาะจงหรือคัดเลือกสัญญาณซึ่งนำได้ดี และสามารถตอบสนองได้ในช่วงปริมาณสัญญาณซึ่งนำที่เกิดขึ้นได้อย่างเหมาะสม กระบวนการแปลงเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าแบ่งเป็น 4 ประเภท ดังนี้

2.5.1 โพลเทนซิออสเมตรี (potentiometry)

วิธีโพลเทนซิออสเมตรี เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างโดยใช้ความต่างศักย์ทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นระหว่างขั้วของเซลล์เคมีไฟฟ้าที่ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าที่จุ่มในสารละลายตัวอย่าง ณ สภาวะสมดุลของการดำเนินปฏิกิริยาเคมีแบบผันกลับของสารละลายตัวอย่างนั้นซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่มีการไหลของกระแสที่เกิดขึ้นในวงจร

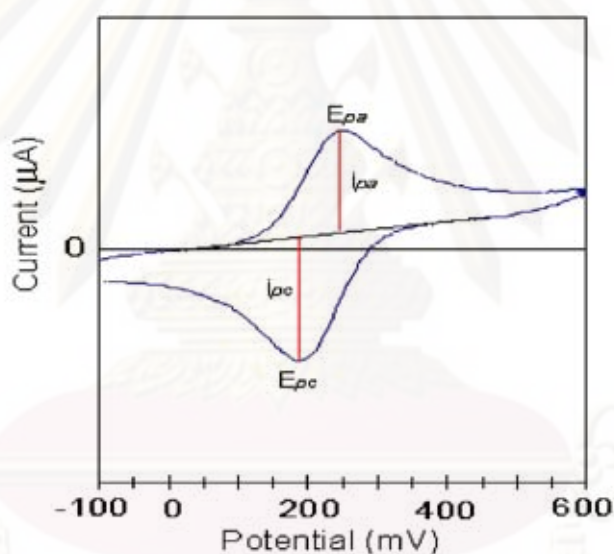
การเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างเกิดที่บริเวณผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าใช้งาน ดังนั้น เฉพาะศักย์ขั้วไฟฟ้าใช้งานที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลาย เนื่องจากศักย์ที่วัดค่าได้ของวงจรเซลล์เคมีไฟฟ้าเป็นศักย์เซลล์ หลักการสำคัญของโพลเทนซิออสเมตรีในการที่จะวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างได้ จึงเป็นการหาค่าศักย์ไฟฟ้าใช้งานจากค่าศักย์เซลล์ที่วัดได้ โดยใช้ผลศักย์ของขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และศักย์รอยต่อสารละลายมีค่าคงที่ หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดที่เป็นไปได้

2.5.2 โวลแทมเมตรี (voltammetry)

วิธีโวลแทมเมตรี เป็นวิธีการวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพวัดศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าพร้อมกันโดยต้องมีการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่อิเลคโตรด ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่อิเลคโตรดจะทำให้ขั้วไฟฟ้าที่มีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไปตามความต่างศักย์ภายนอกที่ให้เข้าไป การที่ขั้วมีการเปลี่ยนแปลงศักย์จะทำให้สารเคมีในสารละลายของเซลล์สามารถมารับหรือมาให้อิเลคตรอนที่ขั้วไฟฟ้า นั่นคือการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ หรือ electron transfer reaction อิเลคตรอนข้างต้นจะไหลผ่านวงจรไฟฟ้างั้นจึงสามารถวัดออกมาเป็นกระแสไฟฟ้าได้และศักย์ไฟฟ้าที่ไหลผ่านอิเลคโตรดใช้งานได้ โวลแทมเมตรีมีความแตกต่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลเทนซิออสเมตรี กล่าวคือ การทำโวลแทมเมตรีเป็นการให้พลังงานไฟฟ้าในรูปศักย์แก่วงจร เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีของสาร

ตัวอย่าง สำหรับโพเทนชิออสแตตที่สารตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาเคมีได้เองในสารละลายอย่างต่อเนื่อง โดยสภาวะการทดลองเป็นสภาวะที่กระแสมีค่าเป็นศูนย์ และไม่มีโพลาริเซชันเกิดขึ้น

รูปแบบฟอร์มที่ใช้ในการวิเคราะห์กระแสและความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นจากการทดลองที่เป็นที่นิยมรูปแบบหนึ่งคือ cyclic voltammetry แสดงในรูปที่ 2.3 เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นรอบระหว่างค่าสองค่าในการศึกษาเชิงกลไกของระบบปรีดออกซ์โดยเฉพาะในการกำหนดและการหาคุณสมบัติของคูรีดออกซ์ การศึกษาในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิคโวลแทมเมตรีในการวิเคราะห์ คือเป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าที่ข้อมูลของการวิเคราะห์ได้จากความสัมพันธ์ของการเกิดกระแสกับการให้พลังงานศักย์แก่วงจรเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีแก่วงจร ดังนั้นจะกล่าวถึงเทคนิควิธีวิเคราะห์และรายละเอียดของวิธีนี้ต่อไป



รูปที่ 2.3 ลักษณะของ cyclic voltammogram

(ที่มา: www.biol.paisley.ac.uk/chapter1)

อุปกรณ์และเครื่องมือการทำโวลแทมเมตรีหรือไม่ว่าเป็นเทคนิควิธีวิเคราะห์แบบใดย่อมประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนของเซลล์เคมีไฟฟ้า และส่วนของเครื่องมือของการควบคุมสัญญาณไฟฟ้า เซลล์เคมีไฟฟ้าในการทำโวลแทมเมตรีมักเรียกเป็น เซลล์โวลแทมเมตรี เพราะมีความแตกต่างจากเซลล์เคมีไฟฟ้าธรรมดาอยู่บ้าง สำหรับเครื่องมือในการควบคุมสัญญาณไฟฟ้ามักประกอบไปด้วยอุปกรณ์ในการควบคุมศักย์ให้แก่ขั้วไฟฟ้าเรียกว่า โพเทนชิออสแตต (potentiostat) และอุปกรณ์ในการอ่านค่ากระแสของวงจรวจรอาจเรียกส่วนของการควบคุม

สัญญาณไฟฟ้านี้ว่า โวลแทมเมตริก อะนาไลเซอร์ (voltammetric analyzer) ในเครื่องมือของการทำโวลแทมเมตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่างๆ ยังมักประกอบด้วยอุปกรณ์บันทึกแปรผลข้อมูล และอาจสร้างเส้นกราฟได้ด้วย

เซลล์โวลแทมเมตรี มักใช้เรียกเซลล์เคมีไฟฟ้าในกลุ่มการวิเคราะห์โวลแทมเมตรี ประกอบไปด้วยขั้วไฟฟ้า และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่แตกต่างไปจากการทำโพเทนชิอเมตรีตรงที่ว่า ขั้วไฟฟ้าในการทำโวลแทมเมตรี มักประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ขั้วไฟฟ้าใช้งาน และขั้วไฟฟ้าวร่วมจุ่มในสารละลายที่มีสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสารอิเล็กโทรไลต์ที่ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา มักเรียกเป็นสารอิเล็กโทรไลต์ช่วยหรือเก็ทหนุน (supporting electrolyte) โดยสารอิเล็กโทรไลต์มักจะใช้ในปริมาณที่มากเกินไป

ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงต้องมีค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ตลอดการทดลอง และควบคุมค่าศักย์ของขั้วไฟฟ้าใช้งานด้วย แม้ขั้วไฟฟ้าคาโลเมลจะถูกจัดเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่ใช้ได้ทั่วไป แต่ด้วยเหตุผลด้านความเป็นพิษและผลต่อมลพิษของปรอท ทำให้ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นที่นิยมรับในการเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแทน ส่วนขั้วไฟฟ้าวร่วมหรือขั้วไฟฟ้าช่วย จัดเป็นขั้วไฟฟ้าที่สามของวงจรโวลแทมเมตรีที่มีคุณลักษณะเฉพาะ คือ ทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี เป็นขั้วไฟฟ้าที่ได้รับพลังงานไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าอ้างอิง วางต่อผ่านสารละลายไปยังขั้วไฟฟ้าใช้งาน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างที่ขั้วไฟฟ้าจุ่มอยู่ โดยขั้วไฟฟ้าวร่วมนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น ในขณะที่เกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างระหว่างการวิเคราะห์ ขั้วไฟฟ้าวร่วมมักมีพื้นที่ผิวมากๆ เพื่อให้การนำไฟฟ้าเป็นไปได้ดี ลดการเกิดศักย์จากโอห์ม ($E = iR$) ของวงจร ขดลวดแพลทินัมหรือแผ่นแพลทินัม หรืออ่างปรอท มักใช้เป็นขั้วไฟฟ้าวร่วมได้ โดยอยู่ในสารละลายที่แยกเฉพาะจากสารละลายตัวอย่างด้วยสะพานเกลือ หรือแผ่นแก้วพอร์ซเลน นอกจากนี้ขั้วไฟฟ้าใช้งานในกลุ่มการวิเคราะห์โวลแทมเมตรี ขั้วไฟฟ้าใช้งานจะแตกต่างจากการวิเคราะห์อื่นๆ ที่ว่าขนาดของขั้วไฟฟ้าต้องเล็ก ซึ่งมักเป็นขั้วไฟฟ้าจุลภาค ทั้งนี้เพื่อให้พื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าในการสัมผัสกับสารตัวอย่างมีน้อย เกิดสภาวะของโพลาร์ไรเซชันตลอดการวิเคราะห์

ส่วนประกอบหลักของขั้วไฟฟ้าจุลภาคที่ใช้กันเ็นทางปฏิบัติมักเป็นโลหะเฉื่อย เช่น แพลทินัม ทอง โพลีไธด์กราฟไฟต์ กลาสคาร์บอน และปรอท รูปแบบของขั้วไฟฟ้าที่ผลิตออกสู่ท้องตลาดมีได้แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของส่วนประกอบของขั้วไฟฟ้านั้นที่กะทัดรัด เหมาะแก่การใช้งานวิเคราะห์ทั่วไป หรือนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์อื่นๆ ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าที่ส่วนประกอบอัดเป็นแผ่นแบนเล็กๆ นอกจากอาจเป็นแพลทินัม หรือคาร์บอน ยังอาจใช้เป็นพวกโลหะกึ่งตัวนำ เช่น

ดีบุก อินเดียมออกไซด์ด้วย โดยแผ่นที่ทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้านี้ถูกฝังอยู่ในแท่งวัสดุที่ไม่นำไฟฟ้า เช่น เทพลอน และมีลวดตะกั่วเป็นตัวนำไฟฟ้าเสียบติดไว้ต่อกับวงจรของเซลล์เคมีไฟฟ้า ปรอทนำมาทำเป็นขั้วไฟฟ้าแบบแผ่นได้ โดยการทำให้เป็นแผ่นฟิล์มเล็บบนแผ่นโลหะอีกที่แต่ไม่ค่อยนิยมทำกันนัก

ในส่วนเทคนิควิธีวิเคราะห์แอมเพอโรเมตรีเป็นเทคนิควิธีวิเคราะห์ที่ประยุกต์หลักการของโวลแทมเมตรี โดยให้ศักย์ที่คงที่ให้แกขั้วไฟฟ้าจุลภาคที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้วัดค่ากระแสที่ค่าต่างๆ ของความเข้มข้นของสารตัวอย่างค่าศักย์คงที่ที่ให้กับวงจรได้มาจากศักย์บนโวลแทมโมแกรม ซึ่งกระแสจำกัดมีค่าแปรไปกับความเข้มข้นของสารที่เกิดปฏิกิริยานั้น

2.5.3 คอนดักโตเมตรี (conductometry)

คอนดักโตเมตรีเป็นวิธีที่เกี่ยวกับการวัดการนำไฟฟ้าของสารละลาย และมีการพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย คอนดักโตเมตรีจัดอยู่ในการวิเคราะห์เชิงเคมีไฟฟ้าของสารประกอบไอออนิก วิธีคอนดักโตเมตรีแตกต่างจากวิธีเชิงอิเล็กโทรดในวิธีโพเทนชิอเมตรี วิธีเชิงโวลแทมเมตรี และวิธีคูลอมเมตรี ซึ่งเกี่ยวข้องกับการวัดคุณสมบัติที่พื้นผิวขณะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ที่อิเล็กโทรดใช้งาน

นอกจากนี้การนำไฟฟ้าเป็นคุณสมบัติที่ไม่เจาะจงของอิเล็กโทรไลต์ที่มีประโยชน์ในการวัดความเข้มข้นของไอออนิกสปีชีส์ ในการพิสูจน์สารประกอบไอออนิกที่ละลายในตัวทำละลาย และในการพัฒนาทฤษฎีของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ การนำไฟฟ้าของไอออนในสารละลายจะเกิดจากการเรียงตัวของประจุบนพื้นผิวของอิเล็กโทรด เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้าของสาร การวัดการนำไฟฟ้าจึงใช้เซลล์อิเล็กโทรดต่อกับวงจรทำให้เกิดกระแสที่ไหลผ่านอิเล็กโทรดเกิดเป็นกระแสซึ่งเกิดจากการนำไฟฟ้าของไอออน หรือความสามารถในการนำไฟฟ้า

2.5.4 คูลอมเมตรี (coulometry)

วิธีคูลอมเมตรี เป็นเทคนิควิธีวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการวัดปริมาณประจุไฟฟ้าทั้งหมด (อิเล็กตรอน) ที่ใช้ในการทำให้สารตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชัน แยกสลายให้ผลปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างด้วยวิธีคูลอมเมตรีทำได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณประจุไฟฟ้าที่ใช้กับจำนวนกรัมสมมูล หรือกรัมโมเลกุลของสารนั้น ตามกฎของฟาราเดย์

คูลอมเมตรีจัดอยู่ในกลุ่มการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิเล็กโทรเคมีวิเคราะห์คือ การจัดเซลล์เพื่อการวิเคราะห์เป็นแบบอิเล็กโทรไลต์ซึ่งต้องอาศัยพลังงานไฟฟ้าจากภายนอก ลักษณะการวิเคราะห์เป็นมหัพภาควิเคราะห์เช่นเดียวกัน และที่สำคัญคือการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีคูลอมเมตรีและอิเล็กโทรเคมีวิเคราะห์ต้องมีการแยกสลายของสารวิเคราะห์เกิดเป็นผลปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ แม้การวัดผลปฏิกิริยาเพื่อหาปริมาณสารตัวอย่างจะแตกต่างกัน โดยคูลอมเมตรีวัดประจุไฟฟ้าและอิเล็กโทรเคมีวิเคราะห์เป็นการชั่งน้ำหนักสารพอกพูนที่ขั้วไฟฟ้า แต่ทั้งสองวิธีสามารถหาปริมาณสารตัวอย่างได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องสร้างครีฟมาตรฐานหรือเทียบสารมาตรฐาน

2.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ (performance factor)

2.6.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)

ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่จะทำให้อิเล็กโทรดแล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด ส่วน range หมายถึงช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวัดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วัดแล้วมี accuracy precision และ linearity อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องยอมรับได้

2.6.2 ความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity)

ความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) หมายถึง ความสามารถในการวัดความเข้มข้นที่แตกต่างกันน้อยที่สุดวิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวสูงจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมาก หรือเป็นวิธีที่สามารถแยกความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกันน้อยมากได้ถูกต้อง ความไวต่อการตอบสนองของวิธีทดสอบหรือของเครื่องมือเป็นอัตราส่วนของการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ (response) ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น (concentration)

$$S = dR/dc$$

$$R = f(C)$$

ถ้าเขียนกราฟระหว่าง R หรือ dR/dc กับ C จะได้กราฟเส้นตรงนั่นคือ $R = kc$ แสดงว่าความไวต่อการตอบสนอง จะมีค่าคงที่ตลอดช่วงความเข้มข้นถ้าความชัน แสดงว่ามีความไวต่อการตอบสนองสูง (high sensitivity) ความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) ของการวิเคราะห์หาได้จากค่าความชันของ calibration curve

2.6.3 ความจำเพาะ (selectivity)

ความจำเพาะ (selectivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยที่สารนั้นเป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งในสารละลายนั้นๆ หรือวิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด จึงกล่าวได้ว่าวิธีวิเคราะห์นั้นมีความจำเพาะ (specific) การศึกษา specificity ของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีหรือเติมสารรบกวนอื่น แล้วตรวจสอบดูว่าสารรบกวนเหล่านั้นมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์หรือไม่ และสารรบกวนเหล่านั้นทำให้การตรวจวัด หรือการหาปริมาณสารที่ต้องการทราบ ผิดไป (มากขึ้น หรือน้อยลง) หรือไม่

2.6.4 การผลิตซ้ำ (reproducibility)

การผลิตซ้ำ (reproducibility) หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน ในสภาวะเดียวกันโดย มักจะวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้ช่วงเวลายาวพอสมควร การหาระดับความแม่นยำโดยหาค่าเปอร์เซ็นต์ของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.6.5 เวลาการตอบสนอง (response time)

เวลาการตอบสนอง (response time) หมายถึง เวลาในการตอบสนองทางสัญญาณทางไฟฟ้าที่ระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) การตอบสนองทางสัญญาณทางไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์จะใช้เวลาในการตอบสนองระหว่าง 5-10 นาที

2.6.6 การจัดเก็บ (life time)

การจัดเก็บ (life time) หมายถึง การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้ที่มีการเสื่อมสภาพไปตามระยะเวลาในการใช้ไบโอเซนเซอร์ และระยะเวลาการจัดเก็บสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้บนอิเล็กโทรด

บทที่ 3

วารสารปริทรรศน์

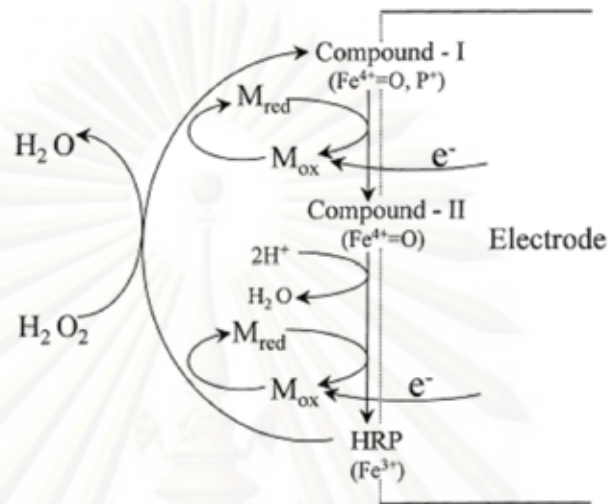
การวิเคราะห์ด้วยการใช้ไบโอเซนเซอร์ เป็นการนำสารชีวภาพที่มีความไวในการตอบสนองมาทำหน้าที่ตรวจจับ หรือทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจได้อย่างจำเพาะเจาะจงซึ่งจุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้ มีความมุ่งเน้นในเรื่องของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะบนอิเล็กโทรดและนำไปประยุกต์ใช้กับไบโอเซนเซอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) สำหรับตรวจวัดฟีนอล ศึกษาถึงวิธีการตรึงเอนไซม์ของโดยวิธีต่างๆ รวมไปถึงการใช้อนุภาคนาโนของโลหะ และพอลิเมอร์นำไฟฟ้าที่ใช้กับไบโอเซนเซอร์

3.1 เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) สำหรับตรวจวัดฟีนอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

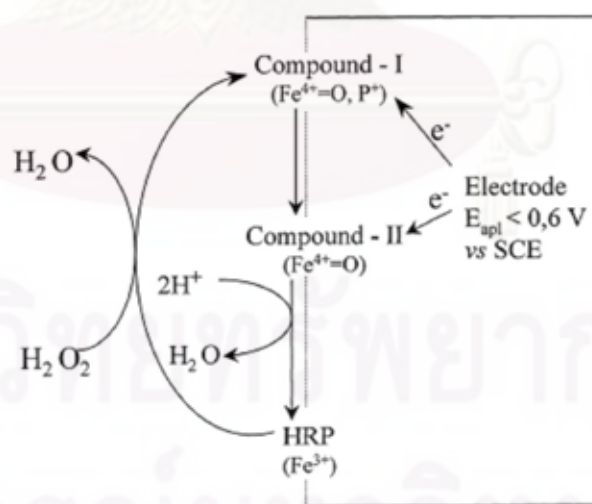
เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีความไวในการตรวจวัดฟีนอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เนื่องจากฟีนอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารเคมีที่มีพิษซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรม เมื่อฟีนอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รั่วไหลจะสามารถแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นสารอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้

การศึกษาของ Rosatto และคณะ 1999 ได้ทำการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนซิลิกาเจล (silica gel) กับไททาเนียม ออกไซด์ (titanium oxide) เพื่อตรวจวัดฟีนอล ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สามารถทำปฏิกิริยาได้ 2 รูปแบบคือ การเกิดปฏิกิริยาที่มีตัวกลางเป็นตัวถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediated electron transfer) ระหว่างเอนไซม์ และอิเล็กโทรดตามรูปที่ 3.1 จะมีการรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ซึ่งในที่นี้คือ ฟีนอลเป็นผู้ให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ โดยเริ่มจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ HRP (Fe^{3+}) โดยเอนไซม์จะเป็นผู้ให้อิเล็กตรอนแก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเอนไซม์อยู่ในรูปฟอร์ม HRP (Fe^{5+}) ต่อมาเอนไซม์ HRP (Fe^{5+}) จะรับอิเล็กตรอนจากผู้ให้อิเล็กตรอนคือ ฟีนอล หรือ M_{red} แล้ว HRP (Fe^{4+}) และขั้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ HRP (Fe^{4+}) จะรับอิเล็กตรอนจากผู้ให้อิเล็กตรอนอีกครั้ง (M_{red}) ซึ่งจะได้รับอิเล็กตรอนจากอิเล็กโทรด ทำให้เอนไซม์จะอยู่ในรูปฟอร์มเดิมอีกครั้งคือ HRP (Fe^{3+}) และอีกรูปแบบคือ ปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) ระหว่าง

เอนไซม์ฮอร์สแรดิซเปอร์ออกซิเดส และอิเลคโทรด โดยจะมีการรับอิเล็กตรอนจากอิเลคโทรด โดยตรงแสดงตามรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่มีตัวกลางเป็นตัวถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediated electron transfer) ระหว่างเอนไซม์ฮอร์สแรดิซเปอร์ออกซิเดสและอิเลคโทรด(Rosatto และคณะ 1999)



รูปที่ 3.2 กลไกการการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) ระหว่าง เอนไซม์ฮอร์สแรดิซเปอร์ออกซิเดส และอิเลคโทรด (Rosatto และคณะ 1999)

3.1.1 วิธีการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สำหรับไบโอเซนเซอร์

การศึกษาการพัฒนาวิธีการตรึงเอนไซม์ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การดูดซับ การยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ การครอสลิงค์เอนไซม์ การกักเก็บเอนไซม์ภายในวัสดุตรึง เป็นต้น ทั้งที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เพื่อให้เอนไซม์สามารถตรึงอยู่บนวัสดุได้โดยไม่หลุดออกมา ซึ่งจะส่งผลต่อไบโอเซนเซอร์โดยจะแสดงให้เห็นได้ด้วยค่าไวในการตอบสนอง (sensitivity) ความเสถียร (stability) และการผลิตซ้ำใหม่ (reproducibility)

3.1.1.1 การดูดซับ (adsorption)

การดูดซับเอนไซม์บนวัสดุตรึงโดยอาศัยพันธะอิออนิก หรือการดูดซับด้วยแรงทางกายภาพถือเป็นเทคนิคการตรึงเอนไซม์ที่ง่ายที่สุด โดยที่ Bai และคณะ (2008) รายงานการศึกษาแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยวิธีการดูดซับด้วยแรงทางกายภาพเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนกลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ทำการปรับปรุงด้วยซิงค์ออกไซด์ (ZnO) ที่ใช้วิธีการเกาะตัวด้วยเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) บนมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวบ์ (multi-wall carbon nanotube) พบว่าเวลาในการทำปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า มีผลต่อการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ อนุภาคนาโนของโลหะมีผลต่อการตอบสนองที่ดีขึ้น และในส่วนของ Xu และคณะ (2004) ได้รายงานการศึกษาอนุภาคของเงินที่อยู่ในฟิล์มของโซลเจล (sol-gel) สามารถดูดซับเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยแรงทางกายภาพบนกลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรด และสามารถแสดงผลที่ดีของกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส มีเสถียรภาพในการเก็บรักษาและการนำไฟฟ้าที่ดี

3.1.1.2 การยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)

เอนไซม์ถูกยึดเหนี่ยวกับวัสดุตรึงโดยอาศัยหมู่ฟังก์ชันต่างๆของเอนไซม์ โดย Li และคณะ (2009) ทำการทดลองการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยใช้การยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ของแมทริกซ์ของไคโตซานกับ โซลเจล (sol-gel) ซึ่งมีหมู่เอมีนของไคโตซาน และอีพอกซีของโซลเจล โดยมีซิลอกเซน (siloxane) เป็นตัวครอสลิงค์ระหว่างไคโตซานกับโซลเจล พบว่าอัตราส่วนระหว่างซิลอกเซน และไคโตซาน ค่า pH และศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ นอกจากนี้ Kong และคณะ (2003) รายงานว่า การตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยใช้การยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์ด้วยหมู่คาร์บอกซิลิกของ 5,2':5',2''-terthiophene-3'-carboxylic acid polymer (TCAP) บนกลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรดซึ่งผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีพอลิเมอร์ชนิดนี้พบว่ามีการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ดียิ่งขึ้น

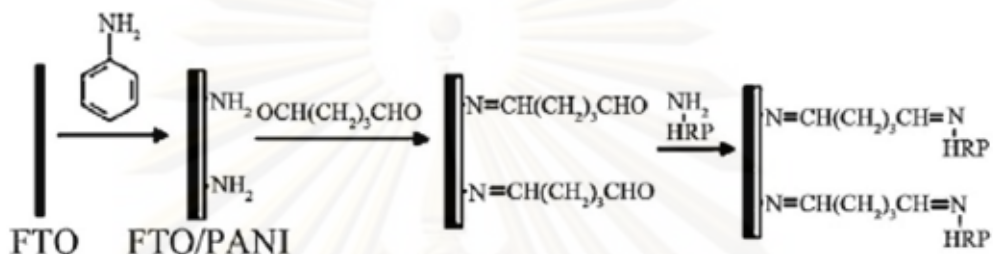
3.1.1.3 การกักยัด (entrapment)

การกักยัดเอนไซม์ทำได้โดยการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในที่จำกัด อาจทำได้โดยการกักยัดไว้ในแมทริกซ์ (matrix) ของวัสดุตรึง ซึ่งการทดลองของ Kang และคณะ (2009) การกักยัดเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ภายในโคโตซาน/ ซิลเจล/ คาร์บอนนาโนทิวบ์บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด ผลที่ได้คือโครงสร้างของฟิล์มมีความเหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ มีความเสถียร และการตอบสนองของสัญญาณทางไฟฟ้าของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ดี จากการทดลองของ Cao และคณะ (2009) ซึ่งนำเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสตรึงภายในวัสดุตรึงมีโซพอร์คือ mesoporous silica hollow sphere (MSHS) พบว่า MSHS สามารถบรรจุปริมาณเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสได้ในปริมาณมากและชี้ให้เห็นว่าเป็นแมทริกซ์ที่ดีในการตรึงเอนไซม์ นอกจากนี้ Li และคณะ (2008) ได้ทดลองศึกษาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ซึ่งกักเก็บเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสภายใน โคโตซาน/ ซิลิกา-ซิลเจล ไฮบริดเมมเบรน (silica sol-gel hybrid membranes หรือ CSHMs) ซึ่งมี $K_3Fe(CN)_6$ และอนุภาคของทองบนแพลทินัมอิเล็กโทรด พบว่า CSHMs มีความพรุนสูงแต่ในทางตรงข้ามจะทำให้ลดกิจกรรม (activity) ความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ ส่วนการศึกษาของ Xi และคณะ (2009) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส/ โคโตซาน/ ไนล์บลู (nile blue) โดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้า ซึ่งมีข้อดีคือง่ายและสะดวกในการวิธีการทำ นอกจากนี้ยังสามารถคงไว้ของสารชีวภาพ (bioactivity) และการนำไฟฟ้า (conductivity)

3.1.1.4 การครอสลิงค์เอนไซม์ (cross-linking)

การครอสลิงค์เอนไซม์เป็นการเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์เข้าด้วยกัน โดยอาศัยการจับด้วยพันธะโคเวเลนต์ของเอนไซม์กับหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีเชื่อมโยงต่อกันไปเรื่อยๆจนเกิดเป็นร่างแหของพอลิเมอร์ของเอนไซม์ซึ่งเมื่อมีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นจึงไม่สามารถละลายน้ำได้ จาก Rosatto และคณะ (1999) รายงานการครอสลิงค์เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสกับซิลิกาที่ปรับปรุงด้วย ไททานเนียมออกไซด์และกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าไบโอเซนเซอร์มีการตอบสนองที่ดีของปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมีการตอบสนองของสัญญาณทางไฟฟ้าของฟีนอลที่ดี ส่วนผลการศึกษา Wang และคณะ (2009) ศึกษาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ การตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยการครอสลิงค์เอนไซม์กับพอลิอะนิลีน (PANI) ด้วยกลูตารัลดีไฮด์บน เอฟ-โดปทินออกไซด์ (F-doped tin oxide หรือ FTO) ตามรูปที่ 3.3 พบว่าไบโอเซนเซอร์สามารถแสดงความเป็นเชิงเส้นได้ถึงความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมีความเสถียร

ที่ดี นอกจากนี้ Elkoutit และคณะ (2008) ศึกษาการครอสลิงค์เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ด้วยกลูตาริกไดออกไซด์ไฮดรีด ซึ่งพบว่าสามารถประเมินค่าการเลือก (selectivity) ของอิเล็กโทรดสารตั้งต้นต่างๆ คือ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดยูริก (uric acid) โดพามีน (dopamine) และ อีพิเนฟริน (epinephrine)



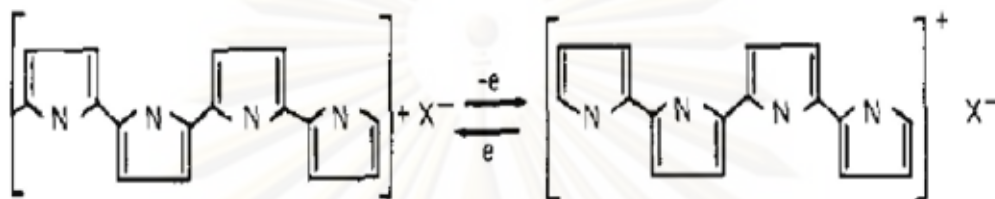
รูปที่ 3.3 การตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนอิเล็กโทรด (Wang และคณะ 2009)

