

## รายงานฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2542

การพัฒนา กลูโคสเซนเซอร์โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  และใช้คอมโพสิทพอลิเมอร์ฟิล์ม

Development of Glucose Sensor by Using  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  and Composit  
Polymer Films

ผศ. ดร.อรรรณ ชัยลภากุล

## บทที่ 1

### บทนำ

ในทางการแพทย์ การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดเป็นสิ่งสำคัญมากในการวินิจฉัยและรักษาโรคเบาหวาน<sup>1,2,3</sup> ดังนั้นเทคนิคและวิธีการตรวจสอบจึงเป็นสิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาให้สามารถตรวจวัดกลูโคสได้แม้ในปริมาณน้อย โดยต้องให้ได้ค่าที่ถูกต้อง แม่นยำและหลีกเลี่ยงจากสิ่งรบกวน (interference) ได้ ในปัจจุบันมีวิธีจำนวนมากที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส เทคนิคทางด้านเคมีไฟฟ้า (electrochemistry) ก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณกลูโคสซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุล โดยอาศัยหลักการของเอนไซม์อิเล็กโทรด (enzyme electrode) เอนไซม์จะถูกตรึงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดเพื่อตรวจสอบหาปริมาณกลูโคส โดยจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจง การตรึงเอนไซม์ลงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดสามารถทำได้หลายวิธี ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการกัก<sup>4</sup> (entrapment) เอนไซม์ไว้ในฟิล์มพอลิเมอร์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ทำลายสมบัติของเอนไซม์ นอกจากนี้ฟิล์มพอลิเมอร์ที่ปิดทับชั้นของเอนไซม์ยังทำหน้าที่เหมือนเป็นเยื่อเลือกผ่าน ช่วยกีดกันตัวรบกวนไม่ให้ผ่านเข้ามาที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดโดยอาศัยหลักการกักขนาดหรือการผลักรันของประจุ<sup>5</sup> พอลิเมอร์ที่นิยมใช้มักเป็น conducting polymer<sup>6</sup> เนื่องจากสามารถเตรียมให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆได้โดยควบคุมเวลาที่จะทำให้เกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน (electropolymerization) ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ได้แก่ polypyrrole, polyindole, polyaniline และ poly(*N*-methylpyrrole) สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ poly(*N*-methylpyrrole) เพราะให้ฟิล์มที่มีเสถียรภาพสูง<sup>7,8</sup>

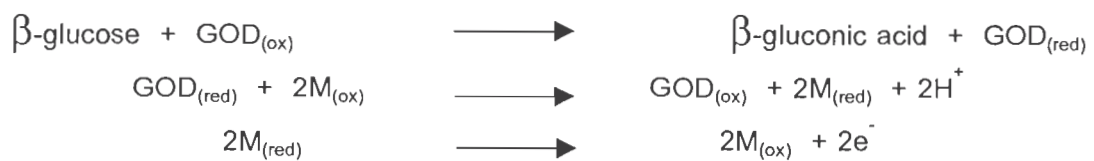
กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการหาปริมาณกลูโคส เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส หรือที่นิยมเรียกว่า GOD จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (gluconic acid) ดังสมการ<sup>9,10</sup>



ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดส์ต่อที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรด ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของกลูโคส ดังสมการ<sup>9</sup>



ในกรณีนี้ออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน (mediator) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนจะต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.7 โวลต์ ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรด ซึ่งที่ศักย์ไฟฟ้าง่านี้สามารถทำให้สารบางชนิดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และให้สัญญาณทางไฟฟ้าได้เช่นเดียวกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ยกตัวอย่างเช่น กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดยูริก (uric acid) และ อะเซตามิโนเฟน<sup>11,12,13</sup> (acetaminophen) ซึ่งสารเหล่านี้มักจะเจือปนอยู่ในเลือด ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสได้ค่ามากกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงประสิทธิภาพของกลูโคสเซนเซอร์ โดยใช้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนชนิดอื่นแทนการใช้ออกซิเจน เพื่อให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำลง ส่งผลให้ช่วยลดปัญหาจากตัวรบกวนต่าง ๆ ได้ ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนหลายชนิดจึงได้ถูกนำมาทดลองใช้แทนออกซิเจน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น<sup>14</sup> คือ



โดยที่  $\text{GOD}_{(\text{ox})}$  และ  $\text{GOD}_{(\text{red})}$  คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่อยู่ในรูปออกซิไดส์และรีดิวซ์ตามลำดับ  $\text{M}_{(\text{ox})}$  และ  $\text{M}_{(\text{red})}$  คือ ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนซึ่งอยู่ในรูปออกซิไดส์และรีดิวซ์ตามลำดับ

ในปี 1988 Nicole และ Christopher<sup>15</sup> เลือกเฟอร์โรซีน (ferrocene) และอนุพันธ์ เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนในการสร้างกลูโคสเซนเซอร์ เนื่องจากมีค่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันค่อนข้างต่ำ คือ อยู่ระหว่าง +0.1 โวลต์ ถึง -0.4 โวลต์ เมื่อเทียบกับ saturated calomel electrode (SCE) แต่ปัญหาที่เกิดขึ้น คือ กลูโคสเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นมีเสถียรภาพ (stability) ต่ำ เนื่องจากเฟอร์โรซีนจะละลายออกมาจากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ได้ง่าย ทำให้สัญญาณการตอบสนองลดลงอย่างรวดเร็ว

ต่อมาในปี 1991 Yoshio<sup>16</sup> และคณะทดลองใช้ไฮโดรเจนควิโนนซัลโฟเนต (hydroquinonesulfonate:HQs) ซึ่งมีค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบมากกว่าเฟอร์โรซีนคาร์บอกซิเลตไอออน (ferrocenecarboxylate ions) เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยได้ทำการตรึง HQs และ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้ฟิล์ม polypyrrole พบว่า HQs จะถูกดูดซับ (adsorp) อยู่บน

ชั้นโปรตีนของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ทำให้ระยะห่างระหว่างรีดอกซ์เซนเตอร์ (redox center) ของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับ HQS สั้นลง ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนเกิดได้ดีขึ้น ส่วนในปี 1992 Bartlett<sup>17</sup> และคณะได้ใช้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนเป็นเฟอร์โร-เฟอร์ริไซยาไนด์ (ferro-ferricyanide) ซึ่งทำการตรึงโดยใช้ฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลพบว่าสามารถวัดกลูโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้า +0.45 โวลต์ เมื่อเทียบกับ SCE จากการทดลองพบว่าเฟอร์โร-เฟอร์ริไซยาไนด์และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะเกิดการแข่งขันกันในการเข้าไปอยู่ภายในฟิล์มพอลิเมอร์ นั่นคือถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์เข้าไปอยู่ในฟิล์มได้มากขึ้นแต่เฟอร์โร-เฟอร์ริไซยาไนด์จะเข้าไปอยู่ภายในฟิล์มน้อยลง

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการสร้างกลูโคสเซนเซอร์ ซึ่งตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนแต่ละชนิด มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป สำหรับเฟอร์โรซีนและอนุพันธ์ เช่น เฟอร์โรซีนคาร์บอกซิเลตไอออนจะละลายออกมาจากแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ได้ง่าย ทำให้กลูโคสเซนเซอร์มีเสถียรภาพต่ำ ส่วนเฟอร์โร-เฟอร์ริไซยาไนด์มีข้อเสีย คือเฟอร์โร-เฟอร์ริไซยาไนด์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ทำให้เกิดการแข่งขันทับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งมีประจุเป็นลบเช่นเดียวกันในการเข้าไปอยู่ภายในฟิล์ม สำหรับในกรณีที่ใช้ HQS ซึ่งมีประจุเป็นลบก็ประสบปัญหาการแข่งขันทับระหว่างเอนไซม์กับตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนเช่นกัน นอกจากนี้ เซนเซอร์ที่ใช้ HQS เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนยังมีเสถียรภาพต่ำด้วย สำหรับการใส่เฟอร์โรซีนจะมีปัญหาเนื่องมาจากมีค่าการละลายต่ำและมีรูปออกซิไดส์ที่ไม่ค่อยเสถียร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้เฮกซะแอมมีนรูทีเนียม (III) คลอไรด์<sup>18</sup> ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ ) เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน เนื่องจากมีค่าการละลายสูงและมีความเสถียรพอสมควรเมื่อละลายน้ำ ศักย์ไฟฟ้าของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมีค่าประมาณ -0.2 โวลต์ เมื่อเทียบกับ SCE และสามารถออกซิไดส์เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในรูปรีดิวซ์ให้กลับไปอยู่รูปออกซิไดส์ได้ นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของคูรีดอกซ์ของรูทีเนียมยังเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้

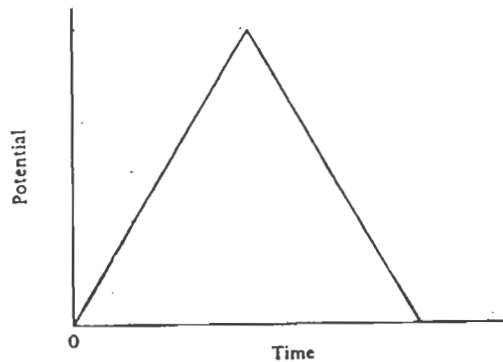
ในงานวิจัยนี้ จะทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเฮกซะแอมมีนรูทีเนียม(III) คลอไรด์ ลงในฟิล์มพอลิไพโรล และพอลิเอินเมทิลไพโรล โดยจะมีการเคลือบผิวหน้าของอิเล็กโทรดก่อนด้วยเนฟิออน(nafion) ซึ่งเนฟิออนมีประจุเป็นลบจะช่วยในการยึดรูทีเนียมที่มีประจุเป็นบวกได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล เพื่อตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเฮกซะแอมมีนรูทีเนียม (III) คลอไรด์ เพื่อให้ได้กลูโคสเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งศึกษาหาสมบัติของกลูโคสเซนเซอร์ที่สร้างขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

## บทที่ 2

### ทฤษฎี

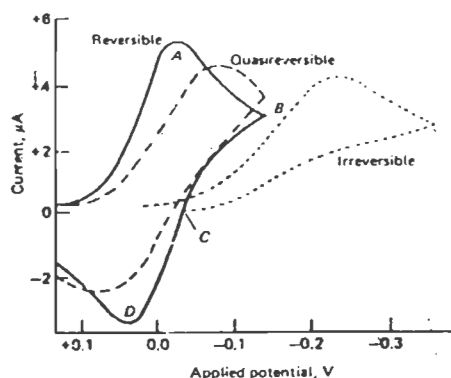
#### 2.1 ไชคลิกโวลแทมเมตรี (Cyclic Voltammetry)

ในการทำไชคลิกโวลแทมเมตรี<sup>14,19</sup> ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แกเซลล์จะมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมหน้าจั่ว แสดงดังรูปที่ 2.1 คือเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นศักย์ไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นจนถึงค่าหนึ่ง จากนั้นจะค่อย ๆ ลดต่ำลงด้วยอัตราเร็วที่เท่ากันจนถึงค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นของการสแกนเป็นได้ทั้งค่าบวกและลบ



รูปที่ 2.1 แสดงโวลเทจโปรแกรมของไชคลิกโวลแทมเมตรี

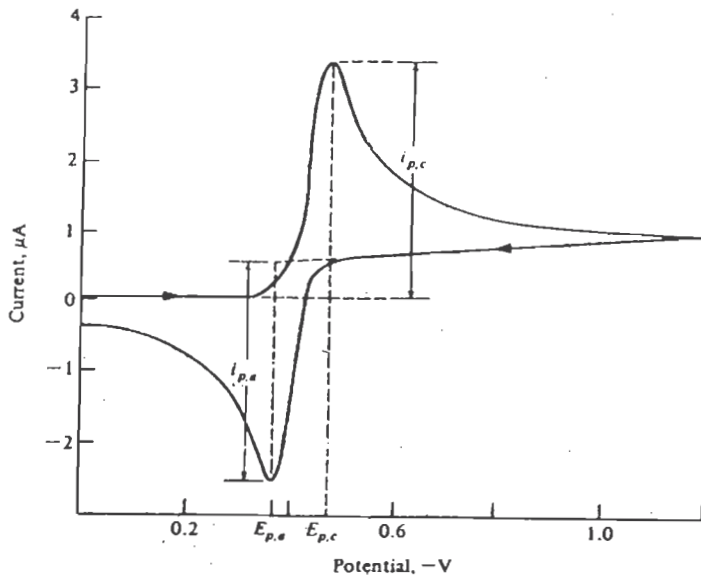
เมื่อเริ่มสแกนศักย์ไฟฟ้าจะเริ่มมีกระแสเกิดขึ้น เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าถึงค่าค่าหนึ่ง (ถึงยอดของสามเหลี่ยม) ในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่สแกนนี้ก็จะมีการสแกนเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันเกิดขึ้นสูงสุดมีลักษณะเป็นพีก และเมื่อสแกนย้อนกลับด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม กระแสก็จะค่อย ๆ ลดลงจนถึงต่ำสุดเพราะเกิดปฏิกิริยาในทิศทางตรงกันข้าม สำหรับปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ (reversible) พีกที่ได้จะมีลักษณะสมมาตรกัน แต่ถ้าปฏิกิริยาผันกลับไม่ได้ (irreversible) จะไม่เกิดพีกเมื่อสแกนศักย์ไฟฟ้าย้อนกลับ และถ้าปฏิกิริยาผันกลับได้ไม่สมบูรณ์ (quasi-reversible) ลักษณะของพีกที่เกิดขึ้นจะไม่สมมาตรกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรม

จากกราฟของปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ พีก A คือแคโทดิกเวฟของปฏิกิริยา ความสูงของพีกคือ กระแสที่เกิดขึ้นซึ่งเรียกว่า  $i_{p,c}$  (cathodic current) เมื่อศักย์ไฟฟ้าถึงค่าที่ทำให้ปฏิกิริยาเริ่มผันกลับ (จุด B) กระแสยังมีค่าเป็นบวกอยู่ จนถึงจุด C ซึ่งเป็นจุดที่กระแสมีค่าเป็นศูนย์ เมื่อศักย์ไฟฟาลดลงต่อไปอีก (ให้เป็นลบน้อยลง ซึ่งหมายถึงเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น) จะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้น กระแสเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดทำให้เกิดเป็นพีก D ซึ่งเรียกว่า แอโนดิกเวฟ ความสูงของพีกเรียกว่า  $i_{p,a}$  (anodic current) สำหรับปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ กระแส  $i_p$  ที่วัดได้จากแคโทดิกเวฟและแอโนดิกเวฟจะมีขนาดเท่ากัน ( $i_{p,c} = i_{p,a}$ ) การวัดค่ากระแส  $i_{p,c}$  และ  $i_{p,a}$  ที่เกิดขึ้นจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมสามารถทำได้โดยต่อฐาน (base line) ของเส้นกราฟตรงบริเวณก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันโดยการประมาณค่าแนวโน้มที่เป็นไปได้ (extrapolation) แล้ววัดระยะระหว่างส่วนยอดของพีกถึงฐานดังแสดงในรูปที่ 2.3 สำหรับปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ไม่สมบูรณ์และปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ สามารถทำการวิเคราะห์ได้จากค่ากระแส  $i_{p,c}$  เท่านั้น

เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยามีผลต่อโวลแทมโมแกรมจึงทำให้วิธีการของไซคลิกโวลแทมเมตริกกลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการศึกษากลไกของปฏิกิริยาและอัตราเร็วในขบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งใช้เป็นประโยชน์อย่างมากในปฏิกิริยาของสารประกอบอินทรีย์



รูปที่ 2.3 แสดงการวัดค่า  $i_{p,c}$  และ  $i_{p,a}$  จากไซคลิกโวลแทมโมแกรม

## 2.2 คูลอมเมตรี<sup>20</sup> (Coulometry)

คูลอมเมตรีเป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดปริมาณประจุไฟฟ้าทั้งหมด (อิเล็กตรอนที่ใช้ในการทำให้สารตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันอย่างสมบูรณ์) การหาปริมาณสารตัวอย่างด้วยวิธีคูลอมเมตรีทำได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณประจุไฟฟ้าที่เข้ากับจำนวนกรัมสมมูลของสารนั้นตามกฎฟาราเดย์ คูลอมเมตรีจะมีการจัดเซลล์แบบ Electrolytic cell ซึ่งจะต้องอาศัยพลังงานไฟฟ้าจากภายนอก

เทคนิควิธีคูลอมเมตรีมี 2 แบบ โดยอาจเป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารตัวอย่างภายใต้สภาวะการควบคุมศักย์ไฟฟ้าเรียกว่าวิธีโพเทนชิโอสแตทหรือคูลอมเมตรีแบบควบคุมศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ อีกแบบเป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าของสารตัวอย่างภายใต้สภาวะที่กระแสคงที่ ซึ่งจะเรียกเป็นวิธีแอมเพอโรสแตท หรือ คูลอมเมตรีแบบกระแสคงที่ วิธีคูลอมเมตรีแบบควบคุมศักย์ไฟฟ้าให้คงที่นี้ จะมีอุปกรณ์ที่เรียกว่าโพเทนชิโอสแตทในการควบคุมศักย์ไฟฟ้าใช้งาน (เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง) ให้มีค่าคงที่ตลอดการทดลอง แต่การทำคูลอมเมตรีเป็นการบันทึกค่ากระแส ณ เวลาต่าง ๆ จนกว่าสารตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ โดยปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เวลาต่าง ๆ จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณประจุไฟฟ้า ดังสมการ

$$Q = i \times t$$

เมื่อ Q แทนปริมาณประจุไฟฟ้าที่ถูกพาเข้าสู่เซลล์โดยการไหลของกระแส 1 แอมแปร์ (A) ในเวลา 1 วินาที (s) มีหน่วยเป็น C (คูลอมบ์)