3.2 พอลิเมอร์นำไฟฟ้าและอิทธิพลที่มีผลต่อพอลิเมอร์ต่อการตรึงเอนไซม์

พอลิเมอร์นำไฟฟ้า (conducting polymer) จะมีคุณสมบัติที่เด่นชัดอย่างหนึ่ง คือมีความแข็งแรงสามารถเข้ากันได้กับสารชีวภาพ และนำไฟฟ้าได้ดี (Chen และคณะ 2008) เป็นวัสดุที่ใช้ใช้กันอย่างแพร่หลายและสามารถนำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์ ตัวอย่างของพอลิเมอร์นำไฟฟ้า เช่น พอลิไพร์โรล (Tian และคณะ 2001; Razola และคณะ 2002; Li และคณะ 2007) พอลิอะนิลีน (Barton และคณะ 2004; Pritchard และคณะ 2004; Myler และคณะ 2005; Law และคณะ 2005) พอลิเอน-เมทิว ไพร์โรล (Garcia-Moreno และคณะ 2001) เป็นต้น

สำหรับการศึกษาในงานวิจัยนี้ จะเป็นการนำพอลิไพร์โรลมาใช้เนื่องจากมอนอเมอร์ของไพร์โรลสามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ตลอดจนสารชีวภาพต่างๆ และสามารถละลายน้ำ (water solubility) หรือสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนืด (supporting electrolyte) ทำให้ง่ายต่อการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (Tian และคณะ 2001; Li และคณะ 2007; Elkoutit และคณะ 2009) และพอลิเมอร์ชนิดนี้มีสายโซ่หลักมีโครงสร้างเป็นพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยวแบบต่อเนื่อง (conjugated system) ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนที่ภายในโครงสร้างจึงเกิดการนำไฟฟ้าได้ สำหรับกระบวนการอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชันเป็นกระบวนการเกิดพอลิเมอร์แบบไซโตโดยใช้ไฟฟ้ากระตุ้นมอนอเมอร์ที่อยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนืดที่สามารถทำให้แคตไอออนหรือแอนไอออนที่มีความว่องไว และสามารถทำปฏิกิริยากับมอนอเมอร์ต่อไปโดยผ่านกลไกการเกิดพอลิเมอร์ซึ่ง

กระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพร์โรลสามารถแสดงกระบวนการได้ดังรูปที่ 3.4 คือ มอนอเมอร์ของไพร์โรลจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันรับอิเล็กตรอนจากอิเล็กโทรดต่อกับมอนอเมอร์ของไพร์โรลกลายเป็นไดเมอร์ และจะมีการพอลิเมอร์ต่อไปเรื่อยๆ กลายเป็นพอลิเมอร์เคลือบบนพื้นผิวอิเล็กโทรด (Umana และคณะ 1986)



รูปที่ 3.4 กระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันพอลิไพร์โรล (Umana และคณะ 1986)

พอลิไพร์โรลเป็นพอลิเมอร์ที่ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องจากงานวิจัยต่างๆ Garcia-Moreno และคณะ (2001) เป็นการศึกษาวีธีการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสพร้อมกับพอลิเอ็นเมทิลไพร์โรล (poly-N-methylpyrrole) ด้วยวิธีเคมีไฟฟ้าซึ่งจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดคอร์แกนิกเปอร์ออกไซด์ โดยตัวแปรที่ทำการศึกษาคือ ขนาดของศักย์ไฟฟ้า ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ปริมาณเอนไซม์และค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี พบว่าพอลิเอ็นเมทิลไพร์โรล/เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และมีค่าการตอบสนองได้ดีเป็นอย่างดี

Gaspar และคณะ (2001) ศึกษาแอมเพอโรเมตรีไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส พร้อมกับพอลิไพร์โรลที่มีหมู่ฟังก์ชัน Osmium (Os-Py) เมื่อทำการตรวจวัดด้วยวิธีแอมเพอโรเมตรี พบว่า Os-Py ที่มีการตรึงเอนไซม์ไว้ นั้นสามารถแสดงปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ดีกว่าในกรณีที่มีพอลิไพร์โรลเพียงอย่างเดียว

Tian และคณะ (2001) ศึกษาการปรับปรุงไบโอเซนเซอร์เพื่อทำการวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยวิธีแอมเพอโรเมตรี ซึ่งตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส กับพอลิไพร์โรลด้วยวิธีเคมีไฟฟ้าบนคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีกรดเฟอร์โรซีนคาร์บอกซิลิก (ferrocenecarboxylic acid) เป็นตัวกลางการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediator) ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีโซลเจล พบว่าไบโอเซนเซอร์สามารถตรวจวัด และมีค่าการตอบสนองของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์เพิ่มขึ้น

Razola และคณะ (2002) ได้ใช้วิธีการอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันพอลิไพร์โรลกับเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนแพลทินัมอิเล็กโทรด พบว่าการทำชั้นพื้น (pre-layer) ก่อนทำปฏิกิริยาอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชัน จะมีผลต่อการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ เนื่องการทำชั้นพื้นจะช่วยไม่ให้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ และปัจจัยที่มีต่อการตรึงเอนไซม์คือ อัตราการสแกน (scan rate) ความเข้มข้นของสารอิเล็กโทรไลต์เกือบหนูน (supporting electrolyte) ความเข้มข้นของพอลิไพร์โรล จำนวนรอบของการสังเคราะห์ และปริมาณเอนไซม์

Shao และคณะ (2005) ศึกษาการสังเคราะห์พอลิไพร์โรลด้วยวิธีเคมีไฟฟ้าบนผิวหน้าอิเล็กโทรดเพื่อเป็นชั้นฟิล์มฐานของการสังเคราะห์ชั้นฟิล์ม (bilayer lipid membrane) พบว่าพอลิไพร์โรลสามารถเป็นฐานสำหรับการสังเคราะห์ชั้นฟิล์มได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งสามารถตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

Li และคณะ (2007) ศึกษาการทำไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส พร้อมกับพอลิไพร์โรลบนสกรีนปรินท์คาร์บอนอิเล็กโทรด (screen print carbon paste) ที่มีโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide) เป็นตัวกลางการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediator) โดยหาสภาวะที่เหมาะสมจากตัวแปรต่างๆ คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอไรเซอร์ สารละลายอิเล็กโทรไลต์ ปริมาณเอนไซม์ ความหนาของชั้นพอลิเมอไรเซอร์ วิธีการดังกล่าวนี้เป็นวิธีการที่ง่ายและมีราคาถูก

Kurkut และคณะ (2008) ได้ศึกษาแอมเพอโรเมตรีไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดอนุพันธ์ของฟีนอล โดยทำการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส พร้อมกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ และพอลิไพร์โรลด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า เมื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์แล้ว พบว่าสามารถตรวจวัดอนุพันธ์ของฟีนอลได้ถึง 18 ชนิด และสามารถตรวจสอบสารที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดี

Sulak และคณะ (2009) ศึกษาแอมเพอโรเมตรีไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดอนุพันธ์ของฟีนอล ซึ่งมีการนำพอลิไวนิลเฟอร์โรซีน (polyvinylferrocene, PVF) เป็นตัวกลางการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediator) แล้วทำการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส และพอลิไพร์โรลด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า พบว่าสามารถตรวจวัดอนุพันธ์ของฟีนอลได้หลากหลายชนิด มีความไวต่อการตอบสนอง และสามารถสารได้ที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดี

อิทธิพลที่มีผลต่อพอลิเมอร์ในการตรึงเอนไซม์

3.2.1 ศักย์ไฟฟ้า

จากการศึกษาของ Yang และคณะ (1997) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนพอลิอะนิลีนฟิล์มโดยใช้ความต่างศักย์ที่แตกต่างกันในการทำปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส พบว่าเมื่อใช้ความต่างศักย์ที่ต่ำลงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าที่ได้กระแสไฟฟ้าที่สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่น้อยลงทำให้การเสื่อมของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสช้าลง และการศึกษาของ Wang และคณะ (2009) เป็นการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยการครอสลิงค์เอนไซม์กับพอลิอะนิลีน (PANI) ด้วยกลูตารัลดีไฮด์โดยใช้ความต่างศักย์ต่างๆ พบว่าเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ลดลงจะทำให้กระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อลดศักย์ไฟฟ้าจะมีผลต่อเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

3.2.2 ค่า pH

ค่า pH เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญซึ่งจากการศึกษาของ Yang และคณะ 1997 ศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนพอลิอะนิลีนฟิล์มโดยใช้ค่า pH ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจะทำให้มีกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดจากการเพิ่มขึ้นของแอกติวิตี (activity) ของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส และการนำไฟฟ้าของพอลิอะนิลีน และจากการศึกษา Wang และคณะ (2009) เป็นการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ด้วยการครอสลิงค์เอนไซม์และพอลิอะนิลีน (PANI) ด้วยกลูตารัลดีไฮด์โดยการเติมสารละลายอิออนิก เพื่อให้ไบโอเซนเซอร์สามารถทำงานได้ในค่า pH ที่สูงได้ ซึ่งทำการทดลองที่ค่า pH ระหว่าง 6-12 ทดสอบด้วยวิธี cyclic voltammetry พบว่าค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย

3.2.3 อุณหภูมิ

จากการศึกษาของ Yang และคณะ (1997) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนพอลิอะนิลีนฟิล์มโดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 0-40 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้มีค่ากระแสไฟฟ้าสูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส มีค่าแอกติวิตีของการตรึงเอนไซม์ที่ดี แต่จะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสูงถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Wang และคณะ (2009) ศึกษาการปรับปรุงการนำไฟฟ้าของพอลิอะนิลีนโดยการเติมสารละลายอิออนิกและตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ด้วยการครอสลิงค์เอนไซม์กับพอลิอะนิลีน (PANI) ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อ

อุณหภูมิเพิ่มขึ้นกระแสไฟฟ้ามีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์สามารถป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้

3.2.4 ความเข้มข้นของสารอิเล็กโทรไลต์ที่เกื้อหนุน (supporting electrolyte)

ความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เกื้อหนุนเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งต่อการฟอร์มตัวของพอลิเมอร์ (Li และคณะ 2007) ความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เกื้อหนุนต้องมีค่าเพียงพอต่อการถ่ายเทประจุในสารละลาย Razola และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของลิเทียมเปอร์คลอเรต (LiClO_4) ซึ่งเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ระหว่าง 0.01-0.5 โมลต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของลิเทียมเปอร์คลอเรต 0.1 โมลต่อลิตร มีค่าเพียงพอต่อการฟอร์มตัวของพอลิเมอร์

3.2.5 ความเข้มข้นของพอลิเมอร์

จากการศึกษาของ Razola และคณะ (2002) พบว่าความเข้มข้นของพอลิไพโรลเป็นสิ่งสำคัญต่อการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส เนื่องจากหากใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่น้อยเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการฟอร์มตัวเป็นฟิล์มพอลิเมอร์และกักเก็บเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนพื้นผิวอิเล็กโทรด ซึ่งจะส่งผลต่อค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าในการตรวจวัดได้

3.2.6 ปริมาณของเอนไซม์

ปริมาณของเอนไซม์มีผลต่อการผลิตใหม่ (reproducibility) การนำกลับมาใช้ใหม่ (repeatability) และความเสถียร (stability) ของไบโอเซนเซอร์ (Tian และคณะ 2001; Li และคณะ 2007) จากการศึกษารายงานของ Razola และคณะ (2002) พบว่าการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันพร้อมกับพอลิไพโรลต้องมีปริมาณมากพอเพื่อค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้า แต่หากมีค่ามากเกินไปการตอบสนองอาจมีค่าลดลงไป และความเสถียรของไบโอเซนเซอร์มีค่าลดลง

3.2.7 จำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิเมอร์

จากการศึกษาของ Razola และคณะ 2002 ศึกษาจำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ต่อความหนาของชั้นฟิล์มที่เกิดขึ้นซึ่งจะส่งผลต่อการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อใช้เวลาในการสังเคราะห์น้อยเกินไปความหนาของชั้นฟิล์มอาจมีค่าไม่เพียงพอต่อการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส แต่หากใช้เวลาในการสังเคราะห์นานเกินไปจะทำให้มีชั้นฟิล์มที่มีความหนา และเอนไซม์อาจเกิดการเสื่อมสภาพได้ไม่เหมาะสมต่อการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างอิเล็กโทรดและเอนไซม์

3.2.8 อัตราการสแกน (scan rate)

การศึกษาของ Razola และคณะ 2002 ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันพร้อมกับพอลิไพรอล ซึ่งทำการศึกษาอัตราการสแกนในช่วง 1, 5, 10, 20 และ 50 มิลลิโวลต์/วินาที พบว่าอัตราการสแกน 1 มิลลิโวลต์/วินาทีไม่สามารถตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส เข้าไปกักยึดในพอลิเมอร์ได้ แต่เมื่อเปลี่ยนค่าเป็น 5 และ 10 มิลลิโวลต์/วินาที สามารถตรึงเอนไซม์เข้าไปกักยึดในพอลิเมอร์ได้เป็นอย่างดี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 อนุภาคนาโนของโลหะและอิทธิพลที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะมีการนำไปศึกษาอย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในลักษณะงานด้านต่าง เช่น สิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรม และการแพทย์ ซึ่งงานเหล่านี้เป็นลักษณะงานที่ต้องมีการตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ และมีปริมาณสารน้อย แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนของโลหะบนอิเล็กโทรดมีความสามารถในการตรวจวัดสารเหล่านี้ได้

การศึกษาของการนำอนุภาคนาโนของโลหะต่างๆ เช่น ทอง (Liu และคณะ 2005; Li และคณะ 2007; Liu และคณะ 2007; Shulga และคณะ 2007; Feng และคณะ 2009; Wang และคณะ 2009; Zeng และคณะ 2009) เงิน (Ng และคณะ 2000; Welch และคณะ 2005; Khaydarov และคณะ 2009) บิสมัท คอปเปอร์และทังสเตน (Ward-Jones และคณะ 2006) แพลทินัม (Yang และคณะ 2006) และอนุภาคของโลหะอีกหลายชนิดมาปรับปรุงความสามารถทางไฟฟ้าแก้อิเล็กโทรด ซึ่งจะมีผลดีในทางด้านความไวในการตอบสนองของสัญญาณทางไฟฟ้า (sensitivity)

3.3.1 อนุภาคนาโนของโลหะ

อนุภาคนาโนของโลหะชนิดต่างๆ เช่น ทอง เงิน คาร์บอนนาโนทิวบ์ เป็นต้น อนุภาคนาโนของโลหะเหล่านี้มีคุณสมบัติที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ค่ะตะไลติก (catalytic) และการนำไฟฟ้า (conductivity) นอกจากนี้ยังมีการเติมพวคนาโนขนาดเล็ก (nanoparticle) ลงไปในการตรึงเอนไซม์ในวัสดุด้วย เพราะจะเป็นตัวที่ทำให้มีการมีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่ระหว่างเอนไซม์กับอิเล็กโทรด

3.3.1.1 อนุภาคนาโนทอง

อนุภาคนาโนทองสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้าน โดยจากการศึกษาของ Dai และคณะ(2004) ทำการศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอน ตามรูปที่ 3.5 โดยมีปัจจัยการศึกษาความเข้มข้น และเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่างกัน พบว่าเมื่อใช้เทคนิคสทริปปิงโวลแทมเมตรีสามารถนำอิเล็กโทรดมาตรวจวัดสารหนูได้ และสามารถตรวจวัดสารได้ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดี และจากกลุ่มวิจัยเดียวกันการศึกษาของ Dai และคณะ(2006) ได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนอินเดียมทินออกไซด์ โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าในสารละลายโดยศึกษาถึงความเข้มข้น และเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเช่นเดียวกันซึ่งผลการทดลองที่ได้จะทำให้มีขนาดอนุภาคนาโนทองที่แตกต่างกัน และสามารถตรวจวัดสารหนูได้ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดีเช่นกัน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดสารหนูได้

นอกจากนี้ได้มีการนำอนุภาคนาโนทองมาประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบสารต่างๆ อีกมากมาย เช่น Liu และคณะ (2005) ได้ทำการเปรียบเทียบโครงสร้างและคุณสมบัติของ mercaptopropionic acids (MPA) ด้วยการสังเคราะห์โดยการจัดวางโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบได้ด้วยตนเอง (self assembly, SAM) บนอิเล็กโทรดของทอง และนาโนอิเล็กโทรดของทองโดยการสังเคราะห์จากวิธีเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) พบว่า MPA SAM สามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้เป็นอย่างดีและชี้ให้เห็นว่า MPA เกิดการเรียงตัวแบบ SAM บนอิเล็กโทรดของทอง และจะมีค่าการนำไฟฟ้าที่ดีขึ้นเมื่อนำ MPA สังเคราะห์บนนาโนอิเล็กโทรดของทอง

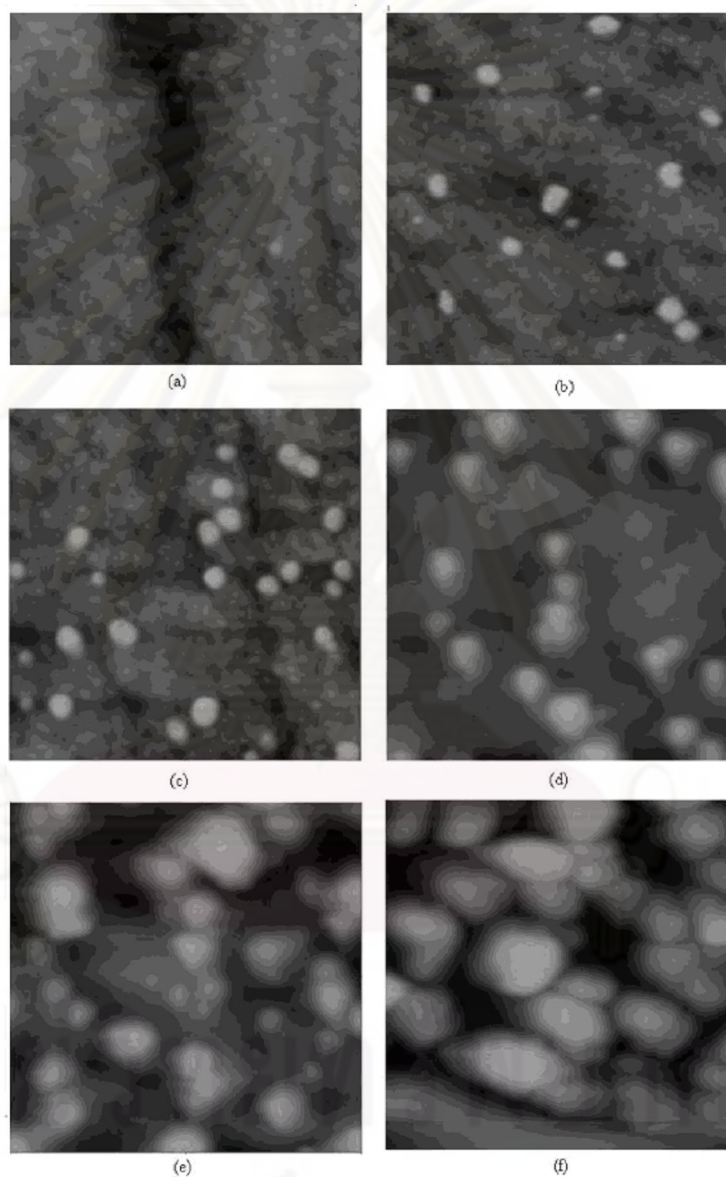
Liu และคณะ (2007) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนอิเล็กโทรดก่อนการทำการปลูกฟิล์มของ dodecanethiol (DDT) ด้วยวิธี SAM เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค cyclic voltammtry โดยใช้เฟอร์ริกไซยาไนด์ (ferricyanide) ที่มีเมทิลวบลู (methyl blue, MB) เป็นตัวกลางถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediator) เพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ พบว่าเมทิลวบลูสามารถแสดงเป็น mediator เพื่อช่วยในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับเฟอร์ริกไซยาไนด์ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับแมคโครอิเล็กโทรดกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองก่อนการปลูกพอลิเมอร์ พบว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองก่อนการปลูกพอลิเมอร์จะมีสัญญาณทางไฟฟ้าในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี (voltammetry) ในขณะที่เมื่อใช้แมคโครอิเล็กโทรดจะไม่มีสัญญาณทางไฟฟ้าเกิดขึ้นมากนัก

EI-Deab และคณะ (2002) ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนในช่วง cathodic reduction เพื่อตรวจวัดอนุภาคนาโนทองที่ถูกสังเคราะห์บนอิเล็กโทรดของด้วยสารละลายซัลฟิวริก (H_2SO_4) ซึ่งสามารถชี้ให้เห็นได้ว่าอนุภาคนาโนทอง สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน โดยออกซิเจนจะรับอิเล็กตรอนกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตามลำดับ

Li และคณะ (2007) ศึกษาการนำอนุภาคนาโนทองซึ่งทำการสังเคราะห์บนเส้นใยนาโนของพอลิไพร์รอล (polypyrrole nanowire) ซึ่งเกิดการฟอร์มตัวเป็นแมทริกซ์บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด พบว่าอนุภาคสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดราซีน (hydrazine) และไฮดรอกซิลามีน (hydroxylamine) ทำให้มีค่าการตอบสนองของการตรวจวัดสารที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้ต่ำลง ซึ่งการสังเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าได้ดีขึ้น และง่ายต่อการสังเคราะห์

Tsai และคณะ (2008) ศึกษาการตรวจวัดเฮกซะวาเลนต์ โครเมียม (hexavalent chromium, CrVI) โดยใช้ทินออกไซด์อิเล็กโทรด และการปรับปรุงประสิทธิภาพของอิเล็กโทรดด้วยการปลูกอนุภาคนาโนทองด้วยวิธีไฟฟ้าเคมีบนทินออกไซด์อิเล็กโทรด ซึ่งอนุภาคนาโนทองมี

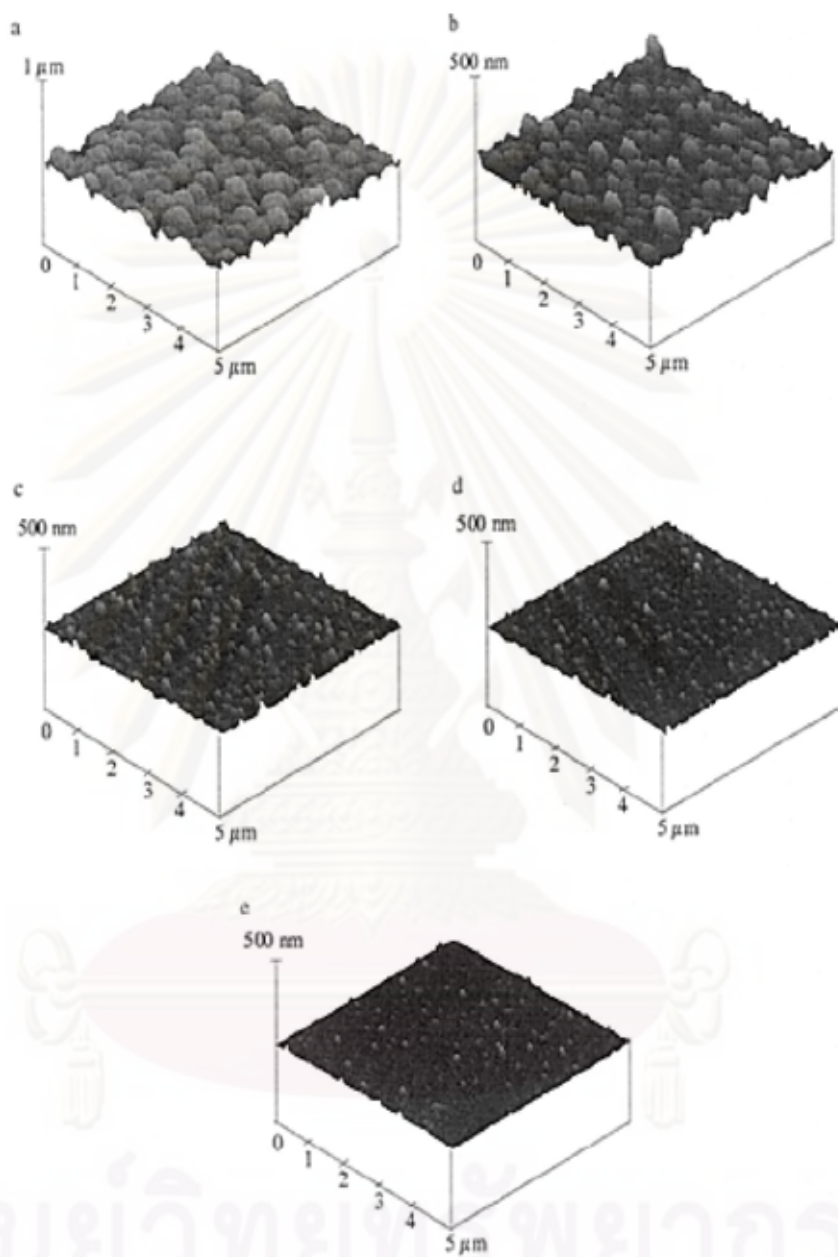
คุณสมบัติเป็นดั่งเร่งปฏิกิริยาได้ดี พบว่าสามารถเป็นดั่งเร่งปฏิกิริยาได้เป็นอย่างดี การตอบสนองที่ดีขึ้นสำหรับการตรวจวัดการทำปฏิกิริยารีดักชันของ Cr(VI) ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 3.5 AFM (500 nm) ของอนุภาคทองบน GCE (a) bare GCE (b) 0.1 mM AuCl_4^- /5 s (c) 0.1 mM AuCl_4^- /15 s (d) 0.1 mM AuCl_4^- /30 s (e) 0.1 mM AuCl_4^- /150 s และ (f) 1.0 mM AuCl_4^- /15 s. (Dai และคณะ 2004)

3.3.1.2 อนุภาคนาโนเงิน

การใช้อนุภาคนาโนเงินเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์นั้นมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย โดย Xu และคณะ (2004) ได้รายงานของการนำอนุภาคนาโนเงินเพื่อปรับปรุงฟิล์มของซิลเจล ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสบนกลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรดซึ่งอนุภาคของเงินมีข้อดีในการปรับปรุงไบโอเซนเซอร์คือ อนุภาคเงินมีคุณสมบัติทางโลหะสามารถนำไฟฟ้าได้ และยังสามารถเพิ่มการเกาะติดกันของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสกับอิเล็กโทรด นอกจากนี้การศึกษาของ Simm และคณะ (2005) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ ไมโครอิเล็กโทรดของเงิน โดยมีวิธีการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดเปรียบเทียบกัน ซึ่งวิธีแรกจะเป็นการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดของเงินด้วยวิธีการอัลตราซาวด์ (ultrasound) และวิธีที่สองจะเป็นการใช้วิธีเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยใช้ atomic force microscopy (AFM) พบว่าพื้นผิวที่ใช้วิธีการอัลตราซาวด์ มีลักษณะอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่าการใช้เคมีไฟฟ้า และพบว่าเวลาที่ใช้ในเทคนิคสทริปปิงเพื่อนำอนุภาคนาโนเงินออกจากอิเล็กโทรดสามารถลดขนาดอนุภาคนาโนเงินบนอิเล็กโทรดได้ตามรูปที่ 3.6 และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสารหนู (arsenic) นอกจากนี้ไมโครอิเล็กโทรดของเงินสามารถตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของฮาโลเทนได้ ซึ่งทั้งสองแบบสามารถวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้คล้ายกัน และจากกลุ่มวิจัยเดียวกันนี้ Welch และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินบนกลาสสิคาร์บอนโดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าอนุภาคนาโนเงินสามารถเพิ่มค่าการตอบสนองของการตรวจวัดได้ดีขึ้น สามารถตรวจวัดค่าต่ำสุดของการตรวจวัด (limit detection) ได้ถึงความเข้มข้นต่ำสุด 2.0×10^{-6} โมลต่อลิตร และมีค่าการตอบสนอง (sensitivity) ที่ดีกว่าแมคโครอิเล็กโทรดของเงิน



รูปที่ 3.6 ลักษณะพื้นผิวของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยใช้เทคนิค AFM โดยการทำให้ปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี (electrodeposition) บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) 1 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ความต่างศักย์ -0.5 โวลต์ ระหว่าง Ag wire (a) ระยะเวลาการ stripping ที่ความต่างศักย์ 0.5 โวลต์ ระหว่าง Ag wire ที่เวลา 1 (b), 2(c), 5(d) และ 10 (e) นาที ตามลำดับ (Simm และคณะ 2005)

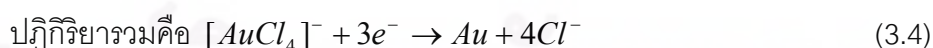
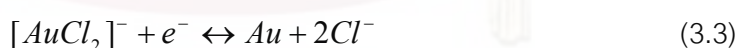
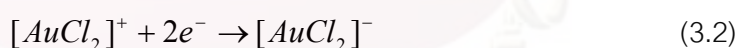
3.1.1.3 คาร์บอนนาโนทิวบ์

คุณสมบัติพิเศษของคาร์บอนนาโนทิวบ์ คือเป็นโมเลกุลของคาร์บอนที่สามารถนำไฟฟ้าได้ เป็นวัสดุที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และสามารถนำมาใช้กับไบโอเซนเซอร์ได้ดีในการปรับปรุงอิเล็กโทรด โดย Korkut และคณะ (2008) ศึกษาการนำคาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT)/ พอลิไพร์โรล (PPy)/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งสังเคราะห์ฟิล์มด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า เพื่อตรวจวัดอนุพันธ์ของฟีนอลทั้งหมด 18 ชนิด และพบว่า CNT สามารถช่วยการถ่ายโอนของอิเล็กตรอนได้ดี สำหรับ Xi และคณะ (2009) รายงานการศึกษา ไคโตซาน/ คาร์บอนนาโนทิวบ์/ ไนลัน 6,6 ปรับปรุงอิเล็กโทรดด้วยเคมีไฟฟ้า พบว่าฟิล์มที่เกิดขึ้นสามารถปรับปรุงการนำไฟฟ้าและมีความเหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส นอกจากนี้ Bai และคณะ (2008) ทำการปรับปรุงกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยซิงค์ออกไซด์ (ZnO) โดยใช้เคมีไฟฟ้าบนคาร์บอนนาโนทิวบ์ จะพบว่าฟิล์มที่เกิดขึ้นสามารถปรับปรุงการตอบสนองของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ Luo และคณะ (2006) ศึกษาการปรับปรุงอิเล็กโทรด เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการสังเคราะห์ฟิล์มของพอลิอะนิลีนบนคาร์บอนนาโนทิวบ์ พบว่าจำนวนชั้นความหนาของฟิล์ม และความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ มีผลต่อความไวต่อการตอบสนอง ซึ่งการมีคาร์บอนนาโนทิวบ์อยู่บนอิเล็กโทรดสามารถเพิ่มค่าการตอบสนองทางสัญญาณไฟฟ้าของเซนเซอร์ได้ถึง 8 เท่า

3.3.2 อิทธิพลที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคโลหะด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

ในการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะต่างๆ ด้วยวิธีไฟฟ้าเคมี (electrodeposition) คือ การทำให้โลหะที่อยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกาะบน (supporting electrolyte) ไปสะสมอยู่บนผิวหน้าชิ้นงานโดยการให้ศักย์ไฟฟ้า หรือกระแสไฟฟ้าซึ่งผิวหน้าชิ้นงานในที่นี้เป็นอิเล็กโทรดใช้งาน โดยอิเล็กโทรดใช้งานจะถูกจุ่มลงในสารละลาย ซึ่งมีโลหะที่ต้องการให้เกิดการสะสมต่อกับอุปกรณ์จะประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว คือ ขั้วใช้งาน (working electrode) ขั้วอ้างอิง (reference electrode) และ ขั้วช่วยหรือแคโทดอิเล็กโทรด (counter electrode) ในการเกิดการสะสมจะเกิดที่ขั้วใช้งาน จากการศึกษาหน้าที่ของสารเคมีที่นำมาใช้ ซึ่งในการทดลองโดยวิธีดังกล่าวนี้จะใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกาะบน ซึ่งจะทำให้สารละลายนั้นสามารถนำไฟฟ้าได้ เนื่องจากมีไอออนซึ่งเป็นไอออนบวกหรือไอออนลบเคลื่อนที่อยู่ในสารละลาย นอกจากนี้สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกาะบนยังทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) ซึ่งช่วยให้ไอออนของอนุภาคโลหะอยู่ในลักษณะที่เป็นคอลลอยด์ในสารละลายได้ (Rodriguez-Sanchez และคณะ 2000)

ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองจะเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของคลอไรด์ไอออน (AuCl₄⁻) ซึ่งมีการแตกตัวของโมเลกุลเชิงซ้อนตามสมการดังนี้ (Komsiyiska และคณะ 2008)



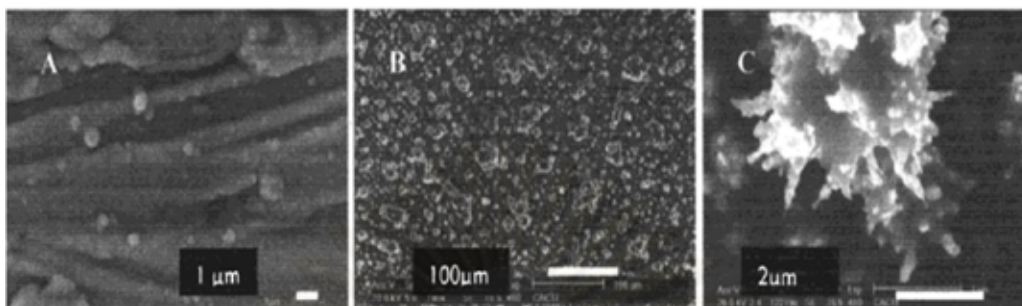
โดยคลอไรด์ไอออนจะรับอิเล็กตรอนจากกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดเกิดเป็นอะตอมของแข็งขึ้นมาก่อน (nucleation) จากนั้นจะเกิดเป็นกลุ่มของอนุภาคทองโดยการรวมตัว (aggregate) ขึ้น และมีการขยายขนาด (growth) เพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาและจะเพิ่มขนาดขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมขนาดของอนุภาคนาโนเงิน เช่น ความเข้มข้นและเวลา ศักย์ไฟฟ้าหรือกระแสไฟฟ้า ตัวทำละลาย สารละลายอิเล็กโทรไลต์ ชนิดของอิเล็กโทรด และอุณหภูมิ เป็นต้น

3.3.2.1 ความเข้มข้นและเวลา

การศึกษาเรื่องความเข้มข้นและเวลาดำยวิธีเคมีไฟฟ้าสามารถนำมาใช้กับอนุภาคโลหะต่างๆ การศึกษาโดยวิธีเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง (El- Deab และคณะ 2002; Liu และคณะ 2005; Liu และคณะ 2007) บนอิเล็กโทรดของทอง El- Deab และคณะ (2003) แพลทินัมอิเล็กโทรด (Dai และคณะ 2004; Du และคณะ 2007; He และคณะ 2007; Huang และคณะ 2007; Kim และคณะ 2008; Yang และคณะ 2009) บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด (Dai และคณะ 2006; Tsai และคณะ 2008) บนอินเดียมทินออกไซด์อิเล็กโทรด การศึกษาโดยวิธีเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนเงินของ Wu และคณะ (2006) บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด พบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้มีอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจะทำให้อนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้นมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของทองในสารละลาย จะทำให้ระยะห่างระหว่างอิออนของทองใกล้ชิดกันมากขึ้น และมีผลทำให้การรวมตัวเป็นไมโครอิเล็กโทรดบนอิเล็กโทรดใช้งานมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นตามลำดับ

3.3.2.2 ศักย์ไฟฟ้า (voltage) และกระแสไฟฟ้า (current density)

การให้ศักย์ไฟฟ้าหรือกระแสไฟฟ้าเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งของวิธีเคมีไฟฟ้าโดย Du และคณะ 2007 ศึกษาการนำอนุภาคนาโนทอง/ โคโคซาน โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ต่างๆ บนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความต่างศักย์ที่ -0.5, -1.0, -1.5, -2.0, -2.5 และ -3.0 โวลท์ พบว่าเมื่อศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นจะทำให้ความหนาของชั้นฟิล์มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความหนาของชั้นฟิล์มหนาเกินไปอาจจะได้กระแสที่เกิดขึ้นน้อยลง นอกจากนี้ Rodriguez-Sanchez และคณะ (2000) ศึกษาการนำอนุภาคนาโนเงินแล้วให้กระแสไฟฟ้า (current density) แก่แพลทินัมอิเล็กโทรด พบว่าจะได้อนุภาคนาโนเงินที่มีขนาด รูปร่าง และสีที่แตกต่างกัน โดยเมื่อใช้ไฟฟ้ากระแสต่ำ (low current density) จะทำให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะอัดตัวแน่น ในขณะที่เมื่อใช้ไฟฟ้ากระแสสูง (high current density) จะทำให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะที่ไม่เป็นระเบียบมากนักตามรูป 3.7



รูปที่ 3.7 ภาพ SEM อนุภาคนาโนเงินเกาะแพลทินัมอิเล็กโทรด (A) ความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าระดับต่ำ (-1.4 mA cm^{-2}) (B) ความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้าระดับสูง (-7 mA cm^{-2}) (C) ภาพขยาย B

3.3.2.3 ตัวทำละลายและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (supporting electrolyte)

การศึกษาเรื่องของตัวทำละลายเป็นเรื่องสำคัญอีกเรื่องหนึ่งสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะ จากการศึกษาของ Rodriguez-Sanchez และคณะ (2000) ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) โดยใช้อะซิโตนไนไตรต์ เป็นตัวทำละลายเนื่องจากอะซิโตนไนไตรต์เป็นตัวทำละลายชนิดอะโปรติก (aprotic solvent) เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีไฮโดรเจนอะตอมชนิดที่มีความเป็นกรดไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ ซึ่งจะไม่ทำให้อิออนของเงินรวมตัวกับตัวทำละลาย และในส่วนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์จะใช้เตตระเอทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ หรือเตตระเอทิลแอมโมเนียมอะซิเตต เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน ซึ่งเมื่อละลายในตัวทำละลายแล้วสามารถนำไฟฟ้าได้ เนื่องจากมีไอออนซึ่งอาจจะเป็นไอออนบวกหรือไอออนลบเคลื่อนที่ที่อยู่ในสารละลาย สารละลายอิเล็กโทรไลต์นี้อาจเป็นสารละลายกรด เบส หรือเกลือ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) ซึ่งช่วยให้อนุภาคของเงินอยู่ในลักษณะที่เป็นคอลลอยด์ และไม่ทำให้อนุภาคเงินเกิดการตกตะกอนด้วย

3.3.2.4 ชนิดของอิเล็กโทรด

ชนิดของอิเล็กโทรดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งของปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า ซึ่งจากการศึกษาของ Rodriguez-Sanchez และคณะ (2000) ได้ทำการสังเคราะห์หอนุภาคนาโนเงินด้วยปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าซึ่งใช้แพลทินัมและอลูมิเนียมอิเล็กโทรด พบว่าเมื่อใช้แพลทินัมอิเล็กโทรดจะสามารถสังเคราะห์หอนุภาคนาโนเงินได้ แต่เมื่อใช้อลูมิเนียมอิเล็กโทรดจะไม่สามารถสังเคราะห์หอนุภาคนาโนเงินได้เนื่องจากหอนุภาคเงินและอลูมิเนียมมีโครงร่างผลึก (crystallographic structure) และรัศมีของอนุภาค (atomic radius) ที่ใกล้เคียงกันจึงเป็นสาเหตุสำคัญในการฟอร์มตัวของหอนุภาคนาโนเงิน

3.3.2.5 อุณหภูมิ

การศึกษาของ Khaydarov และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์หอนุภาคนาโนเงินโดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้นและมีกระแสไฟฟ้าที่สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากจะช่วยลดคุณสมบัติขั้วของการมีขั้ว (polarity) ระหว่างขั้วอิเล็กโทรดและกระแสไฟฟ้าได้

3.4 การนำอนุภาคนาโนของโลหะมาประยุกต์ใช้กับไบโอเซนเซอร์

การนำอนุภาคนาโนของโลหะมาประยุกต์ใช้กับไบโอเซนเซอร์ จะสามารถใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด เมื่อพิจารณาการนำอนุภาคนาโนของโลหะด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) และมีการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สามารถศึกษาได้จากหลากหลายงานวิจัย ยกตัวอย่างเช่น Orozco และคณะ (2009) ได้มีการศึกษาการปรับปรุงอัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ โดยนำอนุภาคนาโนทองคำมาสังเคราะห์ติดกับอิเล็กโทรดซึ่งเป็นอัลตราไมโครอิเล็กโทรดโดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้า แล้วตรึงรูปเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยการยึดเหนี่ยวด้วยพันธะโคเวเลนต์กับ dithiobis-N-succinimidyl propionate (DTSP) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจวัดแคทาซอล (catechol) ที่ความต่างศักย์ 0.1 โวลต์ และอัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของทองสามารถเพิ่มความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) เมื่อเปรียบเทียบกับอัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ และไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ นอกจากนี้สามารถตรวจวัดแคทาซอล ในช่วงที่เป็นเชิงเส้นระหว่าง 0.1 ถึง 0.4 มิลลิโมลต่อลิตร และสามารถตรวจวัดค่าต่ำสุดของการตรวจวัด (limit detection) ได้ถึง 0.05 มิลลิโมลต่อลิตร นอกจากนี้จากการศึกษาของ Yang และคณะ (2009) ศึกษาโนอิเล็กโทรดของทองซึ่งทำการสังเคราะห์ด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า โดยมีคาร์บอนนาโนทิวป์เป็นเทมเพลต และทำการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการดูดซับ (adsorption) เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่านาโนอิเล็กโทรดของทอง/คาร์บอนนาโนทิวป์สามารถตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีการตอบสนองที่ดี และเทคนิควิธีการสังเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วมีการตอบสนองที่ดี และในการวิจัยของ Shi และคณะ (2008) ศึกษาการนำพอลิไทโอนีน (poly-thionine nanowire หรือ PTHNWs) PTHNWs / เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส / อนุภาคนาโนทอง ทำการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไบโอเซนเซอร์ โดยนำ PTHNWs มาเกาะบนพื้นผิวของอิเล็กโทรดด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า แล้วใช้การเอนแคปซูลเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสกับอนุภาคนาโนทอง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่าง (PTHNWs)/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส/ อนุภาคนาโนทอง และ PTHNWs/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส จะมีการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้าที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 เท่า และมีเวลาการตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้า (response time) ที่น้อยกว่า 5 วินาที

นอกจากนี้ได้มีการนำอนุภาคนาโนของโลหะต่างๆ เหล่านี้มาใช้ร่วมกับการตรึงเอนไซม์ชนิดต่างๆ และสารชีวภาพอีกมากมายหลากหลายชนิดด้วยกัน เช่น Wu และคณะ (2006) ได้ศึกษาการนำอนุภาคนาโนเงินและดีเอ็นเอ โดยวิธีเคมีไฟฟ้าบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด พบว่ามีการกระจายตัวของอนุภาคเงินมีลักษณะเป็นไมโครอิเล็กโทรดบนอิเล็กโทรด ซึ่งสามารถตรวจวัด

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเมื่อทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อวัดปริมาณกลูโคสได้เป็นอย่างดี จากงานวิจัยของ Zeng และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์นาโนอิเล็กโทรดของอนุภาคนาโนทองด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า แล้วตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อตรวจวัดกลูโคส นอกจากนี้จากรายงานการวิจัยของ Du และคณะ (2007) ศึกษาการปลูกฟิล์มโคโตซาน และอนุภาคนาโนทองด้วยวิธีเคมีไฟฟ้าบนกระจกสลิคาร์บอนอิเล็กโทรดนำไปตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เพื่อประยุกต์ใช้เป็นกลูโคสไบโอเซนเซอร์ การสังเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถทำได้ง่ายและสะดวกรวดเร็ว โดยการผสมสารละลายโคโตซานและอนุภาคนาโนทองแล้วทำการสังเคราะห์ด้วยการให้ศักย์ไฟฟ้า และตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสด้วยวิธีการจัดวางโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบด้วยตัวเอง (self assembly) บนฟิล์มโคโตซานและอนุภาคนาโนทอง พบว่าความเข้มข้นของโคโตซานและอนุภาคนาโนทอง เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า และขนาดของศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อการตอบสนองต่อสัญญาณทางไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์

Shulga และคณะ (2007) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนอิเล็กโทรดทองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการยึดติดของการตรึงเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) เมื่อไม่มีอนุภาคนาโนทองบนอิเล็กโทรดการตรวจวัดการตอบสนองของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเพื่อตรวจวัดสารอะเซทิลโคลีน จะมีค่าน้อยและวัดค่าได้จำกัด ความสามารถของอนุภาคนาโนที่ถูกสังเคราะห์บนอิเล็กโทรดสามารถเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดสารได้ เพื่อใช้ในการวัดความเข้มข้นของสารประกอบออกาโนฟอสเฟต (organophosphate pesticide carbofuran) ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้นได้ระดับต่ำถึงหน่วยนาโนโมลต่อลิตร ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวมีวิธีการที่ง่ายในการสังเคราะห์และสามารถพัฒนาเพื่อวัดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้ ส่วน Kim และคณะ (2009) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนกระจกสลิคาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า เพื่อเพิ่มค่าการตอบสนองของเอนไซม์ไทโรซิเนส (TYR) โดยควบคุมด้วยศักย์ไฟฟ้าและเวลา พบว่าเมื่อทำการวัดด้วยเทคนิค voltammetric สามารถตรวจวัดการตอบสนองปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถตรวจวัดฟีนอลและแคทาซอล (catechol) และจะได้ผลการตอบสนองที่ดีขึ้น เมื่อมีอนุภาคนาโนทองบนกระจกสลิคาร์บอนอิเล็กโทรด

Liu และคณะ (2005) ศึกษาการปรับปรุงอิเล็กโทรดของทอง โดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้าในการสังเคราะห์นาโนอิเล็กโทรดของทอง แล้วทำการตรึงดีเอ็นเอ (DNA) โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry และปรับปรุงการจัดลำดับดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มความไวในการตอบสนอง พบว่านาโนอิเล็กโทรดของทองสามารถเพิ่มจำนวนของการตรึงดีเอ็นเอ มากกว่าการตรึงบน

แมคโครอิเล็กโทรดของทอง และ Wu และคณะ (2006) ศึกษาการสังเคราะห์ไฮบริทของอนุภาคนาโนเงิน-ดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีเคมีไฟฟ้าบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด ไฮบริทของอนุภาคนาโนเงิน-ดีเอ็นเอ สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชัน ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และยังพบอีกว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเงินที่เกิดขึ้น ซึ่งการมีดีเอ็นเอแบ่งกันระหว่างอนุภาคนาโนเงินจะช่วยให้อนุภาคเงิน แสดงคุณสมบัติเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้ He และคณะ (2007) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนที่มีการปรับปรุงอิเล็กโทรดด้วยพราสเซียลบลู (prussian blue) เพื่อทำการตรึงแอนติบอดี (hepatitis B surface antigen, HBsAg) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของแอนติบอดี HBsAg พบว่ากระแสมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดี HBsAg เพิ่มขึ้น ซึ่งอนุภาคนาโนทองสามารถเข้ากันได้กับสารชีวภาพได้ และสามารถดูดซับแอนติบอดี HBsAg ได้เพิ่มขึ้น และพราสเซียลบลูสามารถเป็น mediator ในการถ่ายเทอิเล็กตรอนแก่อิเล็กโทรดได้เป็นอย่างดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สารเคมี และวิธีการทดลอง

4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

4.1.1 อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P100 ,1000 และP5000 บริษัท Gilson, ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น MP220 บริษัท Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. เครื่องอัลตราโซนิก คลีนเนอร์ (ultrasonic cleaner) รุ่น CREST-MODEL HT บริษัท ไฮแอนดิฟิตโปรโมชัน จำกัด ประเทศมาเลเซีย
4. เครื่องโพเทนชิออสแตท Potentiostat (AUTOLAB รุ่น PGSTAT30) บริษัท Metrohm จำกัด
5. เครื่อง scanning electron microscopy (SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410LV
6. เครื่อง scanning probe microscope ยี่ห้อ Veeco, nanoscope รุ่น IV

4.1.2 เคมีภัณฑ์

1. เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส EC. 1.11.1.7 (horseradish peroxidase เกรด 1 PEO -131 , 131 U/mg) บริษัท Toyobo , ประเทศญี่ปุ่น
2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 30 % บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมนี¹
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Fisher Scientific¹
4. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) บริษัท Fisher Scientific¹
5. ไฮโดรเจน เตตระคลอโรอโรอเรต ไตรไฮไดรต์ ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) บริษัท Sigma Aldrich¹
6. ไพโรล (C₄H₅N) 98% บริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี¹
7. โพแทสเซียมไนเตรต (KNO₃) บริษัท Ajax Chemical¹
8. โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (K₄Fe(CN)₆) บริษัท BDH laboratory supplies

9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Asia Pacific Spacialty Chemical limited¹
10. โพแทสเซียมซัลเฟต (K₂SO₄) บริษัท บริษัท Fisher Scientific¹
11. ฟีนอล (C₆H₅OH) บริษัท Carlo Regent¹

หมายเหตุ ¹ สารเคมีมีความบริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการ

4.2 วิธีการทดลอง

4.2.1 การทำความสะอาดอิเล็กโทรด

การทดลองทางเคมีไฟฟ้าทั้งเทคนิค cyclic voltammetry และ amperometry ใช้เครื่องโพเทนชิออสแตท โดยการทดลองใช้อิเล็กโทรด 3 อิเล็กโทรดเป็นองค์ประกอบ คือใช้ กลาสคาร์บอนเป็นอิเล็กโทรดใช้งาน (working electrode) ส่วน Ag/AgCl เป็นอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) และแพลทินัมเป็นเคาท์เตอร์อิเล็กโทรด (counter electrode) ก่อนการทดลองจะทำการขัดอิเล็กโทรดใช้งาน (working electrode) ด้วยผงอะลูมินาขนาด 0.3 และ 0.05 ไมครอนตามลำดับ เป็นเวลาอย่างละ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และทำความสะอาดอิเล็กโทรดใช้งานด้วยเครื่องอัลตราโซนิคคลื่นเนอริในเอทานอลและน้ำกลั่น ตามลำดับ เป็นเวลาอย่างละ 5 นาที แล้วทั้งอิเล็กโทรดใช้งานไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4.2.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ใช้สารละลายที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน เตตระคลอโรออร์เต ไตรไฮไดรด์ (HAuCl₄•3H₂O) ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลต่อลิตรในน้ำกลั่น และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO₃) 0.1 โมลต่อลิตรในน้ำกลั่น ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ (Lui และคณะ 2005; Huang และคณะ 2007; Lui และคณะ 2007) และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำอิเล็กโทรดออกจากสารละลายแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และวางอิเล็กโทรดใช้งานให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำไปทำการทดสอบทางเคมีไฟฟ้าต่อไป

4.2.3 การวิเคราะห์เส้นผ่าศูนย์กลาง ความสูงและจำนวนอนุภาคนาโนทอง

การวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและจำนวนอนุภาคนาโนทองจากภาพ AFM สองมิติขนาด 5x5 ไมครอน สามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Image Pro plus (บริษัท Adept Electronic Solutions จำกัด) จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ แล้วแบ่งเป็นช่วงความถี่เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคเพื่อคำนวณเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย และการวิเคราะห์จำนวนอนุภาคนาโนทองโดยสามารถคำนวณได้จากจำนวนอนุภาคทั้งหมดต่อพื้นที่ขนาด 5x5 ไมครอน

การวัดความสูงของอนุภาคนาโนทองจากภาพ AFM สองมิติขนาด 5x5 ไมครอน ใช้โปรแกรมของเครื่อง scanning probe microscope (SPM) บริษัท Metrohm จำกัด ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้อนุภาคนาโนทองจำนวน 50 อนุภาค แล้วแบ่งเป็นช่วงความถี่ความสูงของอนุภาคเพื่อคำนวณเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย

$$\text{ความสูงเฉลี่ย, เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย} = \frac{\text{ความถี่} \times \text{ค่ากึ่งกลางของชั้น}}{\text{จำนวนอนุภาคทั้งหมด}} \quad (4.1)$$

4.2.4 อิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของ ไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

สำหรับการเตรียมปริมาณเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส จะใช้ปริมาณเอนไซม์คงที่ตลอดการทดลองคือ 250 ยูนิท/ มิลลิลิตร สำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันระหว่างพอลิไพโรลและ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

ในการเตรียมไพโรลเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันระหว่างพอลิไพโรลและ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สามารถทำการเตรียมไพโรลมอนอเมอร์ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 และ 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส เป็นจำนวนรอบที่แตกต่างกันเป็นจำนวน 5, 10, 15, 20 และ 25 รอบตามลำดับ

โดยกำหนดการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันของ ไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ที่ความต่างศักย์ระหว่าง 0.0 ถึง 1.0 โวลท์ และใช้อัตราการสแกน (scan rate) 10 มิลลิโวลท์/วินาที (Razola และคณะ 2002) และเก็บอิเล็กโทรดใช้งานในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ก่อนนำไปทดสอบทางเคมีไฟฟ้า

4.2.5 การศึกษาสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง และอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

4.2.5.1 อนุภาคนาโนทอง

การศึกษาสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทองบนพื้นผิวของกาสสลิคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ทดสอบใน $K_4Fe(CN)_6$ 10 mM ละลายในตัวทำละลาย K_2SO_4 0.1 M ใช้ความต่างศักย์ระหว่าง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ และใช้อัตราการสแกน (scan rate) 50 มิลลิโวลต์/ วินาที ทำจากการวัดซ้ำ 3 ครั้งจากสารละลาย $K_4Fe(CN)_6$ 10 mM/ K_2SO_4 0.1 M ทำการเตรียมใหม่ทุกครั้ง คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

$$\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน} = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{N}} \quad (4.2)$$

$$\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad (4.3)$$

4.2.5.2 อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

การทดสอบสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร ทดสอบโดยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ซึ่งใช้ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ ทำจากการวัดซ้ำ 3 ครั้งจากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตรทำการเตรียมใหม่ทุกครั้ง คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

4.2.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง และอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนอิเล็กโทรดใช้งาน

ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง และอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดใช้งานโดยใช้เทคนิค scanning electron microscopy (SEM) เพื่อศึกษาพื้นผิวโดยใช้กำลังขยาย 40,000 เท่า และลักษณะพื้นผิวของอนุภาคนาโนทอง และอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดใช้งานด้วยเทคนิค atomic force microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง scanning probe microscope ยี่ห้อ Veeco, nanoscope รุ่น IV เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิว (morphology) ที่มีความเรียบมากโดยใช้พื้นผิวในการวิเคราะห์ขนาด 5x5 ไมครอน

4.2.7 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ (performance factor)

4.2.7.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)

ใช้ความเข้มข้นของฟีนอลระหว่าง 1×10^{-6} - 1×10^{-3} โมลต่อลิตร เพื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ของกราฟ calibration curve ความเข้มข้นของฟีนอล โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นคงที่ 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์

4.2.7.2 ความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity)

ความไวต่อการตอบสนองสามารถตรวจวัดจากความชันของการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณทางไฟฟ้า ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟีนอล (concentration) ในช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ของกราฟ calibration curve

4.2.7.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (detection limit)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้วิเคราะห์จาก $3s_b/m$ โดยที่ s_b คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของช่วงความเป็นเส้นตรง และ m คือความชันของค่าความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) ในช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ของกราฟ calibration curve

4.2.7.4 เวลาการตอบสนอง (response time)

เวลาการตอบสนอง (response time) โดยสามารถหาจากกระแสที่เริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุล (steady-state) โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์

4.2.7.5 การนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability)

การนำกลับมาใช้ใหม่เป็นการตรวจวัดซ้ำจากอิเล็กโทรดแห่งเดิมซึ่งอิเล็กโทรดแห่งเล็กสำหรับการวิเคราะห์ เมื่อนำไปวัดซ้ำเป็นจำนวน 10 ครั้งซึ่งใช้สารละลายใหม่ทุกครั้งโดยใช้โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ 4.3

4.2.7.6 การผลิตซ้ำ (reproducibility)

การผลิตซ้ำเป็นการทำอิเล็กโทรดแบบเดียวกันขึ้นมาใหม่ตามกระบวนการเดิมที่ได้ทำการผลิต โดยทำการผลิตซ้ำกันจำนวน 5 ครั้งซึ่งใช้สารละลายใหม่ทุกครั้ง โดยใช้อิเล็กโทรดแห่งเล็กสำหรับการวิเคราะห์ครั้ง และใช้โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ และ คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ 4.3

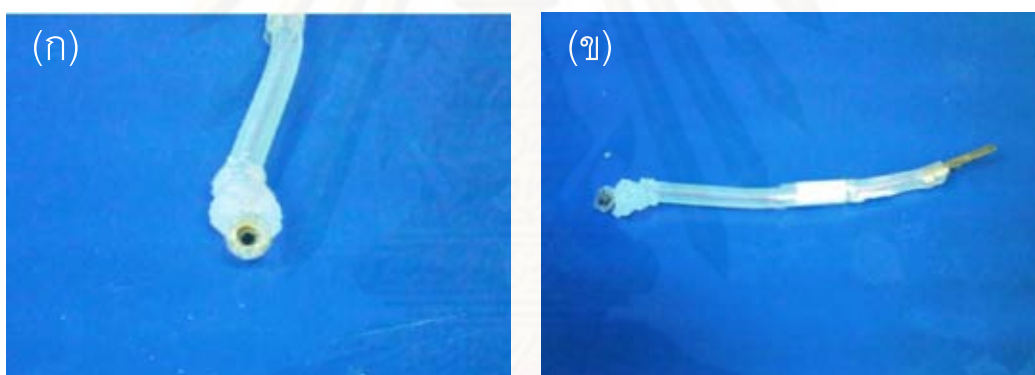
4.2.7.7 การจัดเก็บ (storage stability)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้ที่มีการเสื่อมสภาพไปตามระยะเวลาในการใช้ไบโอเซนเซอร์ และระยะเวลาการจัดเก็บสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้บนอิเล็กโทรด โดยจัดเก็บอิเล็กโทรดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยทำการทดสอบทางเคมีไฟฟ้าโดยใช้โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ เมื่อจัดเก็บไว้เป็นเวลา 3, 5, 10, 15 และ 30 วัน

4.2.8 การทำอิเล็กโทรดแห่งเล็ก

4.2.8.1 การเชื่อมต่อกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดแห่งเล็ก

การทำอิเล็กโทรดแห่งเล็กเป็นการดัดแปลงกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดจากแห่งใหญ่เพื่อให้สามารถทำการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยเครื่อง SEM และ AFM โดยสามารถทำได้โดยนำแห่งกลาสคาร์บอนตัดเป็นแห่งเล็กๆ ความยาว 0.5 มิลลิเมตร ทำการหล่อเรซิน รอบๆ พื้นผิวด้านข้างของอิเล็กโทรดทั้งหมดกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบจากพื้นผิวการนำไฟฟ้าด้านข้างของอิเล็กโทรด จากนั้นกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดขนาดเล็กจะถูกเชื่อมต่อกับสายไฟที่หุ้มด้วยสายยางพลาสติกไว้รอบนอกและปิดรอยต่อด้วยกาวซิลิโคน และนำไปเชื่อมต่อกับแผ่นโลหะเพื่อเป็นที่จับของปากจระเข้สำหรับใช้เป็นที่เชื่อมต่อกับเครื่องโพเทนชิออสแตท ตามรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดแห่งเล็กที่ทำการเชื่อมต่อกับสายไฟ

4.2.8.2 การทดสอบอิเล็กโทรดแห่งเล็ก

การทดสอบกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดแห่งเล็กสามารถทำการทดสอบด้วยเทคนิค cyclic voltammetry ที่อัตราการสแกน (scan rate) ต่างๆ เพื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด (peak current) กับอัตราการสแกน (scan rate) ยกกำลัง 0.5 โดยความสัมพันธ์ที่ได้ต้องมีลักษณะเป็นแบบเชิงเส้น โดยจากการทดสอบที่อัตราการสแกน 20, 50, 80, 100 และ 150 มิลลิโวลต์ต่อวินาที และต้องมีค่าความสัมพันธ์ R^2 มีค่าไม่น้อยกว่า 0.99 แสดงว่ากลาสคาร์บอนแห่งนั้นมีคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าที่ดี และสามารถนำอิเล็กโทรดแห่งนั้นมาใช้ในการทดลอง