### 2.3 แอมเพอโรเมทรี<sup>20</sup> (Amperometry)

แอมเพอโรเมทรีเป็นเทคนิคที่จะให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode) ที่เพียงพอในการทำให้เกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดได้ แล้วทำการวัดค่ากระแสที่เกิดขึ้นที่สัมพันธ์กับเวลา

### 2.4 อิเล็กโทรเคมีคัลเซนเซอร์<sup>14</sup> (Electrochemical sensor)

เซนเซอร์ทางเคมี (chemical sensor) โดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งจะทำหน้าที่ตรวจวัด รับ และส่งสัญญาณ การตอบสนอง ส่วนที่สองจะเป็นส่วนของรีเซปเตอร์ (receptor) ทำหน้าที่มีปฏิสัมพันธ์ (interact) กับสารที่ต้องการวัด ซึ่งส่วนนี้จะรับบทบาทในเชิงการคัดเลือก (selectivity) ต่อสารที่ต้องการวัด สำหรับหลักสำคัญของเซนเซอร์ทางเคมีก็คือความสามารถในเชิงการคัดเลือกหรือความจำเพาะเจาะจงที่มีต่อสารที่ต้องการวัด คือสามารถแยกได้ว่าสัญญาณวัดเป็นผลมาจากสารที่ต้องการวัดเท่านั้น

### 2.5 ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor)

อิเล็กโทรเคมีคัลไบโอสเซนเซอร์<sup>14,20</sup> (electrochemical biosensor) เป็นอุปกรณ์ที่ประกอบด้วยการทำงานร่วมกันระหว่างเทคนิควิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า และความจำเพาะเจาะจงของการเกิดปฏิสัมพันธ์ของสารชีวโมเลกุล การทำงานของไบโอสเซนเซอร์จะเป็นการวัดสัญญาณทางไฟฟ้าที่เชื่อมโยงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ซึ่ง biospecific reagent จะถูกตรึงหรือถูกกักอยู่บนผิวหน้าของอิเล็กโทรด เพื่อทำหน้าที่ให้สารที่วิเคราะห์เกิดปฏิสัมพันธ์ทางชีวโมเลกุลซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงทางด้านชีววิทยาแล้วเปลี่ยนไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า

อิเล็กโทรเคมีคัลไบโอสเซนเซอร์ อาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภท โดยอาศัยธรรมชาติของกระบวนการทางชีววิทยา ประเภทแรกคือ biocatalytic device ซึ่งจะใช้เอนไซม์ เซลล์ หรือเนื้อเยื่อตรึงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรด และอีกประเภทคือ affinity sensors จะใช้แอนติบอดี รีเซปเตอร์หรือกรดนิวคลีอิก ในการตรึงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรด นั่นคือจะอาศัยปฏิสัมพันธ์



ระหว่าง 2 โมเลกุล (molecular recognition) สำหรับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลที่เป็นที่รู้จักกันดี ทั้งนักเคมีและนักชีวเคมี คือ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ (enzyme) กับสับสเตรต (substrate) ซึ่งนอกจากความสามารถในเชิงคัดเลือกแล้ว สิ่งที่สำคัญก็คือความจำเพาะเจาะจง (specificity) ดังนั้นเซนเซอร์ทางเคมีที่ทำจากเอนไซม์ (enzyme-based sensors) จึงได้แพร่หลายมากขึ้นทั้งในงานวิจัยและผลิตภัณฑ์ทางการค้า

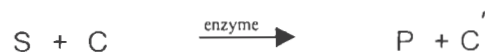
## 2.6 เอนไซม์เซนเซอร์<sup>14,21</sup> (Enzyme-Based Sensors)

เอนไซม์ คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต ซึ่งไม่เพียงแต่มีประสิทธิภาพดีเท่านั้นแต่ยังมีความจำเพาะเจาะจงอย่างมากอีกด้วย ดังนั้นจึงได้มีการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ในการทำเป็นเซนเซอร์ เอนไซม์จำนวนมากมาย สามารถแบ่งออกตามการทำงานได้เป็น 6 กลุ่ม คือ oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases และ lygases แต่ไม่ใช่เอนไซม์ทุกตัวจะสามารถนำมาใช้สร้างเป็นเซนเซอร์ได้ ชนิดของเอนไซม์เป็นตัวกำหนดประเภทของทรานส์ดิวเซอร์ที่จะใช้งานเป็นเซนเซอร์ นอกจากนี้เอนไซม์บางชนิดสามารถสร้างสัญญาณการวัดได้หลายแบบ เช่น เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) ซึ่งเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันดังแสดงในสมการที่ (1)



ปริมาณของกลูโคสสามารถหาได้โดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนหรือใช้ pH วัดปริมาณของ gluconic acid หรือให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่กับอิเล็กโทรด เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (electro-oxidation) แล้ววัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

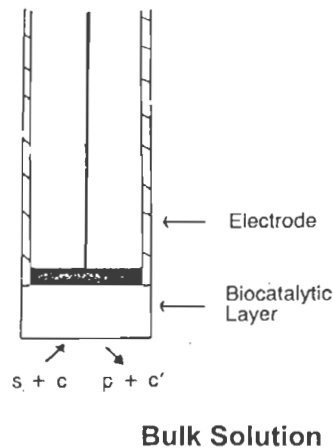
เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรด (แสดงในรูปที่ 2.4 ) จะเร่งปฏิกิริยาซึ่งอาจจะมีผลผลิตเกิดขึ้น ดังสมการ



ซึ่ง S, C คือ สารตั้งต้น และโคแฟกเตอร์

P, C' คือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากที่ทำให้เซนเซอร์ที่ทำจากเอนไซม์มีประสิทธิภาพคือการตรึง (immobilization) เอนไซม์กับส่วนรับสัญญาณของทรานส์ดิวเซอร์



รูปที่ 2.4 แสดงเอนไซม์อิเล็กโทรด<sup>14</sup>

## 2.7 การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization)

การตรึงเอนไซม์<sup>21</sup> เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการทำเอนไซม์เซนเซอร์ วิธีที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์นั้นจะต้องทำให้การตอบสนองสูงสุด สามารถใช้งานได้นานต่อเนื่องหรือวัดซ้ำได้ เมื่อตรึงแล้วจะต้องไม่มีปัญหาการละลายออกมา และที่สำคัญจะต้องรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ไว้ได้ วิธีที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์มีหลายวิธี ได้แก่ การดูดซับ (adsorption) บนผิวหน้าของอิเล็กโทรด การเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent binding) การกักขัง (entrapment) ไว้ในแผ่นพอลิเมอร์หรือเจล และการไขว้ประสาน (cross-linking) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

การดูดซับ (adsorption) เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ที่ไม่ยากได้ผลดีและไม่สิ้นเปลือง เอนไซม์จะถูกยึดด้วยพันธะนอนโควาเลนต์ (non-covalent) ซึ่งเป็นแรงอย่างอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ เป็นต้น จึงทำให้ไม่มีผลต่อโครงรูปของเอนไซม์หรือมีก็เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นเอนไซม์จึงมีแอกติวิตีค่อนข้างสูง แต่เมื่อนำไปใช้งานจริงเอนไซม์อาจหลุดออกมาได้เนื่องจากแรงที่ยึดเป็นแรงอย่างอ่อน

การเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent binding) เอนไซม์จะถูกตรึงโดยเกิดพันธะโควาเลนต์กับ substrate ดังนั้นหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ที่จะเกิดพันธะจะต้องเป็นหมู่ที่ไม่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยา และต้องระวังไม่ให้บริเวณ active site ของเอนไซม์เกิดพันธะโควาเลนต์ เพราะมีฉะนั้นแล้วเอนไซม์ที่เตรียมได้จะสูญเสียแอกติวิตี (activity)

การกักขัง<sup>22</sup> (entrapment) เป็นวิธีการที่ห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในพอลิเมอร์หรือเยื่อที่ยอมให้สารบางชนิดผ่านได้ (semi-permeable membrane) เอนไซม์เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ จะถูกกักไว้ข้างในไม่สามารถออกมาได้ ขณะเดียวกันสับสเตรต (substrate) หรือผลิตภัณฑ์ (product) ซึ่งขนาดของโมเลกุลเล็กกว่ามากจะซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ วิธีการตรึงนี้ไม่มีการสร้างพันธะใด ๆ ระหว่างเอนไซม์กับสารห่อหุ้ม

การไขว้ประสาน (cross linking) เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ที่มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับสารที่เป็นตัวไขว้ประสาน ทำให้เอนไซม์หลาย ๆ โมเลกุลเกาะกลุ่มกันใหญ่ขึ้น การตรึงเอนไซม์วิธีนี้มีผลต่อรูปร่างและแอกติวิตี้ของเอนไซม์ที่ตรึงได้

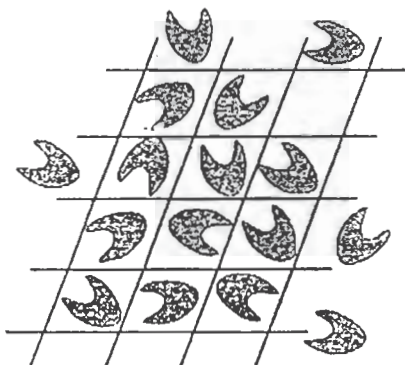
จะเห็นได้ว่า การตรึงเอนไซม์มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อจำกัดและความเหมาะสมแตกต่างกันไป แต่วิธีที่กักเอนไซม์ไว้ในฟิล์มพอลิเมอร์เป็นที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่รุนแรง ในการทำฟิล์มพอลิเมอร์จะใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า<sup>23</sup> (electrochemistry) โดยเอนไซม์จะถูกตรึงในระหว่างที่เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน (electropolymerization) ของสารละลายมอนอเมอร์ (monomer) ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วย ซึ่งมอนอเมอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ pyrrole, indole aniline, และ *N*-methylpyrrole



ADSORPTION



COVALENT BINDING



ENTRAPMENT



CROSS-LINKING

รูปที่ 2.5 ภาพการตรึงเอนไซม์<sup>21</sup>

## 2.8 อิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน (Electropolymerization)

เป็นการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน<sup>24</sup> (polymerization) ของมอนอเมอร์ โดยอาศัยเทคนิคทางด้านเคมีไฟฟ้าเป็นวิธีที่ง่ายและน่าสนใจสำหรับการตรึงเอนไซม์ที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรด โดยในสารละลายจะประกอบด้วยมอนอเมอร์ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน<sup>25</sup> เช่น phenol, aniline และ pyrrole หรือเกิดปฏิกิริยารีดักชัน เช่น vinylpyridine โดยจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชันอย่างรวดเร็วไปเกาะเป็นฟิล์มพอลิเมอร์อยู่บนผิวหน้าของอิเล็กโทรด ฟิล์มพอลิเมอร์ที่ได้จะนำไฟฟ้าหรือไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของมอนอเมอร์และสภาวะที่ใช้ในการเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชัน สำหรับพอลิเมอร์ที่ไม่นำไฟฟ้า ความหนาของฟิล์มจะไม่สามารถควบคุมได้ เพราะเมื่อมีฟิล์มเกิดขึ้นคลุมผิวหน้าของอิเล็กโทรด ฟิล์มชนิดนี้ไม่นำไฟฟ้าจึงป้องกันการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันที่ผิวอิเล็กโทรดได้ ยกเว้นมีมอนอเมอร์ที่สามารถผ่านเข้าไปถึงผิวหน้าของอิเล็กโทรดโดยการแพร่ (diffusion) ผ่านรูของฟิล์มพอลิเมอร์แล้วจะสามารถเกิดอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันขึ้นได้อีก แต่สำหรับพอลิเมอร์ที่นำไฟฟ้า (conducting polymer) เช่น พอลิไพโรล (polypyrrole) ความหนาของฟิล์มจะถูกกำหนดโดยปริมาณของประจุที่ผ่านเข้าไประหว่างการเตรียมฟิล์ม ซึ่งปริมาณประจุที่ใช้ก็จะแตกต่างกันสำหรับพอลิเมอร์แต่ละชนิดขึ้นกับสมบัติในการนำไฟฟ้า

การเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าเป็นวิธีที่มีประโยชน์มาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายต่อการควบคุมและง่ายต่อการทำ<sup>24</sup> และจากการที่พอลิเมอร์ไปเคลือบบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดได้ จึงทำให้วิธีนี้เหมาะสมที่เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ในช่องว่างของฟิล์มพอลิเมอร์

ดังนั้นอิเล็กโทรพอลิเมอร์ไรเซชันจึงเป็นที่นิยมในการนำมาใช้ตรึงเอนไซม์ที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรด กระบวนการนี้สามารถช่วยลดตัวรบกวน (interference) และโพลลิง (fouling) ในการนำมาสร้างแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์ (amperometric biosensor) ได้อีกด้วย

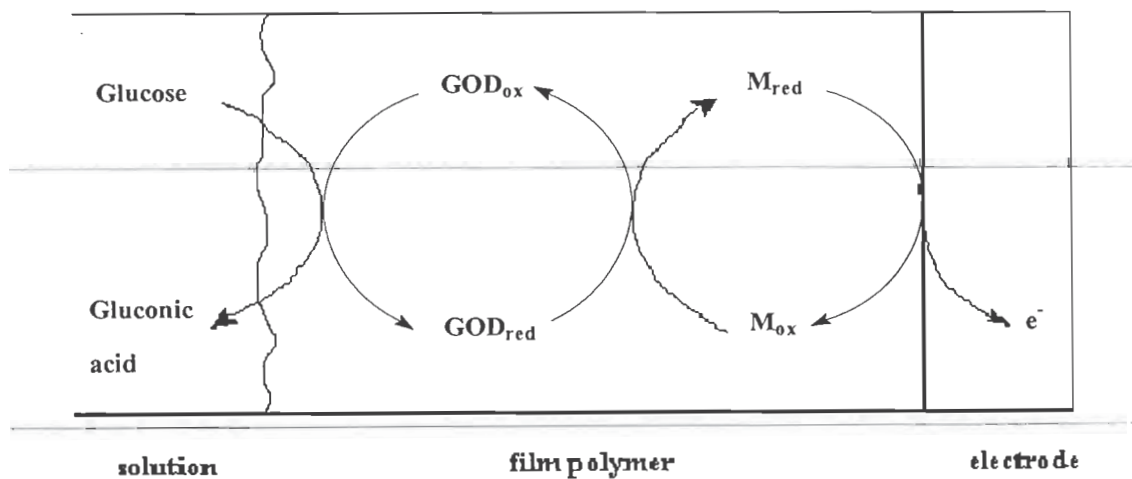
## 2.9 ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน<sup>22, 27, 28</sup> (electron mediator)

ในการทำไบโอเซนเซอร์มักจะมีการใช้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนแทนการใช้ ออกซิเจนที่เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์กับอิเล็กโทรด โดยตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนจะเกิดปฏิกิริยา

รีดอกซ์กับเอนไซม์ และเมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้วตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนจะต้องสามารถเกิดปฏิกิริยา

รีดอกซ์ย้อนกลับมาเป็นตัวเดิมได้ ซึ่งคุณสมบัติของตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนนั้นจะต้องสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ทั้งกับเอนไซม์และที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรด โดยจะต้องส่งผ่านอิเล็กตรอนอย่างรวดเร็วและมีความเสถียรภายใต้สภาวะที่ต้องการ และจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ระหว่างการส่งผ่านอิเล็กตรอน นอกจากนี้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนจะต้องมีค่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ห่างไกลจากสารรบกวนชนิดอื่นที่มีอยู่ในสารตัวอย่างและไม่เป็นพิษต่อเอนไซม์ กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนแสดงดังรูปที่ 2.6

**Glucose sensor**



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนเมื่อใช้ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนชนิดอื่นแทนออกซิเจน

## บทที่ 3

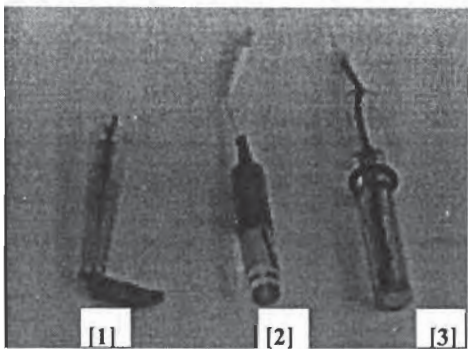
### การทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Potentiostat PGSTAT 100
2. คอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรม AUTOLAB version 4.7
3. ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Ag/AgCl reference electrode)
4. ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode)
5. ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode)
6. Autopipette ขนาด 20  $\mu$ L และ 5 mL
7. เครื่องคนแม่เหล็ก (Stirrer)
8. แท่งคนแม่เหล็กขนาดเล็ก (Magnetic bar)
9. เครื่องวัด pH (pH meter)
10. บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 1000 mL
11. ขวดปริมาตรขนาด 25, 100, 1000 mL
12. ชุดขั้วอิเล็กโทรด
13. ชุดเครื่องกลั่นลดความดัน
14. Microsyringe ขนาด 100  $\mu$ L
15. Ultrasonic cleaner

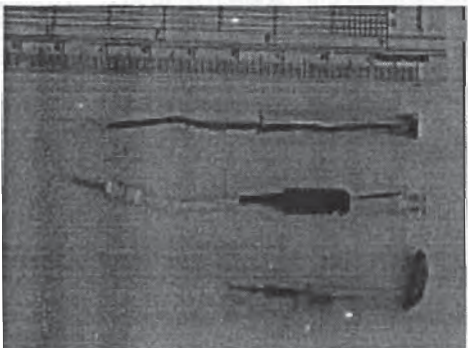
#### 3.2 สารเคมี

1. pyrrole, *N*-methylpyrrole (MW. 81.11), purum>98%(GC), Fluka
2. hexaammineruthenium(III)chloride ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , MW.309.61 ), 99%, Strem Chemicals
3. nafion 117 solution, purum; ~ 5%, Fluka
4. glucose oxidase (GOD) type VII (*Aspergillus niger*), Sigma Chemical co.
5. D(+) glucose anhydrous ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , M.W. 180.16), Farmitalia Carlo Erba
6. potassium dihydrogen orthophosphate anhydrous ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , M.W.136.09), Merck
7. di-sodium hydrogen phosphate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , M.W. 358.14 ), BDH Laboratory Supplies
8. sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , M.W. 98.08), AR grade, Merck