บทที่ 5

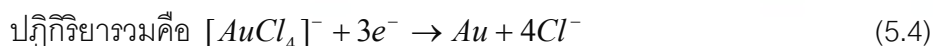
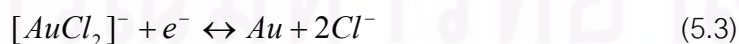
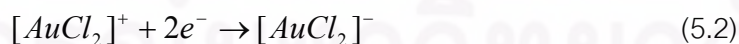
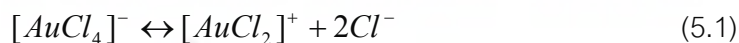
ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง

การศึกษากการดัดแปลงอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์โรลเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดฟีนอล สามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน โดยในส่วนแรกศึกษากลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง และวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM) และ atomic force microscopy (AFM) ร่วมกับทดสอบด้วยเทคนิค cyclic voltammetry เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปลงอิเล็กโทรด โดยข้อมูลที่ได้นี้จะนำไปศึกษาต่อในส่วนที่สองคือ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส/ พอลิไพร์โรล ซึ่งศึกษาปัจจัยจากความเข้มข้นของพอลิไพร์โรล จำนวนรอบของการสังเคราะห์ และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์

5.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิคเคมีไฟฟ้าบนพื้นผิวของอิเล็กโทรด

5.1.1 การศึกษากลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ในการศึกษากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนอิเล็กโทรดใช้งาน เมื่อศึกษาหน้าที่ของสารเคมีที่นำมาใช้สำหรับการทดลองซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) จะเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน (supporting electrolyte) จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการทำให้ไอออนของทองมีการเคลื่อนที่ในสารละลายได้ ส่วนในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่มีค่า -0.2 โวลต์ จะใช้ศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าเพียงพอสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชัน และเหนี่ยวนำไอออนของทองมาที่อิเล็กโทรด (Orozso และคณะ 2009) ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองจะเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของคลอโรออเรตไอออน ($AuCl_4^-$) ซึ่งมีการแตกตัวของโมเลกุลเชิงซ้อนตามสมการดังนี้ (Komsijska และคณะ 2008)



โดยคลอโรอโรอเตรอไอออน (AuCl_4^-) ซึ่งมีการแตกตัวของโมเลกุลเชิงซ้อนเป็น AuCl_2^+ ตามสมการที่ 5.1 และจะรับอิเล็กตรอนจากกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด (สมการที่ 5.2) เกิดเป็นอะตอมของแข็งขึ้นมาก่อน (nucleation) ตามสมการที่ 5.3 ซึ่งมีสมการรวม (overall deposition reaction) เมื่อมีการเปลี่ยนสถานะจากไอออนในสารละลายไปเป็นของแข็งเกิดขึ้นโดยมีการให้กำเนิดนิวเคลียสที่เป็นของแข็งขึ้นมาก่อนจากกลุ่มอะตอมโลหะที่ได้ถ่ายเทพลังงานจำนวนหนึ่งออกไปจากนั้นจะเกิดเป็นกลุ่มของอนุภาคทองโดยการรวมตัว (aggregate) ขึ้น และเมื่อกลุ่มอะตอมอื่นๆ ที่ถ่ายเทพลังงานออกไปแล้วได้จับตัวกับนิวเคลียสทำให้มีการขยายขนาด (growth) เพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาและจะเพิ่มขนาดขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า จนเกิดเป็นผลึกต่อไป

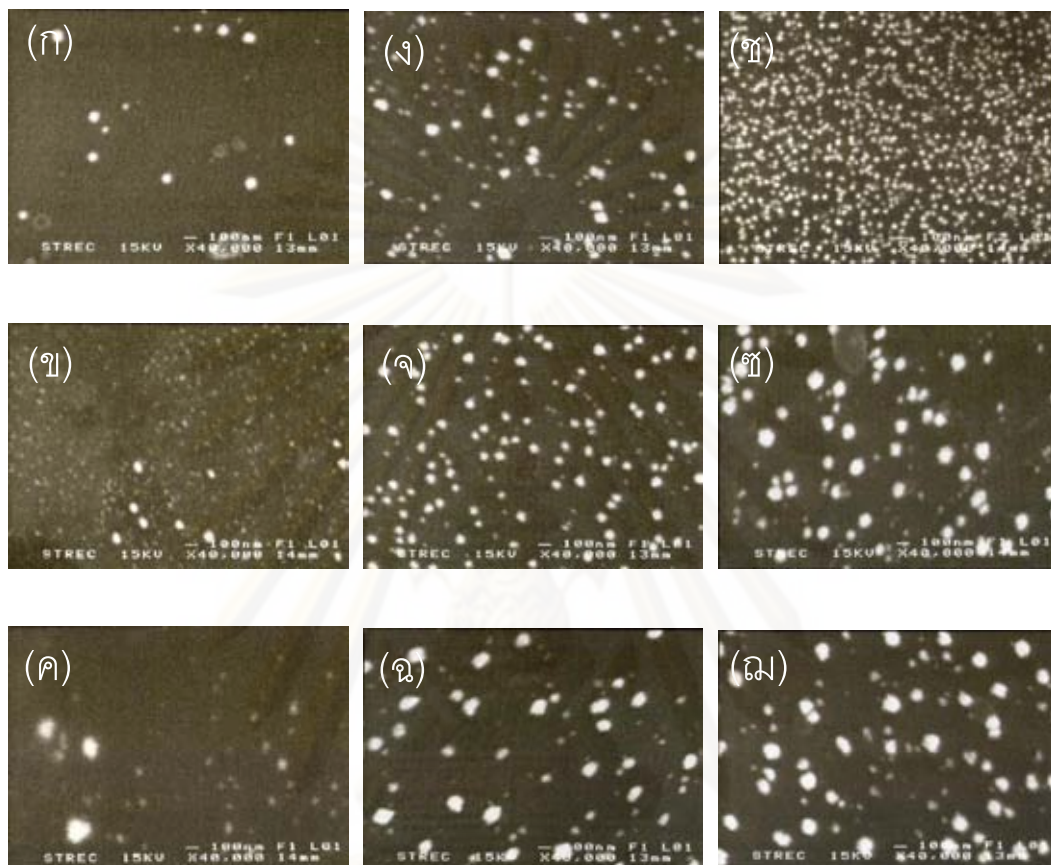
5.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง

ในการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM) ใช้สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคและลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง โดยการวัดสัญญาณอิเล็กตรอนทุติยภูมิที่หลุดจากผิวตัวอย่างจากการชนของอิเล็กตรอนปฐมภูมิภายใต้สภาวะสุญญากาศ การศึกษาพื้นผิวของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ถูกปลูกด้วยอนุภาคนาโนทองด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า (electrodeposition) ซึ่งใช้สารละลายที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน เตตระคลอโรอเตรอ ไตรไฮโดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ (Lui และคณะ 2005; Huang และคณะ 2007; Lui และคณะ 2007) และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 0-60 วินาที ตามลำดับ จากรูปที่ 5.1 เป็นรูป SEM อนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าเมื่อทำการให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเพียง 5 วินาที ตามรูป 5.1ก สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองเกิดขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai และคณะ (2004) และ Dai และคณะ (2006) และเมื่อนำเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าทั้ง 3 เวลา มาเปรียบเทียบสามารถเห็นความแตกต่างกันของอนุภาคนาโนทองบนพื้นผิวกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยที่เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 5 วินาที (รูป 5.1ก) จะมีขนาดและจำนวนอนุภาคนาโนทองบนพื้นผิวกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดน้อยกว่าที่เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 30 (รูป 5.1ข) และ 60 วินาที (รูป 5.1ค) จะเห็นได้ว่าที่เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า 30 วินาที (รูป 5.1ข) นั้นจะมีอนุภาคนาโนทองเกิดขึ้นจำนวนมากบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดซึ่งเกิดจากการเกิดเป็นอะตอมของแข็ง (nucleation) ขึ้นมาและจะเกิดเป็นกลุ่มของอนุภาคทองโดยการรวมตัว

(aggregate) ขึ้น ในขณะที่การให้ศักย์ไฟฟ้าที่เวลา 60 วินาที (รูป 5.1ค) มีการขยายขนาด (growth) เพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาและจะเพิ่มขนาดขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า

เมื่อเพิ่มความเข้มข้น AuCl_4^- เป็น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร จะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคนาโนทอง มีขนาดใหญ่ขึ้นมากกว่าที่ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร เมื่อใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.1ง 5.1จ และ 5.1ฉ ตามลำดับ ในส่วนของจำนวนอนุภาคจะมีจำนวนน้อยลงตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่มากขึ้น เนื่องจากเกิดเป็นกลุ่มของอนุภาคทองโดยการรวมตัว (aggregate) ขึ้น และมีการขยายขนาด (growth) เพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาและจะเพิ่มขนาดขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า และมีแนวโน้มเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้น AuCl_4^- 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.1ซ 5.1ช และ 5.1ฉ ตามลำดับ

ดังนั้นจากการศึกษาถึงแนวโน้มสามารถกล่าวได้ว่า ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร) เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่เวลาในการให้ศักย์ที่ต่างกัน พบว่าขนาดและจำนวนอนุภาคจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่นานขึ้นจะทำให้มีปริมาณอิออนของทองมาเกาะบนอิเล็กโทรดเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นสูงๆ (AuCl_4^- 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร) จะมีขนาดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นตามความเข้มข้นและมีแนวโน้มของจำนวนอนุภาคที่น้อยลง ซึ่งเกิดจากกลุ่มของอนุภาคทองโดยการรวมตัว (aggregate) ขึ้น และมีการขยายขนาด (growth) รวมตัวของอนุภาคทองทำให้มีขนาดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ และเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้น พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นขนาดของอนุภาคทองที่เกิดขึ้นมีขนาดที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของทอง จะทำให้ระยะห่างระหว่างอิออนของทองใกล้ชิดกันมากขึ้น และมีผลทำให้การรวมตัว (aggregate) เป็นอนุภาคทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น และมีการขยายขนาด (growth) เพิ่มขึ้น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Dai และคณะ (2004) ที่ปลูกอนุภาคทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดและ Dai และคณะ (2006) ปลูกอนุภาคนาโนทองบนอินเดียมทินออกไซด์อิเล็กโทรด คือเมื่อความเข้มข้นเดียวกันแต่ใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้มีขนาดอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจะทำให้อนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้นมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นเช่นเดียวกัน



รูปที่ 5.1 ภาพ SEM ของอนุภาคนาโนทงบนกระจกสลิคาร์บอนิเลคโทรด มิลลิเมตรต่อลิตร และให้ศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ ด้วยความเข้มข้น AuCl_4^- และเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าแตกต่างกัน (ก) AuCl_4^- 0.1mM/ 5 วินาที (ข) AuCl_4^- 0.1 mM/ 30 วินาที (ค) AuCl_4^- 0.1 mM / 60 วินาที (ง) AuCl_4^- 0.5 mM/ 5 วินาที (จ) AuCl_4^- 0.5 mM/ 30 วินาที (ฉ) AuCl_4^- 0.5 mM/ 60 วินาที (ช) AuCl_4^- 1.0 mM/ 5 วินาที (ฌ) AuCl_4^- 1.0 mM/ 30 วินาที (ฉ) AuCl_4^- 1.0 mM/ 60 วินาที ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

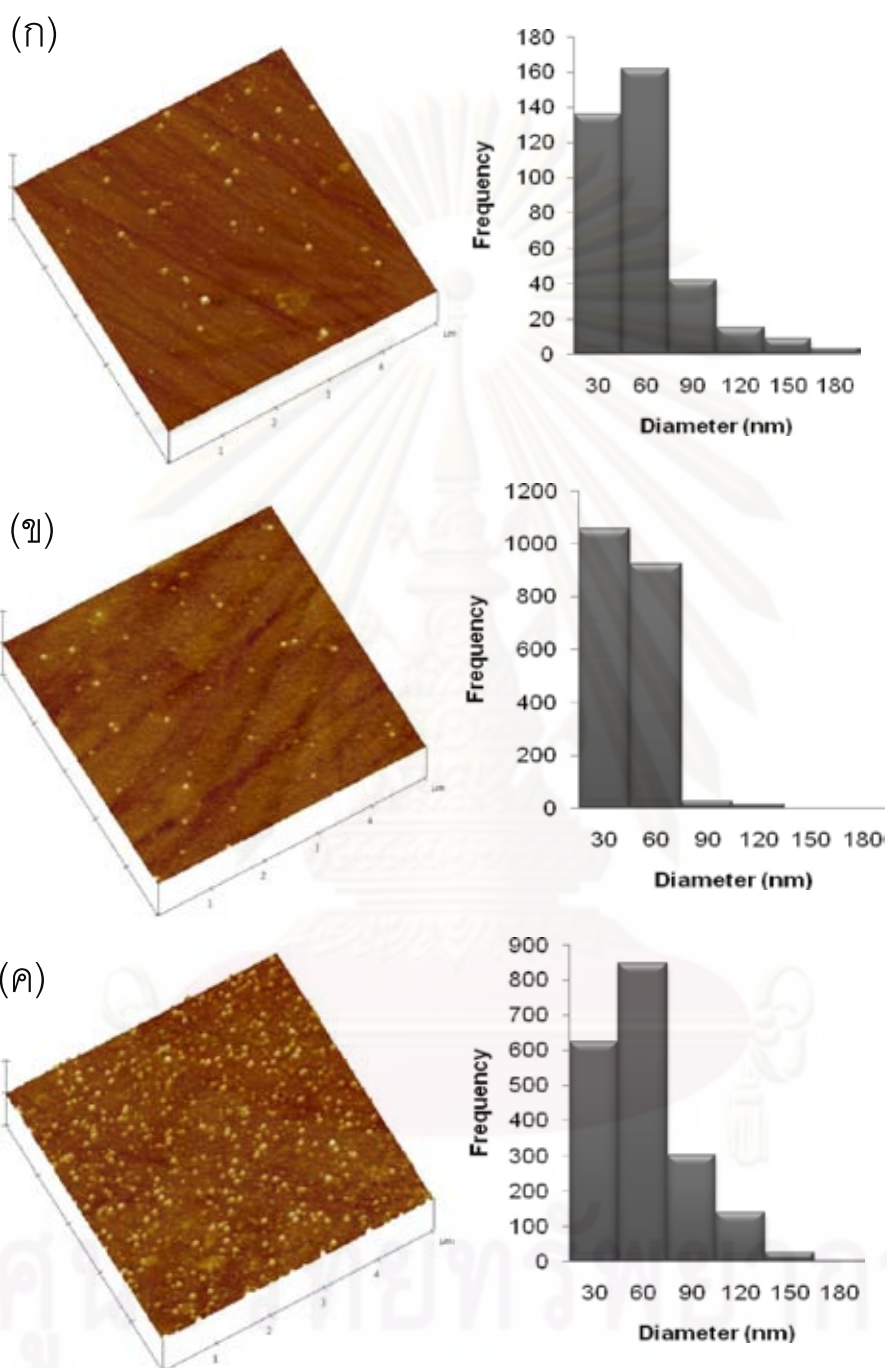
เมื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองบนพื้นผิวของกลาสคาร์บอน อิเล็กโทรดด้วยเทคนิค atomic force microscopy (AFM) ซึ่งมีความแตกต่างจากเทคนิค SEM คือ จะใช้โพรบวัดสแกนไปบนพื้นผิวของตัวอย่าง โดยจะมีแสงเลเซอร์ที่ตกกระทบกับฉากของโพรบวัด แล้วสะท้อนเข้าสู่ตัววัด (detector) ซึ่งจะแปรผลแสดงเป็นภาพพื้นผิวตามการเปลี่ยนแปลงระดับของโพรบวัดที่เคลื่อนที่ผ่านพื้นผิว พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพของอนุภาคนาโนทองด้วยเทคนิค SEM จากรูปที่ 5.2 เป็นภาพ AFM ของอนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.2ก, 5.2ข และ 5.2ค ตามลำดับ จะมีอนุภาคนาโนทองกระจายตัวบนพื้นผิวกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด มีขนาดใหญ่ขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า (วิธีการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง ความสูงและจำนวนอนุภาคตามหัวข้อ 4.2.3) โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 43.27, 30.35 และ 45.86 นาโนเมตร ความสูงของอนุภาคนาโนทองเฉลี่ย 33.54 20.54 และ 52.50 นาโนเมตร และมีจำนวนอนุภาคนาโนทองเฉลี่ย 1.47×10^9 , 8.06×10^9 และ 7.74×10^9 อนุภาค/ cm^2 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.3ก, 5.3ข และ 5.3ค ตามลำดับ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 30.22, 56.22 และ 62.24 นาโนเมตร ความสูงของอนุภาคนาโนทองเฉลี่ย 31.19, 33.27 และ 63.70 นาโนเมตร และมีจำนวนอนุภาคนาโนทองเฉลี่ย 5.56×10^9 , 4.05×10^9 และ 2.97×10^9 อนุภาค/ cm^2 ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้น AuCl_4^- 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.4ก, 5.4ข และ 5.4ค ตามลำดับ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 37.41, 69.69 และ 101.35 นาโนเมตร ความสูงของอนุภาคนาโนทองเฉลี่ย 22.71, 50.90 และ 64.90 นาโนเมตร และมีจำนวนอนุภาคนาโนทองเฉลี่ย 1.42×10^{10} , 4.84×10^9 และ 2.06×10^9 อนุภาค/ cm^2 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสามารถสรุปถึงแนวโน้มของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองได้คือ เมื่อเพิ่มเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเพิ่มขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AuCl_4^- จะทำให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ

ในส่วนของจำนวนอนุภาคนาโนทอง โดยใช้ที่ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าจะมีความแตกต่างกันไปตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ให้ศักย์ไฟฟ้า ซึ่งที่ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ให้ศักย์ไฟฟ้า ทั้งนี้เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำอิออนแต่ละอิออนของทองอยู่ในระยะที่ห่างกันทำให้อิออนเกิดการ

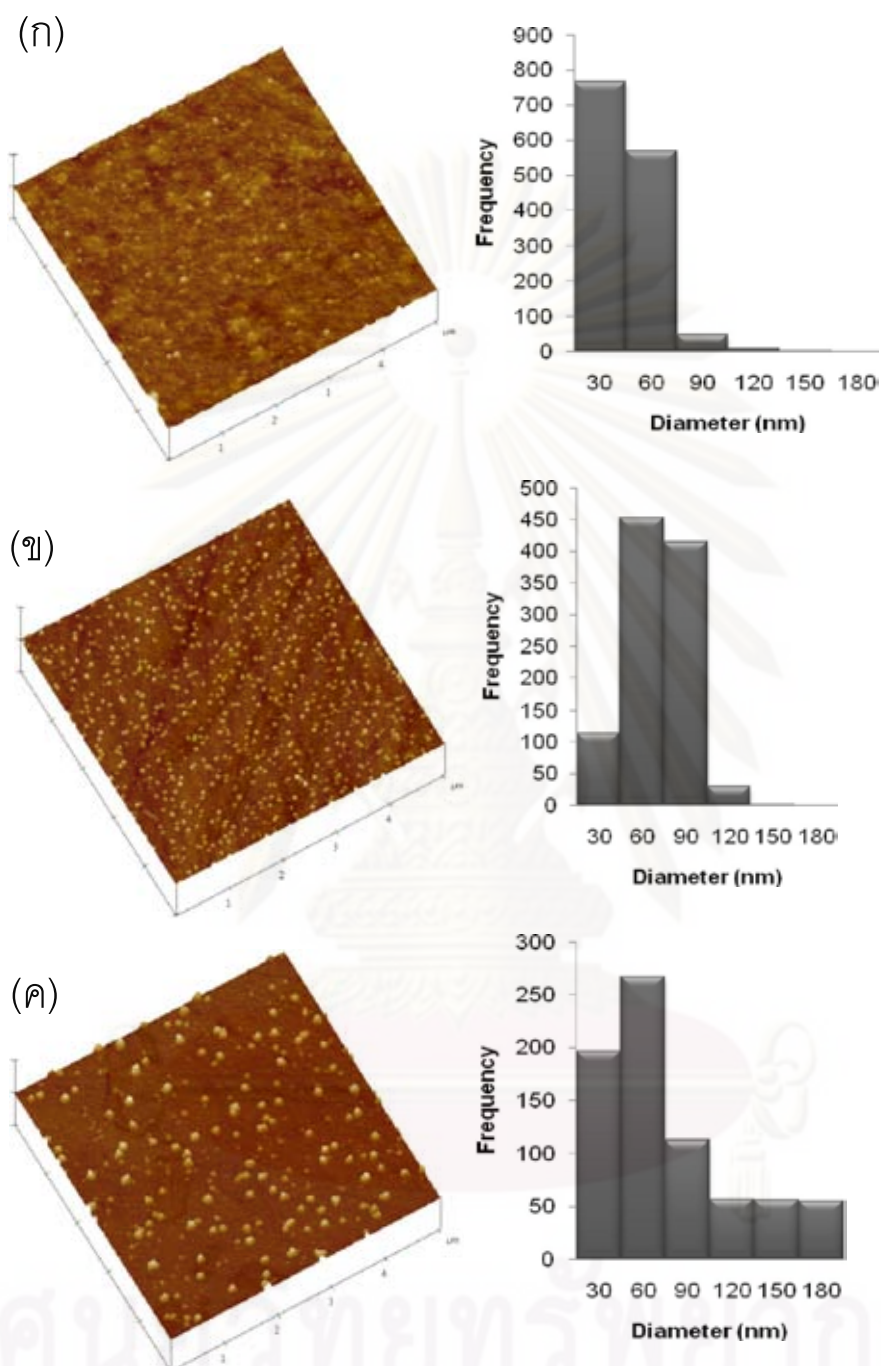
อนุภาคเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และเพิ่มความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร จะทำให้อิออนแต่ไอออนของทองอยู่กันอย่างใกล้ชิดกันมากขึ้น ทำให้ได้จำนวนอนุภาคที่เกิดขึ้นสามารถเกิดการรวมกันอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้มีจำนวนอนุภาคนาโนทองน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AuCl_4^- เป็น 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีจำนวนอนุภาคทองที่เกิดขึ้นน้อยลง แต่จะมีขนาดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเช่นเดียวกัน นอกจากนี้อาจมีจำนวนของอนุภาคจำนวนมากเกิดขึ้นหากมีเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่น้อยหรืออาจไม่เพียงพอต่อการรวมตัวกันของอนุภาค อย่างไรก็ตามจำนวนอนุภาคอาจมีจำนวนมากขึ้นแตกต่างกัน หากอนุภาคนาโนทองมีจำนวนน้อยจะแสดงผลในส่วนของคุณภาพอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคมากขึ้นตามเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า คือเมื่อใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าน้อย ขนาดของอนุภาคจะมีการกระจายตัวอยู่ในช่วงแคบๆ และหากเพิ่มเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น อนุภาคที่เกิดขึ้นจะมีการกระจายตัวอยู่ในช่วงที่กว้างมากขึ้นตามลำดับ และให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ขนาดของอนุภาคทองที่มีขนาดแตกต่างกันมากขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า โดยสามารถสรุปผลเป็นตาราง 5.1 ดังนี้

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย จำนวนอนุภาคนาโนทองและพื้นที่ผิว ที่ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1, 0.5 และ 1.0 โมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า 5, 30 และ 60 วินาที ตามลำดับ

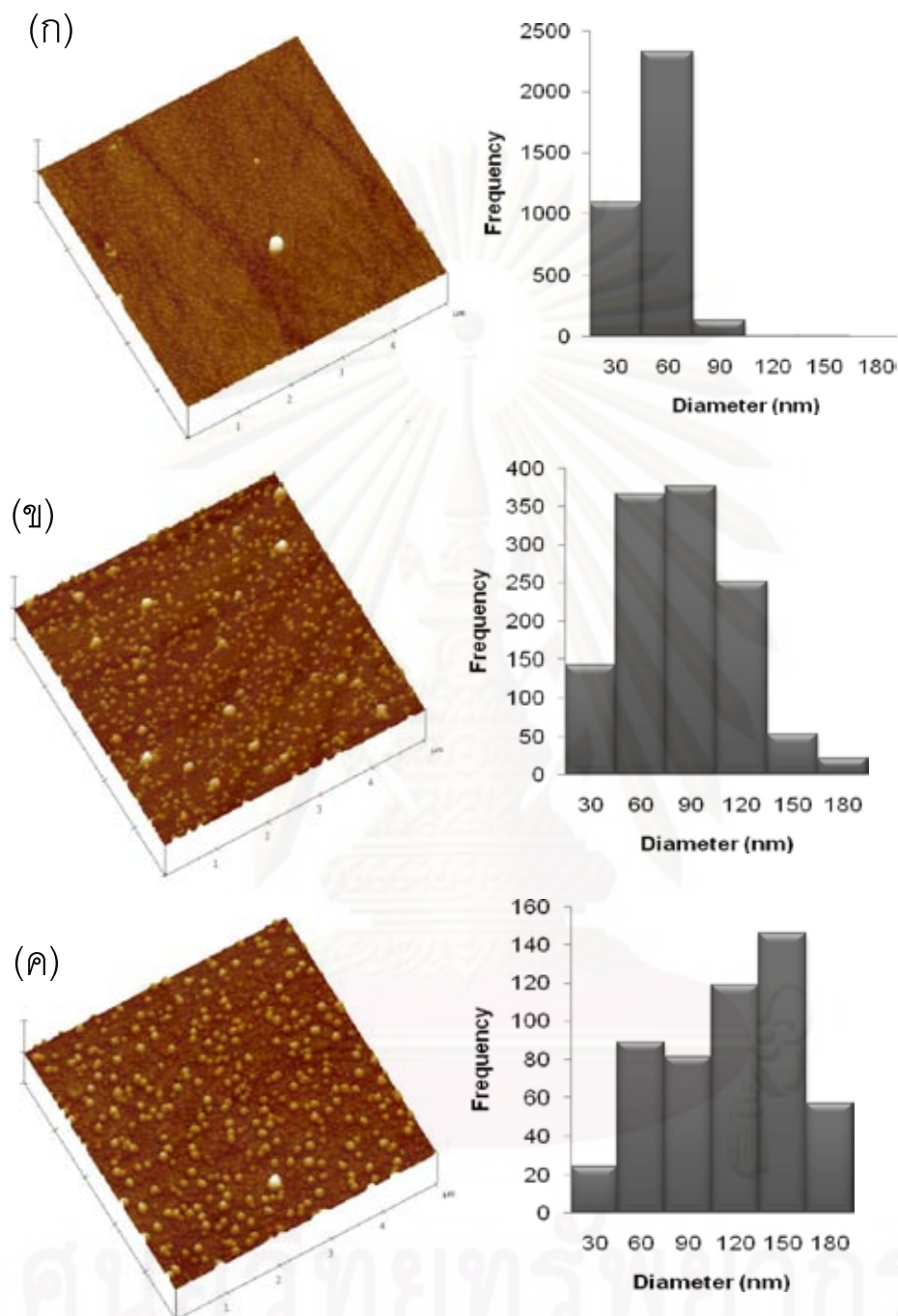
เวลา (วินาที)	ความเข้มข้น AuCl_4^-								
	0.1 มิลลิโมลต่อลิตร			0.5 มิลลิโมลต่อลิตร			1.0 มิลลิโมลต่อลิตร		
	เส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย (นาโนเมตร)	จำนวนอนุภาค อนุภาค/ cm^2	Surface area (um^2)	เส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย (นาโนเมตร)	จำนวนอนุภาค อนุภาค/ cm^2	Surface area (um^2)	เส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย (นาโนเมตร)	Surface area (um^2)	Surface area (um^2)
5	43.27	1.47×10^9	26.099	30.22	5.56×10^9	27.397	37.41	1.42×10^{10}	28.422
30	30.35	8.06×10^9	25.832	56.22	4.05×10^9	27.447	69.69	4.84×10^9	30.993
60	45.86	7.74×10^9	29.922	62.24	2.97×10^9	28.840	101.35	2.06×10^9	28.858



รูปที่ 5.2 ภาพ AFM และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.1 โมลต่อลิตร ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.2ก, 5.2ข และ 5.2ค ตามลำดับ



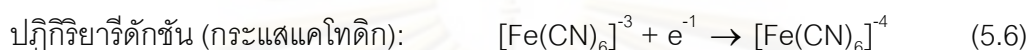
รูปที่ 5.3 ภาพ AFM และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดย ใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.1 โมลต่อลิตร ทำ การให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5 30 และ 60 วินาที ตาม รูปที่ 5.3ก, 5.3ข และ 5.3ค ตามลำดับ



รูปที่ 5.4 ภาพ AFM และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.1 โมลต่อลิตร ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5 30 และ 60 วินาที ตามรูปที่ 5.4ก, 5.4ข และ 5.5ค ตามลำดับ

5.1.3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง

การศึกษาสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทองบนพื้นผิวของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ทดสอบในสารละลาย 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ / 0.1 M K_2SO_4 ความต่างศักย์ระหว่าง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ และที่ใช้อัตราการสแกน (scan rate) 50 มิลลิโวลต์/วินาที พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ดังนี้



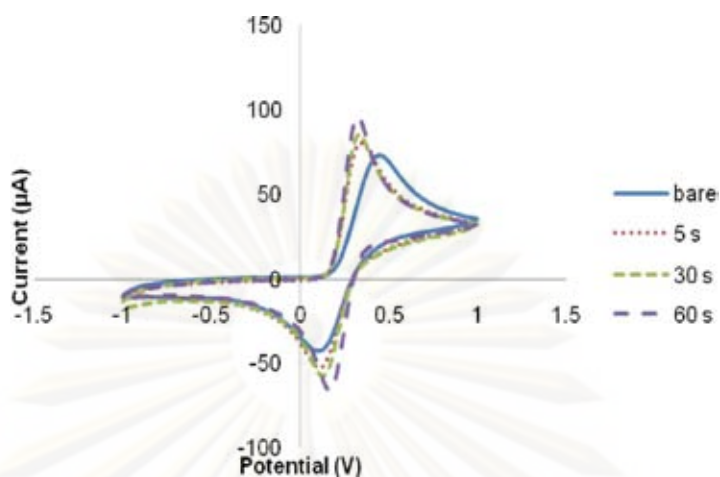
จากรูปที่ 5.5ก แสดง cyclic voltammetry ของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ถูกดัดแปลงด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยความเข้มข้น $AuCl_4^-$ 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดธรรมดา (bare) พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ขึ้น เมื่อเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อปลูกอนุภาคนาโนทองเพิ่มขึ้นทำให้มีกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที anodic peak current หรือ oxidation current (i_{pa}) มีค่า 65.06, 85.05 และ 95.61 ไมโครแอมแปร์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที cathodic peak current หรือ reduction current (i_{pc}) มีค่า -42.10, -57.25 และ -66.25 ไมโครแอมแปร์ ตามลำดับ เนื่องจากอนุภาคนาโนทองจะสามารถเพิ่มพื้นที่ผิว (surface area) ทำให้อิเล็กโทรดมีพื้นที่ผิวสำหรับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้สูงขึ้น กระแสไฟฟ้าที่ไหลระหว่างขั้วไฟฟ้าจึงสูงขึ้น (Dai และคณะ 2004; Lui และคณะ 2005; Liu และคณะ 2007) สอดคล้องกับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพด้วยเทคนิค SEM และ AFM ในหัวข้อ 5.1.2 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น $AuCl_4^-$ เป็น 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามลำดับ จากรูปที่ 5.5ข กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่าเท่ากันทั้ง 3 เวลา คือ anodic peak current หรือ oxidation current (i_{pa}) มีค่าประมาณ 105.50 ไมโครแอมแปร์ และ cathodic peak current หรือ reduction current (i_{pc}) มีค่าประมาณ -80.38 ไมโครแอมแปร์ นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้น $AuCl_4^-$ เป็น 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ตามลำดับ จากรูปที่ 5.5ค กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่าเท่ากันทั้ง 3 เวลาเช่นกัน และมีค่าใกล้เคียงกันเมื่อใช้ความเข้มข้น $AuCl_4^-$ 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร คือ anodic peak current หรือ oxidation current (i_{pa}) มีค่าประมาณ 103.40 ไมโครแอมแปร์ และ cathodic peak current หรือ reduction current (i_{pc}) มีค่าประมาณ -80.32 ไมโครแอมแปร์

ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้นที่ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของ AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีค่าใกล้เคียงเช่นกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจมีปริมาณความเข้มข้นที่มีค่ามากเกินไป มีค่าสัญญาณทางไฟฟ้าใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงถึงการมีพื้นที่ผิว (surface area) ที่ใกล้เคียงกันซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 5.1 ที่ความเข้มข้นของ AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของ surface area คือ 27.90 ตารางไมโครเมตร และที่ความเข้มข้นของ AuCl_4^- 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของ surface area คือ 29.42 ตารางไมโครเมตร ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบทางเคมีไฟฟ้ามีค่าใกล้เคียงกัน ในส่วนของการศึกษาเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า (deposition time) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อขนาดของอนุภาคที่เกิดขึ้น จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของทอง 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5, 30 และ 60 วินาที ซึ่งจะมีค่ากระแสไฟฟ้าใกล้เคียงกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Dai และคณะ 2004 เป็นการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนกลาสสคาร์บอนอิเล็กโทรด เมื่อทำการให้ศักย์ไฟฟ้าแบบ step potential พบว่าการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 15 วินาที เป็นเวลาที่เหมาะสม เนื่องจากเมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที จะเริ่มเกิดเป็นฟิล์มของทองเกิดขึ้นบนพื้นผิวกลาสสคาร์บอนอิเล็กโทรด นอกจากนี้พบว่าเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 15 หรือ 30 วินาที มีค่ากระแสไฟฟ้าไม่แตกต่างกัน (Dai และคณะ 2004) ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้คือ เลือกใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 30 วินาที เนื่องจากเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที เป็นเวลาที่มีค่ามากเกินไปต่อการให้ศักย์ไฟฟ้า และเวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5 วินาที อาจมีการฟอร์มตัวของอนุภาคที่ไม่แม่นยำในการทำแต่ละครั้งและยากต่อการควบคุม ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ให้กระแสไฟฟ้าคือ ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 30 วินาที

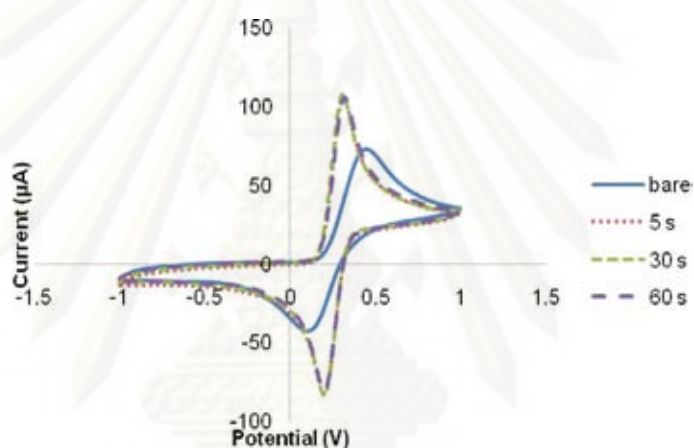
ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำผลการทดลองการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองเปรียบเทียบกับการศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของอนุภาคโลหะจากงานวิจัยต่างๆ พบว่าคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าที่สำคัญของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์คือ มีสัญญาณทางไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็น sigmodal เมื่อทำการทดลองด้วยเทคนิค cyclic voltammetry ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติของ ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาและเข้าสู่สภาวะสมดุลได้อย่างรวดเร็วทำให้ไม่มีลักษณะกระแสสูงสุดเกิดขึ้น (peak current) หากนำมาเปรียบเทียบกับการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองบนกลาสคาร์บอนครั้งนี้จะมีลักษณะเป็นแมคโครอิเล็กโทรด เนื่องจากเมื่อทำการทดลองด้วยเทคนิค cyclic voltammetry จะมีลักษณะของ peak current ทั้งนี้เนื่องจากพื้นผิวอิเล็กโทรดที่ใช้คือกลาสคาร์บอนซึ่งสามารถนำไฟฟ้าได้ทั่วพื้นผิวอิเล็กโทรดอยู่แล้วเช่นเดียวกัน และเมื่อทำการปลูกอนุภาคทองบนกลาสคาร์บอนจะมีผลทำให้มีค่ากระแสไฟฟ้ามีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นเพียงแค่การดัดแปลงอิเล็กโทรดเพื่อเพิ่มกระแสไฟฟ้าให้ดีขึ้นเท่านั้นจึงไม่แสดงคุณสมบัติของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์

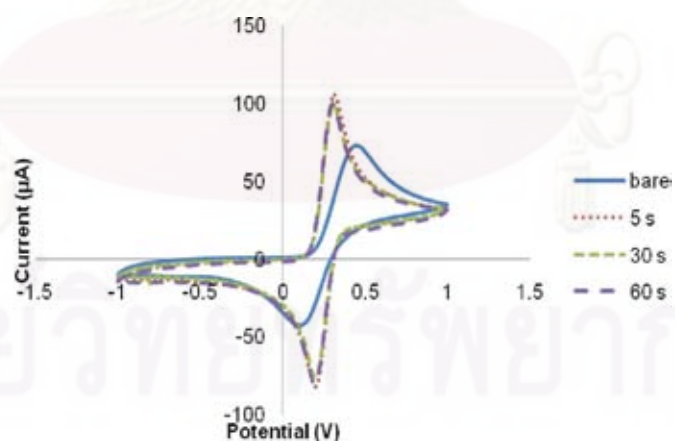
(ก)



(ข)



(ค)



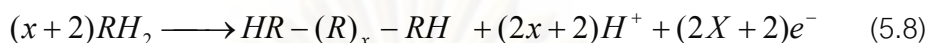
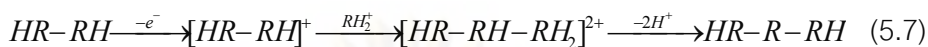
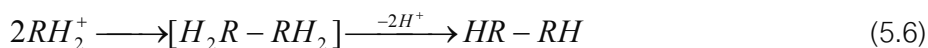
รูปที่ 5.5 Cyclic voltammetry ของกลาสส์คาร์บอนอิเล็กโทรดที่ถูกดัดแปลงด้วยอนุภาคนาโนทอง โดยใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลต่อลิตร การให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลท์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5 30 และ 60 วินาที ตามรูป 5.5ก, 5.5ข และ 5.5ค ตามลำดับ

5.2 สภาวะที่เหมาะสมการตรึงเอนไซม์ฮอรัสแรดิซเปอร์ออกซิเดส (HRP)/ พอลิไพร์อล

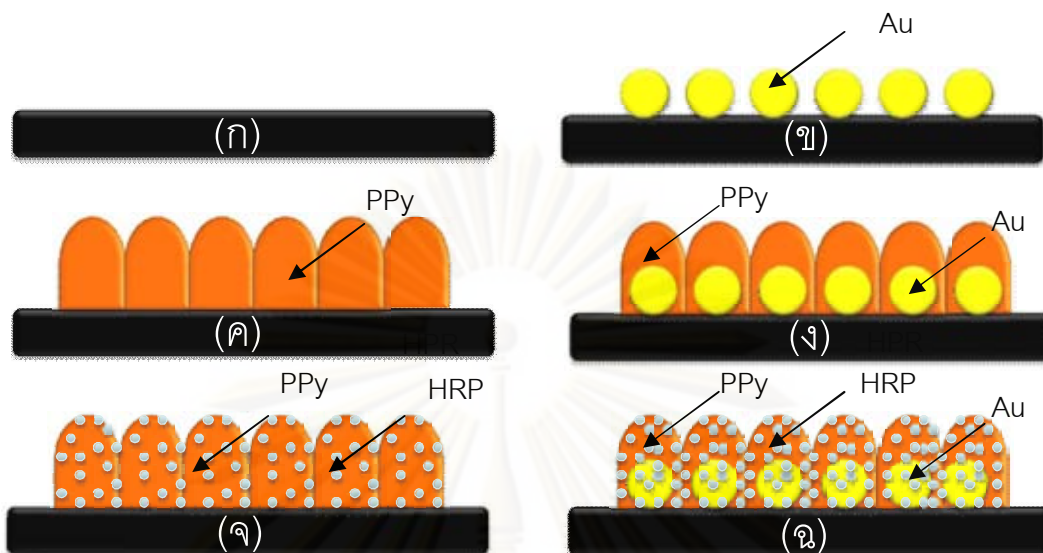
จากการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพพื้นผิวของอิเล็กโทรดด้วยอนุภาคนาโนทองในหัวข้อ 5.1 อนุภาคนาโนทองที่เหมาะสมและให้กระแสไฟฟ้าที่ดี ใช้เวลาน้อยในการสังเคราะห์ ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรด คือ ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลท์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า 30 วินาที ตลอดทุกๆ ครั้งก่อนขึ้นตอนอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชันระหว่างพอลิไพร์อล/ เอนไซม์ฮอรัสแรดิซเปอร์ออกซิเดส

พอลิไพร์อลเป็นพอลิเมอร์ชนิดนำไฟฟ้าที่ได้รับความนิยมสำหรับการตรึงเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากมอนอเมอร์ของไพร์อลสามารถละลายน้ำ (water solubility) หรือสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (supporting electrolyte) ได้ดีจึงทำให้สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายในกระบวนการอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชัน (Tian และคณะ 2001; Li และคณะ 2007) นอกจากนี้สามารถเข้ากันได้กับเอนไซม์ตลอดจนสารชีวภาพต่างๆ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ศึกษาตัวแปรเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ 2 ตัวแปรคือ ความเข้มข้นของพอลิไพร์อลและจำนวนรอบหรือเวลาของการตรึงเอนไซม์ฮอรัสแรดิซเปอร์ออกซิเดส และพอลิไพร์อลด้วยวิธีอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชัน เนื่องจากความเข้มข้นของไพร์อลมีผลต่อความสามารถที่จะกักเก็บเอนไซม์ และจำนวนรอบของการตรึงเอนไซม์พร้อมกับพอลิไพร์อลจะมีผลต่อความหนาของชั้นฟิล์มที่เกิดขึ้น ตลอดจนอนุภาคนาโนทองที่ได้ทำการสังเคราะห์บนพื้นผิวอิเล็กโทรดเพื่อเพิ่มสัญญาณทางไฟฟ้า

กระบวนการอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพร์อลจะมีลักษณะเช่นเดียวกับการอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าต่างๆ สามารถแสดงกระบวนการได้ตามสมการ 5.5-5.8 คือ มอนอเมอร์ของไพร์อลจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็น RH_2^+ (radical cation) ที่บริเวณพื้นผิวของอิเล็กโทรดตามสมการที่ 5.5 จากนั้น RH_2^+ ที่มีอยู่จะรวมตัวและเกิดการสูญเสียโปรตอนกลายเป็นไดเมอร์ของไพร์อลดังสมการที่ 5.6 ต่อมาจะเกิดการฟอร์มตัวกันเป็นไตรเมอร์ตามสมการที่ 5.7 และจะมีการฟอร์มต่อไปเรื่อยๆ กลายเป็นพอลิไพร์อลเคลือบบนพื้นผิวอิเล็กโทรดซึ่งมีสมการรวมของการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชัน (overall electropolymerization) ดังสมการที่ 5.8 (Waltman และคณะ 1986) สำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการกักเก็บ (entrapment) ในพอลิไพร์อลด้วยวิธีอิเล็กโทรดพอลิเมอร์ไรเซชันสามารถใช้วิธีการเดียวกันนี้สำหรับตรึงเอนไซม์เช่นกัน คือ เอนไซม์จะมีการแทรกตัวพร้อมกับมอนอเมอร์ของไพร์อล



ในการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถของการทำปฏิกิริยาเคมีของอนุภาคนาโนทอง พอลิไพร์รอล เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส โดยศึกษาการเปรียบเทียบการดัดแปลงอิเล็กโทรด 6 ชนิด คือ กลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด (bare) อนุภาคนาโนทอง (Gold) พอลิไพร์รอล (PPy) อนุภาคนาโนทอง/พอลิไพร์รอล (Gold/PPy) พอลิไพร์รอล/เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (PPy/HRP) และอนุภาคนาโนทอง/พอลิไพร์รอล/เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (Gold/PPy/HRP) ตามรูปที่ 5.6ก, 5.6ข, 5.6ค, 5.6ง, 5.6จ และ 5.6ฉ ตามลำดับ โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดตามหัวข้อ 5.1 ในส่วนของการสังเคราะห์พอลิไพร์รอลจะใช้ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ใช้ปริมาณเอนไซม์คงที่ทุกการทดลอง 250 ยูนิต/มิลลิลิตร ใช้เทคนิค cyclic voltammetry ในการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันไพร์รอล และไพร์รอล/เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ในช่วงความต่างศักย์ 0.0 - 1.0 โวลต์ และอัตราการสแกน (scan rate) 10 มิลลิโวลต์/วินาทีจำนวน 15 รอบ ตามรูปที่ 5.6



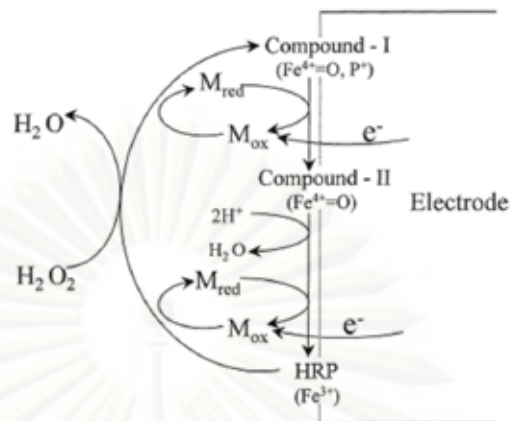
รูปที่ 5.6 แสดงภาพการเปรียบเทียบการดัดแปลงอิเล็กโทรดชนิดต่างๆ (ก) กลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรด (bare) (ข) อนุภาคนาโนทอง (Gold) (ค) พอลิไพร์โรล (PPy) (ง) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์โรล (Gold/ PPy) (จ) พอลิไพร์โรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (PPy/ HRP) และ (ฉ) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์โรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (Gold/ PPy/ HRP) ตามลำดับ

การศึกษาสมบัติทางเคมีไฟฟ้าในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (PBS) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร ทดสอบโดยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ซึ่งใช้ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ซึ่งที่ความต่างศักย์ดังกล่าวจะทำให้สารละลายต่างๆ ที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้นเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ จากการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบอิเล็กโทรดชนิดต่างๆ ด้วยสารละลายแต่ละชนิด พบว่ากลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการดัดแปลง (bare) มีค่ากระแสไฟฟ้าต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดชนิดอื่นๆ เมื่อทำการทดสอบในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (PBS) จะมีค่ากระแสไฟฟ้าน้อยมากเนื่องจาก PBS ไม่มีสารตั้งต้นสำหรับการทำปฏิกิริยาและกลาสสิคาร์บอนอิเล็กโทรดเองมีค่าการนำไฟฟ้าไม่มากเมื่อเทียบกับการดัดแปลงอิเล็กโทรดชนิดอื่น ๆ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดต่างๆ คือ H_2O_2 และ Phenol และ H_2O_2 / Phenol จะมีกระแสไฟฟ้าที่มีค่าใกล้เคียงกันเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอนจากอิเล็กโทรดเพียงอย่างเดียว

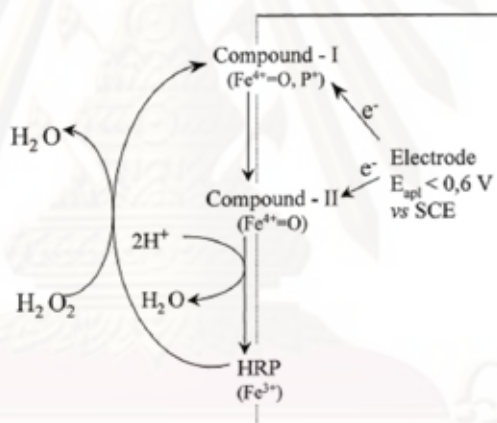
เมื่อพิจารณาจากกลศาสตร์ของอิเล็กโทรดที่มีการดัดแปลงด้วยอนุภาคนาโนทองพบว่า ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์จะมีกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเนื่องจากอนุภาคทองมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากผิวหน้าอิเล็กโทรดไปยังสารละลายที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่นคือ H_2O_2 , Phenol และ H_2O_2 / Phenol กระแสไฟฟ้าดีขึ้นเนื่องจากอนุภาคนาโนทองที่เกิดพื้นผิวกลศาสตร์ของอิเล็กโทรดทำให้พื้นที่ในการถ่ายเทอิเล็กตรอนมีค่าเพิ่มขึ้น ตามรูปที่ 5.10

เมื่อพิจารณาจากกลศาสตร์ของอิเล็กโทรดที่เคลือบด้วยพอลิไพร์โรลพบว่าเมื่อนำไปทดสอบในสารละลาย H_2O_2 , Phenol และ H_2O_2 / Phenol มีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่าการทดสอบในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ เนื่องจากพอลิไพร์โรลมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าและมีสารตั้งต้น (H_2O_2 , Phenol) ที่สามารถรับอิเล็กตรอนจากอิเล็กโทรดทำให้เกิดกระแสไฟฟ้ามากขึ้นเมื่อเทียบกับฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ในกรณีของการดัดแปลงอิเล็กโทรดด้วย Gold/PPy แสดงค่าการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดเมื่อนำไปทดสอบในสารละลาย H_2O_2 , Phenol และ H_2O_2 / Phenol มีค่าสูงกว่าฟอสเฟสบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับ Gold, PPy อย่างไรก็ตามความหนาของไพร์โรลอาจมีผลต่อการแพร่ของสารตั้งต้นไปยังบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนทองซึ่งเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนมีผลทำให้กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นไม่มาก

เมื่อทำการตรึงเอนไซม์ HRP ร่วมกับพอลิไพร์โรล (PPy/ HRP) พบว่าเมื่อทดสอบในสารละลาย H_2O_2 / Phenol กระแสไฟฟ้ามีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ HRP ที่ถูกตรึงในพอลิไพร์โรลสามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ H_2O_2 และมี Phenol เป็น mediator (mediated electron transfer) ทำให้มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ดีขึ้นตามรูปที่ 5.7 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา H_2O_2 , Phenol และฟอสเฟสบัฟเฟอร์ มีค่ากระแสต่ำกว่าเนื่องจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ HRP ต้องอาศัย H_2O_2 และ Phenol ในการเกิดปฏิกิริยาเป็นสารตั้งต้น ซึ่งในกรณีที่ H_2O_2 เป็นสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียวนั้น เมื่อเอนไซม์ HRP ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะสามารถเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอนจากอิเล็กโทรดได้โดยตรง (direct electron transfer) แต่อย่างไรก็ตามกระแสที่เกิดขึ้นอาจมีค่าได้ไม่เท่ากับกรณีที่มี Phenol เป็น mediator เนื่องจากเอนไซม์ HRP เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างอิเล็กโทรดเพียงอย่างเดียวตามรูปที่ 5.8



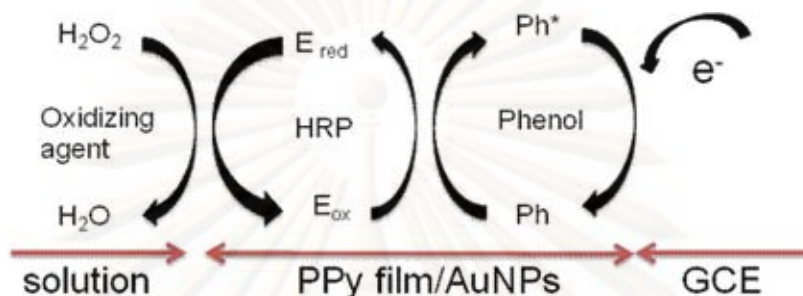
รูปที่ 5.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่มีตัวกลางเป็นตัวถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediated electron transfer) ระหว่างเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสและอิเล็กโทรด (Rosatto และคณะ 1999)



รูปที่ 5.8 กลไกการการถ่ายโอนอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) ระหว่าง เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส และอิเล็กโทรด (Rosatto และคณะ 1999)

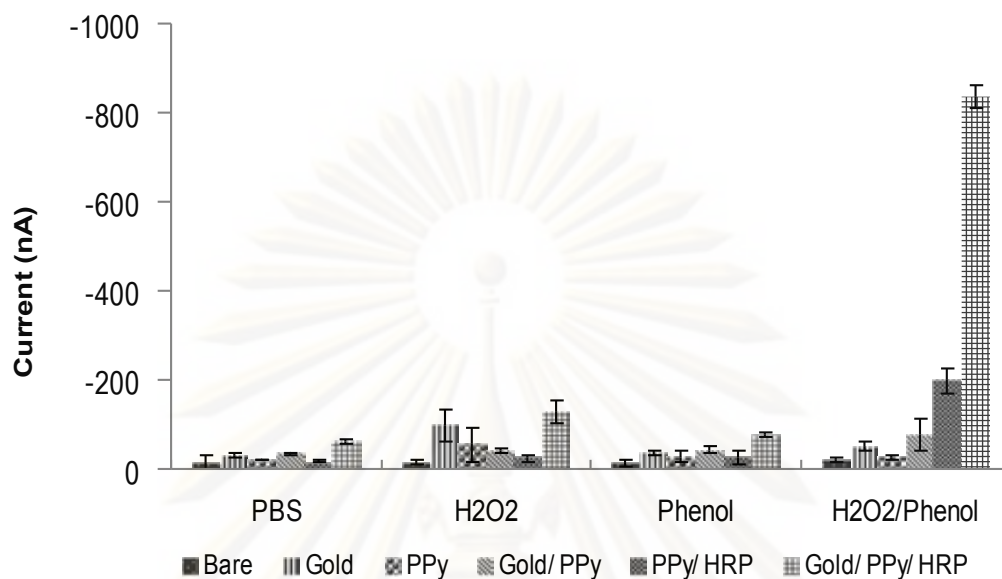
นอกจากนี้เมื่อตัดแปลงอิเล็กโทรดด้วย Gold/ PPy/ HRP เมื่อทดสอบในสารละลาย H_2O_2 / Phenol สารตั้งต้นซึ่งคือ H_2O_2 / Phenol จะแพร่ผ่านชั้นฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงเอนไซม์ HRP และเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ HRP โดยมี Phenol ทำหน้าที่เป็น mediator ในการถ่ายเทอิเล็กตรอนตามรูปที่ 5.9 ซึ่งพบว่าการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ HRP ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าได้ดีที่สุดทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคนาโนทองบนอิเล็กโทรดสามารถทำให้มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์และอิเล็กโทรดได้เป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่มีการตัดแปลงอนุภาคทองบนอิเล็กโทรด อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบด้วย H_2O_2 และ Phenol แยกกันแต่ละสารกระแสที่เกิดขึ้นจะมีค่าลดลงเนื่องจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ HRP ต้อง

อาศัยทั้ง H_2O_2 และ Phenol เป็นสารตั้งต้น และ mediator ตามลำดับ หากนำไปทดสอบในสารละลายนอกจากนี้หากทดสอบในฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะมีกระแสไฟฟ้าลดลงเนื่องจากไม่มีสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 5.9 แสดงภาพกระบวนการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ HRP

จากคำบรรยายข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า อนุภาคนาโนทองมีผลต่อการนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรดโดยช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการถ่ายเทอิเล็กตรอน และเมื่อทำการตรึงเอนไซม์ HRP/ PPy ด้วยวิธีการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันพบว่า กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารตั้งต้น และวิธีการนี้จะทำให้เอนไซม์สามารถถูกกักเก็บไว้ด้วยพอลิไพร์โรลได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้พอลิไพร์โรลสามารถทำให้อิเล็กโทรดนำไฟฟ้าได้เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน โดยที่พอลิเมอร์ชนิดนี้มีสายโซ่หลักมีโครงสร้างเป็นพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยวแบบต่อเนื่อง (conjugated system) ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนที่ภายในโครงสร้างได้จึงเกิดการนำไฟฟ้าได้ตามรูปที่ 5.10



รูปที่ 5.10 การเปรียบเทียบกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่ไม่มีการดัดแปลง (bare) อนุภาคนาโนทอง (Gold) พอลิไพร์รอล (PPy) อนุภาคนาโนทอง/พอลิไพร์รอล (Gold/PPy) พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (PPy/HRP) และอนุภาคนาโนทอง/พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (Gold/PPy/HRP) ตามลำดับ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร ทดสอบโดยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีที่ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์

5.2.1 อิทธิพลของความเข้มข้นของไพร์รอล

ความเข้มข้นของพอลิไพร์รอลเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญหนึ่งต่อการตรึงเอนไซม์ HRP ในการทดลองจะให้ความเข้มข้นของไพร์รอลมอนอเมอร์ 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 และ 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ ใช้ปริมาณเอนไซม์คงที่ตลอดการทดลองคือ 250 ยูนิต/ มิลลิลิตร ใช้เทคนิค cyclic voltammetry ในการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ในช่วงความต่างศักย์ 0.0 - 1.0 โวลท์ และอัตราการสแกน 10 มิลลิโวลท์/ วินาทีจำนวน 15 รอบ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมตามการศึกษาของ Razola และคณะ (2002) วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร

5.2.1.1 อิทธิพลจากความเข้มข้นของไพโรลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

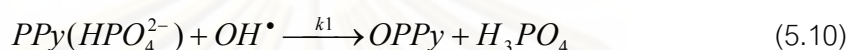
นาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

ในการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยเทคนิค SEM พบว่าที่ความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์ 0.03, 0.05 และ 0.07 โมลต่อลิตร ดังรูป 5.11ก 5.11ข และ 5.11ค ตามลำดับ ลักษณะฟิล์มของพอลิไพโรลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็ก จากนั้นเมื่อความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์เป็น 0.09, 0.11 และ 0.13 โมลต่อลิตร ดังรูป 5.11ง, 5.11จ และ 5.11ฉ ตามลำดับ พอลิไพโรลที่ได้มีลักษณะยาวขึ้นคล้ายกับแท่งนาโน (nanorod) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพิจารณาสมการ 5.5 พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันที่บริเวณพื้นผิวอิเล็กโทรด (electrode/solution interface) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสมการคือ RH_2^+ ซึ่ง radical cation ที่เกิดขึ้นนี้จะส่งผลต่ออัตราของปฏิกิริยาในสมการที่ 5.6 และ 5.7 นอกจากนี้อิทธิพลจากการแพร่ของไพโรลมอนอเมอร์จากสารละลาย (bulk solution) ไปยังบริเวณผิวหน้าอิเล็กโทรด (electrode/solution interface) ทำให้เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันอัตราเร็วที่ต่างกัน

จากการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของไพโรลมีลักษณะคล้ายกับการศึกษาของ Debiemme-Chouvy และคณะ (2009) ศึกษาการคุณสมบัติการนำไฟฟ้าของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่แตกต่างกัน คือ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) และไดโซเดียมเปอร์คลอเรต (Na_2ClO_4) พบว่า สารละลายอิเล็กโทรไลต์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ซึ่งมีหมู่ HPO_4^{2-} (weak acid anion) ปริมาณ 0.2 โมลต่อลิตร มีการนำไฟฟ้าในปริมาณต่ำ และพบว่าเมื่อมีไดโซเดียมเปอร์คลอเรตซึ่งมีหมู่ ClO_4^- (non acid anion) ปริมาณ 1×10^{-3} โมลต่อลิตร ผสมอยู่ด้วยในสารละลายจะทำให้มีการนำไฟฟ้าที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การสังเคราะห์พอลิไพโรลในไดโซเดียมไฮโดรเจนออกซิฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ซึ่งใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบจะทั้งหมดจะทำให้พอลิไพโรลที่ได้มีลักษณะเป็นฟิล์มบางบนอิเล็กโทรด เนื่องจากในกระบวนการเกิดพอลิไพโรลจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไพโรลทำให้เกิดโปรตอนในสารละลายบริเวณนั้น (สมการ 5.6 และ 5.7) ซึ่ง HPO_4^{2-} จะทำหน้าที่เป็นตัวจับโปรตอนที่เกิดขึ้นทำให้แอนไอออนในสารละลายบริเวณผิวหน้าอิเล็กโทรด (electrode/solution interface) นั้นมีปริมาณน้อยลงทำให้กระบวนการออกซิเดชันของไพโรลสูญหายไป เมื่อใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบทั้งหมดประกอบด้วย ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ปริมาณ 0.2 โมลต่อลิตร และไดโซเดียม

เปอร์คลอเรต (Na_2ClO_4) ปริมาณ 1×10^{-3} โมลต่อลิตรจะทำให้พอลิไพโรลที่ได้มีลักษณะเป็นแท่งนาโน (nanorod) สามารถอธิบายได้ดังนี้

เมื่อมีศักย์ไฟฟ้าที่เพียงพอจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำทำให้เกิดการแตกตัวเป็น hydroxyl radical ตามสมการ 5.9 และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของพอลิไพโรลฟิล์มตามสมการ 5.10



นอกจากนี้ hydroxyl radical สามารถทำปฏิกิริยาด้วยตัวเองทำให้เกิด H_2O_2 และจะถูกออกซิไดซ์เป็นออกซิเจนอย่างรวดเร็ว ตามสมการ 5.11 และ 5.12

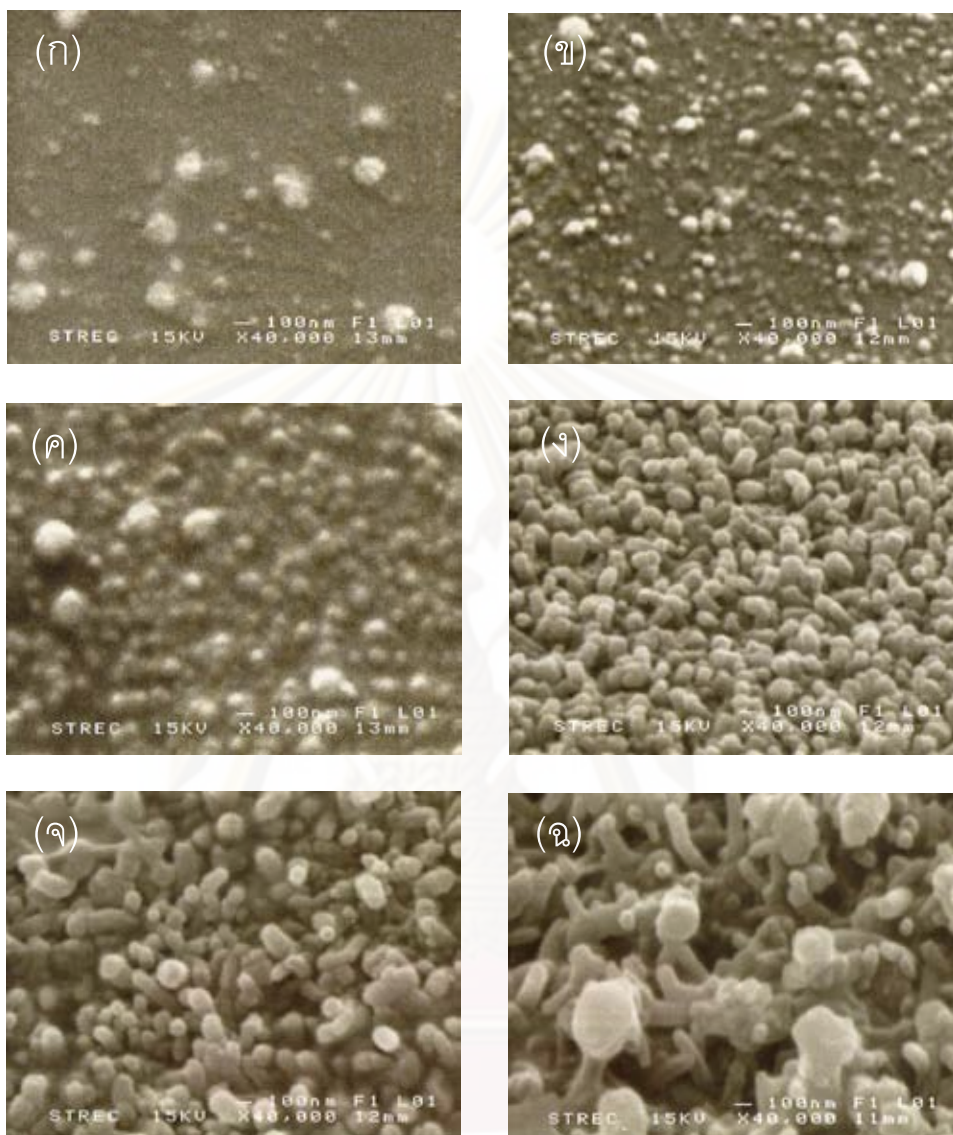


เมื่อการเกิด hydroxyl radical มีอัตราต่ำ พบว่าปฏิกิริยาในสมการที่ 5.10 จะมีอิทธิพลเด่นกว่าปฏิกิริยาในสมการที่ 5.11 ซึ่งเป็นสมการอันดับสอง จากข้อความข้างต้นที่ได้กล่าวสามารถเสนอกกลไกการเกิดพอลิไพโรลได้ 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกการเกิดฟิล์มของพอลิไพโรล (เกิดโปรตอนและแอนไอออนมีความเข้มข้นลดลงตรงบริเวณ electrode/electrolyte interface) ขั้นตอนที่สองเกิดขึ้นในช่วงสั้น คือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของพอลิไพโรลด้วย hydroxyl radical ปฏิกิริยาในสมการที่ 5.10 และการเกิดฟองออกซิเจน (O_2 nanobubble) ปฏิกิริยาในสมการที่ 5.12 และการเพิ่มขึ้นของแอนไอออนบริเวณ film/electrolyte interface เนื่องจากการแพร่ของแอนไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ไปยัง และขั้นตอนสุดท้ายการโตของแท่งพอลิไพโรลเนื่องจากการเกิดฟองออกซิเจน เมื่อพิจารณาจากกลไกที่ได้เสนอข้างต้นเราสามารถสมมุติฐานกลไกการเกิด โครงสร้างพอลิไพโรลดังนี้ โครงสร้างแบบโพรง (hollow หรือ like cup) เนื่องจากการเกิดพอลิไพโรลรอบฟองออกซิเจน และเมื่อฟองออกซิเจนหลุดออกจากพื้นผิวอิเล็กโทรดพอลิไพโรลจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องภายในโพรงทำให้เกิดเป็นแท่งนาโน (nanorod)

จากผลการทดลองการสังเคราะห์พอลิไพโรลโดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนุน (supporting electrolyte) คือ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ มีค่า pH 7.4 ของสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) มีหมู่ HPO_4^{2-} และ H_2PO_4^- มีคุณสมบัติเป็น weak acid anion และ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีคุณสมบัติเป็น non acid anion อยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนุน ให้ผลสอดคล้องกับ Debiemme-Chouvy และคณะ (2009) ดังกล่าวไว้ข้างต้นคือ ลักษณะของพอลิไพโรลที่ได้เป็นแท่งนาโน โดยเมื่อความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์เพิ่มขึ้นจะทำให้แท่งนาโนยาวขึ้น ตามสมการที่ 5.8 จะเห็นว่าอัตราการเกิดพอลิไพโรลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์ และ hydroxyl radical



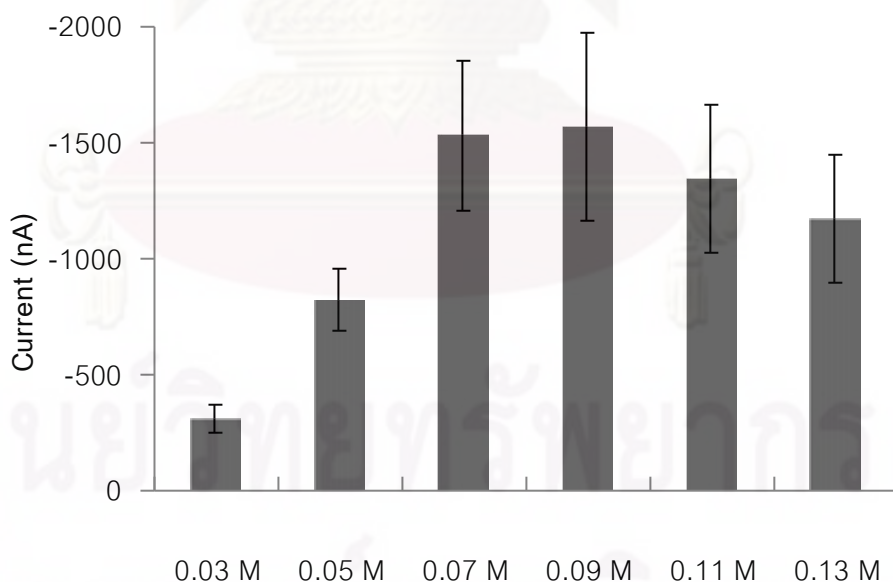
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.11 ภาพ SEM (30 องศา) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่มีไพโรลมอนอเมอร์ความเข้มข้นของต่างๆ (ก) 0.03 (ข) 0.05 (ค) 0.07 (ง) 0.09 (จ) 0.11 และ (ฉ) 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ

5.2.1.2 อิทธิพลจากความเข้มข้นของไพโรลต่อคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง/พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เป็นสิ่งสำคัญต่อการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากหากใช้ความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์ที่น้อยเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการฟอร์มตัวเป็นฟิล์มพอลิเมอร์และกักเก็บเอนไซม์บนพื้นผิวอิเล็กโทรด และไพโรลมอนอเมอร์มีค่ามากเกินไปซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาเป็นพอลิไพโรลฟิล์มที่มีความหนามากเกินไป (สมการที่ 5.5-5.8) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของสารตั้งต้นไปยังเอนไซม์ และมีส่วนป้องกันการถ่ายเทอิเล็กตรอนไปยังอิเล็กโทรด จะมีผลต่อค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าในการตรวจวัดฟีนอลได้ จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์ที่ 0.09 โมลต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ มีผลค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงที่สุดตามรูปที่ 5.12 โดยพบว่าความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์มีค่าสูงกว่า 0.09 โมลต่อลิตร จะมีค่ากระแสลดลงเนื่องจากพอลิไพโรลที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นแท่งนาโนที่มีความยาวขึ้นและขนาดใหญ่ขึ้นตามรูปที่ 5.11 ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของสารตั้งต้นไปยังเอนไซม์ที่อยู่ภายในแท่งพอลิไพโรล



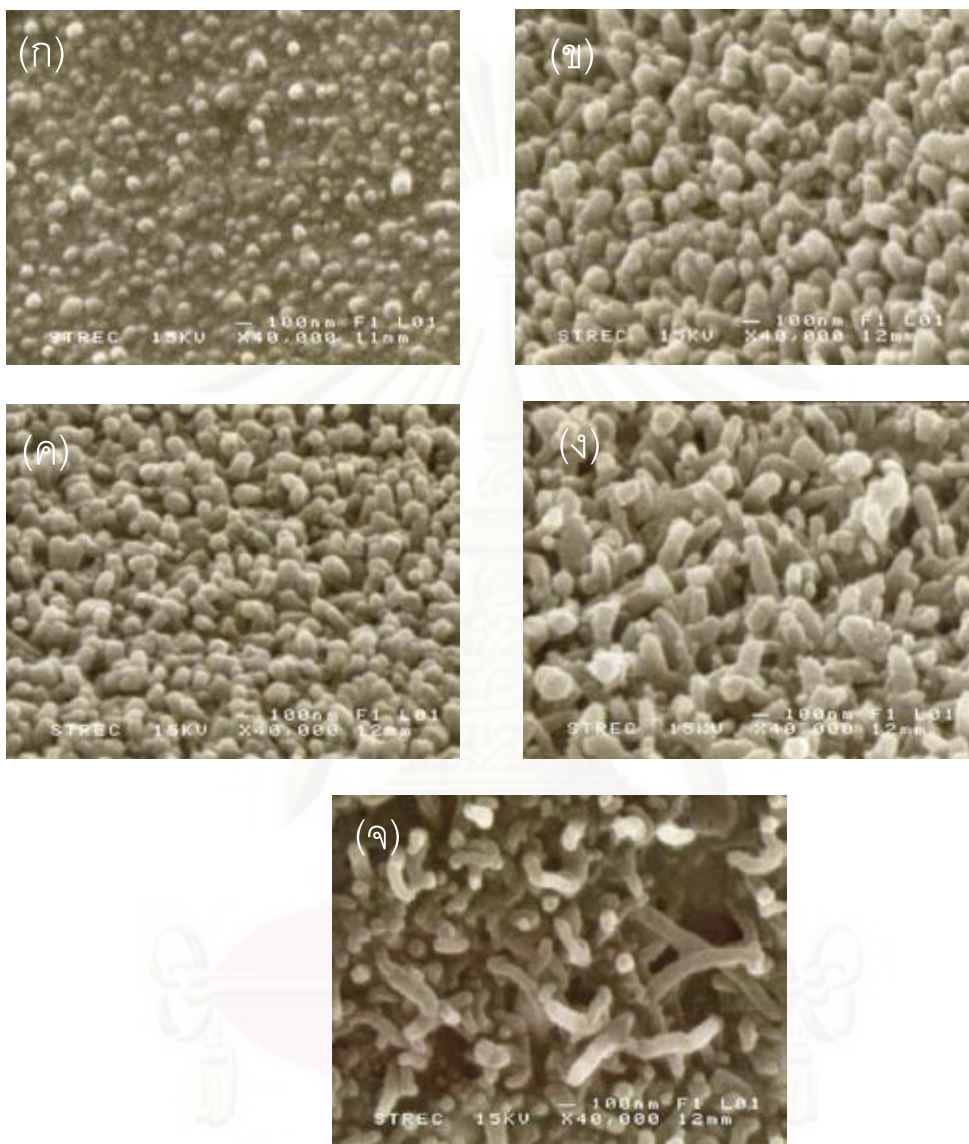
รูปที่ 5.12 ค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความเข้มข้นพอลิไพโรล 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 และ 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ

5.2.2 อิทธิพลของจำนวนรอบ

สภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นไพโรลนอโนเมอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส คือ 0.09 มิลลิโมลต่อลิตร มีผลค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงที่สุด นอกจากนี้ก็ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อค่าตอบสนองสัญญาณทางไฟฟ้า คือ จำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ต่อความหนาของชั้นฟิล์มที่เกิดขึ้น คือเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น (เวลาการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันเพิ่มขึ้น) ทำให้เกิดพอลิไพโรลฟิล์มที่มีความหนามากขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าของไบโอเซนเซอร์ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปที่อิเล็กโทรด ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวอาจถูกกำหนดโดยการขนส่งสารไปยังอิเล็กโทรด การมีฟิล์มที่มีความหนาเกินไปส่งผลต่อการขนส่งสารหรือการแพร่ของสารละลายไปยังพื้นผิวอิเล็กโทรด (Razola และคณะ 2002) จากการทดลองสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส จำนวน 5, 10, 15, 20 และ 25 รอบ ตามลำดับ

5.2.2.1 อิทธิพลของจำนวนรอบต่อคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

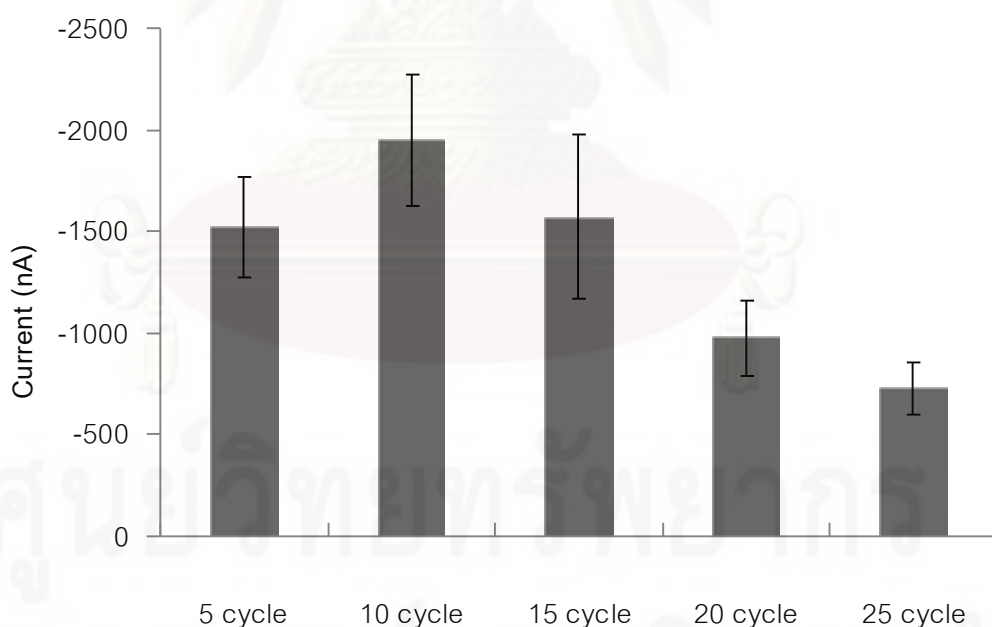
ในการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยเทคนิค SEM จำนวนรอบของการสังเคราะห์ 5, 10, 15, 20 และ 25 รอบ ดังรูป 5.13ก, 5.13ข, 5.13ค, 5.13ง และ 5.13จ ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนรอบทำให้ความยาวของแท่งนาโนเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำนวนรอบเพิ่มขึ้นทำให้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันเพิ่มขึ้นสอดคล้องตาม Debiemme-Chouvy และคณะ (2009)



รูปที่ 5.13 ภาพ SEM (30 องศา) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่มีจำนวนรอบต่างๆ (ก) 5 (ข) 10 (ค) 15 (ง) 20 (จ) 25 รอบตามลำดับ

5.2.2.2 อิทธิพลของจำนวนรอบต่อคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

เมื่อทำการวัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น $50/50$ ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าจำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส มีค่าการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงสุด คือ 10 รอบ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อใช้เวลาในการสังเคราะห์น้อยเกินไปจำนวนเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้ในพอลิไพโรลอาจมีค่าน้อยเกินไป แต่หากใช้เวลาในการสังเคราะห์นานเกินไปจะทำให้มีชั้นฟิล์มที่มีความหนาและเอนไซม์อาจเกิดการเสื่อมสภาพได้และไม่เหมาะสมต่อการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างอิเล็กโทรดและเอนไซม์ นอกจากนี้หากใช้เวลาในการสังเคราะห์พอลิเมอร์/ เอนไซม์มากเกินไปความหนาของชั้นฟิล์มพอลิไพโรลอาจส่งผลต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนผ่านอนุภาคทองไปยังอิเล็กโทรดที่มีผลต่อการตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ ดังนั้นจำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส สภาวะที่เหมาะสมที่สุดและมีผลค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงสุด 10 รอบ ตามรูปที่ 5.14



รูปที่ 5.14 ค่าตอบสนองของกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรีของจำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 5, 10, 15, 20 และ 25 รอบ ตามลำดับ

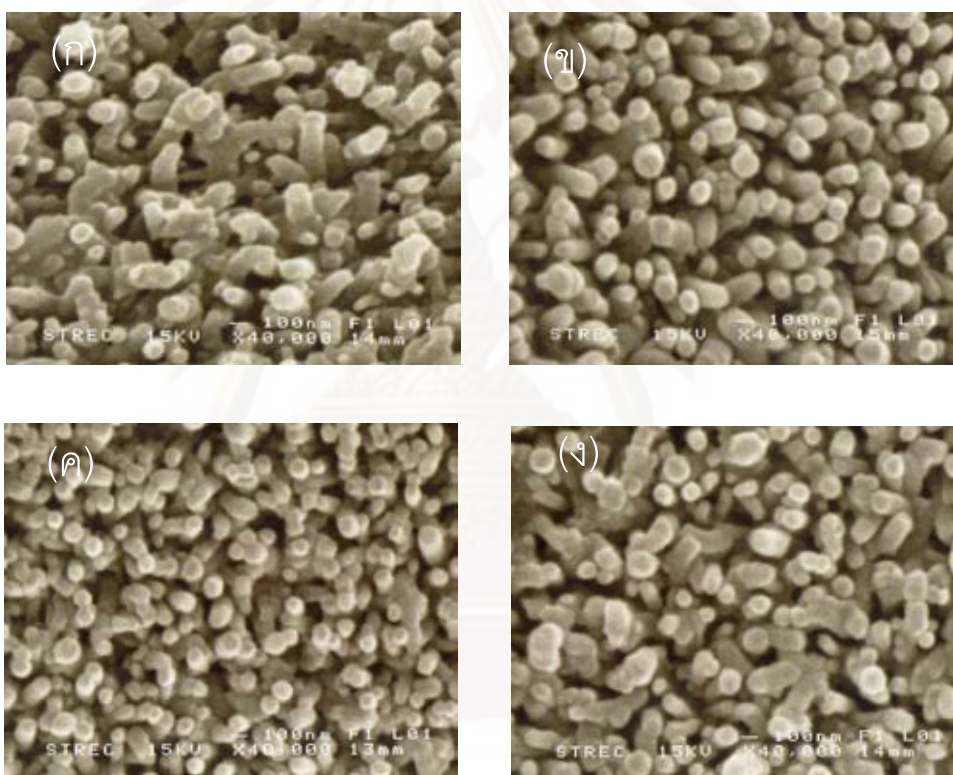
5.2.3 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดดิชเปอร์ออกซิเดส

ในการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพของชั้นฟิล์มบนพื้นผิวของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM) จากรูปที่ 5.15ก เป็นการสังเคราะห์พอลิไพโรลโดยใช้ไพโรลมอนอเมอร์ความเข้มข้น 0.09 โมลต่อลิตร ใช้เทคนิค cyclic voltammetry ในการอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันไพโรล ในช่วงความต่างศักย์ 0.0 - 1.0 โวลต์และอัตราการสแกน 10 มิลลิโวลต์/ วินาที จำนวน 10 รอบ รูปที่ 5.15ข เป็นการปลูกอนุภาคนาโนทอง ซึ่งใช้ความเข้มข้น AuCl_4^- 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปลูกอนุภาคนาโนทองตามหัวข้อ 5.1 แล้วสังเคราะห์พอลิไพโรลบนพื้นผิวของกลาสคาร์บอนที่ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองเช่นเดียวกันตามลำดับ รูปที่ 5.15ค เป็นการสังเคราะห์พอลิไพโรลร่วมกับการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดดิชเปอร์ออกซิเดส ซึ่งใช้ปริมาณเอนไซม์ 250 ยูนิต์/ มิลลิลิตร และรูปที่ 5.15ง เป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง และพอลิไพโรลร่วมกับการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดดิชเปอร์ออกซิเดส

การทดลองจากรูปที่ 5.15ก พบว่าฟิล์มของพอลิไพโรลที่เกิดขึ้นมีลักษณะโครงสร้างซึ่งมีการอัดตัวอย่างหนาแน่น (compact) และมีลักษณะฟิล์มที่เป็นแบบเดียวกัน (homogeneous) มีลักษณะพื้นผิวคล้ายกับแท่งนาโน (nanorod) ดังนั้นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบจะแห้งและความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์จึงมีผลต่อลักษณะโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบจะแห้งแต่ละชนิดมีการนำไฟฟ้าที่แตกต่างกันส่งผลต่อโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้น และความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์มีค่าต่ำลักษณะของพอลิไพโรลที่ได้คือเม็ดเล็กๆกระจายอยู่บนพื้นผิวของอิเล็กโทรด และเมื่อความเข้มข้นของไพโรลมอนอเมอร์มีค่ามากพอลิไพโรลที่ได้มีลักษณะเป็นแท่งนาโนซึ่งได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 5.2.1

จากรูปที่ 5.15ข เป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพโรล จะพบว่าโครงสร้างอนุภาคของพอลิไพโรลมีขนาดเล็กและมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น (homogeneous) ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคนาโนทองที่ผิวของอิเล็กโทรดช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทอิเล็กตรอนในกระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันของไพโรล และรูปที่ 5.15ค เป็นการสังเคราะห์พอลิไพโรล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดดิชเปอร์ออกซิเดส จะพบว่าโครงสร้างอนุภาคของพอลิไพโรลมีขนาดเล็กและเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ฮอร์สแรดดิชเปอร์ออกซิเดสที่ถูกตรึงภายในพอลิไพโรลมีส่วนช่วยให้เกิดนิวเคลียสของแท่งพอลิไพโรลขึ้นบริเวณใหม่บนพื้นผิวอิเล็กโทรด และหน่วยการเติบโตของพอลิไพโรล ทำให้พอลิไพโรลมีขนาดเล็ก (Tian และคณะ 2001)

นอกจากนี้รูปที่ 5.15 เป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์ส แรดิซเปอร์ออกซิเดส พบว่าโครงสร้างอนุภาคของพอลิไพรอลมีขนาดเล็กเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องการกระจายของอนุภาคนาโนทองที่ดีมีส่วนช่วยในการกระจายตัวของนิวคลีโอซัน และเอนไซม์มีผลต่อการหน่วงการเติบโตของพอลิไพรอล อย่างไรก็ตามพอลิไพรอลอาจมีขนาดใหญ่ในบางบริเวณทั้งนี้เนื่องพอลิไพรอลที่เกิดจากการนิวคลีโอซันขึ้นใหม่เกิดการซ้อนทับและรวมตัวกับอนุภาคเดิมของชั้นพอลิไพรอล (EIKaoutit และคณะ 2009)

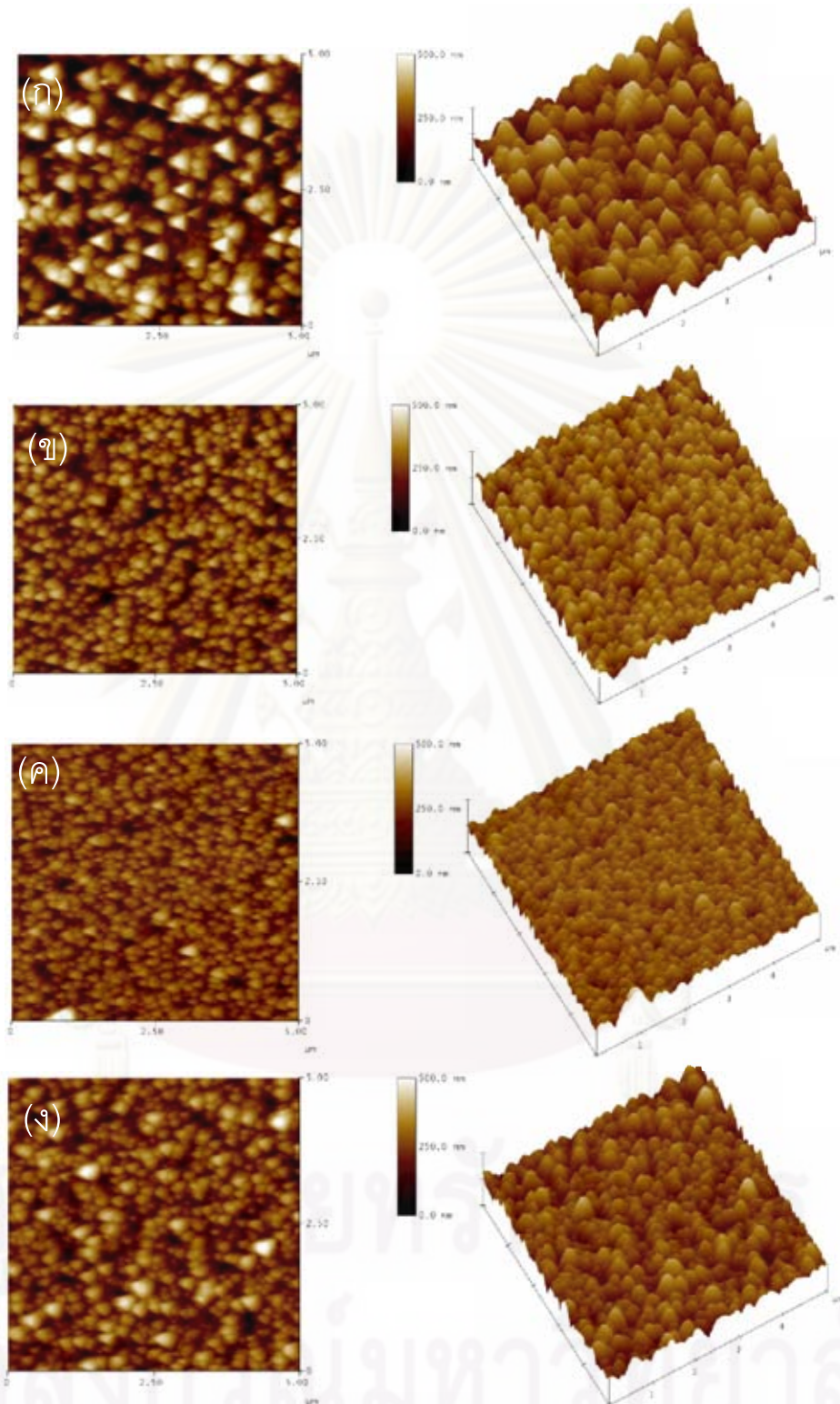


รูปที่ 5.15 ภาพ SEM โครงสร้างของฟิล์มชนิดต่างๆ (ก) พอลิไพรอล (ข) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล (ค) เอนไซม์ฮอร์สแรดิซเปอร์ออกซิเดส/ พอลิไพรอล (ง) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิซเปอร์ออกซิเดส

สำหรับการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพบนพื้นผิวของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด ด้วยเทคนิค atomic force microscopy (AFM) ตามรูปที่ 5.16 มีความสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะพื้นผิวทางกายภาพด้วยเทคนิค SEM ซึ่งจากการศึกษาอาจมองเห็นลักษณะของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสได้ไม่เด่นชัดมากนัก ซึ่งจากการศึกษาของEIKaoutit และคณะ (2009) ถึงแม้จะใช้เทคนิค FTIR หรือ XRD ยังไม่สามารถยืนยันได้แน่ชัด ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์น้อยมากจึงไม่สามารถวิเคราะห์พันธะพอลิเปปไทด์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำรูปที่ 5.16ก รูปที่ 5.16ข รูปที่ 5.16ค และรูปที่ 5.16ง มาเปรียบเทียบจะสามารถเห็นได้อย่างชัดเจนว่าขนาดอนุภาคของพอลิไพโรลมีขนาดเล็กลง ทั้งนี้เนื่องจากมีเอนไซม์เข้ามาฝังแทรก และไม่อาจที่จะทำให้เกิดการรวมกันของอนุภาคพอลิไพโรลเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

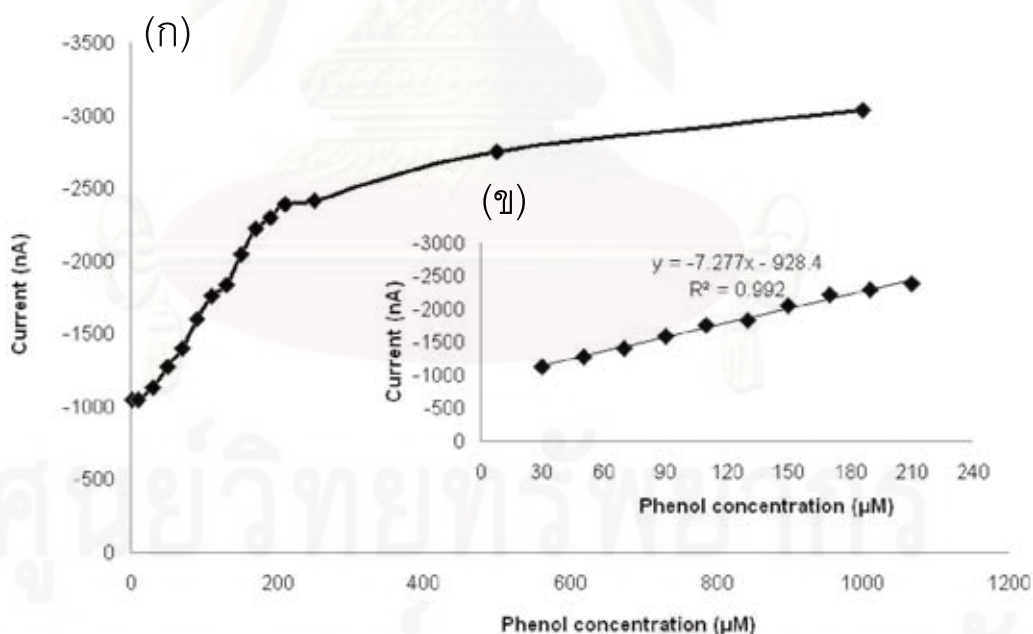


รูปที่ 5.16 ภาพ AFM โครงสร้างของฟิล์มชนิดต่างๆ (ก) พอลิไพรอล (ข) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล (ค) เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส / พอลิไพรอล (ง) อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