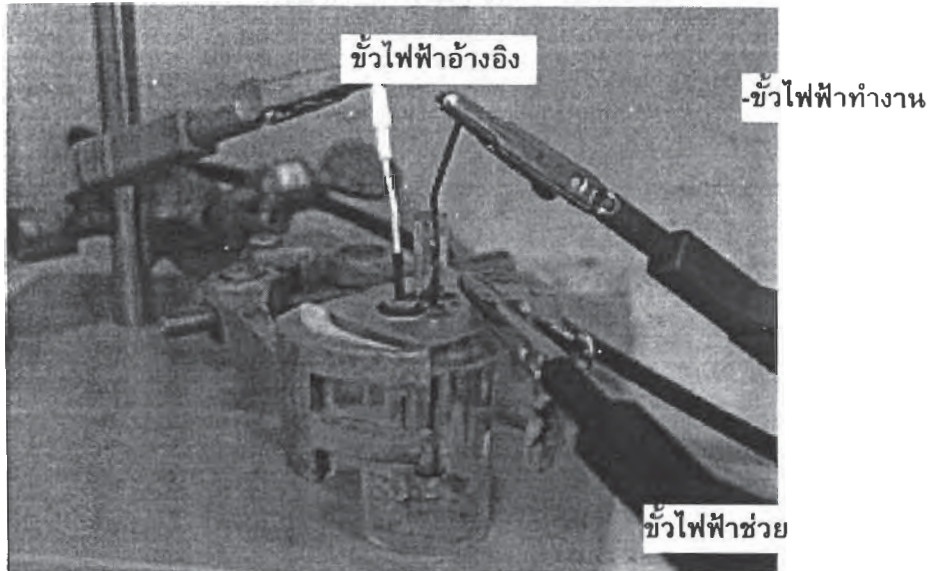


รูปที่ 3.1 แสดงขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการทดลองซึ่งประกอบด้วย

- [1] คือ ขั้วไฟฟ้าช่วย (Pt electrode)
- [2] คือ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Ag/AgCl electrode)
- [3] คือ ขั้วไฟฟ้าทำงาน (Gold electrode)



รูปที่ 3.2 แสดงขนาดของขั้วไฟฟ้าที่ใช้งาน



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

### 3.3 การเตรียมสาร

1. สารละลาย  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M ตวง conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปริมาตร 2.8 mL เทลงในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 497 mL แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน

2. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้นประมาณ 0.1 M ชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.62 g และ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  21.02 g ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 mL

3. สารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$   
ละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 1 mL โดยชั่งน้ำหนักตามตารางต่อไปนี้

ความเข้มข้น (mM)	น้ำหนัก (g)
25	0.0077
40	0.0123
50	0.0154



4. สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นประมาณ 0.2 M  
ซึ่ง D(+) glucose anhydrous 0.9008 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ใน  
ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL
5. สารละลายเอ็นเมทิลไพโรล 0.1 M ที่มี GOD 200 units/mL  
ปิเปตเอ็นเมทิลไพโรลที่กลั่นแล้ว 45  $\mu$ L ลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายฟอสเฟต  
บัฟเฟอร์ 0.1 M 5 mL จากนั้นซึ่ง GOD 0.0044 g ละลายลงในบีกเกอร์ดังกล่าว

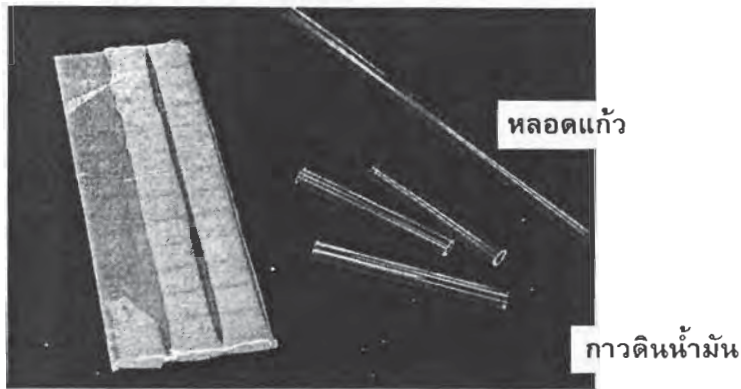
### 3.4 การสร้างอิเล็กโทรดทองแบบฝัง

#### 3.4.1 อุปกรณ์

1. แผ่นทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 cm
2. หลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.4 cm ยาว 5-7 cm
3. สายไฟใส่โลหะเงินขนาดยาวกว่าหลอดแก้วประมาณ 2 cm ลอก  
ฉนวนสายไฟทั้ง 2 ด้านประมาณ 0.5 cm
4. อุปกรณ์เชื่อมโลหะ และลวดบัดกรี
5. เทปใส 2 หน้า
6. แผ่นกระจก
7. กาวดินน้ำมัน (UHU tac)
8. เรซินสำหรับงานหล่อ และสารทำให้แข็ง (Hardener)
9. กระดาษทรายละเอียด
10. Ultrasonic cleaner

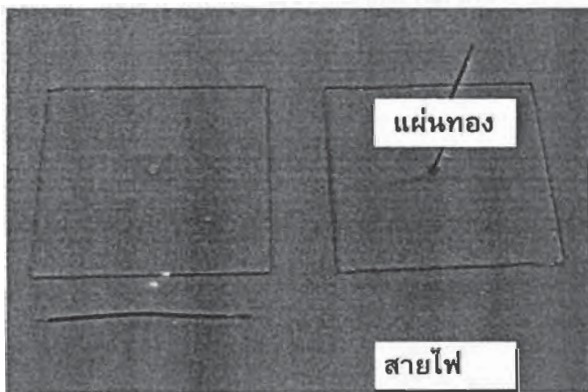
#### 3.4.2 วิธีสร้างอิเล็กโทรดทองแบบฝัง

1. เตรียมหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.4 cm ยาว 5-7  
cm ดัดแก้วด้วยตะไบ ขัดหลอดแก้วกับกระดาษทรายให้ผิวหน้าดัด  
เรียบ และทำความสะอาดหลอดแก้วด้วย ultrasonic cleaner เป็น  
เวลา 5 นาที



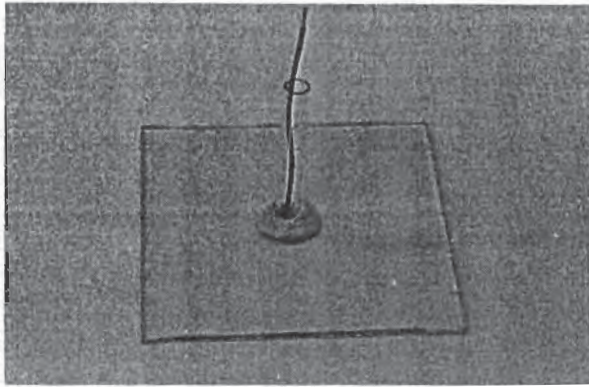
รูปที่ 3.4 แสดงหลอดแก้วที่ใช้ทำอิเล็กทรอนิกส์และกาวดินน้ำมัน

2. เตรียมสายไฟใส่โลหะเงินขนาดยาวกว่าหลอดแก้วประมาณ 2 cm ลอกฉนวนสายไฟทั้ง 2 ด้าน จากนั้นบัดกรีแผ่นโลหะทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 cm ติดกับสายไฟในแนวตั้งฉาก
3. นำเทปใส 2 หน้าติดกับแผ่นกระจกแล้วนำแผ่นทองที่เชื่อมกับสายไฟติดลงบนเทปใส พยายามทำให้สายไฟอยู่ในแนวตั้งฉากกับแผ่นโลหะทอง



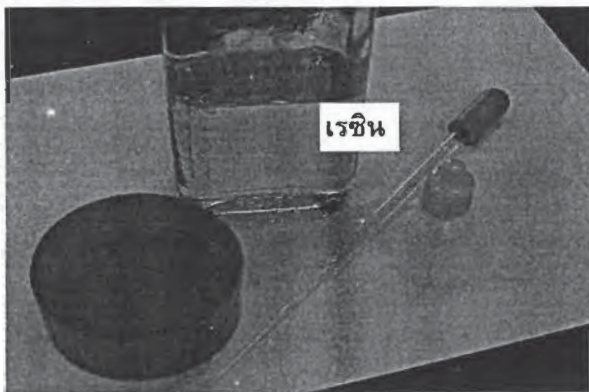
รูปที่ 3.5 แสดงแผ่นทองที่เชื่อมติดกับสายไฟ

4. นำหลอดแก้วที่เตรียมไว้ครอบลงในเส้นลวดโดยให้แผ่นทองอยู่ตรงกลางหลอดแก้ว
5. ยึดฐานโดยรอบของหลอดแก้วที่ติดกับแผ่นทองด้วยกาวดินน้ำมัน จัดให้หลอดแก้วตั้งฉากกับแผ่นกระจก



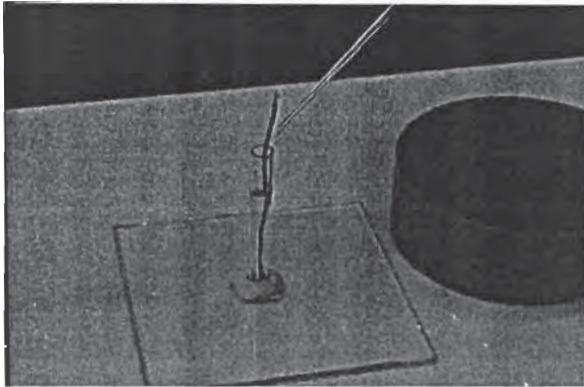
รูปที่ 3.6 แสดงการยึดฐานโดยรอบของหลอดแก้วที่ติดกับแผ่นทองด้วยกาวดินน้ำมัน

- ใช้เรซิน 5 กรัมผสมกับสารทำให้แข็ง 2 หยด จากนั้นหยอดลงในหลอดแก้วเพื่อให้ยึดแผ่นทองติดกับหลอดแก้ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 8 ชั่วโมง



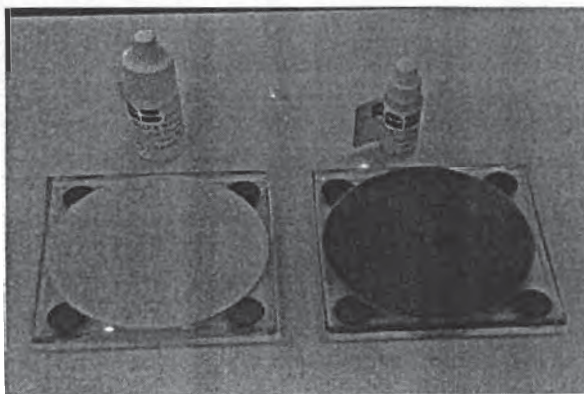
สารทำให้แข็ง

รูปที่ 3.7 แสดงหลอดหยด เรซิน และสารทำให้แข็ง

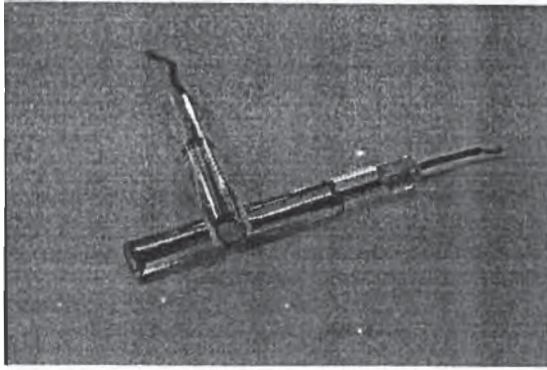


รูปที่ 3.8 แสดงการหยอดเรซินที่ผสมกับสารทำให้แข็งลงในหลอดแก้ว เพื่อยึดแผ่นทองให้ติดกับหลอดแก้ว

7. เอาภาวน้ำมันออก แล้วทิ้งอีเล็กโทรดให้แห้งอีก 1 วัน
8. ชัดอีเล็กโทรดทองให้เรียบด้วยกระดาษทรายละเอียดเพื่อให้แผ่นทองเสมอพอดีกับหลอดแก้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปกำจัดอนุภาคต่าง ๆ ออกด้วย ultrasonic cleaning 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น



รูปที่ 3.9 แสดงชุดชัดอีเล็กโทรด



รูปที่ 3.10 แสดงอิเล็กโทรดทอง

### 3.5 การทำความสะอาดอิเล็กโทรดทองคำก่อนนำไปใช้งาน

#### 3.5.1 การขัดผิวหน้าของอิเล็กโทรด

1. ล้างอิเล็กโทรดทองคำด้วยน้ำกลั่น
2. ฉีดน้ำกลั่นลงบนแผ่น Polishing Pad และขัดด้วยผงอลูมินาขนาด  $1\ \mu\text{m}$
3. ขัดอิเล็กโทรดตามทิศทางรูปเลข 8 โดยในระหว่างการขัดอิเล็กโทรดจะต้องตั้งฉากกับแผ่นขัดเสมอ จับเวลาในการขัด 2 นาที
4. ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำอิเล็กโทรดไปทำความสะอาดด้วย Ultrasonic cleaning เพื่อให้อนุภาคหลุดออกจากผิวหน้าของอิเล็กโทรด และขัดอิเล็กโทรดอีกครั้งโดยใช้แผ่นขัดอย่างละเอียด และใช้ผงอลูมินาขนาด  $0.3\ \mu\text{m}$  จับเวลาในการขัด 2 นาที ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปทำ Ultrasonic cleaning 3 นาที แล้วล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่น

#### 3.5.2 การทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

การนำอิเล็กโทรดทองคำที่ผ่านการขัดมาทำความสะอาดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยทำในสารละลาย  $0.1\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$  ใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีด้วยเครื่องโพเทนชิโอสแตทรุ่น PGSTAT 100 ให้ศักย์ไฟฟ้า  $-0.2$  ถึง  $+1.6$  โวลต์ เทียบกับขั้ว Ag/AgCl และมีขั้วไฟฟ้าแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ด้วยอัตราเร็วของการสแกน  $0.1\ \text{V}/\text{sec}$  จำนวน 6 รอบ จะได้กราฟที่พลอตระหว่างกระแส (i) กับ ศักย์ไฟฟ้า (E)

### 3.6 การเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดสและเฮกซะแอมมีนรูธิเนียม (III) คลอไรด์บนอิเล็กโทรด

1. นำอิเล็กโทรดที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยชุดขัดและด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้ามาทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์  $0.1\ \text{M}$  โดยใช้วิธีไซคลิกโวล

- แทมเมตรี ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 โวลต์ และใช้อัตราเร็วของการสแกน 0.1 V/sec จำนวน 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าพื้นผิวไม่มีสิ่งเจือปน
2. หยดสารละลาย nafion ปริมาตร 1  $\mu\text{L}$  ลงบนผิวอิเล็กโทรดโดยใช้ Autopipette แล้วรอให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที
  3. หยดสารละลายรูทีเนียมปริมาตร 5  $\mu\text{L}$  ลงบนผิวอิเล็กโทรด (ปีเปิดจากสารละลายรูทีเนียม 25 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ) แล้วรอให้แห้งเป็นเวลา 20 นาที
  4. เตรียมฟิล์มเอ็นเมทิลไพโรลโดยวิธีคูลอมเมตรีที่ศักย์ไฟฟ้า 0.8 V ให้ปริมาณไฟฟ้า 30 mC ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL pH 7.0 ซึ่งมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOD) 200 units/mL และเอ็นเมทิลไพโรล 0.1 M
  5. ทำการพิสูจน์ว่ามีรูทีเนียมบนผิวของอิเล็กโทรดโดยทำการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 โดยใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีให้ค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V จำนวน 2 รอบ

### 3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟิล์มพอลิเอ็นเมทิลไพโรล

เตรียมกลูโคสเซนเซอร์ดังอธิบายในข้อ 3.6 โดยใช้สภาวะในการเตรียมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะต่างๆที่ใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิเอ็นเมทิลไพโรล

ศักย์ไฟฟ้า	ปริมาณ nafion ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาณรูทีเนียม (mM)	ปริมาณรูทีเนียมในสารละลาย <i>N</i> -methylpyrrole (mM)	ปริมาณ GOD units/mL	ปริมาณไฟฟ้า Q(mC)
0.8	0.2	25	20	50	50
	0.2	50	20	50	50
	0.2	25	20	50	30
	0.2	25	20	50	40
	0.2	25	-	50	20
	0.2	25	-	50	20
	0.2	25	-	50	20
	0.2	25	-	200	30
	0.2	25	10	200	40

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ศักย์ไฟฟ้า	ปริมาณ nafion ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาณรูธิเนียม (mM)	ปริมาณรูธิเนียมในสารละลาย <i>N</i> -methylpyrrole (mM)	ปริมาณ GOD units/mL	ปริมาณไฟฟ้า Q(mC)
0.8	1.0	25	-	100	20
	1.0	25	-	200	30
	1.0	*25	-	200	30
	1.0	40	-	200	30
0.75	0.2	25	20	50	50
	1.0	25	-	200	30
	1.0	25	-	200	40
0.9	0.2	25	20	50	50

หมายเหตุ

- \* ตรึงรูธิเนียมโดยใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM ให้ศักย์ไฟฟ้าจาก +0.1 ถึง -0.4 โวลต์ อัตราเร็วในการสแกน 0.01 V/sec จำนวน 3 รอบ
- รูธิเนียม =  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

### 3.8 การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

#### 3.8.1 ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์

นำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ โดยวิธีแอมเพอโรเมตรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL พร้อมทั้งทำการคนสารละลายด้วยแท่งคนแม่เหล็กในขณะที่ทดลอง รอจนกระทั่ง background current มีค่าคงที่ แล้วทำการฉีดสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.2 M ครั้งละ 100  $\mu\text{L}$  ซึ่งความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 4 mM

### 3.8.2 ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์

นำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ โดยวิธีแอมเพอโรเมทรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL ซึ่งต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในสารละลายก่อนทำการทดลองเพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน คนสารละลายด้วยแท่งคนแม่เหล็กในขณะที่ทดลอง รอจนกระทั่ง background current มีค่าคงที่ แล้วทำการฉีดสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.2 M ครั้งละ 100  $\mu$ L ซึ่งความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 4 mM

## 3.9 การตรวจสอบคุณภาพและความสามารถของอิเล็กโทรด

### 3.9.1 เวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ (response time : $t_{95\%}$ )

นำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ โดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ปริมาตร 5 mL และทำการฉีดสารละลายกลูโคส 0.2 M ครั้งละ 100  $\mu$ L เมื่อ background current มีค่าคงที่ โดยที่ความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 4 mM ทำการวัดเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณของกลูโคสเมื่อเริ่มทำการฉีด จนกระทั่งมีกระแสตอบสนองที่เกิดขึ้นสมบูรณ์ ( $I_{max}$ ) โดยที่เวลาในการตอบสนอง ( $t_{95\%}$ ) จะวัดจากเวลาที่เริ่มมีกระแสเกิดขึ้นจนถึงเวลาที่กระแสตอบสนองมีค่า 95% ของกระแสตอบสนองสูงสุด ( $I_{max}$ )

### 3.9.2 ความไว ( sensitivity )

นำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์เมื่อ background current มีค่าคงที่ ทำการฉีดสารละลายกลูโคส 0.2 M ครั้งละ 100  $\mu$ L โดยความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 4 mM นำกระแสสัญญาณที่ได้จากการฉีดกลูโคสในแต่ละความเข้มข้นมาทำ calibration curve และคำนวณหาความไวของอิเล็กโทรดจากความชันของ calibration curve ในส่วน ที่เป็นเส้นตรง โดยที่

$$\text{ความไว} = \text{ความชัน} / \text{พื้นที่หน้าตัดของอิเล็กโทรด}$$



### 3.9.3 ความเสถียร (stability)

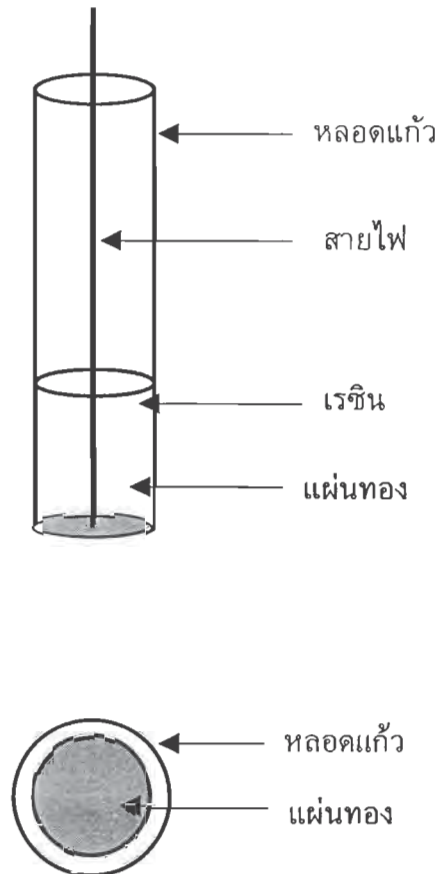
นำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ เมื่อ background current มีค่าคงที่ ทำการฉีดสารละลายกลูโคส 0.2 M ครั้งละ 100  $\mu$ L โดยความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 4 mM จากนั้นนำ อิเล็กโทรดไปเก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำมาวัดกลูโคสโดยบันทึกจำนวนวันการเก็บ (storage) และค่า กระแสที่ได้

### 3.9.4 การตรวจสอบตัวรบกวน (interference)

นำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ เมื่อ background current มีค่าคงที่ ทำการฉีดสารละลายกลูโคส 0.2 M ครั้งละ 100  $\mu$ L โดยความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 4 mM จากนั้นทำการฉีดกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 20 mM ซึ่งเป็นตัวรบกวน โดยฉีดครั้งละ 100  $\mu$ L ความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 0.4 mM

บทที่ 4  
ผลการทดลอง

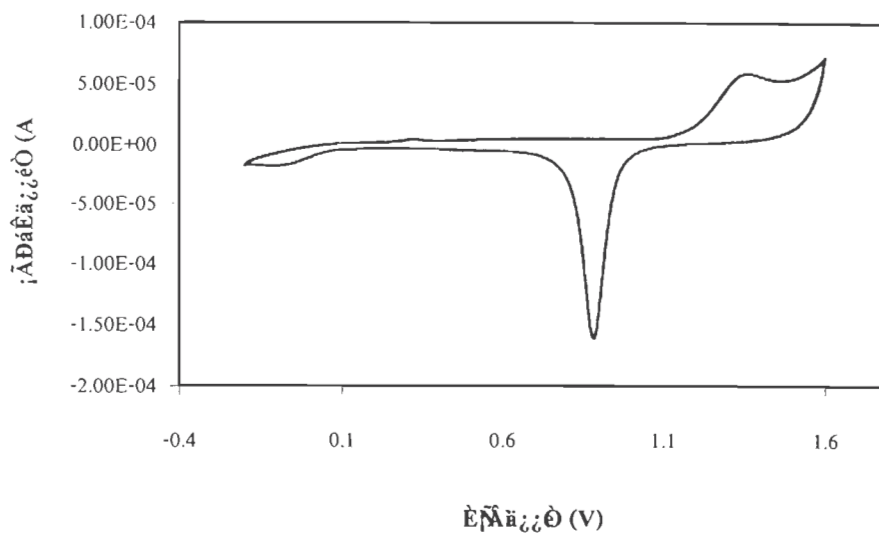
4.1 การสร้างอิเล็กโทรดทอง



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของอิเล็กโทรดทอง

การทำความสะอาดอิเล็กโทรด

หลังจากทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยชุดขัดแล้ว นำมาทำความสะอาดด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี จะได้โวลแทมโมแกรมดังรูป 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงการทำความสะอาดอิเล็กโทรดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยใช้ไซคลิก โวลแทมเมทรี ในสารละลาย 0.1 M  $H_2SO_4$  ให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.6 ถึง 1.2 โวลต์

ได้แบ่งผลการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 จะใช้ไฟโรล และส่วนที่ 2 จะใช้เอ็นเมทิลไฟโรลสำหรับทำฟิล์มโพลีเมอร์

**ส่วนที่ 1: ใช้พอลิไพโรลตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน บนอิเล็กโทรดทอง**

**การศึกษาภาวะที่เหมาะสม**

**การศึกษาหาความเข้มข้นของ Nafion และเวลาที่ใช้ในการรอให้ Nafion แห้ง**

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่า  $I_{\text{red}}$  ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Nafion และเวลาที่ใช้ในการรอให้ Nafion แห้ง

ปริมาณ Nafion ( $\mu\text{L}$ )	$I_{\text{red}}$ (A)		
	เวลา 10 นาที	เวลา 15 นาที	เวลา 20 นาที
0.5	$1.51 \times 10^{-4}$	$2.29 \times 10^{-4}$	$2.37 \times 10^{-4}$
1.0	$1.67 \times 10^{-4}$	$4.57 \times 10^{-8}$	$1.57 \times 10^{-4}$
1.5	$2.09 \times 10^{-4}$	$2.17 \times 10^{-4}$	$2.15 \times 10^{-4}$
2.0	$2.10 \times 10^{-4}$	$2.02 \times 10^{-4}$	$2.01 \times 10^{-4}$
2.5	$1.42 \times 10^{-4}$	$2.48 \times 10^{-4}$	$2.53 \times 10^{-4}$
3.0	$2.02 \times 10^{-4}$	$2.37 \times 10^{-4}$	$1.48 \times 10^{-4}$

จากตารางที่ 1 พบว่าจากการใช้ปริมาณ Nafion 2.5  $\mu\text{L}$  และเวลาที่ใช้ในการรอ Nafion แห้งเป็นเวลา 20 นาที ได้ค่า  $I_{\text{red}}$  ที่สูงที่สุด คือ  $2.53 \times 10^{-4}$  A

แต่เมื่อนำภาวะนี้ไปใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส ไม่สามารถนำไปใช้วัดกลูโคสต่อไปได้ เนื่องจากแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้มีความหนาเกินไป ดังในผลการตรวจสอบความหนาของฟิล์มพอลิไพโรล โดย SEM นอกจากนี้แผ่นฟิล์มยังเกิดการร่อนหลุดของฟิล์ม จึงเลือกค่า  $I_{\text{red}}$   $1.67 \times 10^{-4}$  A เพื่อลดความหนาของฟิล์ม โดยใช้ปริมาณ Nafion 1.0  $\mu\text{L}$  และเวลาที่ใช้ในการรอ Nafion แห้งเป็นเวลา 10 นาที

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

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า  $I_{\text{red}}$  ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  และเวลาที่ใช้ในการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

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

จากตารางที่ 2 พบว่าจากการใช้ความเข้มข้นของ  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  10 mM และเวลาที่ใช้ในการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลาย เป็นเวลา 10 นาที ได้ค่า  $I_{\text{red}}$  ที่สูงที่สุดคือ  $2.98 \times 10^{-4}$  A จึงนำภาวะนี้มาใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรล

การศึกษาความเข้มข้นของไพโรล และประจุไฟฟ้าที่ใช้ในการควบคุมการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรล

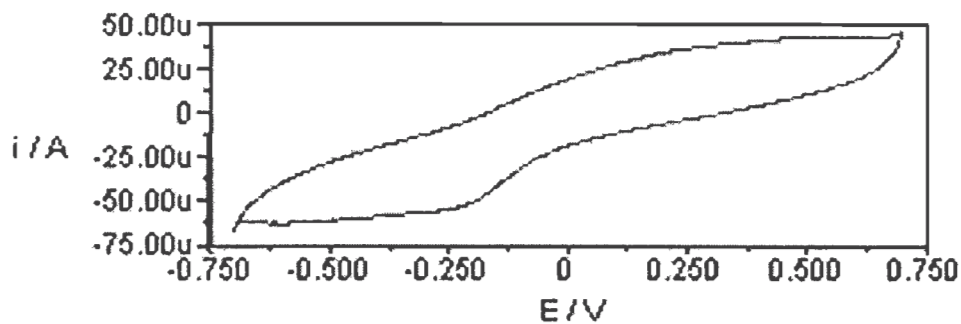
เมื่อให้ปริมาณประจุไฟฟ้า 45 mC ได้ความหนา  $0.1 \mu\text{m}^4$  ดังนั้นอิเล็กโทรด  $\text{Cu}$  ที่มีพื้นที่ผิว  $0.1964 \text{ cm}^2$  จึงให้ปริมาณไฟฟ้าในการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรล 8.8 mC

ตารางที่ 3 แสดงค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไพโรล

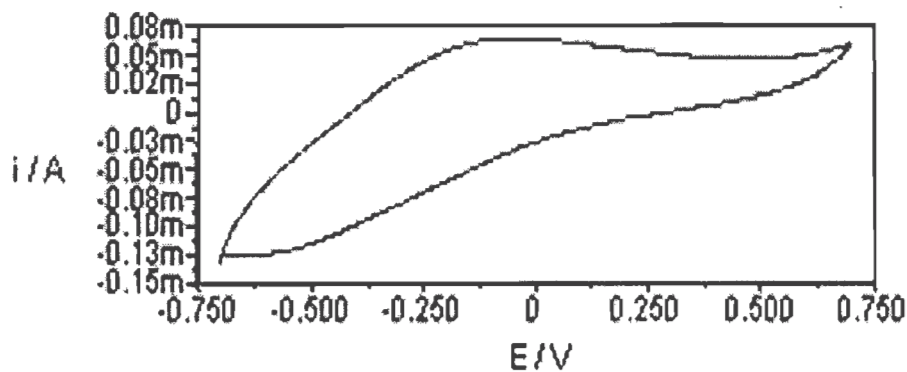
ความเข้มข้นของไพโรล (M)	สัญญาณกระแส (nA)
0.1	25.00
0.3	27.87

**การเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลเมื่อใช้ออกซิเจนเป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน**  
**การตรวจสอบอิเล็กโทรด ก่อนและหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน**

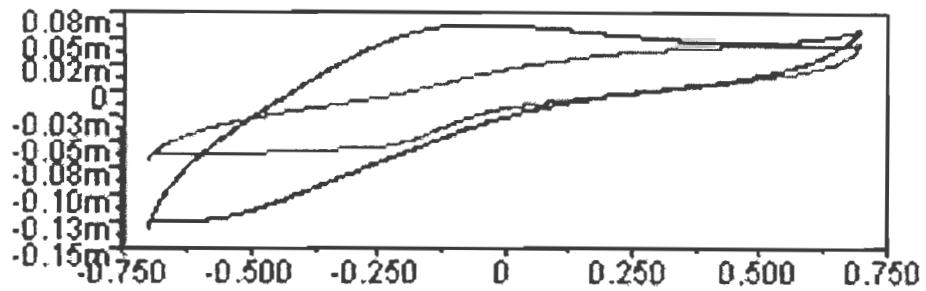
ทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเปรียบเทียบไซคลิก โวลแทมโมแกรมก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชันที่พื้นผิวอิเล็กโทรดดังรูปที่ 4.3 และหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งจากโวลแทมโมแกรมที่แสดงการเปรียบเทียบดังรูปที่ 4.5 ภายหลังจากทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน มีกระแสเพิ่มสูงขึ้นกว่าก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน แสดงให้เห็นความแตกต่างของอิเล็กโทรดที่ยังไม่ได้ทำการเตรียมฟิล์ม และภายหลังเมื่อมีการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคส ออกซิเดส



รูปที่ 4.3 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



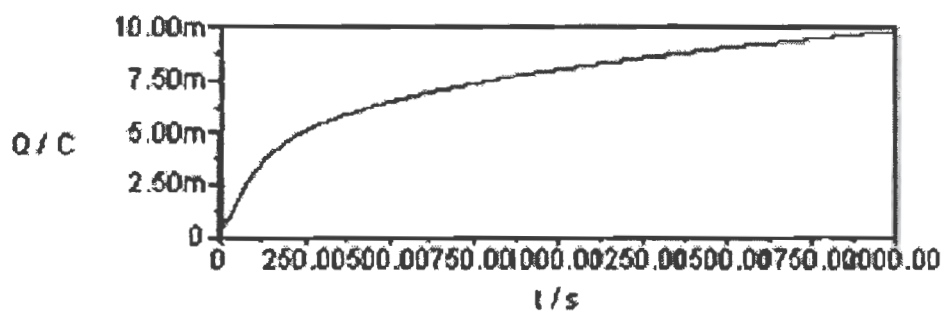
รูปที่ 4.4 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 V หลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



รูปที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลาย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และหลังพอลิเมอร์ไรเซชัน

#### การพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล

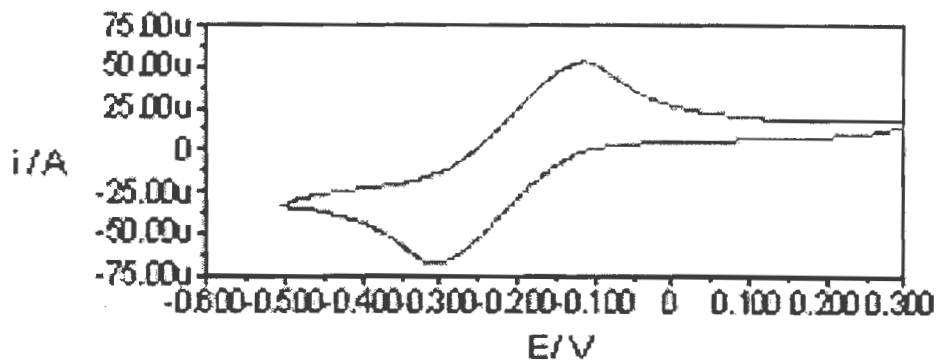
ใช้เทคนิคคูลอมป์เมตรีในการพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.7 V ในสารละลาย 50 Units/mL GOD และ 0.1 M ไพโรล โดยมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ทำการควบคุมปริมาณไฟฟ้าที่ให้ จะเกิดปฏิกิริยาการพอลิเมอร์ไรเซชันดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งเมื่อเวลาที่ใช้ในการพอลิเมอร์ไรเซชันมากขึ้น ปริมาณกระแสไฟฟ้าก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย



รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (Q) กับเวลา (t) ในการพอลิเมอร์ไรเซชัน

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

การตรวจสอบไซคลิก โวลแทมโมแกรมของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในสารละลาย 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำการทดลองใน 5 mM สารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ด้วยเทคนิคไซคลิก โวลแทมเมตรี โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก 0.3 ถึง  $-0.5$  V ดังแสดงในรูปที่ 4.7



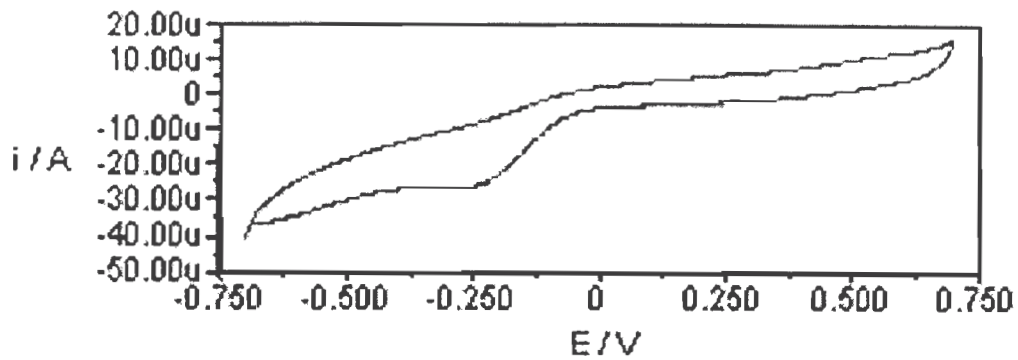
รูปที่ 4.7 แสดงโวลแทมโมแกรมของ 5 mM สารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  โดยเทคนิคทางไซคลิก โวลแทมเมตรีโดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก 0.3 ถึง  $-0.5$  V

## การตรวจสอบอิเล็กโทรด ก่อนและหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

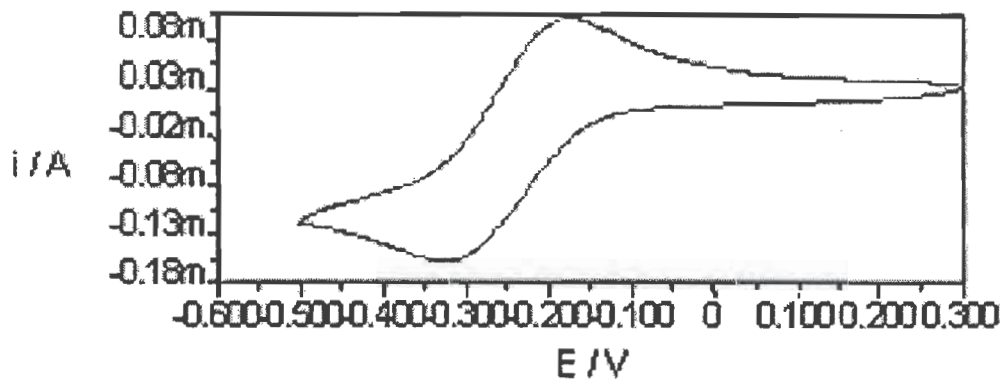
ทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเปรียบเทียบไซคลิก โวลแทมโมแกรมก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชันที่พื้นผิวอิเล็กโทรดดังรูปที่ 4.8 และหลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ดังรูปที่ 4.9

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



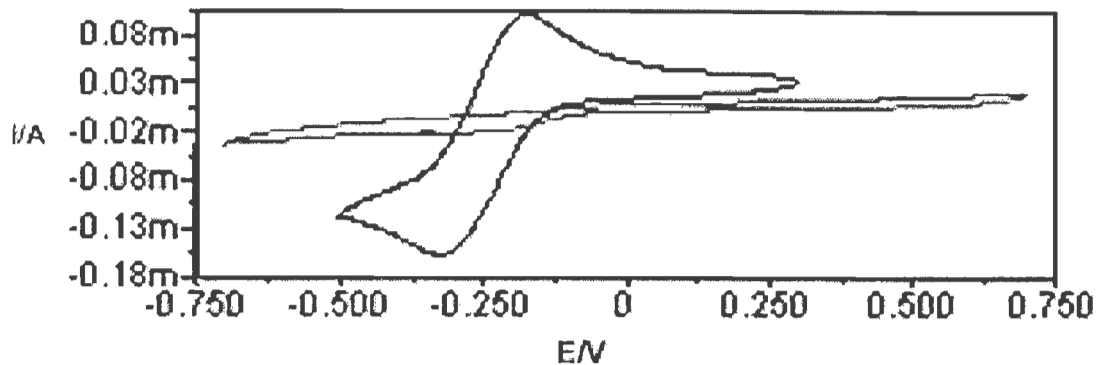


รูปที่ 4.9 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน สารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก  $-0.7$  ถึง  $0.7$  V ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน



รูปที่ 4.10 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองในสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก  $-0.7$  ถึง  $0.7$  V หลังทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน

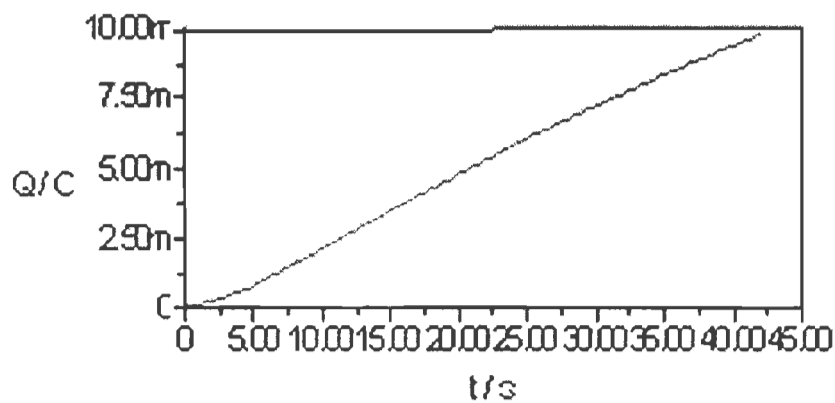
เมื่อนำไซคลิก โวลแทมโมแกรม ของรูปที่ 4.9 และ 4.10 มาเปรียบเทียบบ่งแสดงในรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าโวลแทมโมแกรมที่ได้จากภายหลังการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคส ออกซิเตส และ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$  บนอิเล็กโทรด เกิดโวลแทมโมแกรมแสดงกระแสของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$  ขึ้น ทำให้ทราบว่าได้มีการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$  บนอิเล็กโทรดแล้ว



รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และหลังพอลิเมอร์ไรเซชัน

#### การพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล

หลังจากการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  โดยวิธีอิเล็กโตรสแตติก ไบดิงส์ (Electrostatic binding) นำอิเล็กโตรดไปทำการพอลิเมอร์ไรเซชันในสารละลาย 50 Units/mL GOD และ 0.1M ไพโรล โดยเทคนิคคูลอมป์เมตรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V ดังรูปที่ 4.12 ลักษณะของกราฟมีความชันมากกว่ารูปที่ 4.6 ซึ่งเป็นการพอลิเมอร์ไรเซชันฟิล์มพอลิไพโรล เมื่อไม่มีการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  นอกจากนี้ เวลาที่ใช้ในการพอลิเมอร์ไรเซชันสำหรับอิเล็กโตรดที่มีการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  จะใช้เวลาน้อยกว่าอิเล็กโตรดที่ใช้  $\text{O}_2$  เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน เมื่อควบคุมปริมาณไฟฟ้าที่ให้เท่าเดิม คาดว่าเนื่องจาก  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของพอลิไพโรล ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.12 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (Q) กับเวลา (t) ในการพอลิเมอร์ไรเซชันเมื่อมีการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

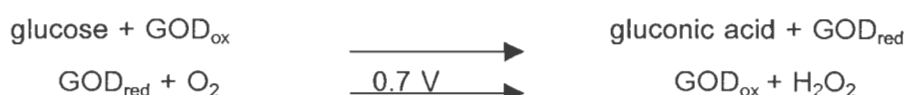
นอกจากนี้ขั้นตอนใน การตรึงกลูโคสออกซิเดส ผู้ทำการวิจัยได้ทดลองทำการจุ่ม อิเล็กโทรดที่ตรึง Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> แล้ว ในสารละลายกลูโคสออกซิเดสก่อนทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน เพื่อต้องการให้มีการตรึง GOD อยู่ในอิเล็กโทรดปริมาณมาก แต่เมื่อนำไปใช้ตรวจวัดสำหรับหา ปริมาณกลูโคส ไม่สามารถวัดสารละลายกลูโคสมาตรฐานได้ จากผลการทดลองคาดว่าเป็นผลมา จาก การที่ GOD มีประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่อทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน ไพโรลซึ่งมีประจุเป็นบวกจึง เข้ามาจับกับ GOD ที่ตรึงอยู่ที่ขั้วอิเล็กโทรดอยู่ก่อนแล้วได้ดีกว่า GOD ที่อยู่ในสารละลาย ทำให้ กลูโคสไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าอิเล็กโทรดได้ นอกจากนี้ GOD ยังถูกปกคลุมด้วยฟิล์ม พอลิไพโรลที่มีความหนาแน่นมาก ดังนั้นในการนำอิเล็กโทรดไปวัด จึงไม่เกิดกระแสไฟฟ้าเนื่องจาก การแพร์ขึ้น

### การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

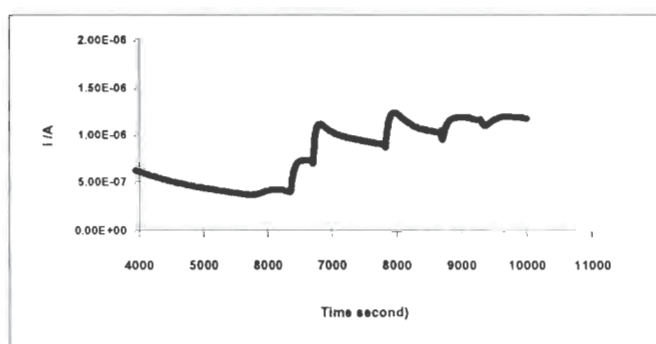
ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

เมื่อนำอิเล็กโทรดที่ได้ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลและตรึง GOD แล้ว มาตรวจวัด ปริมาณกลูโคส โดยเทคนิคแอมเพอโรเมตริก ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 V โดยมีออกซิเจนซึ่งอิมมัว ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน<sup>5</sup>

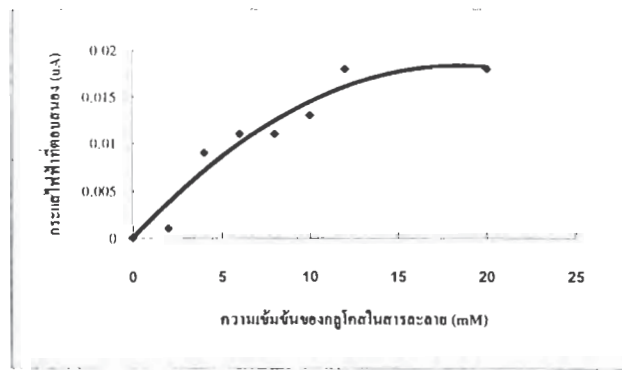
กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วทำงาน คือ



สามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคสได้ดังรูปที่ 4.13



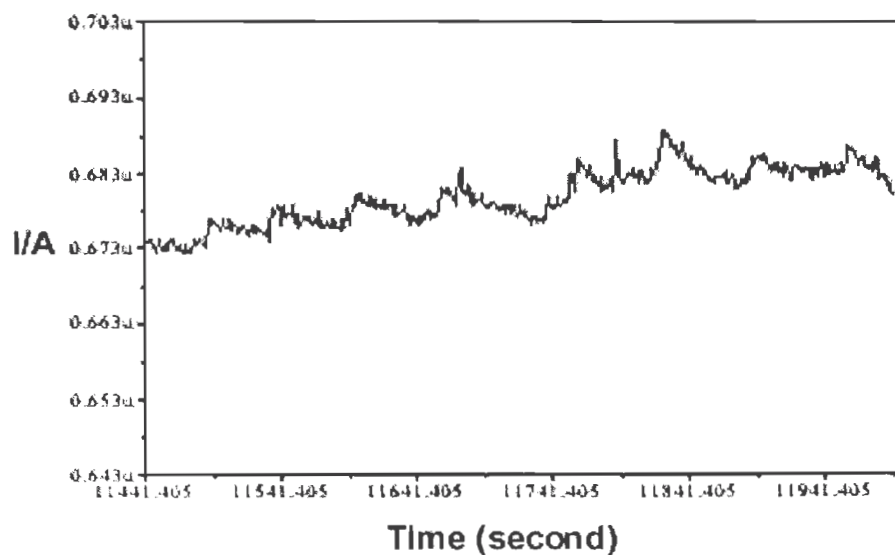
รูปที่ 4.13 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V



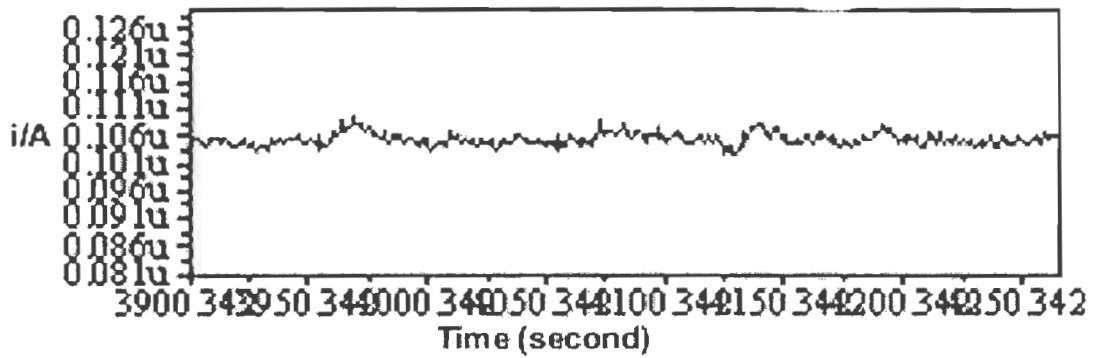
รูปที่ 4.14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนอง ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 V

ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4, 0.2, 0.0 V

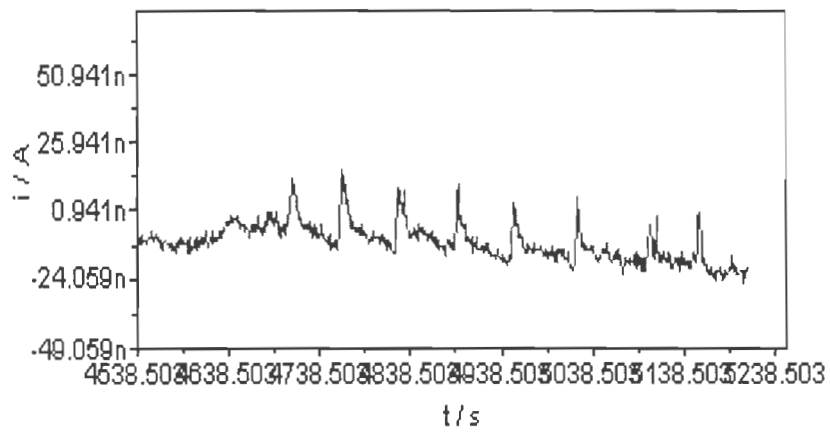
การพัฒนาวัสดุโกลด์ โบไอเซนเซอร์ ในงานวิจัยนี้ต้องการปรับปรุงเพื่อให้สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า 0.7 V ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงตัวรบกวน และสามารถวัดค่าได้ถูกต้องโดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ดังรูปที่ 4.15, 4.16 และ 4.17 แสดงให้เห็นว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4, 0.2, และ 0.0 V สามารถให้กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานตามลำดับ



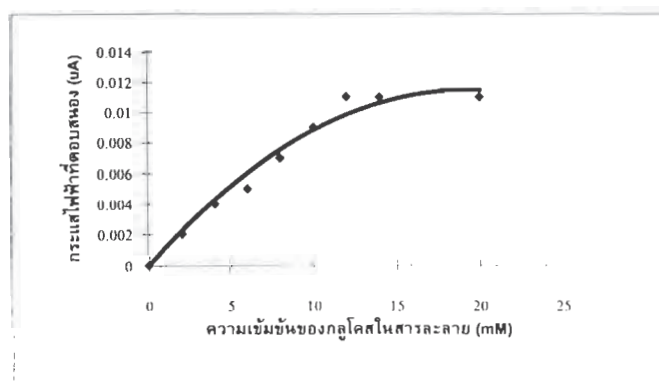
รูปที่ 4.15 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V



รูปที่ 4.16 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.2 V

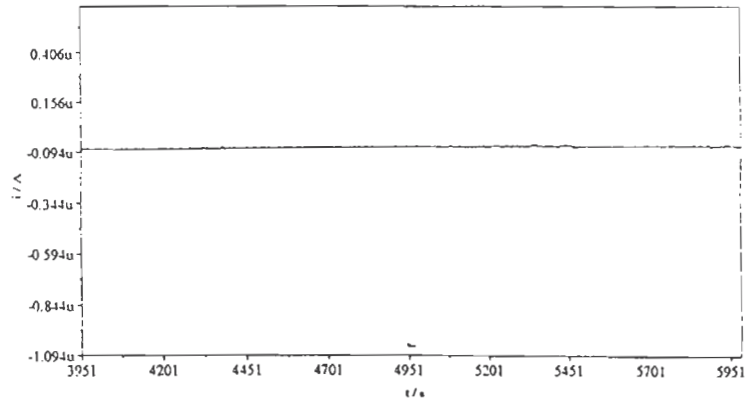


รูปที่ 4.17 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.0 V



รูปที่ 4.18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนอง ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

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

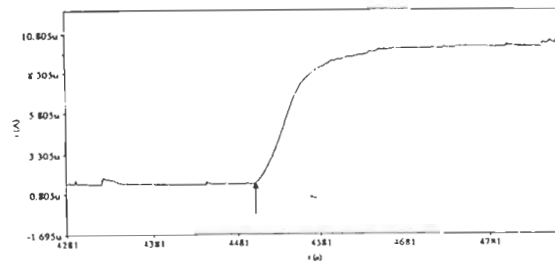


รูปที่ 4.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองกับเวลาในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ศักย์ไฟฟ้า 0.0 V โดยใช้อิเล็กโทรดที่ไม่มีการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

### การทดสอบคุณภาพและความสามารถของอิเล็กโทรด

#### เวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ (response time)

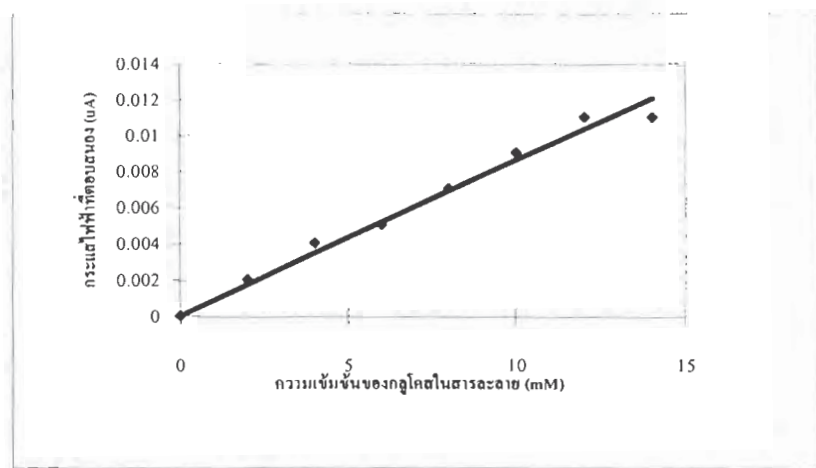
จากการศึกษาเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณของอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลและมีการตรึงกลูโคสออกซิเดส โดยมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน ทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V พบว่าเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ คือ 5 วินาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 แสดงเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ เมื่อทำการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

### ความไว (sensitivity)

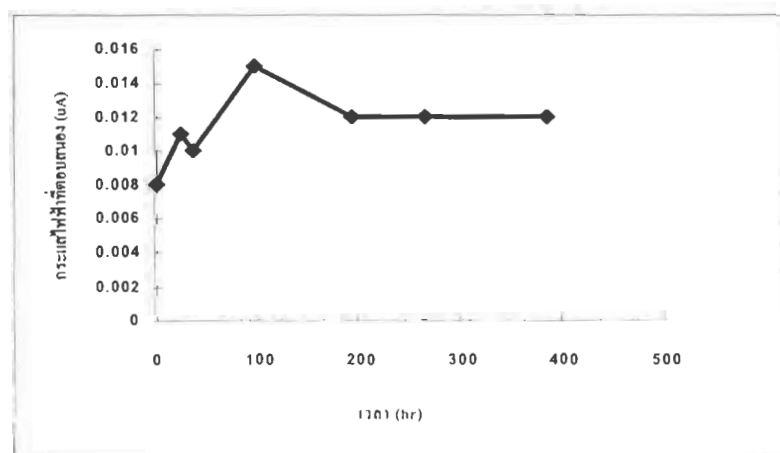
จาก calibration curve ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส เมื่อทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V สามารถคำนวณความไวได้เท่ากับ  $5.5 \times 10^{-9}$  A/mM ดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

### ความเสถียร (stibility)

ทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 12 mM ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 V ภายหลังทำการพัฒนาอิเล็กโทรดโดยเตรียมฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึงกลูโคสออกซิเดส และ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$  ในช่วงเวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 V

**ส่วนที่ 2: ใช้พอลิเอินเมทิลไพโรลตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และใช้ Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> เป็นตัวกลางส่งผ่านอิเล็กตรอน**

การศึกษาภาวะที่เหมาะสม

**4.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอิเล็กโทรด**

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล

เตรียมกลูโคสเซนเซอร์ โดยใช้สภาวะในการเตรียมดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สภาวะต่างๆที่ใช้ในการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล

ศักย์ไฟฟ้า	ปริมาณnafion (μL)	ปริมาณรูทีเนียม (mM)	ปริมาณรูทีเนียมในสารละลาย N-methylpyrrole (mM)	ปริมาณ GOD units/mL	ปริมาณไฟฟ้า Q(mC)	ผลการทดลอง
0.8	0.2	25	20	50	50	ฟิล์มเต็ม มีฟีกของรูทีเนียม เล็กน้อย
	0.2	50	20	50	50	ฟิล์มเกือบเต็มแต่ไม่มีฟีกของรูทีเนียม
	0.2	25	20	50	30	ฟิล์มเกือบเต็มแต่ไม่มีฟีกของรูทีเนียม
	0.2	25	20	50	40	ฟิล์มเต็ม มีฟีกของรูทีเนียม เล็กน้อย
	0.2	25	-	50	20	ฟิล์มไม่เต็ม มีฟีกของรูทีเนียม
	0.2	25	-	50	20	ฟิล์มไม่เต็ม มีฟีกของรูทีเนียม
	0.2	25	-	50	20	ฟิล์มไม่เต็ม มีฟีกของรูทีเนียม
	0.2	25	-	200	30	ฟิล์มไม่เต็ม ไม่ได้ ดูฟีกของรูทีเนียม
	0.2	25	10	200	40	ฟิล์มเต็มแต่มีฟีกของรูทีเนียมน้อยมาก และนำไปวัดกลูโคสที่ 0.7 โวลต์และที่ 0.4 โวลต์



ตารางที่ 4 (ต่อ)

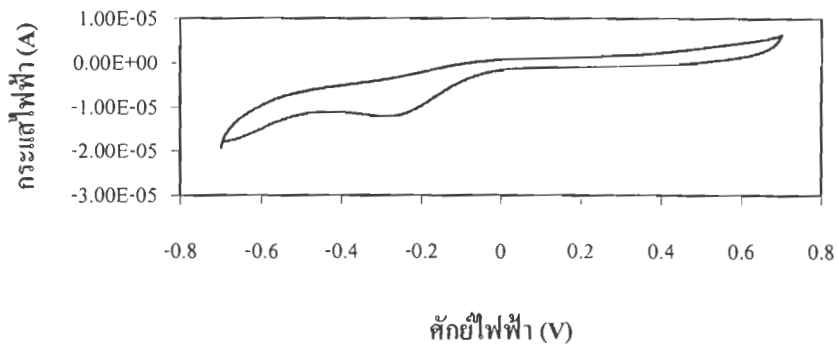
ศักย์ไฟฟ้า	ปริมาณ nafion ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาณรูทีเนียม (mM)	ปริมาณรูทีเนียมในสารละลาย <i>N</i> -methylpyrrole (mM)	ปริมาณ GOD units/mL	ปริมาณไฟฟ้า Q(mC)	ผลการทดลอง
0.8	1.0	25	-	100	20	ฟิล์มไม่เต็ม มีฟิกรูทีเนียม มีสัญญาณกลูโคสต่ำ
	1.0	25	-	200	30	ฟิล์มเต็ม มีฟิกรูทีเนียม มีสัญญาณกลูโคส
	1.0	*25	-	200	30	ฟิล์มไม่เต็ม มีสัญญาณกลูโคสต่ำ
	1.0	40	-	200	30	ฟิล์มไม่เต็ม ไม่มีฟิกรูทีเนียม ไม่มีสัญญาณกลูโคส
0.75	0.2	25	20	50	50	ฟิล์มเต็มแต่ไม่มีฟิกรูทีเนียม
	1.0	25	-	200	30	ฟิล์มไม่เต็ม มีฟิกรูทีเนียม น้อย ไม่มีสัญญาณกลูโคส
	1.0	25	-	200	40	ฟิล์มเต็ม มีฟิกรูทีเนียม น้อยมาก (รูปที่ 19) สัญญาณกลูโคสต่ำ
0.9	0.2	25	20	50	50	ฟิล์มไม่เต็ม ไม่มีฟิกรูทีเนียม

- หมายเหตุ
- \* ตรึงรูทีเนียมโดยใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ที่มี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM ให้ศักย์ไฟฟ้าจาก +0.1 ถึง -0.4 โวลต์ อัตราเร็วในการสแกน 0.01 V/sec จำนวน 3 รอบ
  - รูทีเนียม =  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอิเล็กโทรดตามตารางที่ 4 พบว่า ภาวะที่สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้และให้สัญญาณกระแสสูงสุดคือ ใช้ความเข้มข้นของพอลิเอินเมทิลไพโรล 0.1 M ความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  คือ 25 mM ปริมาตร 5  $\mu\text{L}$  ใช้เนฟิออน 1.0  $\mu\text{L}$  และทำการพอลิเมอไรเซชันที่ศักย์ไฟฟ้า 0.8 โวลต์ให้ปริมาณไฟฟ้า 30 mC

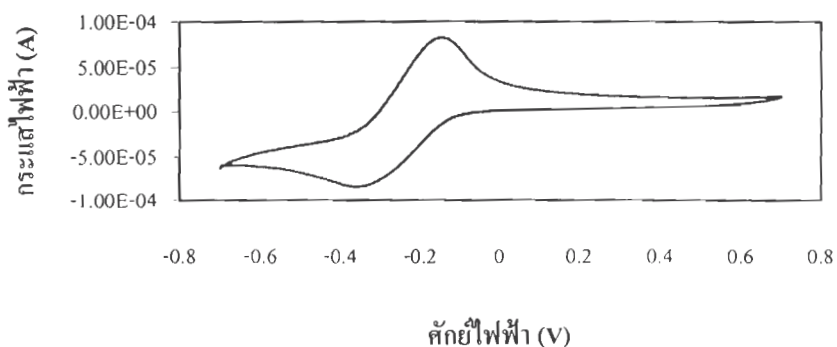
#### การตรวจสอบพื้นผิวอิเล็กโทรดก่อนและหลังทำการพอลิเมอไรเซชัน

เมื่อนำอิเล็กโทรดที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยชุดขัดมาทำการทดลองในสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมดังแสดงในรูป 4.23



รูปที่ 4.23 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า -0.7 ถึง 0.7 โวลต์ ก่อนการเตรียมฟิล์ม

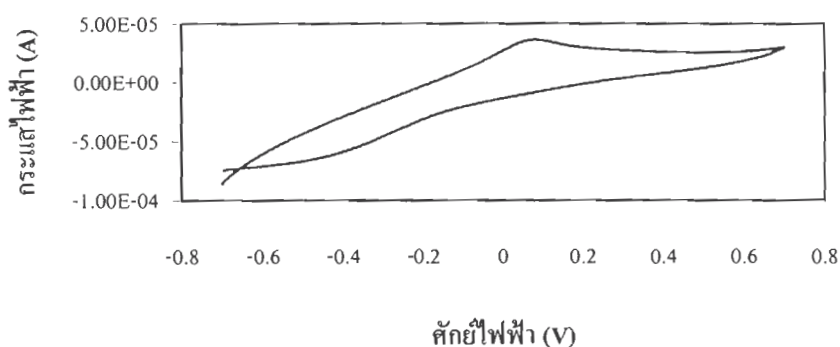
หลังจากหยดเนฟิออนและรูทีเนียมนำอิเล็กโทรดมาทำการทดลองโดยใช้วิธี ไซคลิกโวลแทมเมทรีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของรูทีเนียม ก่อนทำการพอลิเมอไรเซชัน ดังแสดงในรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 แสดงไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทดลองในสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ 0.1 M โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 โวลต์ หลังจากหยดเนฟิออนและรูทีเนียม

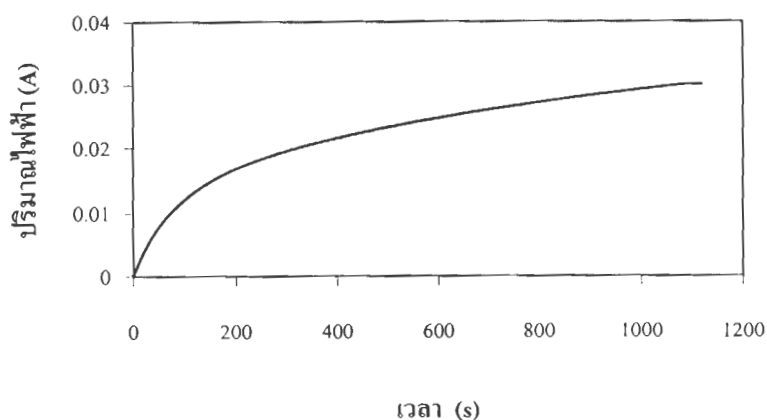
เมื่อนำอิเล็กโทรดที่หยดเนฟิออน และรูทีเนียมไปทำการพอลิเมอไรเซชัน และนำมาทำการทดลองโดยใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมทรีใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จะได้ไซคลิกโวลแทมโมแกรมหลังทำการพอลิเมอไรเซชันของรูทีเนียม ดังแสดงในรูป 4.25



รูปที่ 4.25 แสดงโวลแทมโมแกรมที่ได้จากการทำการทดลองใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าจาก -0.7 ถึง 0.7 โวลต์ หลังทำการพอลิเมอไรเซชัน

#### 4.4 การเกิดพอลิเมอไรเซชันของฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล

หลังจากการตรึงเนฟิออนและรูทีเนียม นำอิเล็กโทรดไปทำการพอลิเมอไรเซชันในสารละลายเอินเมทิลไพโรล 0.1 M และ GOD 200 Units/mL ในสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 5 mL โดยวิธีคูลอมเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.8 โวลต์ ให้ปริมาณไฟฟ้า 30 mC ดังแสดงใน รูป 4.26



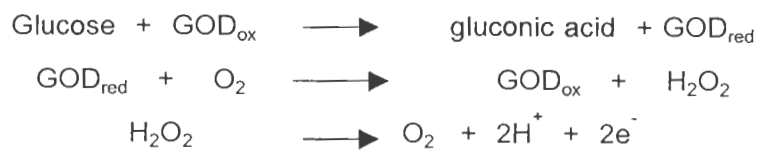
รูปที่ 4.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟฟ้า (Q) กับ เวลา (t) ในการพอลิเมอไรเซชัน

## 4.5 การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

### 4.5.1 ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์

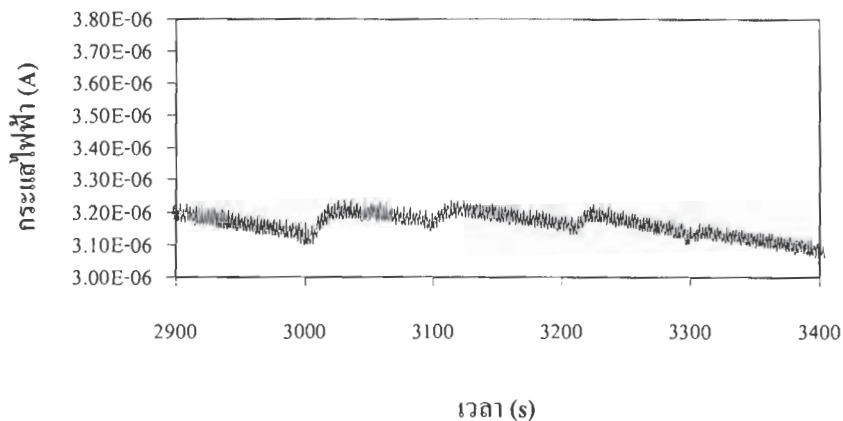
เมื่อนำกลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมได้มาทำการวัดปริมาณกลูโคส โดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรีที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ ซึ่งที่ค่าศักย์ไฟฟ้านี้ออกซิเจนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จะมีส่วนช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอน

กลไกในการเกิดปฏิกิริยา

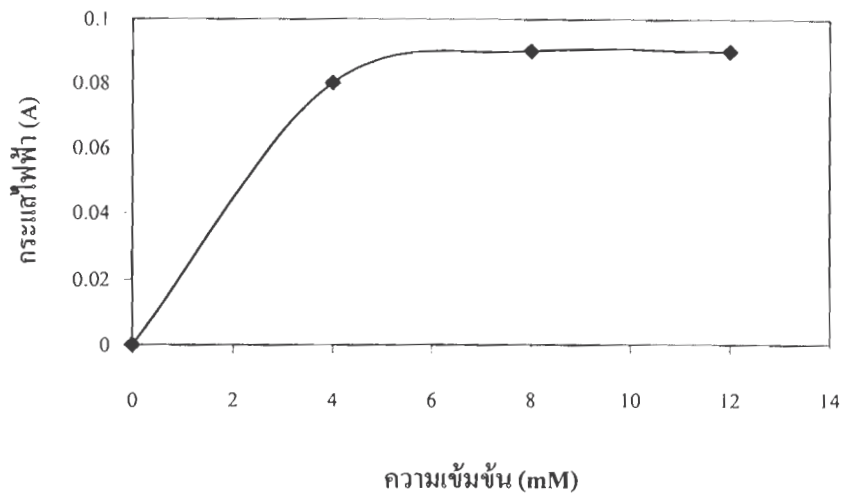


สามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคส ได้ดังรูปที่ 4.27

เมื่อนำค่ากระแสที่ได้จากการวัดกลูโคสในรูปที่ 4.27 มาสร้างกราฟ calibration curve ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับปริมาณกระแสที่วัดได้ จะได้กราฟ ดังรูปที่ 4.28



รูปที่ 4.27 แสดงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 M โดยฉีดกลูโคสครั้งละ 100  $\mu\text{L}$  โดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรี ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์



รูปที่ 4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน และ กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์

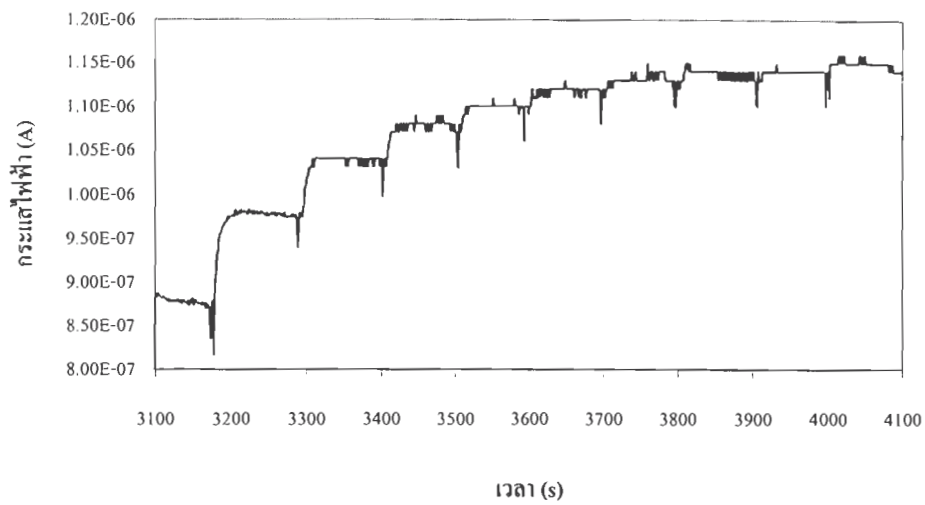
#### 4.5.2 ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์

เมื่อนำกลูโคสเซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการส่งผ่านอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน มาวัดปริมาณกลูโคสที่ 0.4 โวลต์ เพื่อหลีกเลี่ยงตัวรบกวน ซึ่งกลไกในการเกิดปฏิกิริยา คือ

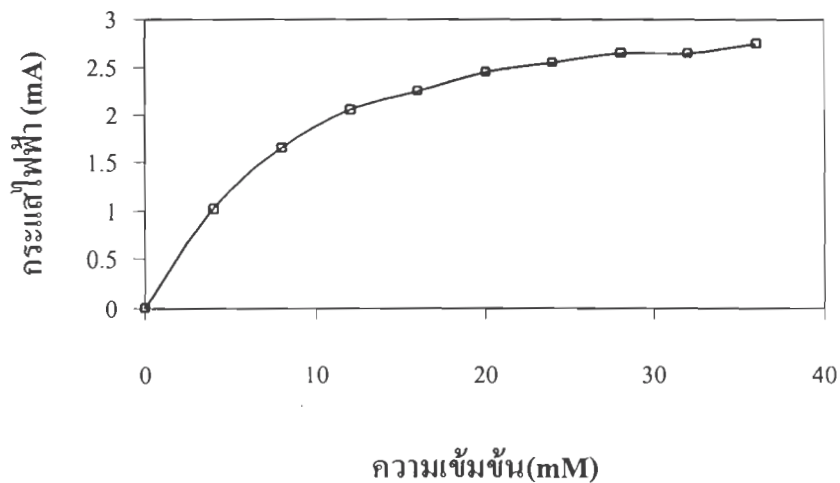


ซึ่ง  $\text{M}_{\text{ox}}$  และ  $\text{M}_{\text{red}}$  คือ ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ และรูปรีดิวซ์ ตามลำดับจากการทดลองพบว่าสามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ดังรูปที่ 4.29

เมื่อนำค่ากระแสที่ได้จากการวัดกลูโคสในรูปที่ 4.29 มาสร้างกราฟ calibration curve ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับปริมาณกระแสที่วัดได้จะได้กราฟดังรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.29 กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.2 M โดยฉีดกลูโคสครั้งละ 100  $\mu$ L โดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรี ที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์

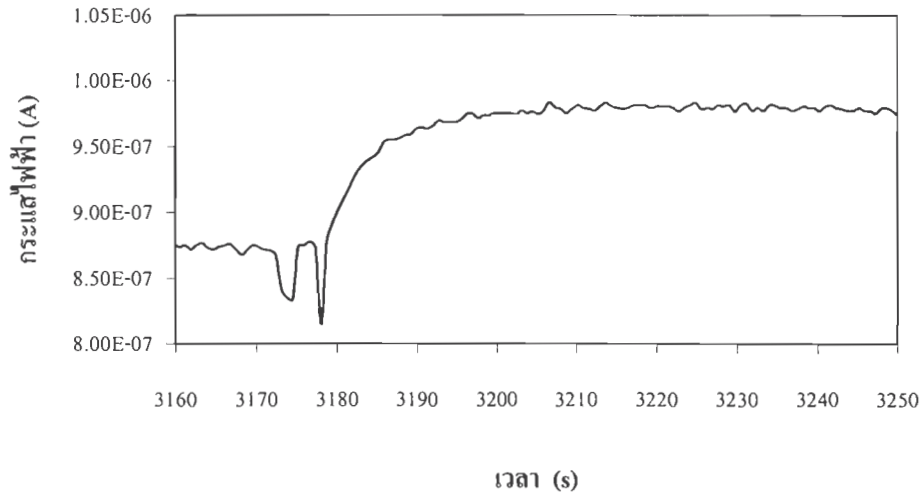


รูปที่ 4.30 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและ กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์

#### 4.6 การทดสอบคุณภาพและความสามารถของอิเล็กโทรด

4.6.1 เวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ (response time :  $t_{95\%}$ )

จากการศึกษาเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณของอิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล และมีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  เป็นตัวกลางในการส่งผ่านอิเล็กตรอน ทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ พบว่าเวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณคือ 4 วินาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.31



รูปที่ 4.31 เวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ เมื่อทำการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน 0.2 M โดยฉีดกลูโคสครั้งละ 100  $\mu\text{L}$  ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ โดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรี

#### 4.6.2 ความไว(sensitivity)

จาก calibration curve ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส รูปที่ 4.30 เมื่อทำการวัดปริมาณกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ สามารถคำนวณความไวโดยนำค่าความชันของกราฟในช่วงที่เป็นเส้นตรงมาคำนวณความไวโดยที่

$$\text{ความไว} = \text{ความชัน} / \text{พื้นที่ผิวของอิเล็กโทรด}$$

จากการคำนวณพบว่าความไวมีค่าเท่ากับ  $1.72 \times 10^{-6}$  แอมแปร์ต่อมิลลิโมลาร์ต่อตารางเซนติเมตร

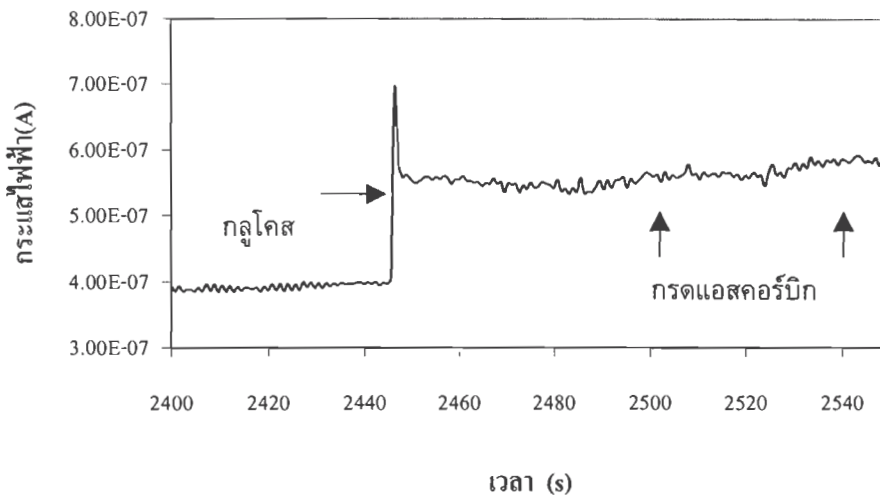
#### 4.6.3 ความเสถียร(stability)

ทำการตรวจวัดปริมาณสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ค่าศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้อิเล็กโทรดที่ตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ใน

ฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลพบว่า เมื่อทำการวัดปริมาณกลูโคสหลังจาก 5 วัน กระแสที่วัดได้จะลดลง 98.82 % ของกระแสที่วัดได้ในครั้งแรก

#### 4.6.4 การตรวจสอบสิ่งรบกวน (interference)

จากการศึกษาผลของสิ่งรบกวนที่มีต่ออิเล็กโทรดที่ทำการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล และมีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  เป็นตัวกลางในการส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยทำการวัดปริมาณสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 M โดยฉีดกลูโคส ครั้งละ 100  $\mu\text{L}$  ซึ่งความเข้มข้นที่ทำการฉีดแต่ละครั้งคือ 4 mM ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์พบว่าได้กระแสสัญญาณสูง 0.16  $\mu\text{A}$  จากนั้นฉีดกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ซึ่งความเข้มข้นที่ทำการฉีดในแต่ละครั้งคือ 0.4 mM พบว่าเมื่อฉีดกรดแอสคอร์บิกจะไม่มีสัญญาณตอบสนองเกิดขึ้นซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.32



รูปที่ 4.32 เวลาในการตอบสนองของกระแสสัญญาณ เมื่อทำการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน 0.2 M และกรดแอสคอร์บิก 0.02 M โดยฉีดกลูโคสและกรดแอสคอร์บิก ครั้งละ 100  $\mu\text{L}$  ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์ โดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรี



## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยใช้คอมโพสิตของฟิล์มพอลิไพโรล และ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

สำหรับวัดน้ำตาลกลูโคสได้ โดยการเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิไพโรลที่มีการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ด้วยกระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชัน พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมอิเล็กโทรด โดยการทำอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชันของเอนไซม์บนอิเล็กโทรด ได้ใช้ขั้วทอง เป็นขั้วทำงาน  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  อิเล็กโทรด เป็นขั้วอ้างอิง และใช้แพลตินัมอิเล็กโทรด

เป็นขั้วเคาน์เตอร์ ใช้มอนอเมอร์ ไพโรล ความเข้มข้น 0.1 mM เอนไซม์: กลูโคสออกซิเดส (*Aspergillus niger*) 50 units/mL สารละลายบัฟเฟอร์และค่า pH: ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นประมาณ 0.1 M pH = 7 ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการพอลิเมอไรเซชัน 0.7 V เทียบกับ  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  อิเล็กโทรด ปริมาณไฟฟ้าที่ใช้ในการพอลิเมอไรเซชัน 45  $\text{mC}/\text{cm}^2$

สำหรับการทำอิเล็กโทรดเสถียรติดไปดิง ใช้ปริมาณ nafion 1  $\mu\text{L}$  เวลาในการรอให้ nafion แห้ง 10 นาที แล้วนำไปจุ่มในสารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  10 mM เป็นเวลา 10 นาที ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการวัดกลูโคส 0.4 V เทียบกับ  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  อิเล็กโทรด

ภาวะที่ใช้ในการวัดปริมาณกลูโคส คือ 0.1 M ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ค่า pH = 7 ที่ 25 °C ได้ค่า sensitivity  $9.0 \times 10^{-10}$  A/mM เวลาตอบสนอง 80 วินาที storage stability มากกว่า 16 วัน และความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ 1.5 mM

ข้อจำกัดสำหรับการเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยใช้คอมโพสิตของฟิล์มพอลิไพโรล และ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  คือ ฟิล์มไม่สามารถยึด  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ได้ คาดว่าเนื่องมาจากการจัดเรียงตัวของสายพอลิไพโรลที่ไม่สามารถกักตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนนี้ได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองเปลี่ยนมาใช้ฟิล์มพอลิเอ็นเมทิลไพโรลซึ่งค้นพบจากเอกสารอ้างอิงว่าจะง่ายต่อการเตรียมฟิล์ม และให้การจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ที่จะป้องกันไม่ให้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  แพร่หลุดออกจากแผ่นฟิล์ม

#### 5.2 การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์โดยใช้คอมโพสิตของฟิล์มพอลิเอ็นเมทิลไพโรลและ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$

งานวิจัยนี้สามารถสร้างแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดน้ำตาลกลูโคสได้ โดยการเตรียมแผ่นคอมโพสิตของฟิล์มพอลิเอ็นเมทิลไพโรล และ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  พร้อมทั้งมีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ด้วยกระบวนการอิเล็กโทรพอลิเมอไรเซชัน ในการทดลองจะมีการเตรียม

ผิวหน้าของอิเล็กโทรดก่อน โดยทำการหยดเนฟิออนลงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรด แล้วรอจนแห้ง จากนั้นจึงหยดสารละลาย  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ลงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดที่มีเนฟิออนอยู่

ฟิล์มของเนฟิออนมีประจุเป็นลบจะช่วยตรึง  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  ซึ่งมีประจุเป็นบวกไว้ได้ ชั้นตอนการตรึง  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ด้วยวิธีนี้จะเรียกว่า อิเล็กโทรสแตติกไบดิง (electrostatic binding) นอกจากนี้เนฟิออนยังช่วยทำให้ฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลเกิดได้ง่ายอีกด้วย

หลังจากเตรียมฟิล์มแล้ว จะทำการตรวจสอบหาปริมาณที่ตรึงอยู่ในฟิล์ม โดยนำมาทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M และใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่า ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของรูทีเนียมที่อยู่ภายในฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลจะแตกต่างไปจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมของรูทีเนียมที่อยู่ในสารละลาย เนื่องจากรูทีเนียมที่อยู่ภายในฟิล์มจะส่งผ่านอิเล็กตรอนกับอิเล็กโทรดได้ยากกว่ารูทีเนียมที่อยู่ในสารละลาย จึงมีผลทำให้โวลแทมโมแกรมของรูทีเนียมภายหลังการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรล เกิดการย้ายตำแหน่งของค่าศักย์ไฟฟ้า

จากการทดลองยังพบอีกว่า ในกรณีที่เตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลให้มีความหนาเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณไฟฟ้า จะมีผลทำให้พีคของรูทีเนียมลดลงจนบางครั้งไม่ปรากฏให้เห็น จึงทำให้ไม่สามารถบอกได้แน่นอนว่ามีรูทีเนียมอยู่ในฟิล์มหรือไม่ อย่างไรก็ตามยังสามารถตรวจสอบว่ามีรูทีเนียมอยู่หรือไม่ได้โดยทำการทดลองวัดกลูโคสที่ 0.4 โวลต์ ซึ่งที่ศักย์ไฟฟ้านี้ รูทีเนียมจะทำหน้าที่เป็นตั้งส่งผ่านอิเล็กตรอน ถ้าสามารถวัดกลูโคสที่ 0.4 โวลต์ได้ แสดงว่าสามารถตรึงรูทีเนียมได้ แต่ถ้าไม่เกิดสัญญาณขึ้นที่ 0.4 โวลต์แสดงว่าไม่สามารถตรึงรูทีเนียมได้ หรือตรึงรูทีเนียมได้ แต่ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่อยู่ภายในฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลไม่เหมาะสม

จากการตรวจวัดสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ 0.4 โวลต์ จะเห็นว่าความสูงของพีคจะลดลงเมื่อทำการฉีดครั้งต่อ ๆ ไป คาดว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ กรดกลูโคนิก ซึ่งจะไปติดอยู่บนผิวหน้าของอิเล็กโทรด ทำให้เกิดขบวนการแพร่ของสารละลายกลูโคส ที่เข้าไปในฟิล์มพอลิเมอร์ได้ จึงมีผลทำให้สัญญาณที่ได้ลดลงเรื่อย ๆ

ในการทดลองหาความเสถียรของอิเล็กโทรด พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน สัญญาณกลูโคสที่วัดได้มีค่าต่ำลงมาเมื่อเทียบกับสัญญาณที่วัดได้ในวันแรก ซึ่งเป็นผลการทดลองปกติของเอนไซม์อิเล็กโทรดอันเนื่องมาจากเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเสื่อมสภาพ สิ่งที่เป็นไปได้อีกประการหนึ่ง คือ อิเล็กโทรสแตติกไบดิงระหว่าง  $\text{Ru}^{3+}$  และ nafionไม่แข็งแรงทำให้รูทีเนียมละลายออกมาจากฟิล์มพอลิเมอร์ หรืออาจจะเกิดเนื่องมาจากการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงได้อาจไม่ได้เกิดจากการกักเอนไซม์ไว้ในฟิล์มพอลิเมอร์เพียงอย่างเดียว แต่เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสอาจถูกดูดซับ (adsorption) อยู่บนผิวหน้าของฟิล์มพอลิเมอร์ ในระหว่างการเกิดพอลิเมอร์เซชัน ทำให้สัญญาณของกลูโคสที่วัดได้มีค่าสูง เพราะเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ถูกดูดซับอยู่บนผิวหน้าของอิเล็กโทรดจะมีส่วนช่วยในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสด้วย แต่เมื่อเวลาผ่านไป เอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนผิวหน้าของอิเล็กโทรด จะหลุดออกจากผิวหน้าของฟิล์มพอลิเมอร์ ทำให้สัญญาณของกลูโคสที่วัดได้ลดลงอย่างรวดเร็ว

สรุปว่า การเตรียมกลูโคสเซนเซอร์ให้มีประสิทธิภาพสูง จำเป็นจะต้องมีการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสม เช่น ปริมาณของรูธีนียมที่เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน ถ้ามีน้อยจะไม่สามารถวัดกลูโคสที่ต่ำกว่า 0.7 โวลต์ได้ แต่ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดฟิล์มพอลิเมอร์ได้ยาก หรืออาจมีผลทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเกิดการเสียดสภาพได้ ตัวแปรที่สำคัญอีกประการหนึ่งได้แก่ ความหนาของฟิล์มพอลิเมอร์ที่เตรียมขึ้นจะต้องมีความหนาเพียงพอที่จะตรึงเอนไซม์ไว้ได้ ฟิล์มยี่งหนายังมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมาก แต่ถ้าฟิล์มหนาเกินไปจะทำให้กลูโคสแพร่ผ่านเข้าไปยังผิวหน้าของอิเล็กโทรดได้ยากขึ้น ส่งผลให้สัญญาณของการตอบสนองต่อปริมาณของกลูโคสลดลง และต้องใช้เวลาในการตอบสนองนานขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีตัวแปรอื่น ๆ อีกมากมายที่มีผลต่อการเตรียมกลูโคสเซนเซอร์ เช่น ปริมาณของเนฟิออน ความเข้มข้นของมอนอเมอร์และเอนไซม์ที่ใช้ และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการพอลิเมอร์ไรเซชัน ซึ่งตัวแปรต่าง ๆ เหล่านี้จะต้องมีความเหมาะสม จึงจะทำให้กลูโคสเซนเซอร์ที่เตรียมขึ้นมีประสิทธิภาพดี

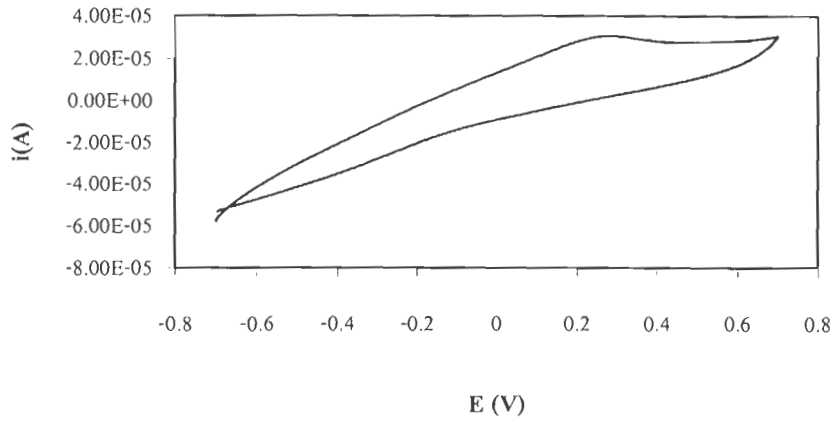
สำหรับการเปลี่ยนมาใช้ฟิล์มพอลิเอ็นเมทิลไพโรลพบที่ไม่ช่วยในการป้องกันไม่ให้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  แพร่หลุดออกจากแผ่นฟิล์ม

## References

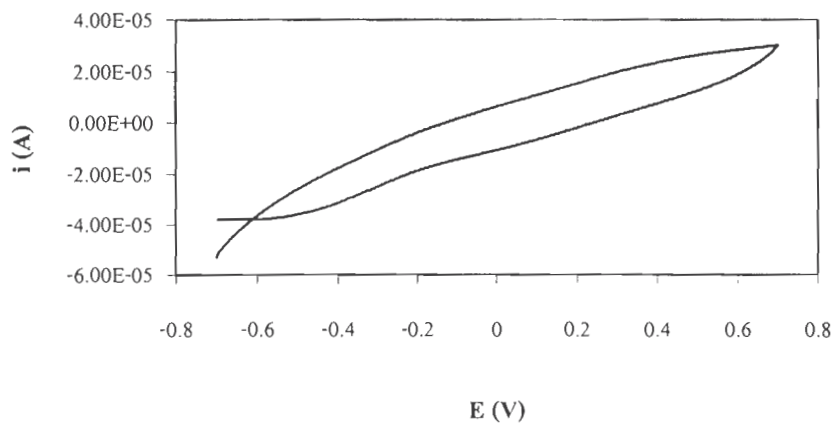
1. Trojanowicz, M.; Geschke, O.; Krawczyk, T.K.V.; Cammann, K. *Seosensors and Actuators* **1995**, *28*, 191-199.
2. Fortier, G.; Brassard, E.; Belanger, D. *Biosensors Bioelectron.* **1990**, *5*, 473-490.
3. Anthony, E.G.C.; Graham, D.; Graeme, D.F.; Hill, H.A.O.; Aston, W.J.; Higgins, I.J.; Plotkin, E.V.; Scott, L.D.L.; Turner, A.P.F. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 667-671.
4. Cunningham, A.J.; *Introduction to Bioanalytical Sensors*. New York, **1998**.
5. Netchiporouk, L.I.; Sharm, N.F.; Renault, N.J.; Martelet, C.; Cespuglio, K. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4358-4364.
6. Imisides, M.D; John, R.; Wallace, G.G. *CHEMTECH* **1996**, *26*, 19-25.
7. Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. *Biosensors* **1987**, *3*, 359-379.
8. Bartlett, P.N.; Csruana, D.J. *Analyst* **1992**, *117*, 1287-1292.
9. Bartlett, P.N.; Cooper, J.M. *J.Electroanal.Chem.* **1993**, *362*, 1-12.
10. Palleschi, G.; Rahni, M.A.N.; Lubrano, G.J.; Ngwainbi, J.N.; Guilbault, G.G. *Anal.Biochem.* **1986**, *159*, 114-121.
11. Rodriguez, M.C.; Rivas, G.A. *Electroanalysis* **1999**, *8*, 558-564.
12. Palmisano, F.; Centonze, D.; Guerrieri, A.; Zambonin, P.G. *Biosensors Bioelectron.* **1993**, *8*, 393-399.
13. Pei, J.; Li, X. *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1267-1272.
14. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, WILEY-VCH, New York, **1994**.
15. Foulds, N.C.; Lowe, C.R. *Anal. Chem*, **1988**, *60*, 2473-2478.
16. Kajija, Y.; Sugai, H.; Iwakura, C.; Yoneyama, H. *Anal.Chem.* **1991**, *63*, 49-54.
17. Bartlett, P.N.; Ali, Z.; Field, V.E. *J.Chem.Soc.Faraday Trans* **1992**, *88*, 2677-2683.
18. Morris, N.A.; Cardosi, M.F.; Birch, B.J.; Turner, A.P.F. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 1-9.
19. Skook, D. A.; Leary, J. J. *Principles of Instrumental Analysis*, 4 ed.; Saunders College Publishing: Florida, **1992**.
20. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ, เคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, **2539**.

21. สุนันทา ภิณญาวรัตน์ (บรรณาธิการ), เอกสารการประชุมเชิงวิชาการเรื่องเอนไซม์เทคโนโลยี, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพมหานคร, **2542**.
22. Yacynych et al. "Surface-Modified Electrochemical Biosensor" : U.S. Pat. 5,286,364 Feb. 15, **1994**.
23. Fortier, G.; Belanger, D. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 854-858.
24. Gros, P.; Bergel, A. *J.electroanal. chem.* **1995**, *386*, 65-73.
25. Almeida, N.F.; Beckman, E.J.; Atai, M.M. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 1037-1045.
26. Bartlett, P.N.; Caruana, D.J. *Analyst* **1994**, *119*, 175-180.
27. Mosbach, K. *Immobilized Enzymes and Cells*, Academic Press, Inc., London, **1988**.
28. McRipley, M.A; Linsenmeirer, R.A. *J.Electroanal. Chem.* **1996**, *414*, 235-246.
29. Watcharaphalakorn, S.; Ketithum, A.. *Senior Project* Department of Chemistry, Chulalongkorn University, **1997**.

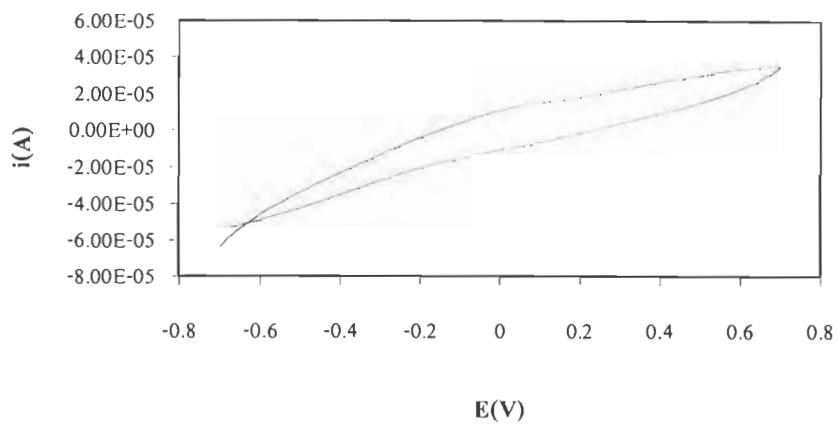
### ภาคผนวก



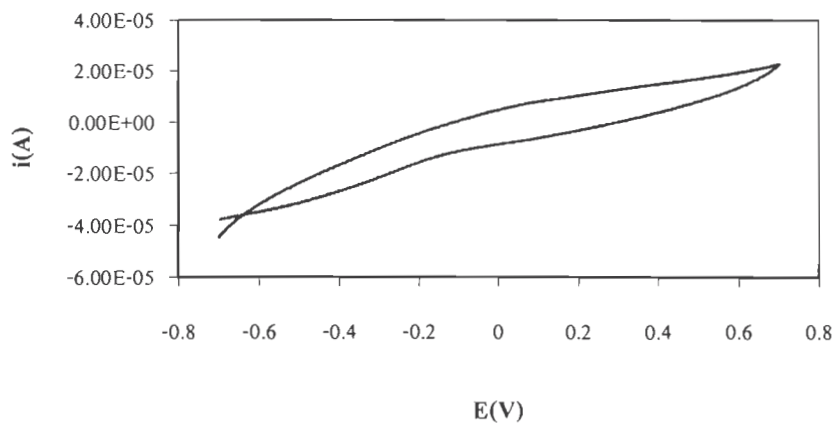
รูปที่ 1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.7$  ถึง  $0.7$  โวลต์ หลังจากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD  $50 \text{ units/mL}$  ที่ศักย์ไฟฟ้า  $0.8$  โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$   $25 \text{ mM}$  และในสารละลายที่ทำการพอลิเมอไรเซชันมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$   $20 \text{ mM}$  และ ให้ปริมาณไฟฟ้า  $50 \text{ mC}$



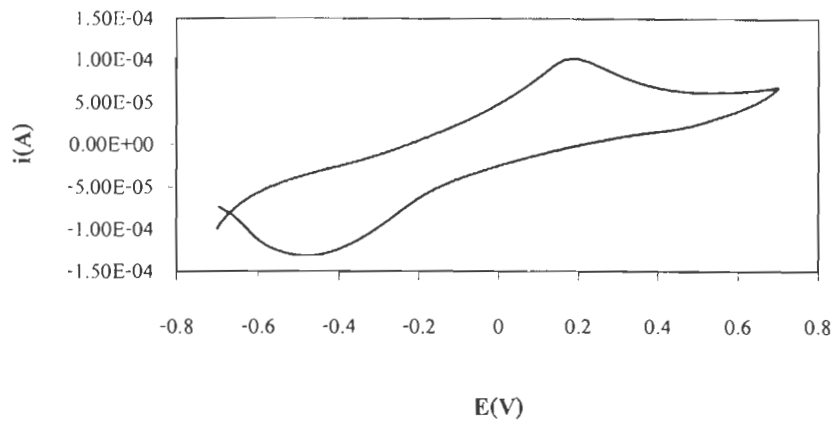
รูปที่ 2 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.7$  ถึง  $0.7$  โวลต์ หลังจากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD  $50 \text{ units/mL}$  ที่ ศักย์ไฟฟ้า  $0.8$  โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$   $50 \text{ mM}$  และในสารละลายที่ทำการพอลิเมอไรเซชันมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$   $20 \text{ mM}$  โดยให้ปริมาณไฟฟ้า  $50 \text{ mC}$



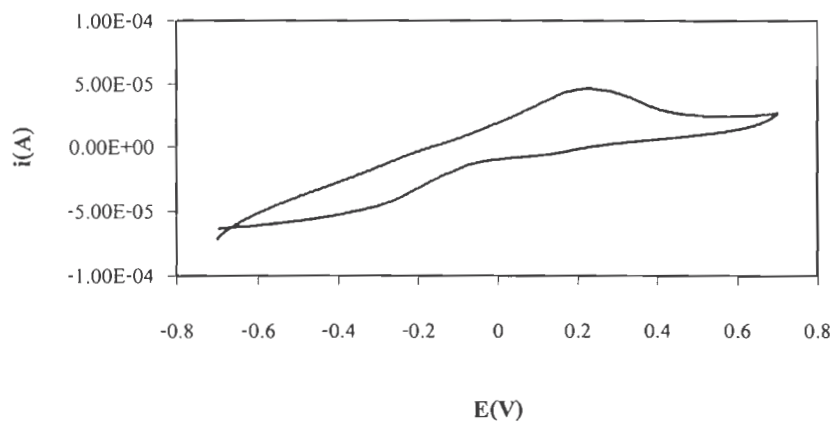
รูปที่ 3 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรม ของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.7 ถึง 0.7 โวลต์ ภายหลัง จากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD 50 units/mL ที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.8 โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM และมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  20 mM ในสารละลายที่ทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และให้ปริมาณไฟฟ้า 30 mC



รูปที่ 4 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรม ของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.7 ถึง 0.7 โวลต์ ภายหลัง จากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD 50 units/mL ที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.8 โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM และมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  20 mM ในสารละลายที่ทำการพอลิเมอร์ไรเซชัน และให้ปริมาณไฟฟ้า 40 mC

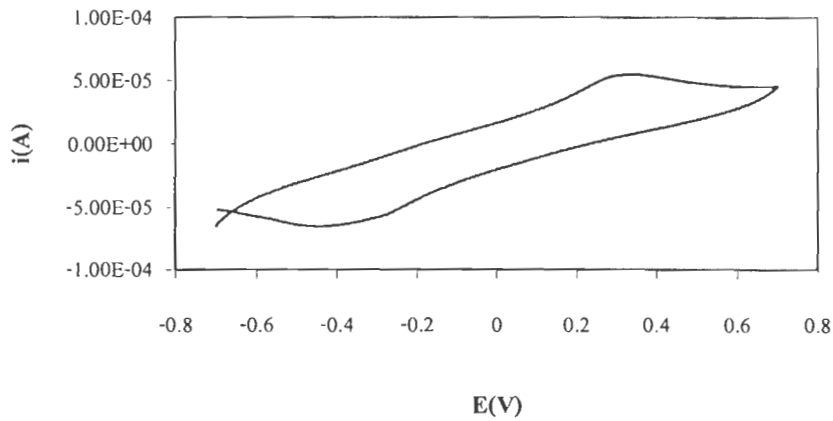


รูปที่ 5 ซิกนัลโวลแทมโมแกรม ของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.7$  ถึง  $0.7$  โวลต์ ภายหลังจากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD 50 units/mL ที่ศักย์ไฟฟ้า  $0.8$  โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM และให้ปริมาณไฟฟ้า 20 mC

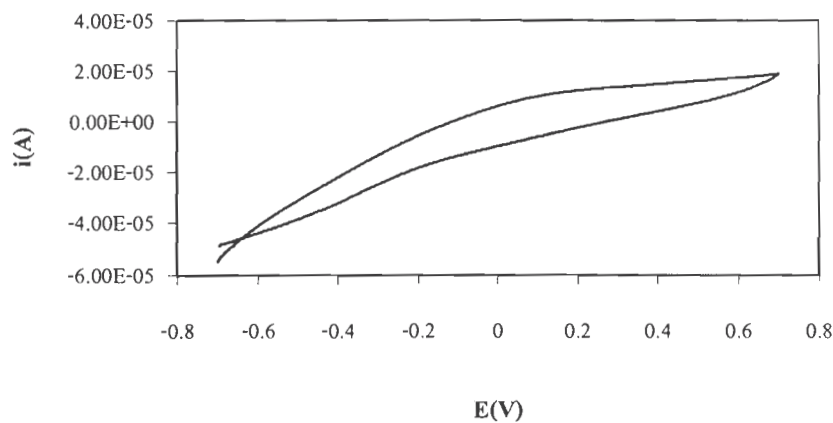


รูปที่ 6 ซิกนัลโวลแทมโมแกรม ของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.7$  ถึง  $0.7$  โวลต์ ภายหลังจากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD 50 units/mL ที่ศักย์ไฟฟ้า  $0.8$  โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM และให้ปริมาณไฟฟ้า 20 mC

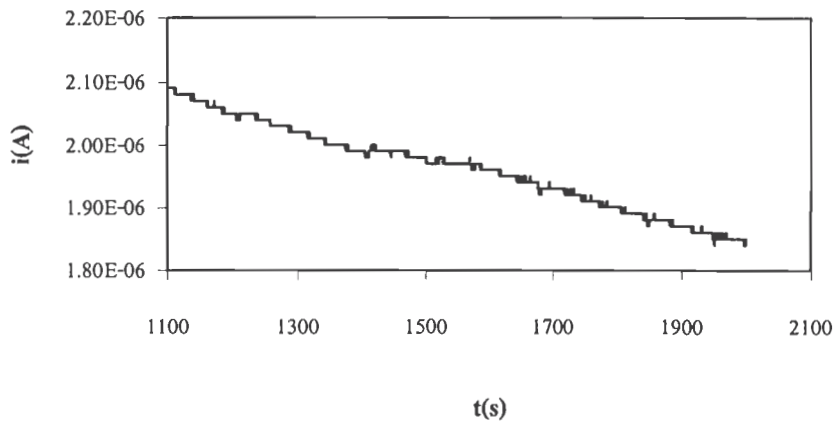




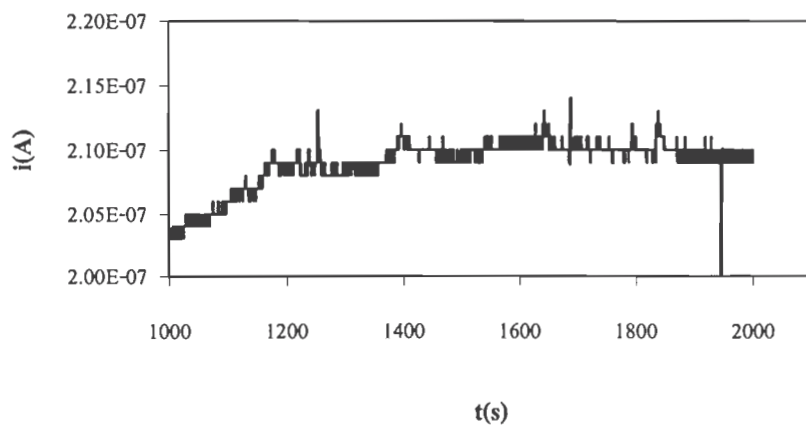
รูปที่ 7 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรม ของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.7$  ถึง  $0.7$  โวลต์ ภายหลังจากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD 50 units/mL ที่ศักย์ไฟฟ้า  $0.8$  โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  25 mM และให้ปริมาณไฟฟ้า 20 mC



รูปที่ 8 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรม ของ  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ศักย์ไฟฟ้า  $-0.7$  ถึง  $0.7$  โวลต์ ภายหลังจากการเตรียมฟิล์มพอลิเอินเมทิลไพโรลที่มี GOD 50 units/mL ที่ศักย์ไฟฟ้า  $0.8$  โวลต์ โดยใช้  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  50 mM และมี  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  20 mM ในสารละลายที่ทำกรพอลิเมอไรเซชัน และให้ปริมาณไฟฟ้า 50 mC



รูปที่ 9 กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานเมื่อใช้ฟิล์มพอลิ เอ็นเมทิลไพโรล ซึ่งฉีดกลูโคสครั้งละ 50  $\mu\text{L}$  จากสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.2 M โดยใช้วิธี แอมเพอโรเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์



รูปที่ 10 กระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานเมื่อใช้ฟิล์มพอลิ เอ็นเมทิลไพโรล ซึ่งฉีดกลูโคสครั้งละ 50  $\mu\text{L}$  จากสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.2 M โดยใช้วิธี แอมเพอโรเมทรี ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.4 โวลต์