5.2.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ (performance factor)

5.2.4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)

จากรูปที่ 5.17 พบว่าในช่วงแรกปริมาณของฟีนอลมีค่าความเข้มข้นน้อยจึงทำให้มีค่าการตอบสนองทางไฟฟ้ามีค่าใกล้เคียงกันมาก และหากเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงๆ หนึ่งสามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของฟีนอลได้อย่างดี เนื่องจากฟีนอลซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (mediator) มีค่าความเข้มข้นที่เพียงพอต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจะทำให้มีค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าที่ไม่เป็นเชิงเส้น เนื่องจากเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของฟีนอลมากขึ้นแต่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่าเดิม ซึ่งเป็นไปได้ที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจมีตัวกำหนดการเกิดปฏิกิริยา (limiting substrate) และเกิดการเสื่อมของเอนไซม์ ดังนั้นช่วงความเป็นเส้นตรงเป็นความสามารถของวิธีการวิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น มีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 3.0×10^{-5} - 2.1×10^{-4} โมลต่อลิตร



รูปที่ 5.17 (ก) calibration curve ความเข้มข้นของฟีนอล (ข) ช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์

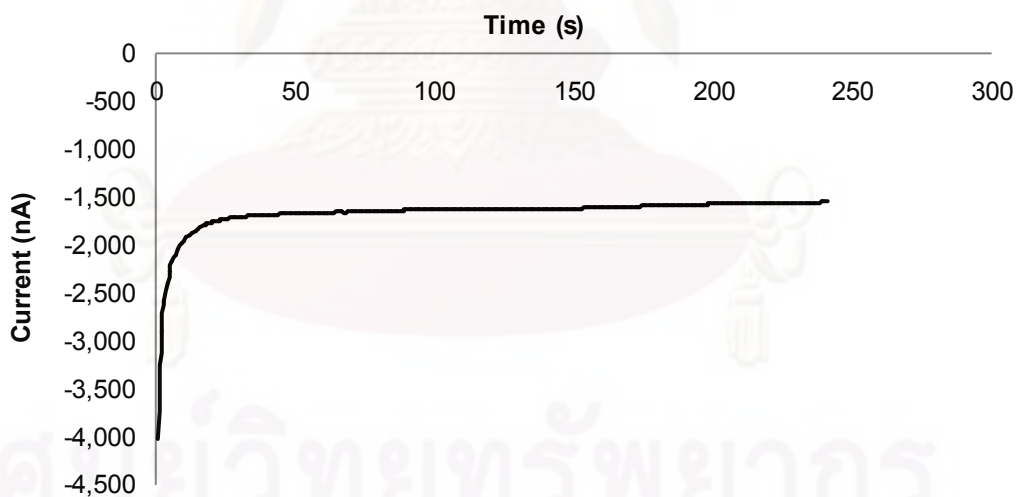
5.2.4.2 ความว่องไวต่อการตอบสนอง (sensitivity)

ความว่องไวต่อการตอบสนองสามารถตรวจวัดจากอัตราส่วนของการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณทางไฟฟ้า ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟินอล (concentration) โดยสามารถหาได้จากความชันของช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) จากรูปที่ 5.17 พบว่า ความว่องไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) คือ $7.277 \text{ nA}/\mu\text{M}$ ($R^2 = 0.992$)

5.2.4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (detection limit)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้วิเคราะห์จาก $3s_b/m$ โดยที่ s_b คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของช่วงความเป็นเส้นตรง และ m คือความชันของค่าความว่องไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้มีค่า 2.54×10^{-5} โมลต่อลิตร ($n=5$), ($S/N=3$)

5.2.4.4 เวลาการตอบสนอง (response time)

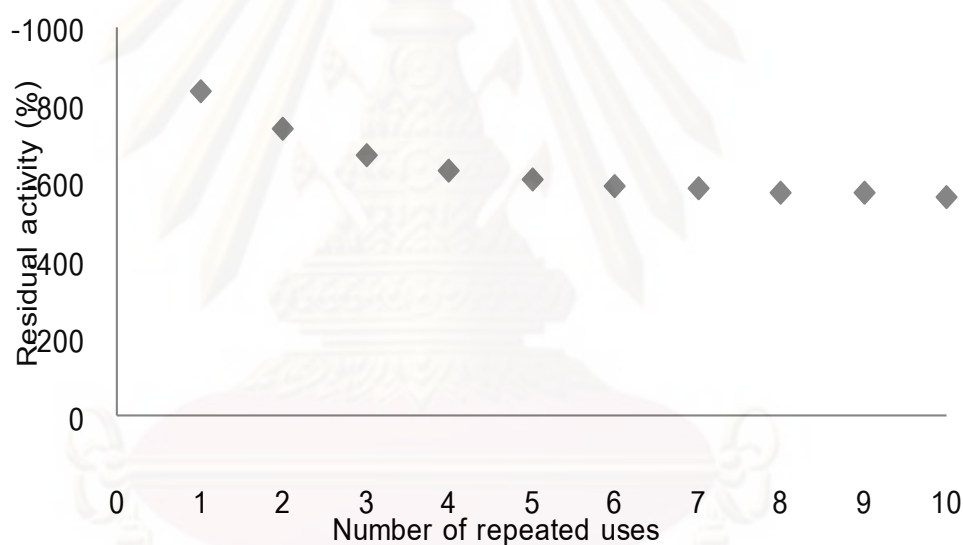


รูปที่ 5.18 เวลาการตอบสนองด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟินอลความเข้มข้น $50/50$ ไมโครโมลต่อลิตร

เวลาการตอบสนอง (response time) โดยสามารถหาจากกระแสที่เริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุล (steady-state) พบว่ามีค่าการตอบสนองทางสัญญาณไฟฟ้าเริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุลที่เวลา 50 วินาที ตามรูปที่ 5.18

5.2.4.5 การนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability)

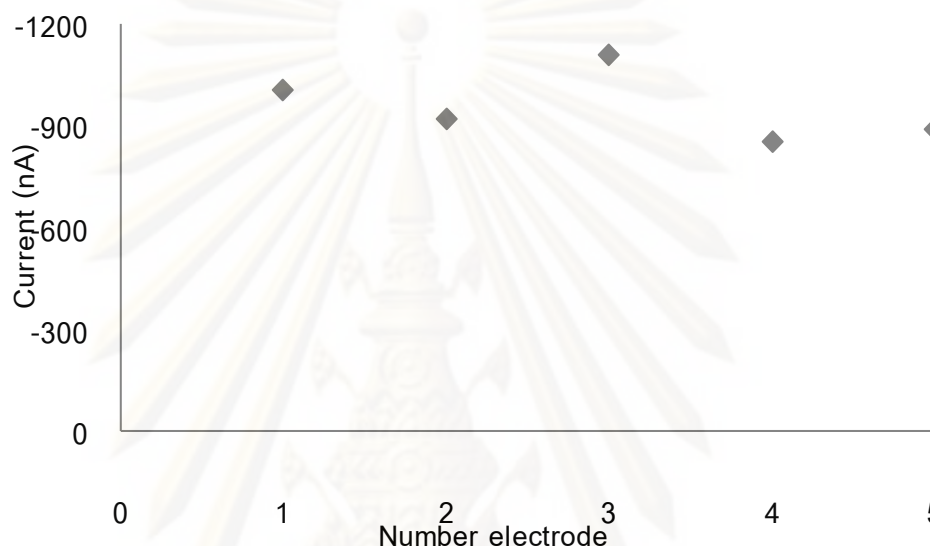
การนำกลับมาใช้ใหม่เป็นการตรวจวัดซ้ำจากอิเล็กโทรดแท่งเดิมซึ่งอิเล็กโทรดแท่งเล็กสำหรับการวิเคราะห์ เมื่อนำไปวัดซ้ำเป็นจำนวน 10 ครั้งพบว่า กระแสไฟฟ้ามีค่าลดลงเรื่อยๆ หลังจากการวัดครั้งที่ 1-5 ซึ่งมีกระแสไฟฟ้าลดลง 72.38% จากการวัดครั้งแรก และมีกระแสไฟฟ้าลดลงเหลือ 67.45% หลังจากการวัดครั้งที่ 10 ตามรูปที่ 5.19 กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะมีค่าลดลงหลังจากการวัดแต่ละครั้งทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกกักเก็บนั้นอาจมีส่วนที่เสื่อมสภาพลงไปเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ทำให้มีค่ากระแสลดลงตามจำนวนครั้งที่ทำการวัด นอกจากนี้โมเลกุลของเอนไซม์ HRP อาจจะหลุดออกจากพอลิไพร์โรลฟิล์มได้ เนื่องจากพอลิไพร์โรลฟิล์มมีการเสื่อมสภาพได้เมื่อมีการสัมผัสกับ H_2O_2 (Umana และคณะ 1986)



รูปที่ 5.19 การวัดกระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดจากแท่งเดิมซ้ำจำนวน 10 ครั้งด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อพื้นอลความเข้มข้น 50/50 ไมโครโมลต่อลิตร

5.2.4.6 การผลิตซ้ำ (reproducibility)

เมื่อทำการผลิตซ้ำตามกระบวนการเดิมซึ่งใช้อิเลคโทรดแท่งเล็กสำหรับการวิเคราะห์พบว่า กระแสไฟฟ้ามีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 10.67 ตามรูปที่ 5.20

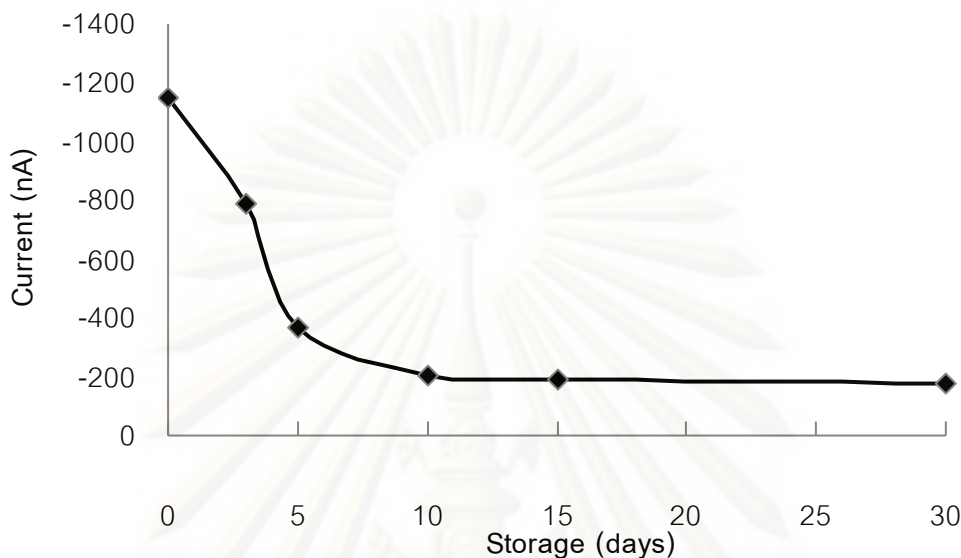


รูปที่ 5.20 การวัดกระแสไฟฟ้าของอิเลคโทรดที่ผลิตซ้ำ จำนวน 5 ครั้ง ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อฟีนอลความเข้มข้น 50/ 50 ไมโครโมลต่อลิตร

5.2.4.7 การจัดเก็บ (storage stability)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้ที่มีการเสื่อมสภาพไปตามระยะเวลาในการใช้ไบโอเซนเซอร์ และระยะเวลาการจัดเก็บสารชีวภาพที่ถูกตรึงไว้บนอิเลคโทรด โดยจัดเก็บอิเลคโทรดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 พบว่าเมื่อจัดเก็บเป็นเวลา 3, 5, 10, 15 และ 30 วัน พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลงเหลือ 68.34%, 31.83%, 17.68%, 16.42%, 15.34% จากการวัดครั้งแรก ตามรูป 5.21

เมื่อทำการเปรียบเทียบการนำกลับมาใช้ใหม่และการจัดเก็บ พบว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะมีค่าลดลงตามหลังจากการวัดแต่ละครั้งทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกกักเก็บนั้นอาจมีส่วนที่เสื่อมสภาพลงไปเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 และเมื่อทำการจัดเก็บจะมีค่าลดลงจะมีค่าลดลงตามระยะเวลาในการจัดเก็บที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 5.21 การวัดกระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดที่จัดเก็บเป็นเวลา 30 วัน ด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์ ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อพื้นอลความเข้มข้น 50/50 ไมโครโมลต่อลิตร

5.2.4.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์

(performance factor)

การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ (performance factor) กับงานวิจัยอื่นๆ ที่มีการตรวจวัดฟินอลเช่นเดียวกัน ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบค่าต่างๆ ตามตารางที่ 5.2 พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ที่มีความกว้างกว่างานวิจัยอื่นๆ มีเวลาการตอบสนอง (response time) และความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) มีค่าน้อยกว่างานวิจัย อย่างไรก็ตามความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (detection limit) อาจมีค่าที่ไม่ต่ำมากนักจึงต้องมีการปรับปรุงต่อไป

จากการทดลองในการตรวจวัดฟินอลดังกล่าวสามารถที่จะทำไปประยุกต์ใช้กับสารประกอบฟินอลอื่นๆ หรือสามารถนำอิเล็กโทรดตรวจวัดฟินอลจากตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำต่างๆ เช่น แม่น้ำ ลำคลอง หรือน้ำที่ผ่านการบำบัดจากโรงงาน เพื่อตรวจวัดฟินอลที่มีโอกาสปล่อยออกสู่แหล่งน้ำต่างๆ

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์

(performance factor)

Working electrode	Detection Limit	Linear range	Sensitivity	Response time	เอกสารอ้างอิง
Silica-titanium / HRP/ carbon paste	-	10-50 μM	1 μM	3 s	Rosatto และคณะ (1999)
$\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ sol-gel/ HRP/ carbon SPE	0.5 $\mu\text{M dm}^{-3}$	5-25 $\mu\text{M dm}^{-3}$	3.2 nA dm^3	-	Rosatto และคณะ (2002)
PVF/ PPy/ HRP/ GCE	0.17 μM	0.5-10 μM	29.91 nA μM^{-1}	5 min	Sulak และคณะ (2009)
Poly(GMA-co-MTM)/ polypyrrole/HRP/GCE	0.3 μM	2-12 μM	90 nA μM^{-1}	3 s	Korkut และคณะ (2009)
CNT/ PPy/ HRP/ Au	3.52 μM	16-24 μM	1 nA μM^{-1}	2 s	Korkut และคณะ (2009)
Gold/ PPy/ HRP/ GCE	25.4 μM	30-210 μM	7.277 nA μM^{-1}	50 s	จากงานวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 ขนาดอนุภาคนาโนทอง

1. ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองใช้สารละลายที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน เตตระคลอโรอโรเตต ไตรไฮไดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.1 โมลต่อลิตร ทำการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.2 โวลต์ และใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้า 30 วินาที เส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงของอนุภาคนาโนทอง 56.22, 33.27 นาโนเมตร ตามลำดับ และมีจำนวนอนุภาคนาโนทอง 4.05×10^9 อนุภาค/ cm^2

6.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง/ พอลิไพร์รอล/

เอนไซม์ฮอสแรดิซเปอรอกซิเดสบนอิเล็กโทรดใช้งาน

1. ความเข้มข้นของไพร์รอลมอนอเมอร์ 0.09 โมลต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ฮอสแรดิซเปอรอกซิเดส
2. จำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอสแรดิซเปอรอกซิเดส มีค่าการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงที่สุด คือ 10 รอบ

6.1.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอเซนเซอร์ (performance factor)

1. ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) มีค่าในช่วงความเข้มข้นของฟีนอลระหว่าง 3.0×10^{-5} - 2.1×10^{-4} โมลต่อลิตร
2. ความไวต่อ การตอบสนอง (sensitivity) มีค่า 7.277 nA/ μM ($R^2 = 0.992$)
3. เข้มข้นต่ำสุดที่สารสามารถวัดได้ (detection limit) มีค่า 2.54×10^{-5} โมลต่อลิตร ($n=5$), ($S/N=3$)
4. เวลาการตอบสนอง (response time) เป็นเวลา 50 วินาที
5. การนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability) หลังจากการวัดครั้งที่ 1-5 ซึ่งมีกระแสไฟฟ้าลดลง 72.38% จากการวัดครั้งแรก และมีกระแสไฟฟ้าลดลงเหลือ 67.45% หลังจากการวัดครั้งที่ 10

6. การผลิตซ้ำ (reproducibility) มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 10.67
7. การจัดเก็บ (storage stability) พบว่าเมื่อจัดเก็บเป็นเวลา 3, 5, 10, 15 และ 30 วัน พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลงเหลือ 68.34%, 31.83%, 17.68%, 16.42%, 15.34% จากการวัดครั้งแรก

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ปัจจัยของการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันมีหลายปัจจัยด้วยกัน ดังนั้นควรมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ให้มีสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มเติมต่อไป
2. การทดลองเสถียรภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ และการเก็บรักษาของเอนไซม์ตรึงรูปในงานวิจัยนี้พบว่ามีเสถียรภาพไม่มากนัก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวัสดุที่จะช่วยในการรักษาเสถียรภาพเอนไซม์ และควรมีการปรับปรุงรูปแบบการเก็บรักษาให้มีความเหมาะสมต่อไป

รายการอ้างอิง

- Bai H, P., Lu, X. X., Yang, G. M., Yang, Y. H. Hydrogen peroxide biosensor based on electrodeposition of zinc oxide nanoflowers onto carbon nanotubes film electrode. Chinese Chemical Letters 19 (2008): 314–318.
- Barton, A. C., Collyer, S. D., Davis, F., Gornall, D. D., Law, K. A., Lawrence, E. C.D., Mills, D. W., Myler, S., Pritchard, J. A., Thompson, M., Higson, S.P.J. Sonochemically fabricated microelectrode arrays for biosensors offering widespread applicability: Part I. Biosensors and Bioelectronics 20 (2004): 328–337.
- Blanch, H.W., and Clark, D.S. Biochemical Engineering. Marcel Dekker, Inc., USA, 1997.
- Cao, Z., Zhang, J., Zeng, J., Sun, L., Xu, F., Cao, Z., Zhang, L., Yang, D. Mesoporous silica hollow sphere (MSHS) for the bioelectrochemistry of horseradish peroxidase. Talanta 77 (2009): 943–947.
- C. G. Zoski, Handbook of Electrochemistry 2007.
- Chen, Ch-Ch., Gu Y. Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin. Biosensors and Bioelectronics 23 (2008): 765–770.
- Cheng, J, Yu, SM, Zuo, P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. water research 40 (2006): 283-290.
- Dai, X., Compton, R. G. Direct Electrodeposition of gold nanoparticles onto indium tin oxide film coated glass: application to the detection of arsenic(III). ANALYTICAL SCIENCES 22 (2006): 567-570.
- Dai, X., Nekrassova, O., Hyde, M. E., Compton, R. G., Anodic stripping voltammetry of arsenic(III) using gold nanoparticle-modified electrodes. Anal. Chem. 76 (2004): 5924-5929.

- Debiemme-Chouvy, Catherine. Template-free one-step electrochemical formation of polypyrrole nanowire array. Electrochemistry Communications 11 (2009): 298–301.
- Du, Y., Luo, X-L., Xu, J-J., Chen, H-Y. A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor Bioelectrochemistry 70 (2007): 342–347.
- Eggins, B. R., Biosensors: An Introduction. John Wiley & Sons Ltd, chichester, 1999.
- El- Deab, M. S., Ohsaka, T. An extraordinary electrocatalytic reduction of oxygen on gold nanoparticles-electrodeposited gold electrodes. Electrochemistry Communications 4 (2002): 288–292.
- El- Deab, M. S., Ohsaka, T. Electrocatalysis by nanoparticles: oxygen reduction on gold nanoparticles-electrodeposited platinum electrodes. Journal of Electroanalytical Chemistry 553 (2003): 107-115.
- ElKaoutit, M., N-R., I., Dominguez, M., Hernandez-Artiga, M. P., Bellido-Milla, D., Cisnerosa, J. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a nafion–sonogel–carbon composite. Electrochimica Acta 53 (2008): 7131–7137.
- ElKaoutit, M., Naggat, A. H., Naranjo-Rodrigueza, I., Dominguezc, M., José, Luis, Hidalgo-Hidalgo, de Cisnerosa. Electrochemical AFM investigation of horseradish peroxidase enzyme electro-immobilization with polypyrrole conducting polymer. Synthetic Metals 159 (2009): 541–545.
- Feng, D., Wang, F., Chen, Z. Electrochemical glucose sensor based on one-step construction of gold nanoparticle–chitosan composite film. Sensors and Actuators B 138 (2009): 539–544.
- Fernandes, KF, Lima, CS, Pinho, H, Collins, CH. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. Process Biochemistry 38 (2003): 1379-1384.

- Garcia-Moreno, E., Ruiz, M.A., Barbas, C., Pingarron, J.M. Determination of organic peroxides in reversed micelles with a poly-N-methylpyrrole horseradish peroxidase amperometric biosensor. *Analytica Chimica Acta* 448 (2001): 9–17.
- Gaspar, S., Habermuller, K., Csoregi, E., Schuhmann W. Hydrogen peroxide sensitive biosensor based on plant peroxidases entrapped in Os-modified polypyrrole films. *Sensors and Actuators B* 72 (2001): 63-68.
- He, X., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, Y., Shi, Y. A new antibody immobilization strategy based on electro-deposition of gold nanoparticles and prussian blue for label-free amperometric immunosensor. *Biotechnol Lett* 29 (2007): 149-155.
- Huang, H., Ran, P., Liu, Zh. Impedance sensing of allergen–antibody interaction on glassy carbon electrode modified by gold electrodeposition. *Bioelectrochemistry* 70 (2007): 257-262.
- Kang, X., Wang, J., Tang, Z., Wub, H., Linb, Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in hybrid organic–inorganic film of chitosan/sol–gel/carbon nanotubes. *Talanta* 78 (2009): 120–125.
- Khaydarov, R. A., Khaydarov, R. R., Gapurova, O., Estrin, Y., Scheper, Th. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *J Nanopart Res* 11 (2009): 1193–1200.
- Kim, Gh-Y., Shim, J., Kang, M-S., Moon, S-H. Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. *Journal of Hazardous Materials* 156 (2008): 141–147.
- Komsiyska, L, Staikov, G. Electrocrystallization of Au nanoparticles on glassy carbon from HClO₄ solution containing [AuCl₄]. *Electrochimica Acta* 54 (2008): 168–172.
- Kong, Y-T, Boopathi, M., Shim, Y-B. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase bonded on a conducting polymer modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2003): 227-232.

- Korkut, S., Keskinler, B., Erhan, E. An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)- horseradish peroxidase nanobiocomposit film for determination of phenol derivatives. Talanta 76 (2008): 1147–1152.
- Law, K. A., Higson, S.P.J. Sonochemically fabricated acetylcholinesterase micro-electrode arrays with in a flow injection analyser for the determination of organophosphate pesticides. Biosensors and Bioelectronics 20 (2005): 1914–1924.
- Li, F., Chen, W., Tang, C., S H. Development of hydrogen peroxide biosensor based on in situ covalent immobilization of horseradish peroxidase by one-pot polysaccharide-incorporated sol-gel process. Talanta 77 (2009): 1304–1308.
- Li, G., Wang, Y., Xu, H. A hydrogen peroxide sensor prepared by electropolymerization of pyrrole based on screen-printed carbon paste electrodes. Sensors 7 (2007): 239-250.
- Li, J., Lin, X., Electrocatalytic oxidation of hydrazine and hydroxylamine at gold nanoparticle—polypyrrole nanowire modified glassy carbon electrode. Sensors and Actuators B 126 (2007): 527–535.
- Li, W, Yuan, R., Chai, Y., Zhou, L., Chen, S., Li, N. Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan/silica sol–gel hybrid membranes for the preparation of hydrogen peroxide biosensor. Biochem. Biophys. Methods 70 (2008): 830–837.
- Liu, Sh-f., Li, X-H., Li, Y-C., Li, Y-F., Li, J-R., Jiang, L. The influence of gold nanoparticle modified electrode on the structure of mercaptopropionic acid self-assembly monolayer. Electrochimica Acta 51 (2005): 427-431.
- Liu, Sh-f., Li, Y-f., Li, J-r., Jiang, L. Enhancement of DNA immobilization and hybridization on gold electrode modified by nanogold aggregates. Biosensors and Bioelectronics 21 (2005): 789-795.
- Liu, Sh-f., Wang, L., Zhao, F. Influence of gold nanoparticle modified electrode on the mediation reduction of ferricyanide by methylene blue. Journal of Electroanalytical Chemistry 602 (2007): 55–60.

- Luo, X., Killard, A. J., Morrin, A. Smyth M. R. Enhancement of a conducting polymer-based biosensor using carbon nanotube-doped polyaniline. *Analytica Chimica Acta* 575 (2006): 39-44.
- Lui, Y-Ch, Yang, K-H. Catalytic electroxidation pathway for electropolymerization of polypyrrole in solutions containing gold nanoparticles. *Electrochimica Acta* 51 (2006): 5376–5382.
- Myler, S., Collyer, S. D., Davis, F., Gornall, D. D., Higson, S.P.J. Sonochemically fabricated microelectrode arrays for biosensors Part III. AC impedimetric study of aerobic and anaerobic response of alcohol oxidase within polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005): 666–671.
- Myler, S., Davis, F., Collyer, S. D., Higson S.P.J.. Sonochemically fabricated microelectrode arrays for biosensors-part II modification with a polysiloxane coating. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004): 408–412.
- Ng, H. Kwok., Lui, H., Penner, R. M. Subnanometer silver clusters exhibiting unexpected electrochemical metastability on graphite. *Langmuir* 16 (2000): 4016-4023.
- Ordeig, O., Banks, C. E., Davies, T. J., Campo, J. D., Munoz, F. X., Compton, R. G. The linear sweep voltammetry of random arrays of microdisc electrodes: Fitting of experimental data. *Electroanalytical Chemistry* 592 (2006): 126–130.
- Orozco, J., Fernández-Sánchez, C., Jiménez-Jorquera, C. Gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays: A suitable transducer platform for the development of biosensors. *Procedia Chemistry* 1 (2009): 666–669.
- Orozco, J., Jiménez-Jorquera, C., Fernández-Sánchez, C. Gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays: A comparative assessment. *Bioelectrochemistry* 75 (2009): 176-181.
- Ozoner, S. K., Erhan E., Yilmaz ,F., Celik, A., Keskinler, B., Newly synthesized poly (glycidylmethacrylate-co-3-thienylmethylmethacrylate)-based electrode designs for phenol biosensors. *Talanta* (2009)

- Pritchard, J., Law, K., Vakurov, A., Millner, P., Higson, S.P.J. Sonochemically fabricated enzyme microelectrode arrays for the environmental monitoring of pesticides. Biosensors and Bioelectronics 20 (2004): 765–772.
- Razola, S. S., Ruiz, B. L., Diez, N. M., Mark, H. B., Jr, Kauffmann, J-M. Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 921-928.
- Reetz, M. T., Helbig, W. Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. Am. Chem. SOC 116. (1994), 1401-1402.
- Rodríguez-Sánchez, L., Blanco, M.C., López-Quintela, M.A. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. Phys. Chem. B 104 (2000), 9683-9688.
- Rodríguez-Sánchez, M. L., Rodríguez, M. J., Blanco, M.C., Rivas, J., López-Quintela, M.A. Kinetic and mechanism of the formation of Ag nanoparticles by electrochemical techniques: A Plasmon and cluster time-resolved spectroscopic study. J. Phys. Chem. B 109 (2005): 1183-1191.
- Rosatto, S. S., Kubota, L. T., Neto, G. D. O. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. Analytica Chimica Acta 390(1999): 65-72.
- Ruzgas, T., Emnéus, J., Gorton, L. Marko-Varka, G. The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds. Analytica Chimica Acta 311(1995): 245-253.
- Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., Marko-Varka, G. Review Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. Analytica Chimica Acta 330(1996): 123-138.
- Ruzgas, T., Gorton, L., Emneus, J., Marko-Varga, G. Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry 391(1995): 41-49.
- Sawyer, D. T., Roberts, Jr. J. L. Experimental electrochemistry for chemists 1979.

- Scheper, T., Khaydarov, R.A., Khaydarov, R.R., Gapurova, O., Estrin, Y., Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. Nanopart Res 11 (2009): 1193–1200.
- Shao, Y., Jin, Y., Wang, J., Wang, L., Zhao, F., Dong, Sh. Conducting polymer polypyrrole supported bilayer lipid membranes. Biosensors and Bioelectronics 20 (2005): 1373–1379.
- Shi, A. W., Qu, F. L., Yang, M. H., Shen, G. L., Yu, R. Q. Amperometric H₂O₂ biosensor based on poly-thionine nanowire/HRP/nano-Au-modified glassy carbon electrode. Sensors and Actuators B 129 (2008): 779–783.
- Shulga, O., Kirchhoff, J.R. An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer. Electrochemistry Communications 9 (2007): 935–940.
- Simm, A. O., Ward-Jones, S., Banks, C. E., Compton, R. G. Novel method for the production of silver microelectrode arrays. Characterisation by atomic force microscopy and application to the eletro-reduction of halothane. Analytical science 21 (2005).
- Sulak, M. T., Erhan, E. Keskinler, B. Amperometric phenol biosensor based on horseradish peroxidase entrapped PVF and PPy composite film coated GC electrode. Appl Biochem Biotechnol (2009): 10.1007/s12010-009-8534-y.
- Tian, F., Xu, B., Zhu, L., Zhu, G. Hydrogen peroxide biosensor with enzyme entrapped within electrodeposited polypyrrole based on mediated sol-gel derived composite carbon electrode. Analytica Chimica Acta 443 (2001): 9–16.
- Tsai, M-C., Chen, P-Y., Voltammetric study and electrochemical detection of hexavalent chromium at gold nanoparticle-electrodeposited indium tin oxide (ITO) electrodes in acidic media. Talanta 76 (2008): 533–539.
- Umanã, M., Walle, J., Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/ polypyrrole system. Anal. Chem 58 (1986): 2979-2983.

- Wang, J., Wang, L., Di, J., Tu, Y. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor. Talanta 77 (2009): 1454-1459.
- Wang, P., Li, S., Kan, J. A hydrogen peroxide biosensor based on polyaniline/FTO. Sensors and Actuators B 137 (2009): 662-668.
- Wang, Y., Deng, J., Di, J., Tu, Y. Electrodeposition of large size gold nanoparticles on indium tin oxide glass and application as refractive index sensor. Electrochemistry Communications 11 (2009): 1034-1037.
- Ward-Jones, S., Simm, A. O., Banks, C. E., Compton, R. C. Acoustically fabricated random microelectrode assemblies. Ultrasonics Sonochemistry 13 (2006): 261-270.
- Welch, C. M., Bank, C. E., Simn, A. O., Compton, R.G. Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide. Anal Bioanal Chem 382 (2005): 12-21.
- Wu, S., Zhao, H., Ju, H., Shi, C., Zhao, J. Electrodeposition of silver-DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. Electrochemistry Communications 8 (2006): 1197-1203.
- Xi, F., Liu, L., Chen, Z., Lin, X. One-step construction of reagentless biosensor based on chitosan-carbon nanotubes-nile blue-horseradish peroxidase biocomposite formed by electrodeposition. Talanta 78 (2009): 1077-1082.
- Xiao, L., Streeter, I., Wildgoose, G. G., Compton, R. G. Fabricating random arrays of boron doped diamond nano-disc electrodes: Towards achieving maximum Faradaic current with minimum capacitive charging. Sensors and Actuators B 133 (2008): 118-127.
- Xu, J-Z, Zhang, Y., Li, G-X, Zhu, J-J. An electrochemical biosensor constructed by nanosized silver particles doped sol-gel film. Materials Science and Engineering C 24 (2004): 833-836.

- Xu Q, Mao C, Liu N-N , Zhu J-J , Sheng J . Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan–gold nanoparticle nanocomposite. Biosensors and Bioelectronics (2006)
- Yang, M., Qu, F., Lu, Y., He, Y., Shen, G., Yu, R., Platinum nanowire nanoelectrode array for the fabrication of biosensors. Biomaterials 27 (2006): 5944–5950.
- Yang, Y., Mu, Sh. Bioelectrochemical responses of the polyaniline horseradish peroxidase electrodes. Journal of Electroanalytical Chemistry 432 (1997): 71-78.
- Yang, Y., Yang, G., Huang ,Y., Bai, H., Lu, X. A new hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoelectrode ensembles/ multiwalled carbon nanotubes/ chitosan film-modified electrode. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 340 (2009): 50–55.
- Zeng, X., Li, X., Xing, L., Liu, X., Luo, Sh. Electrodeposition of chitosan-ionic liquid-glucose oxidase biocomposite onto nano-gold electrode for amperometric glucose sensing. Biosensors and Bioelectronics 24 (2009): 2898-2903.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

ข้อมูลผลการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ก.1 ขนาดอนุภาคนาโนทอง

อนุภาคทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด โดยใช้สารละลายไฮโดรเจน เตตระคลอโรออร์เทอโรไตรไฮไดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.1-1 มิลลิโมลต่อลิตร ใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 5 30 และ 60 วินาที ตามลำดับ

ตารางที่ ก.1 เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด ในสารละลายไฮโดรเจน เตตระคลอโรออร์เทอโรไตรไฮไดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร ใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เวลาต่างๆ

เส้นผ่านศูนย์กลาง	ความถี่		
	5 วินาที	30 วินาที	60 วินาที
0-30	136	1054	623
31-60	162	922	846
61-90	42	26	301
91-120	15	14	140
120-150	9	0	24
151-180	3	0	1

ตารางที่ ก.2 เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคทองบนกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด ในสารละลายไฮโดรเจน เตตระคลอโรออร์เทอโรไตรไฮไดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.5 มิลลิโมลต่อลิตร ใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เวลาต่างๆ

เส้นผ่านศูนย์กลาง	ความถี่		
	5 วินาที	30 วินาที	60 วินาที
0-30	765	114	196
31-60	567	453	267
61-90	48	415	112
91-120	8	30	57
120-150	2	1	56
151-180	0	0	55

ตารางที่ ก.3 เส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคทองบนกลาสสึคาร์บอนอิเล็กโทรด ในสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรออร์เตไตรไฮไดรด์ ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1 มิลลิโมลต่อลิตร ใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เวลาต่างๆ

เส้นผ่าศูนย์กลาง	ความถี่		
	5 วินาที	30 วินาที	60 วินาที
0-30	1093	143	24
31-60	2323	366	89
61-90	132	376	81
91-120	4	251	119
120-150	4	53	146
151-180	0	21	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.2 การดัดแปลงอิเล็กโทรดแต่ละชนิด

การวัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05 โวลท์ หน่วยของสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นนาโนแอมแปร์ (nA) ของการดัดแปลงอิเล็กโทรดแต่ละชนิด

ตารางที่ ก.4 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรด (นาโนแอมแปร์)

BARE	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
PBS	-19.203	-15.560	-14.810	-16.524	2.350	-14.221
H ₂ O ₂	-16.528	-15.274	-15.034	-15.612	0.802	-5.139
Phenol	-15.007	-13.474	-13.188	-13.890	0.978	-7.043
H ₂ O ₂ / Phenol	-22.594	-21.306	-20.978	-21.626	0.854	-3.950

ตารางที่ ก.5 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกอนุภาคทอง (นาโนแอมแปร์)

GOLD	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
PBS	-33.630	-31.944	-30.103	-31.893	1.764	-5.531
H ₂ O ₂	-135.048	-89.708	-65.951	-96.902	35.105	-36.228
Phenol	-36.346	-34.730	-32.749	-34.609	1.802	-5.206
H ₂ O ₂ / Phenol	-57.723	-50.317	-46.258	-51.433	5.813	-11.303

ตารางที่ ก.6 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกฟิล์มพอลิไพร์รอล (นาโนแอมแปร์)

Pyrrole	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
PBS	-21.023	-20.619	-20.204	-20.615	0.409	-1.985
H ₂ O ₂	-78.214	-46.560	-37.491	-54.088	21.380	-39.527
Phenol	-31.132	-26.720	-25.196	-27.683	3.083	-11.137
H ₂ O ₂ / Phenol	-25.622	-23.725	-23.302	-24.217	1.235	-5.101

ตารางที่ ก.7 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกอนุภาคทอง/ พอลิไพร์รอล (นาโนแอมแปร์)

GOLD/PPy	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
PBS	-34.896	-33.844	-33.459	-34.066	0.744	-2.184
H ₂ O ₂	-42.839	-40.829	-39.587	-41.085	1.641	-3.994
Phenol	-46.056	-42.822	-40.545	-43.141	2.769	-6.419
H ₂ O ₂ /Phenol	-107.738	-67.700	-57.272	-77.570	26.641	-34.345

ตารางที่ ก.8 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกฟิล์มพอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (นาโนแอมแปร์)

HRP/PPy	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
PBS	-17.482	-17.116	-16.806	-17.135	0.338	-1.974
H ₂ O ₂	-26.046	-24.107	-22.806	-24.320	1.630	-6.704
Phenol	-31.343	-25.289	-23.241	-26.624	4.213	-15.823
H ₂ O ₂ / Phenol	-258.848	-175.781	-159.690	-198.106	53.215	-26.862

ตารางที่ ก.9 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกอนุภาคทอง/ พอลิไพร์รอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (นาโนแอมแปร์)

GOLD/HRP/PPy	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
PBS	-63.518	-60.486	-58.735	-60.913	2.420	-3.972
H ₂ O ₂	-160.495	-121.710	-100.017	-127.407	30.639	-24.048
Phenol	-79.973	-75.058	-73.073	-76.035	3.552	-4.672
H ₂ O ₂ / Phenol	-1020.048	-613.300	-831.914	-821.754	203.564	-24.772

ก.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นของพอลิไพรอลต่างๆ

เทคนิคแอมเพอโรเมตรีที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05 โวลท์ หน่วยของสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นนาโนแอมแปร์ (nA) โดยก่อนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันระหว่างพอลิไพรอลและเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส จะทำการสังเคราะห์อนุภาคของก่อนทุกครั้ง ความเข้มข้นของพอลิไพรอลมอโนเมอร์ 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11 และ 0.13 โมลต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ ก.10 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกอนุภาคของ/พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (นาโนแอมแปร์)

	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
0.03 M	-374.257	-300.505	-250.062	-308.275	62.461	-20.262
0.05 M	-972.714	-707.062	-831.914	-837.230	132.906	-15.874
0.07 M	-1878.476	-1478.524	-1241.524	-1532.841	321.931	-21.002
0.09 M	-2026.952	-1439.524	-1249.714	-1572.063	405.216	-25.776
0.11 M	-1316.857	-1039.429	-1675.238	-1343.841	318.763	-23.720
0.13 M	-1440.000	-1192.190	-890.500	-1174.230	275.190	-23.436

ก.4 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่จำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส

เทคนิคแอมเพอโรเมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.05 โวลท์ หน่วยของสัญญาณทางไฟฟ้าเป็นนาโนแอมแปร์ (nA) โดยก่อนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันระหว่างพอลิไพรอล และเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส จะทำการสังเคราะห์อนุภาคทองก่อนทุกครั้ง จากจำนวนรอบของการสังเคราะห์พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 5, 10, 15, 20 และ 25 รอบ ตามลำดับ

ตารางที่ ก.11 กระแสไฟฟ้าของกลาสคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการปลูกอนุภาคทอง/ พอลิไพรอล/ เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (นาโนแอมแปร์)

cycle	I(1)	I(2)	I(3)	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
5 cycle	-1784.52	-1494.62	-1286.762	-1521.968	250.005	-16.427
10 cycle	-2307.48	-1876.29	-1675.238	-1953.000	323.025	-16.539
15 cycle	-2026.95	-1439.52	-1249.714	-1572.063	405.216	-25.776
20 cycle	-1176.81	-925.886	-821.619	-974.771	182.572	-18.729
25 cycle	-867.338	-702.567	-613.214	-727.706	128.914	-17.715

ก.5 calibration curve ความเข้มข้นของฟีนอล โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
 ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี
 ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลท์

ความเข้มข้นฟีนอล (μM)	I (nA)
1	-1052.545
10	-1050.364
30	-1136.091
50	-1279.364
70	-1399.273
90	-1600.545
110	-1763.182
130	-1840.000
150	-2048.545
170	-2228.364
190	-2298.000
210	-2390.000
250	-2414.364
500	-2751.727
1000	-3036.455

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.6 การนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability) โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค แอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์

No.	I(nA)
1	-836.500
2	-740.700
3	-668.600
4	-628.700
5	-605.500
6	-592.700
7	-585.000
8	-573.400
9	-572.800
10	-564.300
avg	-6.37E-07
SD	8.87E-08
RSD	-13.921

ก.7 การผลิตซ้ำ (reproducibility) โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์

No.	I (nA)
1	-1003.484
2	-918.167
3	-1107.062
4	-851.786
5	-891.713
avg	-954.442
SD	101.842
RSD	-10.670

ก.8 การจัดเก็บ (storage stability) โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร วัดกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมตรี ความต่างศักย์ที่ -0.05 โวลต์

วัน	I(nA)
1	-1151.480
3	-786.880
5	-366.550
10	-203.550
15	-189.100
30	-176.700

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

Conference

ยุทธาน ดาไธ้ะ, ชัญชนา ธนชยานนท์ และ สี่รุ่ง ปรีชานนท์ “การสังเคราะห์ไมโครอิเล็กทรอนิกส์
อาร์เรย์ของเงินโดยวิธีไฟฟ้าเคมี” การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย
ครั้งที่ 19 ความร่วมมือทางการวิจัยระหว่างภาคการศึกษาและภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย
ไทย ระหว่างวันที่ 26-27 ตุลาคม 2552 ณ เฟลิกซ์ ริเวอร์ แคว รีสอร์ท จ.กาญจนบุรี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19
 ความร่วมมือทางการวิจัยระหว่างภาคการศึกษาและภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย
 Research Cooperation Between Academies and Industries in Thailand

วันที่ 26-27 ตุลาคม 2552 ณ เฟลิกซ์ ริเวอร์ แคว รีสอร์ท กาญจนบุรี



ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
 มหาวิทยาลัยศิลปากร

โดยมีเกียรติเป็นเจ้าภาพร่วมกับ

สมาคมวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย

เมื่อจัดการประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19 ประจำปี 2552
 ระหว่างวันที่ 26-27 ตุลาคม 2552 ณ เฟลิกซ์ ริเวอร์ แคว รีสอร์ท กาญจนบุรี

การสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยวิธีไฟฟ้าเคมี

ยุสราน ดาโอ๊ะ¹ ชัญชนา ธนชยานนท์² และ สิริง ปรีชานนท์^{1,*}

1) ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

2) ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

E-mail address: seeroong.p@chula.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยวิธีไฟฟ้าเคมี (electrochemical deposition) โดยทำการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการให้ศักย์ไฟฟ้า (0-30 วินาที) ต่อการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยทำการวิเคราะห์ผลการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry ร่วมกับทดสอบลักษณะพื้นผิวด้วยเทคนิค AFM ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้เวลาในการปลูกอนุภาคเงินด้วยวิธีไฟฟ้าเคมีเพียง 5 วินาที สามารถที่จะสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินบนพื้นผิว glassy carbon ได้ และเมื่อทำการทดสอบไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินด้วยเทคนิค cyclic voltammetry พบว่าเมื่อใช้เวลาในการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินเพิ่มขึ้น จะสามารถวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน ทั้งนี้ผลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานทางไบโอเซนเซอร์

1. บทนำ

การศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของโลหะเป็นสิ่งที่ไม่ได้รับความสนใจกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งอนุภาคของโลหะเหล่านี้จะมีคุณสมบัติที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) จะช่วยลดกิจกรรมการนำไฟฟ้า (conductivity) นอกจากนี้อนุภาคของโลหะจะช่วยในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนบริเวณพื้นผิวของอิเล็กโทรดด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาวិธีการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยเปรียบเทียบกัน 2 วิธีคือวิธีอัลตราซาวด์ (ultrasound) และวิธีไฟฟ้าเคมี (electrochemical deposition) เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของซาลิไซลีน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ออกมาจะมีลักษณะที่คล้ายกัน [1] นอกจากนี้ได้ศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของอนุภาคโลหะ คือ บิสมัท เงิน คอปเปอร์และสังกะสี โดยใช้วิธีอัลตราซาวด์ (ultrasound) พบว่าบิสมัท เงิน คอปเปอร์และสังกะสีสามารถเกาะติดบนอิเล็กโทรดได้ และยังพบอีกว่าไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินสามารถตรวจวัดสารหนู (arsenic) และไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของบิสมัทสามารถตรวจวัดแคดเมียมได้ [2]

การศึกษาไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของอนุภาคโลหะในงานไบโอเซนเซอร์มีปรากฏรายงานอยู่บ้าง โดยได้มีการศึกษาการปรับปรุงอัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์โดยนำอนุภาคของทองคำมาเกาะติดกับอิเล็กโทรดที่เป็นอัลตราไมโครอิเล็กโทรดโดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมี

(electrochemical deposition) แล้วตรึงรูบิโพรเนอซิม HRP เพื่อตรวจวัด catechol อัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของทองคำสามารถเพิ่มความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) เมื่อเปรียบเทียบกับอัลตราไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ และไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ [3]

วิธีการในการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์เงินสามารถสังเคราะห์ได้หลากหลายวิธี ตัวอย่างเช่น การใช้วิธีระเหิดด้วยเลเซอร์ (laser ablation) การฉายรังสีแกมมา (gamma irradiation) การใช้ปฏิกิริยารีดักชันทางเคมี (chemical reduction) การใช้ปฏิกิริยาเคมีแสง (photochemical method) และการใช้รังสีไมโครเวฟ (microwave process) เป็นต้น ซึ่งในการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธีไฟฟ้าเคมีในการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยมีข้อดีคือสามารถสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่มีความบริสุทธิ์ และสามารถที่จะควบคุมขนาดของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมขนาดของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้น วิตามินซีซึ่งเอเจนท์ และตัวทำละลาย เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาสภาวะของการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินด้วยวิธีไฟฟ้าเคมี (electrochemical deposition) เพื่อการนำไปใช้งานในไบโอเซนเซอร์

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์

การทดลองทางไฟฟ้าเคมีวิธี cyclic voltammetry ใช้อิเล็กโทรด 3 อิเล็กโทรด เป็นองค์ประกอบคือใช้ glassy carbon เป็นอิเล็กโทรดใช้งาน (working electrode) ส่วน Ag/AgCl เป็นอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) และแพลทินัมเป็นอิเล็กโทรดเคาน์เตอร์ (counter electrode) เครื่อง Glucoson potentiostat (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2.2 การสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน

การสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน โดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมี (electrochemical deposition) บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดใช้งาน ในการเตรียมอิเล็กโทรดโดยใช้ทองลุ่มีขนาด 0.3 ไมครอน และ 0.05 ไมครอน ชนิดอิเล็กโทรดเป็นเวลา 5 นาที และใช้เอทานอลและน้ำทำความสะอาด ด้วยเครื่อง ultrasonic cleaner (CREST, model D, มาเลเซีย) เป็นเวลา 5 นาที

การเตรียมสารละลายประกอบด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมเปอร์คลอเรต (TBAP) 0.1 โมลต่อลิตร และซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) 1 มิลลิโมลต่อลิตร ในสารละลายอะซิโตนไนไตรด์ (MeCN) ทำการทดลองโดยใช้วิธี electrodeposition เป็นเวลา 0-30 วินาที โดยใช้ความต่างศักย์ -0.5 โวลต์ [1]

2.3 การวิเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ทางกายภาพ

ภาพ optical microscopy บนพื้นที่ 410 x 550 ไมครอน ของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินบนอิเล็กโทรดใช้งานและลักษณะพื้นผิวไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินด้วยเทคนิค atomic force microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง scanning probe microscope (Veeco, nanoscope IV, สหรัฐอเมริกา) เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิว

2.4 การทดสอบไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมี

การทดสอบไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินทางไฟฟ้าเคมีด้วยวิธี cyclic voltammetry ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้ scan rate ที่ 75 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ใช้ความต่างศักย์ระหว่าง -0.5 ถึง 0.5 โวลต์

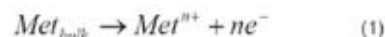
3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน

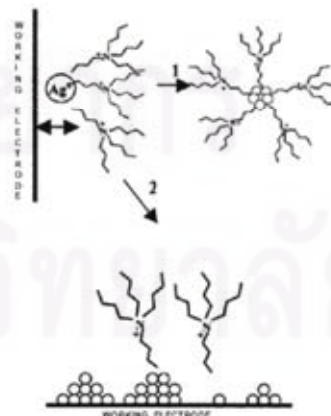
ในการศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมี บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดใช้งานสามารถเตรียมโดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 โมลต่อลิตร ของ TBAP และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร ของซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) ในสารละลายอะซิโตนไนไตรด์

ทำการทดลองที่ความต่างศักย์ -0.5 โวลต์ โดยจากการศึกษาหน้าที่ของสารเคมีที่นำมาใช้ ซึ่งในการทดลองโดยวิธีดังกล่าวนี้จะใช้อะซิโตนไนไตรด์เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากอะซิโตนไนไตรด์เป็นตัวทำละลายชนิดอะโพรติก (aprotic solvent) เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีไฮโดรเจนอะตอมชนิดที่มีความเป็นกรด และไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน ตัวอย่างตัวทำละลายชนิดนี้ เช่น เบนซีน ไซโคลเฮกเซน คลอโรฟอร์ม อะซิโตน อะซิโตนไนไตรด์ อีเธอร์ เป็นต้น ซึ่งจะไม่ทำให้อิออนของโลหะเงินรวมตัวกับตัวทำละลาย และ TBAP เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ซึ่งเมื่อละลายในตัวทำละลายแล้วสามารถนำไฟฟ้าได้ เนื่องจากมีอิออนซึ่งเป็นอิออนบวกหรืออิออนลบเคลื่อนที่อยู่ในสารละลาย นอกจากนี้ TBAP ยังทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) ซึ่งช่วยให้อิออนของเงินอยู่ในลักษณะที่เป็นคอลลอยด์ในสารละลายได้

ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคโลหะต่างๆ โดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมีสามารถแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการคือ การฟอร์มตัวของอนุภาคโลหะ และการเกิดเป็นอนุภาคโลหะ ตามสมการดังนี้ [4]



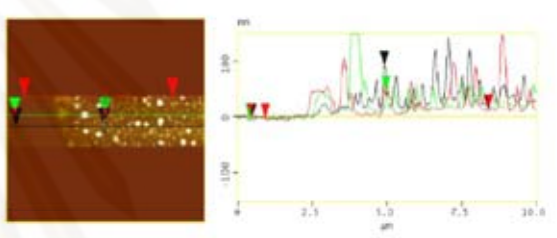
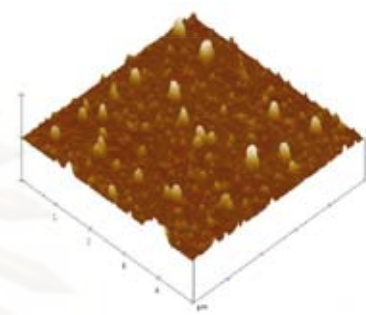
สำหรับการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมีจะมีลักษณะการฟอร์มตัวที่เกิดขึ้นเป็นไปตามสมการด้านบนเช่นเดียวกัน โดยมีกลไกการเกิดขึ้นของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินสามารถอธิบายได้ตามรูปที่ 1 [5]



รูปที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมี (1) การฟอร์มตัวของคอลลอยด์เงิน (2) การเกิดไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน [5]

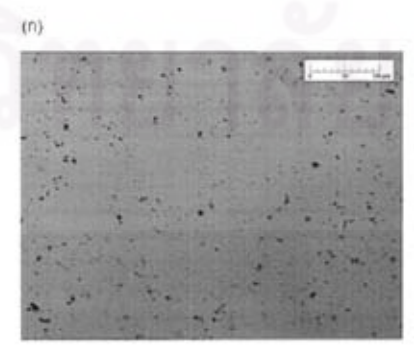
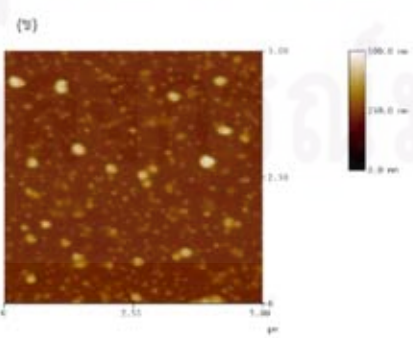
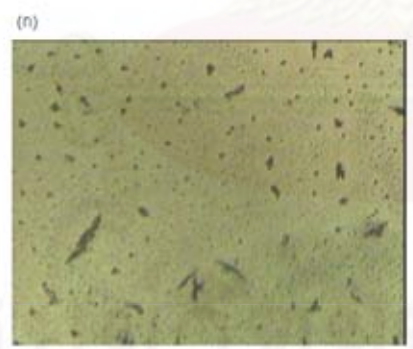
3.2 การศึกษาลักษณะพื้นผิวด้วยเทคนิค AFM

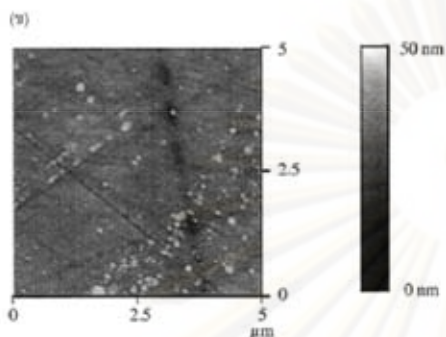
ในการศึกษาลักษณะพื้นผิวด้วยเทคนิค AFM หรือ atomic force microscopy โดยศึกษาพื้นผิวของ glassy carbon อิเล็กโทรดที่ถูกปลูกด้วยอนุภาคเงิน โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 โมลต่อลิตร ของ TBAP และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร ของซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃) ในสารละลายอะซิโตนไนเตรด ทำการทดลองที่ความต่างศักย์ -0.5 โวลต์ ใช้เวลาที่แตกต่างกันระหว่างเวลา 0-30 วินาที ในการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินโดยใช้วิธีไฟฟ้าเคมี พบว่าเมื่อทำการให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเพียง 5 วินาที สามารถสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งมีลักษณะภาพที่เกิดขึ้นจากการศึกษาไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่เกิดขึ้นในครั้งนั้น พบว่ามีการกระจายตัวทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ทั่วพื้นผิวอิเล็กโทรดใช้งาน ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งสามารถวัดค่าเฉลี่ยของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่เกิดขึ้นได้ โดยไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่มีขนาดใหญ่มีค่าความสูงเฉลี่ยคือ 396 นาโนเมตร มีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยคือ 233 นาโนเมตร และมีไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินเกิดขึ้น 1.20×10^6 อนุภาคต่อตารางเซนติเมตร นอกจากนี้สามารถตรวจวัดความหนาที่เกิดขึ้นของชั้นฟิล์มคือ 14.03 นาโนเมตร



รูปที่ 2 ภาพ (ก) optical microscopy บนพื้นที่ 410 x 550 ไมครอน (ข) AFM ของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินบนอิเล็กโทรดใช้งาน 2 มิติ 3 มิติ และความหนาที่เกิดขึ้น เมื่อผ่านการสังเคราะห์ (electrodeposition) เป็นเวลา 5 วินาที โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 โมลต่อลิตร ของ TBAP และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร ของซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃) ในสารละลายอะซิโตนไนเตรด ทำการทดลองที่ความต่างศักย์ -0.5 โวลต์

จากการศึกษาการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Simm และคณะ 2005 ตามรูปที่ 3 ที่ทำการศึกษากการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินบน glassy carbon ซึ่งใช้สารละลายที่มีอนุภาคของเงินปริมาณ 0.05 กรัม ในสารละลายออกเทนโดยใช้วิธีอัลตราซาวด์เป็นเวลา 60 วินาที และพบว่าไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินเกิดขึ้น 185,000 อนุภาคต่อตารางเซนติเมตร โดยพบว่ามีการกระจายตัวเกิดเป็นไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์เกิดขึ้นทั่วอิเล็กโทรด

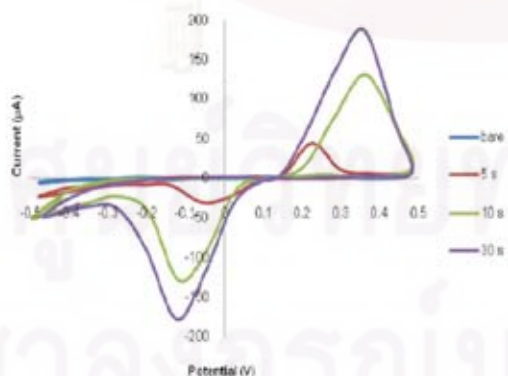




รูปที่ 3 ภาพ (ก) optical microscopy ขนาดพื้นที่ 400 x 540 ไมครอน (ข) AFM ของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินบนอิเล็กโทรดไร้ฐานโดยใช้อิทธิพลความยาวคลื่นเป็นเวลา 1 นาที [1]

3.3 การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค cyclic voltammetry

การศึกษาการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร โดยใช้ scan rate ที่ 75 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ใช้ความต่างศักย์ระหว่าง -0.5 ถึง 0.5 โวลต์ พบว่าเมื่อเวลาที่ใช้ในการทำการสังเคราะห์ไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่ 5, 10, 30 วินาที กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่ามากขึ้นตามลำดับตามรูปที่ 4 ซึ่งเกิดจากการมีจำนวนไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินเกิดขึ้นและมีการกระจายตัวของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน เนื่องจากไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินมีสมบัติการนำไฟฟ้า (conductivity) ช่วยในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนบริเวณพื้นผิวของอิเล็กโทรด ทำให้สามารถวัดกระแสได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 4 cyclic voltammetry ของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน ที่เวลาในการสังเคราะห์ 5, 10, 30 วินาที ตามลำดับ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร โดยใช้ scan rate ที่ 75 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ใช้ความต่างศักย์ระหว่าง -0.5 ถึง 0.5 โวลต์

4. สรุปผลการทดลอง

การใช้วิธีไฟฟ้าเคมี (electrochemical deposition) สามารถทำให้ออกภาคของเงินมาเกาะบนพื้นผิวของบนพื้นผิวของอิเล็กโทรดไร้ฐานได้เป็นอย่างดี และเกิดเป็นไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน ซึ่งในการศึกษาใช้ glassy carbon electrode เป็นอิเล็กโทรดไร้ฐาน โดยสามารถศึกษาสมบัติทางกายภาพของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินที่เกิดขึ้นโดยใช้อะตอมิฟอร์ซไมโครสโคปี (AFM) เพื่อศึกษาความขรุขระ (roughness) ของพื้นผิว และสามารถทำให้กระแสที่เกิดขึ้นมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลานานในการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเนื่องจากการนำไฟฟ้า (conductivity) ที่ดีของไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงิน นอกจากนี้ การศึกษาไมโครอิเล็กโทรดอาร์เรย์ของเงินสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสำหรับพีแอลเอไอเซนเซอร์

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] Simm A. O., Ward-Jones S., Banks C. E., Compton R. G. Novel method for the production of silver microelectrode arrays. Characterisation by atomic force microscopy and application to the electro-reduction of haloethane. *Analytical science* 21 (2005).
- [2] Ward-Jones S., Simm A. O., Banks C. E., Compton R. G. Acoustically fabricated random microelectrode assemblies. *Ultrasonics Sonochemistry* 13 (2006): 261-270.
- [3] Orozco J., Jiménez-Jorquera C., Fernández-Sánchez C. Gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays for biosensing: A comparative assessment. *Bioelectrochemistry* 75 (2009): 176-181.
- [4] Reetz M. T., Helbig W. J. Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. *J Am Chem Soc* 116 (1994): 7401-7406.
- [5] Rodríguez-Sánchez L., Blanco M. C., López-Quintela M. A. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *J Phys Chem B* 104 (2000): 9683-9688.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายยุทธวาน ดาไช้ะ เกิดวันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ.2528 จังหวัด นราธิวาส สำเร็จการศึกษา ระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนนราธิวาส และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยสำเร็จการศึกษา ในปีการศึกษา 2550 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย