



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง กลูโคสออกซิเดส-คาร์บอนนาโนทิวบ์คอมโพสิตเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคส
ในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง

Glucose Oxidase-CNT Composite for Glucose Determination in Honey
Products

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2553

จำนวน 280,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายชานินทร์ แดงกวารัมย์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

-

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 / ธันวาคม / 2554

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือสารเคมี อุปกรณ์ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณคุณจิราภรณ์ กิตติกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการผลิตขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จเสร็จสิ้นโครงการ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา น้องสาว และครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน แนะนำ และเป็นกำลังใจจนงานวิจัยสำเร็จคล่องไปด้วยดี

ชานินทร์ แดงกวารัมย์
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทคัดย่อ	1
Abstract	1
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	22
สรุปผลการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและดัชนีวัดความสำเร็จ	4
ตารางที่ 2 องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง	8
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ที่ได้จากการปรับปรุง ขั้วไฟฟ้าโดยใช้วัสดุที่แตกต่างกัน	15
ตารางที่ 4 สารเคมี	17
ตารางที่ 5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	18
ตารางที่ 6 ตัวอย่างน้ำผึ้งยี่ห้อต่างๆ และความเข้มข้นที่ตรวจพบโดยใช้กลูโคส ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น	38

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 น้ำผึ้ง (Wikipedia, 2012)	6
รูปที่ 2 โครงสร้างแบบ Fischer ของน้ำตาลกลูโคส	9
รูปที่ 3 แผ่นกราฟีน (grapheme sheet), B. ซิลิกิลวอลล์คาร์บอนนาโนทิวบ์ (single-walled carbon nanotube) และ C. มัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวบ์ (multi-walled carbon nanotube)	11
รูปที่ 4 ไดอะแกรมของไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบไปด้วย (1) ส่วนของรีเซพเตอร์ที่เป็นสารชีวโมเลกุล และ (2) ทรานสดิวเซอร์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล	12
รูปที่ 5 ไดอะแกรมของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ลูกศร $\Leftarrow$ บอกทิศทางของการเคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าของตัวออกซิไดซิง (ox) และลูกศร $\Rightarrow$ บอกทิศทางของการเคลื่อนที่ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าของตัวรีดิวซิง (red) ส่วนสัญลักษณ์ δ คือความหนาของชั้นของการแพร่	13
รูปที่ 6 กลไกการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase : Gox) ตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube : CNT) และอนุภาคนาโน (nanoparticles : NPs) กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสแล้วได้กลูโคนแลคโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดส์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า	14
รูปที่ 7 ขั้นตอนการสร้างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน	19
รูปที่ 8 การจัดเซลล์สำหรับการทดลองด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรี	19
รูปที่ 9 การออกแบบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแบบสี่เหลี่ยม	22
รูปที่ 10 โซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน โดยทดลองในสารละลายของโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ความเข้มข้น ก) 0.0 ข) 10.0 ค) 20.0 และ ง) 30.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย	22
รูปที่ 11 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20	23

- รูปที่ 12 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์:ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที 24
- รูปที่ 13 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20 25
- รูปที่ 14 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์:ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 4 นาที 26
- รูปที่ 15 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 6 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20 26
- รูปที่ 16 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 6 นาที 27
- รูปที่ 17 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 8 นาที 28
- รูปที่ 18 ยูวีสเปกตรัมของทองคำขนาดนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดเป็น 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 8 นาที 29
- รูปที่ 19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคกับเวลาในการสังเคราะห์ทองคำขนาดนาโนโดยใช้ทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดในอัตราส่วนโมล 1:10 30
- รูปที่ 20 อนุภาคนาโนทองคำจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ที่อัตราส่วนการสังเคราะห์ทองคำคลอไรด์ต่อไตรโซเดียมซิเตรด 1 : 10 โดย ทำที่สภาวะการให้ความร้อน (ก) 2 นาที (ข) 4 นาที (ค) 6 นาที และ (ง) 10 นาที กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านใช้กำลังไฟฟ้า 75 kV และกำลังขยาย 200,000 เท่า 31
- รูปที่ 21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคส ไบโอเซนเซอร์กับปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น 32
- รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V 33

- รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการตรึงฟิล์มปร๊สเซียนบลูกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม 34
- รูปที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการตรึงฟิล์มไคโตซานกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงปร๊สเซียนบลู 115 วินาที 35
- รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์กับกระแสไฟฟ้าที่ได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงปร๊สเซียนบลู 115 วินาที เวลาของการตรึงไคโตซาน 60 วินาที 36
- รูปที่ 26 กราฟเทียบมาตรฐานระหว่างกระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx โดยใช้สภาวะของเครื่องมือดังนี้ $E_{\text{applied}} = -0.05$ โวลต์, 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.4, CNT = 0.009 มิลลิกรัม, เวลาของการตรึงไคโตซาน 60 วินาที, เวลาของการตรึงปร๊สเซียนบลู 105 วินาที, และปริมาณของกลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม 37

กลูโคสออกซิเดส-คาร์บอนนาโนทิวบ์คอมโพสิตเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดกลูโคสในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง

Glucose Oxidase-CNT Composite for Glucose Determination in Honey Products

ธานินทร์ แทงกวารมย์

Tanin Tangkuarm

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

กลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยสมบัติทางชีวภาพของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและอาศัยสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของปรัสเซียนบลูติดลงบนคาร์บอนนาโนทิวบ์และไคโตซานโดยมีอนุภาคนาโนทองคำเป็นส่วนช่วยตรึงติดบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาได้ถูกนำไปทดสอบเพื่อหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยมีฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย โดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพอโรเมทรีในการทดสอบศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับขั้วไฟฟ้า ผลทดสอบพบว่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้ที่เหมาะสมคือ -0.05 V ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 15.56 ไมโครโมลาร์ (สัญญาณต่อสัญญาณพื้น = 3) มีช่วงความเป็นเส้นตรง 20 ไมโครโมลาร์ถึง 15 มิลลิโมลาร์ ไบโอเซนเซอร์นี้ถูกนำไปตรวจวัดหาปริมาณกลูโคสในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง ซึ่งพบว่ามีกลูโคสในช่วง 54 ไมโครโมลาร์ - 4.5 มิลลิโมลาร์

คำสำคัญ: กลูโคสไบโอเซนเซอร์, ปรัสเซียนบลู, อนุภาคนาโนทองคำ, คาร์บอนนาโนทิวบ์, กลูโคสออกซิเดส, ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน

Abstract

Glucose biosensor based on the deposition of biocatalytic activity of glucose oxidase (GOx) with the electrochemical properties of Prussian blue (PB) deposited on carbon nanotube and chitosan on the sphere of gold nanoparticles (AuNP) modified screen printed electrode (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) for determination of glucose is described. The SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx was examined glucose in honey product using 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.4 as supporting electrolyte. The chronoamperometric technique was used for testing

applied potential and it was found that the -0.05 V was the appropriated operational potential. The biosensor gave a detection limit of $15.56 \mu\text{M}$ based on $S/N = 3$ with the linearity in the range of $20 \mu\text{M}$ to 15 mM . The SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx was applied to determine glucose in honey samples and it found that the glucose in honey products were in the range of $54 \mu\text{M} - 4.5 \text{ mM}$.

Keywords: Glucose biosensors, Prussian blue, Gold nanoparticles, Carbon nanotube, Glucose oxidase, Screen printed electrode



คำนำ

น้ำตาลกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของร่างกาย การขาดแคลนหรือมีมากเกินไปเนื่องจากความผิดปกติของเซลล์ที่ใช้กลูโคสจะส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ เช่นโรคเบาหวาน (Diabetes) โรคความบกพร่องจากการขาดกลูโคส (Hypoglycemia) นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสยังเป็นสารอาหารที่ชดเชยการขาดพลังงานอย่างเฉียบพลันของเซลล์ ซึ่งพบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในเครื่องดื่มเกลือแร่ชนิดต่างๆ

น้ำผึ้งเป็นสารให้ความหวานตามธรรมชาติที่ได้จากผึ้ง ลักษณะเป็นของเหลวค่อนข้างข้น มีสีเหลืองจนถึงน้ำตาล ผึ้งผลิตน้ำตาลโดยใช้น้ำหวานที่ได้จากดอกไม้ โดยเก็บไว้ในกระเพาะอาหารแล้วนำมาเก็บไว้ในรังผึ้ง น้ำตาลในน้ำผึ้งมีถึง 95-99 % ได้แก่ฟรุคโทส กลูโคส ที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปสร้างพลังงานได้ทันที น้ำผึ้งที่ดีควรมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 20-40 % น้ำผึ้งสามารถใช้เป็นสารแทนความหวานแทนน้ำตาลทั่วไปได้โดยเหมาะสำหรับบุคคลที่ไม่ต้องการควบคุมน้ำตาลมากนัก การมีปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งมากเกินไป จะทำให้การเก็บรักษาและอายุของน้ำผึ้งลดลง เนื่องจากการสลายและกลิ่นของน้ำผึ้งเปลี่ยนไปเพราะกลูโคสที่มากเกินไปจะเป็นแหล่งพลังงานที่ทำให้จุลินทรีย์ทำงานเร็วขึ้น (Cavia *et al.*, 2002)

การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในน้ำผึ้งส่วนใหญ่ทำได้โดยอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างแพงเช่น HPLC-UV-Vis , ICP-AES (Cavia *et al.*, 2002; Ioannidou *et al.*, 2005) ทำให้การวิเคราะห์ทำได้ช้า ไม่สามารถทำในภาคสนามได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์ในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้งเพื่อให้การวิเคราะห์ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความไวมากขึ้น เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปให้ชุมชนใช้ได้ และเป็นการทำให้ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการผลิตน้ำผึ้งมีมาตรฐานมากขึ้นซึ่งได้จากวิธีการตรวจสอบที่ง่าย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์การวิจัยดังนี้

1. สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองคำ
2. ทำคาร์บอนนาโนทิวป์ให้บริสุทธิ์
3. สร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์ให้มีราคาถูกสามารถทำในภาคสนามได้

ขอบเขตการวิจัย

ในการวิจัยนี้มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. สังเคราะห์ ศึกษาคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทองคำ
2. สร้างและทดสอบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน
3. ประกอบและสร้างเซนเซอร์โดยใช้กลูโคสออกซิเดส
4. ศึกษาผลของตัวแปรได้แก่ พีเอช, ศักย์ไฟฟ้าที่ให้, ปริมาณของอนุภาคนาโนทองคำ และ ปริมาณของไคโตซาน
5. ศึกษาคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์, ขีดจำกัดการตรวจวัด และค่าการทำซ้ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ตารางที่ 1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและดัชนีวัดความสำเร็จ

ประโยชน์	ดัชนีตัววัดความสำเร็จ
1. เทคโนโลยีใหม่	ไบโอเซนเซอร์ชนิดใหม่โดยใช้เทคโนโลยีพิมพ์สกรีน
2. องค์ความรู้ใหม่	2.1 การสังเคราะห์สารนาโนเทคโนโลยีแบบใหม่ 2.2 นาโนเทคโนโลยี-ไบโอคอมโพสิต
3. หน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์	3.1 ชุมชนในท้องถิ่น 3.2 สถาบันการศึกษาต่างๆ
4. การผลิตนักศึกษา	ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาตรีจำนวน 1 คน
5. การตีพิมพ์ผลงานวิชาการ	ตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง
6. การนำเสนอผลงานในที่ประชุม	6.1 เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ 6.2 เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

นิยามศัพท์

Ag/AgCl = ขั้วไฟฟ้าชนิดซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์

AuNP = อนุภาคนาโนทองคำ

CE = ขั้วไฟฟ้านับ

e^- = อิเล็กตรอน

RE = ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง

CNT = คาร์บอนนาโนทิวบ์

GOx = เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

m = เมตร

M = ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ (Molar)

MWCNT = คาร์บอนนาโนทิวบ์แบบผนังหลายชั้น

nm = ความยาวในหน่วยนาโนเมตร (10^{-9} เมตร)

PB = ปรีตเขียนบลู

SPCE = ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx = กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

TEM = กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

WE = ขั้วไฟฟ้าทำงาน

UV-Vis = เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

%RSD = เปอร์เซนต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

λ = ความยาวคลื่น

μL = ปริมาตรในหน่วยไมโครลิตร

การตรวจเอกสาร

น้ำผึ้ง (Honey)

น้ำผึ้ง คือ เป็นของเหลวที่ผึ้งดูดเก็บจากต่อมน้ำหวานของพืชนำกลับไปแปรรูปและเก็บสะสมไว้ในรวงผึ้ง มีลักษณะเหลืองใสดังรูปที่ 1 น้ำผึ้งที่ผลิตออกมาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี มีความเข้มข้นสูงจนในที่สุดจะมีปริมาณน้ำเหลืออยู่ไม่เกินร้อยละ 20 ของน้ำหนัก ซึ่งระดับของความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่สมบูรณ์จะมีปริมาณน้ำตาล 79% ขึ้นไป



รูปที่ 1 น้ำผึ้ง (Wikipedia, 2012)

คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำผึ้ง

ที่อุณหภูมิ 20 °C มีความถ่วงจำเพาะ = 1.4225 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

น้ำผึ้ง 3,785 มิลลิลิตร (1 แกลลอน)หนัก 5,375 กรัม

น้ำผึ้ง 0.453 กิโลกรัม (1 ปอนด์) มีปริมาตร 318.9 มิลลิลิตร

น้ำผึ้ง 0.453 กิโลกรัม (1 ปอนด์) ให้พลังงาน 1,380 แคลอรี

น้ำผึ้ง 100 กรัม ให้พลังงาน 303 แคลอรี

องค์ประกอบของน้ำผึ้ง

1. ปริมาณความชื้น น้ำผึ้งที่ดีควรมีปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 21
2. น้ำตาลของน้ำผึ้ง น้ำผึ้งเป็นแหล่งของสารอาหารคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ เพราะถ้าหักปริมาณน้ำหรือความชื้นออกเสียแล้ว ร้อยละ 95-99 ที่เหลือจะเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ชนิดที่สำคัญคือ น้ำตาลลิวูโลส (ฟรุคโทส) และเดกซ์โทรส (กลูโคส) ที่ผึ้งย่อยสลายจากน้ำตาลซูโครสในน้ำหวาน น้ำตาล

ทั้งสองชนิดซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปสร้างพลังงานได้ทันที นอกจากน้ำตาลทั้งสองชนิดแล้ว น้ำผึ้งยังประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส, มอลโทส, แล็กโทส และน้ำตาลอื่น ๆ รวม 17 ชนิด

3. กรดในน้ำผึ้ง เนื่องจากน้ำผึ้งมีรสหวานจัด รสเปรี้ยวของสภาพความเป็นกรดจึงถูกปิดบังเอาไว้ กรดในน้ำผึ้งมีหลายชนิด เช่น กรดฟอรั่มิก อะซีติก มิวทาร์ค ซิตริก มาลิก และซักซินิก กรดที่สำคัญที่สุดในน้ำผึ้งคือ กรดกลูโคนิก ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลเดกซ์โทรส ในน้ำผึ้งยังมีกรดอะมิโนถึง 16 ชนิด นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์ คือกรดฟอสฟอริก และกรดเกลือ

4. แร่ธาตุในน้ำผึ้ง ปริมาณต่ำ (ส่วนของแร่ธาตุต่างๆ) ในน้ำผึ้งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.17% ของน้ำหนักน้ำผึ้ง แร่ธาตุที่พบในน้ำผึ้ง ได้แก่ แคลเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม สังกะสี เหล็ก แมงกานีส

5. เอนไซม์ในน้ำผึ้ง เอนไซม์สำคัญที่สุดที่พบในน้ำผึ้ง คือ “อินเวอร์เทส” ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำหวานของดอกไม้ให้เป็นน้ำตาลแปรสภาพ คือ น้ำตาลเดกซ์โทรสและกลูโคส ในน้ำผึ้งมีเอนไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ “ไดเอสเทส” (หรืออัมเลส) เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในน้ำผึ้งมี เอนไซม์คาตาเลส และฟอสฟาเทส และในรายงานล่าสุดพบว่าในน้ำผึ้งมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ กลูโคสออกซิเดส เป็นเอนไซม์จากฟาริงเกลเกล็ดของผึ้ง ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ “อินฮิบิท” ที่ทำหน้าที่ยับยั้งและทำลายเชื้อโรคได้

6. วิตามินในน้ำผึ้ง ในน้ำผึ้งมีวิตามินอยู่หลายชนิด ได้แก่ ไทอามิน (บี1), ไรโบฟลาวิน (บี 2), กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี), ไพรีดอกซิน (บี 6), กรดแพนโทนิค, กรดนิโคตินิก หรือที่เรียกรวมกลุ่มว่า วิตามินบีคอมเพล็กซ์ ปริมาณวิตามินในน้ำผึ้งแต่ละชนิดแตกต่างกันตามที่มาของน้ำผึ้ง เดกซ์ทรินในน้ำผึ้ง เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นโซ่ยาว เป็นส่วนที่ทำให้ น้ำผึ้งข้นหนืดและเคลือบผิว

7. สารแขวนลอยในน้ำผึ้ง สารแขวนลอย หมายถึง โมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดจากการรวมกลุ่มกันของโมเลกุลขนาดเล็ก และกระจายตัวอยู่ในของเหลวนั้น ๆ โมเลกุลของสารแขวนลอยจะไม่ตกตะกอน สารแขวนลอยส่วนใหญ่ในน้ำผึ้งจะเป็นเอนไซม์ดอกไม้ ทั้งที่ไม่ถูกน้ำย่อยย่อย และที่ถูกน้ำย่อยย่อยแล้วบางส่วน และพบว่ามีโปรตีน 4-7 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน ปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งจะมีอยู่ประมาณ 0.1% - 0.6%

8. อินฮิบิท หรือ คุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อโรคของน้ำผึ้ง สารอินฮิบิทมีผลต่อต้านเชื้อโรค เพราะมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปฏิกิริยาเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกลูโคสในแลคโตน โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส จึงมีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาบาดแผลสด ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก

ผลิตเชื้อ สารกระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวภาพอื่น ๆ ในน้ำผึ้ง ได้แก่ วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ ในน้ำผึ้ง นับว่าเป็นส่วนหนึ่งของสารที่กระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวภาพด้วย

องค์ประกอบโดยรวมของน้ำผึ้งสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง

องค์ประกอบพื้นฐาน	จำนวนเปอร์เซ็นต์	จำนวนกรัม
ฟรุกโตส (d-fructose)	38.19	173.20
เดกโทรส (d-glucose)	31.28	141.90
ซูโครส (น้ำตาลทราย)	1.31	5.90
มอลโทส	7.31	33.20
น้ำตาลอื่นๆ	1.50	6.80
รวมปริมาณน้ำตาล	79.59	361.00
น้ำ (ความชื้น)	17.20	78.0
กรด	0.57	2.60
โปรตีน	0.26	0.20
แอส (ash)	0.17	0.80
อื่นๆ	2.21	10.00
รวม	100.00	453.60

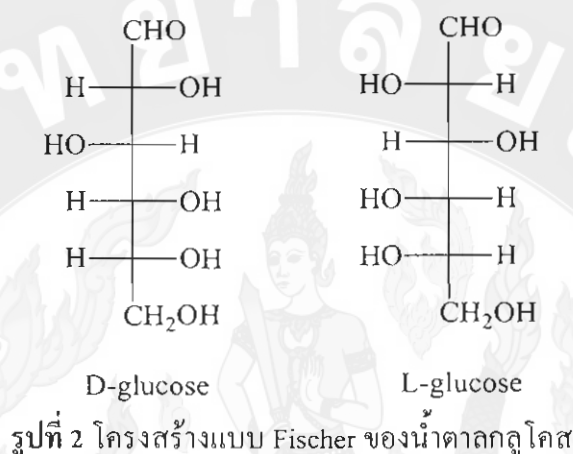
ประโยชน์ของน้ำผึ้ง

- บรรเทาอาการไอและหวัด
- ลดกรดในกระเพาะอาหาร ช่วยให้อาหารย่อยดีขึ้น
- แก้ความดันโลหิตสูง
- ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวพรรณและเส้นผม
- ช่วยคลายความเหน็ดเหนื่อยและอ่อนเพลีย

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)

น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และกลูโคสเป็น

หนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) โครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของกลูโคสมี 2 รูป คือ รูป L และ D ดังรูปที่ 2 กลูโคสนี้จะอยู่ในรูปที่เรียกว่า เดกซ์โตรส (dextrose) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะใช้ในในอุตสาหกรรมอาหาร



กลูโคสเป็นน้ำตาลที่พบได้ทั่วไปในรูปอิสระโดยเฉพาะในส่วนต่างๆของพืชพบมากในผักผลไม้ น้ำผึ้ง และน้ำเลือดเป็นน้ำตาลที่สลายให้พลังงานมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต มีความหวานเป็นที่สองรองจากน้ำตาลฟรักโทส ทางารแพทย์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่ต้องการใช้อย่างรวดเร็ว เช่น ในคนป่วยที่อ่อนแอ น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลชนิดเดียวในกระแสเลือดของมนุษย์ที่ได้จากการย่อยคาร์โบไฮเดรตจึงเรียกว่า น้ำตาลในเลือด (blood sugar)

หน้าที่ของกลูโคส

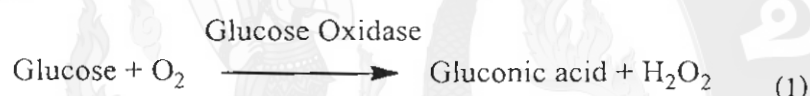
ทำหน้าที่หลัก 3 ประการในขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์คือ

1. เป็นแหล่งของคาร์บอนในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) กรดอะมิโน (amino acids) และสารประกอบอื่นๆ
2. ในกระบวนการเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) จะสามารถผลิต NADPH ซึ่งจำเป็นในขบวนการสังเคราะห์ไขมัน (Lipogenesis)
3. เป็นแหล่งพลังงานโดยตรง

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase : GOx)

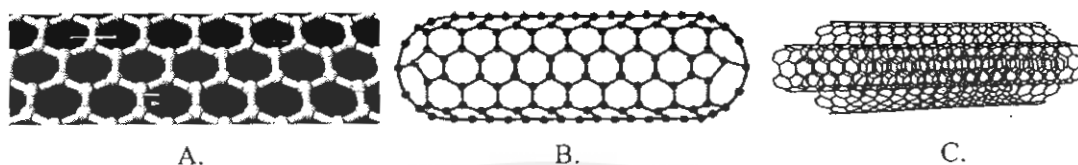
มีชื่อตามระบบคือ β -D-glucose : oxygen oxidoreductase : พบเมื่อปี ค.ศ. 1982 โดย Muller โดยสกัดจาก *Aspergillus* และ *Penicillium glaucum* เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ D-glucose ไปเป็น δ -D-gluconolactone ในสภาวะที่มีออกซิเจน เดิมมีการเรียกชื่อเอนไซม์นี้ว่า penicillium B, notatin และ glucose aerodehydrogenase และต่อมาได้มีการเสนอให้เรียกว่า glucose oxidase หรือใช้ตัวย่อว่า GOx

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับกลูโคสเท่านั้น จะจับกับกลูโคสแบบ lock and key ในไบโอเซนเซอร์เมื่อนำกลูโคสมาทำปฏิกิริยากับกลูโคสออกซิเดสจะได้กรดกลูโคนิกกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเมื่อเกิดปฏิกิริยากับกลูโคสจะกลายเป็นกรดกลูโคนิกดังสมการ (1)



คาร์บอนนาโนทิวและคุณสมบัติโดยทั่วไป

คาร์บอนนาโนทิว (Carbon nanotube) คือรูปหนึ่งของคาร์บอนที่เกิดจากแผ่นกราฟีน (graphene) ม้วนตัวเกิดเป็นท่อขนาดนาโน (nanotube) ถ้าการม้วนตัวดังกล่าวเกิดเป็นท่อโดยใช้กราฟีนแผ่นเดียวจะเรียกว่าซิงเกิลวอลล์คาร์บอนนาโนทิว (single-walled carbon nanotube ; SWCNT) หรือเกิดจากแผ่นกราฟีนหลายแผ่นม้วนตัวเกิดเป็นท่อขนาดนาโนเรียกว่ามัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิว (multi-walled carbon nanotube ; MWCNT) ดังรูปที่ 3 ทั้งซิงเกิลวอลล์และมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวแสดงคุณสมบัติเด่นทางด้านแสง เคมี กล ไฟฟ้า และไฟฟ้าเคมี (Rao *et al.*, 2004; Gogotsi, 2006) ด้วยการถูกละลายได้ดีและสามารถปรับปรุงพื้นผิว (surface) ของคาร์บอนนาโนทิวได้ง่าย ทำให้มีการใช้คาร์บอนนาโน-ทิวในแอปพลิเคชันด้านนาโนเทคโนโลยี ได้แก่ nanocomposite, nanotube-probe และ nanotube-proteins conjugates นอกจากนี้คาร์บอนนาโนทิวยังถูกใช้ในแอปพลิเคชันด้านไบโอเทคโนโลยีโดยการติดหมู่ฟังก์ชัน (functionalization) กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides), เอนไซม์ (enzymes) และ โปรตีน (proteins) เพื่อให้ได้ความเลือกเฉพาะ (selectivity) มากขึ้น



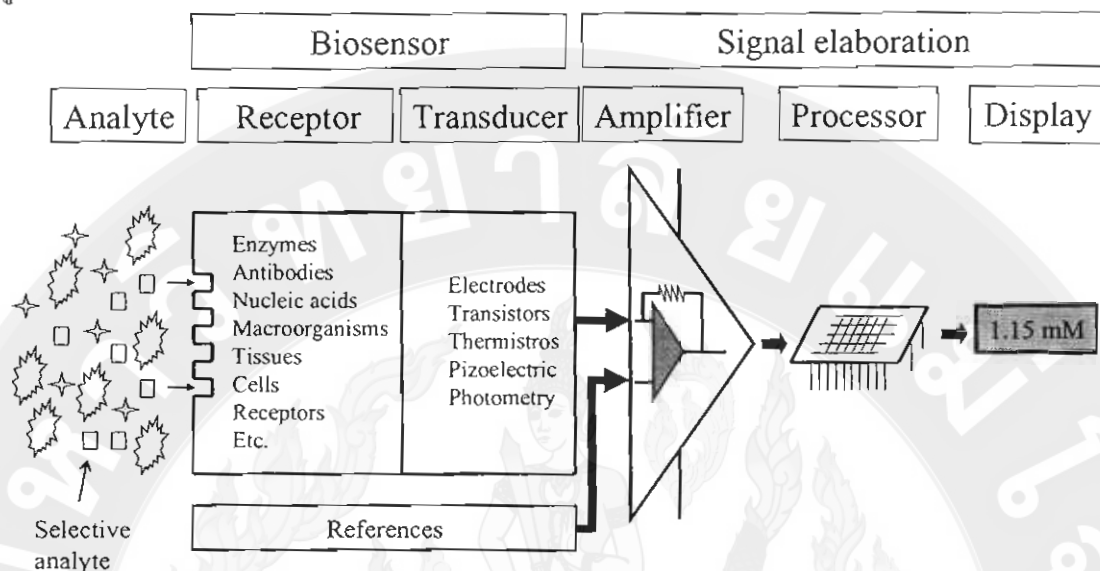
รูปที่ 3 แผ่นกราฟีน (grapheme sheet), B. ซิลิกลวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (single-walled carbon nanotube) และ C. มัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (multi-walled carbon nanotube)

คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งของคาร์บอนนาโนทิวป์คือความเข้ากันได้ (compatibility) ของคาร์บอนนาโนทิวป์กับสารชีวภาพ (biomaterials) นำไปสู่การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ คอมโพสิต ชนิดต่างๆ เช่นการนำซิลิกลวอลล์และมัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ไปใช้ในการพัฒนาเซนเซอร์ เพื่อตรวจวัดกลูโคส ซึ่งทำให้เซนเซอร์ดังกล่าวมีอายุการใช้งานที่นานขึ้นโดยไม่เสียแอคติวิตีของเอนไซม์ ประสิทธิภาพที่ดีขึ้นของกลูโคสเซนเซอร์เกิดจากการเอนไซม์กลูโคสสามารถไหลเข้าไปได้มากขึ้นและประสิทธิภาพของการเชื่อมต่อทางไฟฟ้าระหว่างชั้นของสารชีวภาพกับผิวสัมผัสของขั้วไฟฟ้าดีขึ้นกว่าการไม่มีคาร์บอนนาโนทิวป์ และเกิดองค์ความรู้ใหม่คือการค้นพบการขนถ่ายอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer) ระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับขั้วไฟฟ้า เนื่องจากคาร์บอนนาโนทิวป์ได้เข้าไปอยู่ในบริเวณแอคติฟของเอนไซม์ทำให้สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนได้โดยตรง นอกจากนี้ยังได้ก่อให้เกิดความเข้าใจถึงปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการพัฒนานาโนไบโอเซนเซอร์ (nanobiosensors) นาโนไบโอรีแอคเตอร์ (nanobioreactors) และเซลล์พลังงานชีวภาพขนาดนาโน (nanobio fuel cells) ต่อไปในอนาคต

ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี

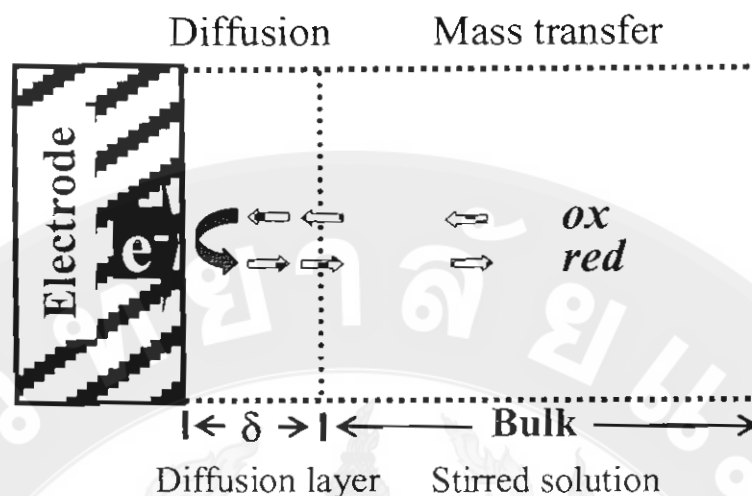
ไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical biosensors) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของสารใดๆ โดยใช้สัญญาณที่ได้จากการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า คุณสมบัติของไบโอเซนเซอร์ มีความเลือกเฉพาะสูง มีความไวสูงเมื่อเทียบกับเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตริ ไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วน (Kissinger, 2005; Luong *et al.*, 2008) คือ (1) ส่วนของสารทางชีวภาพ (biomaterials) ที่ทำหน้าที่จดจำ (recognition) หรือเลือกเฉพาะ (selection) สารตัวอย่างที่จะทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีอย่างจำเพาะ ส่วนที่ (1) นี้จะถูกตรึง (immobilization) อยู่บนผิวหน้าของ (2) ทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งทรานสดิวเซอร์นี้จะทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณดังกล่าวไปยังส่วนประมวลผล (processor) เพื่อวัดหรือแสดงสัญญาณให้เราได้ทราบ (signal elaboration) ซึ่งจะ

ทำหน้าที่ในการวัดสัญญาณและแปลค่าออกมาเป็นหน่วยต่างๆ ที่ต้องการ ไบโอสเซนเซอร์นี้แสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครงสร้างของไบโอสเซนเซอร์ซึ่งประกอบไปด้วย (1) ส่วนของรีเซปเตอร์ที่เป็นสารชีวโมเลกุล และ (2) ทรานสดิวเซอร์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณ ให้แก่ส่วนของการประมวลผล

การเกิดกระแสทางไฟฟ้าเคมีนั้นสามารถอธิบายได้ง่ายๆ ดังรูปที่ 5 เริ่มจากการที่ตัวออกซิไดซิง (oxidizing species : *ox*) จากสารละลายบัลค์ (bulk solution) เคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของการแพร่ (diffusion layer : δ) ใกล้ๆ บริเวณผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่มีการจ่ายศักย์ไฟฟ้าจากเครื่องโพเทนชิโอสแตต ตัวออกซิไดซิง ซึ่งดังกล่าวจะรับอิเล็กตรอนที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเกิดเป็นตัวรีดิวซิง (reducing species : *red*) แล้วเคลื่อนที่ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเข้าสู่ชั้นของการแพร่และออกสู่สารละลายบัลค์ ปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องมือวัดคุมทางไฟฟ้าเคมีหรือเรียกว่าเครื่องโพเทนชิโอสแตต (potentiostat) และสามารถนำไปแปลผลได้ต่อไป



รูปที่ 5 ไดอะแกรมของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ลูกศร $\Leftarrow$ บอกทิศทางของการเคลื่อนเข้าสู่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าของตัวออกซิไดซิง (ox) และลูกศร $\Rightarrow$ บอกทิศทางการเคลื่อนที่ออกจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้าของตัวรีดิวซิง (red) ส่วนสัญลักษณ์ δ คือความหนาของชั้นของการแพร่

การตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคคอมโพสิต

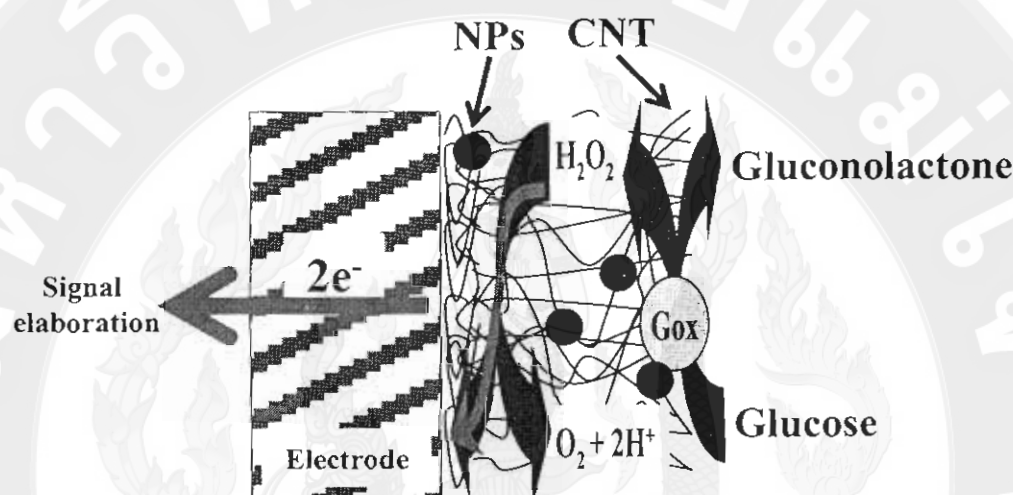
การปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคคอมโพสิต เป็นการรวมองค์ประกอบของส่วนการรับรู้ (recognition) ร่วมกับส่วนซัพพอร์ต (supporting part) ต่างๆ ที่ทำให้การตรึงดังกล่าวมีความแข็งแรง (strength) มีความทนทาน (endurance) ให้สัญญาณดีขึ้น (signal enhancing)

การตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า สามารถทำได้โดยการผสมส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำไปตรึงด้วยเทคนิคที่เฉพาะ เช่น การตรึงโดยการดูดซับ (adsorption), การตรึงโดยวิธีโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization), การตรึงโดยวิธีทำให้เกิดพันธะทางเคมี (chemical bonding), การตรึงโดยวิธีเคลือบ (entrapment) ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดี-ข้อเสียที่แตกต่างกัน การตรึงเอนไซม์ส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคการตรึงแบบการดูดซับเพราะจะทำให้เอนไซม์ยังคงดีสภาพการทำงานที่ดี สามารถเติมองค์ประกอบต่างๆ ที่สำคัญได้ง่าย ทำการตรึงได้รวดเร็ว และสามารถทำได้ในปริมาณมาก

การตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคคอมโพสิต

กลูโคสไบโอเซนเซอร์เป็นเซนเซอร์ที่ทำงานได้โดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสได้กลูโคนแลกโตน (gluconolactone) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ที่เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับกลูโคส (Chen *et al.*, 2008;

Crespilho *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; Luong *et al.*, 2008; Musameh *et al.*, 2008; Olea *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2008) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นี้จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าได้แก๊สออกซิเจนและโปรตรอนออกมา ดังรูปที่ 6 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นโดยอาศัยนาโนเทคโนโลยีเช่นคาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT) และอนุภาคนาโน (nanoparticles ; NPS)



รูปที่ 6 กลไกการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase : Gox) ตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าร่วมกับคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube : CNT) และอนุภาคนาโน (nanoparticles : NPs) กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับกลูโคสแล้วได้กลูโคนแลกโตนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดส์ที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า

การเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจะให้กระแสไฟฟ้าออกมา ซึ่งปริมาณกระแสไฟฟ้างกล่าวเป็นฟังก์ชันกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความสัมพันธ์กับกลูโคส ดังนั้นกระแสที่ได้จึงเป็นความสัมพันธ์กับกลูโคส ดังสมการ (2) (Lacourse, 1997; Settle, 1997)

$$j = \frac{nFADC}{\delta} \quad (2)$$

เมื่อ j คือกระแสไฟฟ้า, n คือจำนวนอิเล็กตรอนที่ใช้ในปฏิกิริยา, A คือพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้า, D คือสัมประสิทธิ์ของการแพร่, C คือความเข้มข้นของกลูโคส, δ คือความหนาของชั้นการแพร่

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาวัสดุโกลด์ไบโอเซนเซอร์มีมาอย่างต่อเนื่องโดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase ; GOx) ทำหน้าที่รับรู้ (recognition) กับกลูโคสที่มีอยู่ในสารละลาย มีการนำเทคโนโลยีและวัสดุต่างๆ เช่น เทฟลอน[®] (Teflon[®]), คาร์บอนนาโนทิวบ์ (CNT), แพลทินัมโซลเจล (Pt-sol-gel), ไคโตซาน (chitosan, CHIT), แนฟฟิออน[®] (nafion[®]), โพลีไพโรล (polypyrrole ; PPy), คาร์บอนนาโนทิวบ์-คาร์บอนเพสต์ (CNTPE), อนุภาคนาโนทองคำ (AuNP), อนุภาคแพลทินัมนาโน (PtNP) โดยนำอนุภาคเหล่านั้นตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าชนิดต่างๆ กัน เช่น กลาสคาร์บอน (GCE), กราไฟต์ (graphite), เบซอลเฟนไฟโรลิดิกกราไฟต์ (BBPG) การปรับปรุงดังกล่าวทำประสิทธิภาพและคุณลักษณะของขั้วไฟฟ้าเช่นศักย์ไฟฟ้าที่ให้แกขั้วไฟฟ้า (E_{applied}), ช่วงที่เป็นเส้นตรง (linear range), ความไว (sensitivity), ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection ; LOD), อายุการใช้งาน (useful lifetime), ค่าการยับยั้งของไมเกลิส (K_M^{app}) แสดงได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบคุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์ที่ได้จากการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าโดยใช้วัสดุที่แตกต่างกัน

Biosensor	E_{applied} (V)	Linearity (mM)	Sensitivity (mA M ⁻¹)	LOD (μM)	Useful life time	K _M ^{app} (mM)	References
GOx-CNT-Teflon	+0.1	2-20					(Wang and Musameh, 2003)
GOx-CoNP-CNT-CHIT-GCE	-0.2 vs SCE	0.01-10		5			(Yang <i>et al.</i> , 2006)
PDDA/GOx/PDDA/CNT-GCE	-0.1 vs Ag/AgCl ^a	0.015-6		7	1 month ^b		(Liu and Lin, 2006)
GOx-Pt-sol-gel/CNT	+0.1	1-25	1.2				
(CNT-GOx) _n -graphite	+0.6	0.5-15	0.039	90	15 days ³		(Huang <i>et al.</i> , 2006)
GOx-CNT-CHIT	+0.4	up to 78	0.52		14 days ³		(Liu <i>et al.</i> , 2005)

Biosensor	E_{applied} (V)	Linearity (mM)	Sensitivity (mA M^{-1})	LOD (μM)	Useful life time	K_d^{app} (min)	References
Pd-GOx-Nafion-CNT	+0.3 vs Ag/AgCl	up to 12		150		8.2	(Lim <i>et al.</i> , 2005)
PPy/CNT/GOx-GCE	+0.9 vs Ag/AgCl	4–50	0.023	200			(Wang and Musameh, 2005)
CNTPE-GOx	-0.1	up to 25	0.013	600	3 months ^a		(Rubiane s and Rivas, 2003)
AuNP/CNT-GOx	+0.45	0.05–13	0.01	10	22 days		(Wang <i>et al.</i> , 2003)
Gox/PtNP/CNT/graphite	+0.6 vs SCE	0.1–13.5			3 weeks		(Tang <i>et al.</i> , 2004)
CNT-sol-gel-GOx/BBPG	+0.3 vs SCE	0.2–20	0.196	50		10.11	(Salimi <i>et al.</i> , 2004)
GOx/CHIT/Nafion-CNT/GCE	+0.7	up to 7.5	0.28	35			(Rivas <i>et al.</i> , 2007)

a = Flow injection stability

b = Storage stability

อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานการทำไบโอเซนเซอร์โดยใช้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนเป็นวัสดุใช้งาน จึงทำให้คณะผู้จัดทำโครงการนี้ เล็งเห็นว่าควรปรับปรุงด้วยขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนซึ่งสามารถผลิตขึ้นได้เอง สำหรับตัวอย่างที่จะนำไปใช้คือตัวอย่างน้ำผึ้ง ซึ่งจะเป็นการนำเทคโนโลยีนี้สู่ชุมชน เพื่อให้ชุมชนได้ตระหนักและเพิ่มคุณภาพของน้ำผึ้งซึ่งเป็นสินค้าของจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีการตรวจวัดที่ง่ายและมีราคาถูก

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมีและอุปกรณ์

ในการทำการวิจัยนี้ได้จัดเตรียมสารเคมี ดังตารางที่ 4 เพื่อนำไปเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง หรือใช้ในการสังเคราะห์สารสำคัญ สำหรับนำมาปรับปรุงกลูโคสไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดหาปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 4 สารเคมี

ลำดับ	ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1.	Ascorbic acid	AR grade	May & Barker	England
2.	Carbon ink	-	Acheson	USA
3.	Multi-walled carbon nanotube	> 98.9%	Nanolab	USA
4.	Caffeine	AR grade	Sigma	USA
5.	D-glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$)	99.0%	Ajax Chemical	Australia
6.	Dimethylformamide (DMF)	HPLC	Ajax Chemical	Australia
7.	Disodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)	99.0%	Ajax Chemical	Australia
8.	Ethanol (C_2H_5OH)	AR grade	Merck	Germany
9.	Ferric chloride anhydrous ($FeCl_3$)	99.0%	Fluka	Switzerland
10.	Glucose oxidase (GOx) from aspergillus niger	100,000 – 25,000 units/g	Sigma	USA
11.	Gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4$)	49.0%	Sigma	USA
12.	Hydrochloric acid (HCl)	37.0%	Merck	Germany
13.	Nitric acid (HNO_3)	70.0%	Ajax Chemical	Australia
14.	Potassium chloride (KCl)	99.5%	Merck	Germany
15.	Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$)	99.0%	Ajax Chemical	Australia
16.	Silver/silver chloride ink	-	Acheson	USA
17.	Sodium dihydrogen orthophosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	99.0%	Ajax Chemical	Australia

ลำดับ	ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
18.	Trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	99.0%	Ajax Chemical	Australia

เครื่องมือและอุปกรณ์

ในการทำการวิจัยนี้ได้จัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญเพื่อใช้ในการทดลอง เช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร หรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในสารตัวอย่าง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

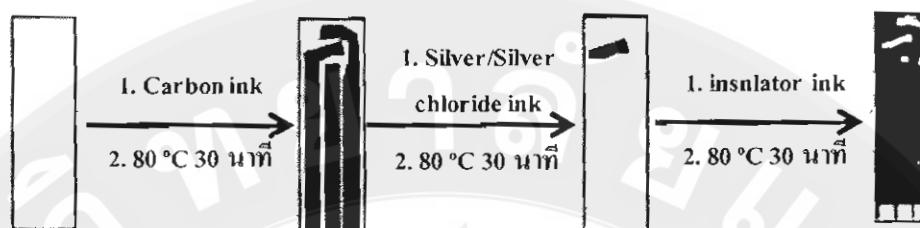
ลำดับ	ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/รุ่น	ประเทศ
4.	เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง	Mettler Toledo / pg 5002-s	Switzerland
5.	เครื่องไมโครเวฟ	Samsung / M181GN	Thailand
6.	เครื่องวัดคูลอมบ์-กระแสไฟฟ้า	CH Instrument/CH1230A	USA
7.	เครื่องวัดกลูโคส	Medisense/optium xceed	USA
8.	เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	Hitachi / U-2900	Japan
9.	เครื่องอัลตราโซนิก	Labquip	England
10.	เตาอบ (Oven)	Gallenkamp	Germany

การประดิษฐ์ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน (Screen printed electrode preparation)

ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ได้สร้างขึ้นโดยใช้โปรแกรม CAD/CAM ในการออกแบบ ซึ่งขั้วนี้เป็นขั้วที่มี 3 ขั้วในพิมพ์เดียว โดยมีขั้วไฟฟ้าทำงาน (Working electrode; WE) เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 2.21 ตารางเซนติเมตร มีขั้วไฟฟ้าช่วยขนาดใหญ่กว่าขั้วไฟฟ้าทำงาน และมีขั้วไฟฟ้าอ้างอิงขนาดเล็กกว่าขั้วทำงาน ดังรูปที่ 7 วิธีการสร้างนี้ได้ใช้ตามวิธีของ Tangkauram (Tangkuaram *et al.*, 2007) สรุปได้ดังนี้คือ

1. สกรีนสีการ์บอน (Carbon-ink) ลงไปบนแผ่น PVC เพื่อทำเส้นนำไฟฟ้า, ขั้วไฟฟ้าทำงาน และขั้วไฟฟ้าช่วย
2. สกรีนคอลลอยด์เงิน/เงินคลอไรด์ (Ag/AgCl ink) เพื่อเป็นขั้วอ้างอิง
3. สกรีนทับด้วยสีฉนวน (Insulator ink) เพื่อกำหนดขอบเขตของขั้วไฟฟ้า

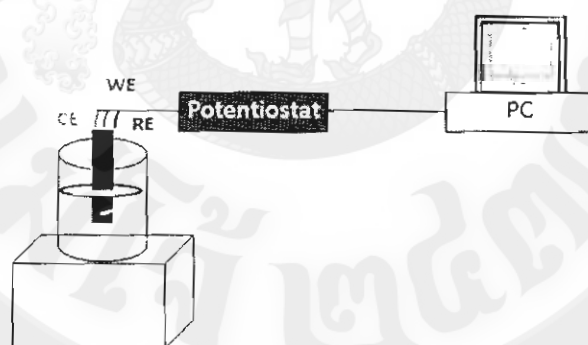
4. อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 °C



รูปที่ 7 ขั้นตอนการสร้างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน

การทดสอบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี

นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทำงานมาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยจัดการทดลองดังรูปที่ 8 ทำการวัดสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ จากนั้น ก็ทำการวัดโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ เพื่อหาขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ให้สัญญาณสูงที่สุด



รูปที่ 8 การจัดเซลล์สำหรับการทดลองด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี

การเตรียมทองคำนาโน (Gold nanoparticle)

นำ 0.010% ทองคลอไรด์ (HAuCl_4) มา 5.0 mL แล้วให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 1% ไตรโซเดียมซิทเรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ปริมาณ 18 μL ลงไปใน 0.01% ทองคลอไรด์ทั้ง 5 บีกเกอร์ จากนั้นก็นำทองคำนาโนทั้งหมดไปหาลักษณะทางกายภาพทางแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

การล้างคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotube purification)

ล้างคาร์บอนนาโนทิวบ์มา 0.0300 g แล้วเติมกรดไนตริก (HNO_3) ลงไป 40.0 mL แล้วปิดด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปใส่ก๊าซ (sonicate) 10-12 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอีก 10-12 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ เทน้ำออกเอาเฉพาะตะกอน นำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำปราศจากไอออนจนเต็มบีกเกอร์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน วัดค่า pH ให้ได้ค่า ~ 7 แต่ถ้า $\text{pH} \neq 7$ ทำการตกตะกอนไปเรื่อยๆ จนได้ $\text{pH} \sim 7$ เมื่อได้ $\text{pH} \sim 7$ เทน้ำออกให้เหลือเฉพาะตะกอน แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 90°C

การเตรียมสเลอรี คาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotube slurry preparation)

นำคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ได้จากข้อ 2.3.2 มา 2 mg เติม DMF ลงไป 1 mL จากนั้นก็นำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ในขวดปิด ก่อนนำมาใช้ต้องทำการเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกทุกครั้ง

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.4

1. เตรียม 0.2 M Dibasic sodium phosphate (สาร A)

ชั่ง Na_2HPO_4 มา 7.1 g ละลายด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 250 mL

2. เตรียม 0.2 M Monobasic sodium phosphate (สาร B)

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ต้องชั่งมา 7.80 g ละลายด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 250 mL

3. เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

นำสาร A มา 40.5 mL + สาร B มา 9.5 mL ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 100 mL ในขวดวัดปริมาตร 100 mL จะได้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M pH 7.4

การเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์

การเตรียมกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) ทำได้โดยการตรึงคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคการเกาะติดด้วยไฟฟ้า (Electrodeposition) หลังจากนั้นจึงทำการตรึงด้วยปรัสเซียนบลู (Prussian blue) โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า -2.0 V ด้วยเครื่องวัดคุณสมบัติกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นจึงทำการตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยใช้เอนไซม์เข้มข้น 3 mg L^{-1} ปริมาตร $30 \mu\text{L}$ รอให้แห้ง แล้วจึงตรึงทับด้วยอนุภาคนาโนทองคำ จะได้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พร้อมใช้งาน

การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

นำกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาไปตรวจวัดหาปริมาณของกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้จากหลายๆ ยี่ห้อ โดยไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัด



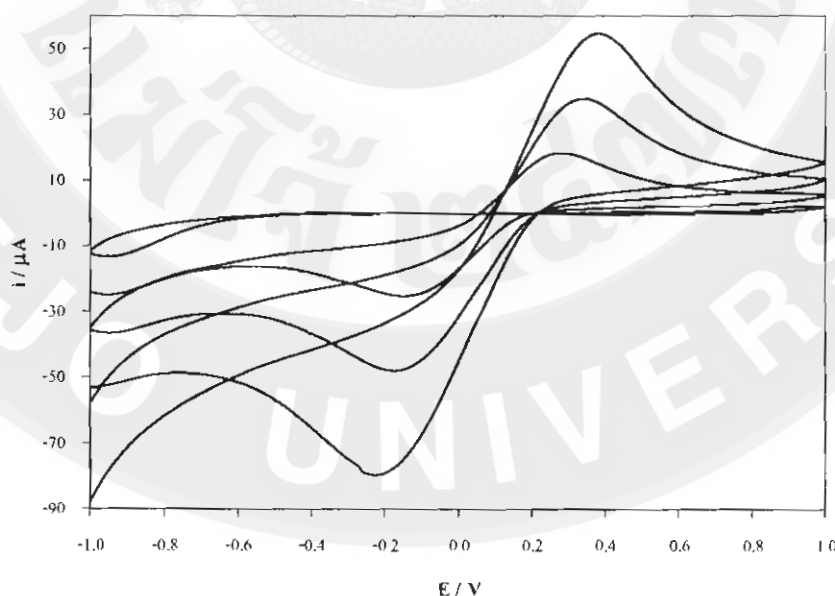
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การสร้างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน

นำขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนทำงานแบบสี่เหลี่ยมที่ประดิษฐ์ได้ดังรูปที่ 9 มาทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี ทำการวัดสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับโดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วยเป็นโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยสแกนศักย์ไฟฟ้าในช่วง -1.0 ถึง 1.0 โวลต์ ที่อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ได้ผลดังรูปที่ 10



รูปที่ 9 การออกแบบขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแบบสี่เหลี่ยม



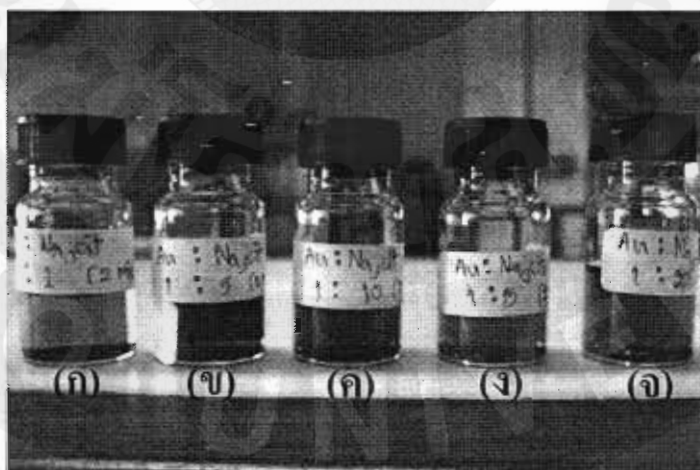
รูปที่ 10 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน โดยทดลองในสารละลายของโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรตที่ความเข้มข้น ก) 0.0 ข) 10.0 ค) 20.0 และ ง) 30.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ช่วย

จากรูปที่ 10 พบว่าความสูงของกระแสฟลักซ์ที่ได้จากข้อไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน มีความสอดคล้องในแง่ของความสูงของกระแสแอโนดิกและกระแสแคโทดิก ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างกระแสฟลักซ์กับความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์รต์มีความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปตามสมการของ Randles-Sevcik [(Wang, 2006)]

การเตรียมสารละลายทองคำนาโน

ผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปีของทองคำนาโน

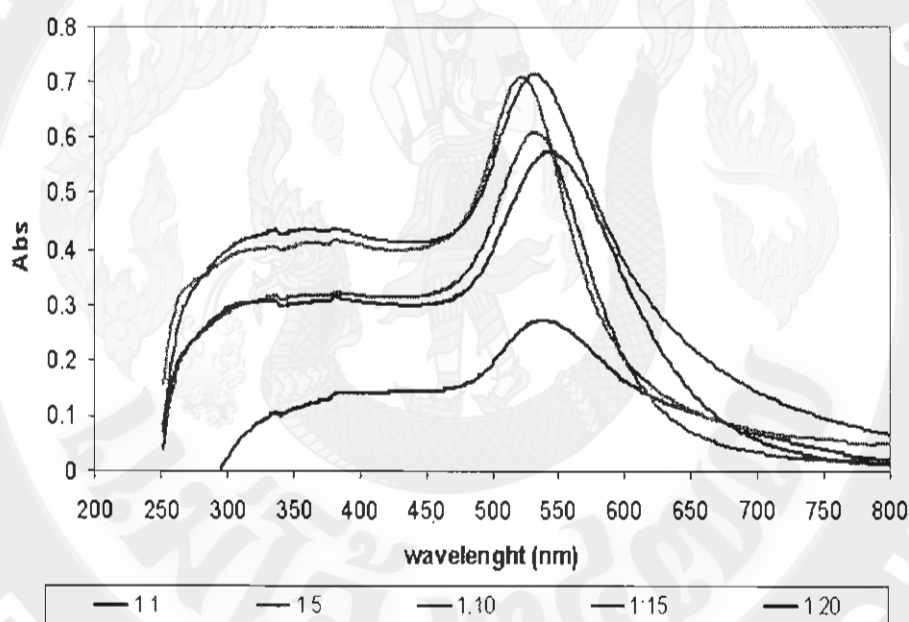
สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:1 และ 1:20 ดังรูปที่ 11ก และ รูปที่ 11จ ตามลำดับ ให้สารละลายสีม่วงอ่อนเกิดเป็นทองคำนาโนยังไม่สมบูรณ์และไม่เสถียร สืบเนื่องจากการตั้งสารละลายทองคำนาโนนี้ไว้เป็นเวลานานๆ จะเกิดเป็นตะกอนเกิดขึ้น ส่วนสารละลายทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:5 และ 1:10 ดังรูปที่ 11ข และรูปที่ 11ค ตามลำดับ มีสีแดงเชอร์รี่จะเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Tangkuararn et.al [1] และสารละลายทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:15 ดังรูปที่ 11ง มีสีแดงอ่อนเนื่องจากยังเกิดเป็นทองคำนาโนยังไม่สมบูรณ์เพราะปริมาณตัวรีดิวซ์ของไตรโซเดียมซิเตรตมีปริมาณมากเกินไป



รูปที่ 11 สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20

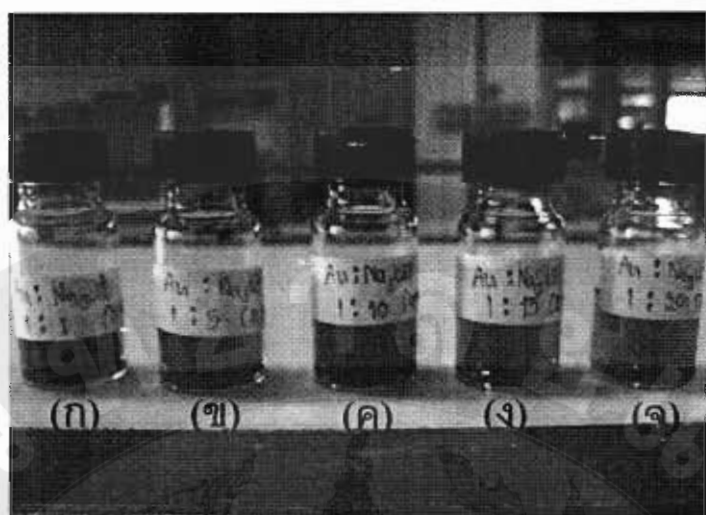
จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี

โคร โฟโตมิเตอร์ พบว่าสารละลายทองขนาดนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร สอดคล้องกับผลของ Tangkuaram et.al [1] และการให้ความร้อนตอนสุดท้ายที่เวลา 2 นาที อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ($Abs=0.271$) และที่อัตราส่วน 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ($Abs=0.713$) ส่วนที่อัตราส่วน 1:5, 1:15 และ 1:20 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.710, 0.609 และ 0.574 ตามลำดับ ดังรูปที่ 12 ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าที่อัตราส่วนต่ำปฏิกิริยายังเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์จึงมีค่าการดูดกลืนแสงน้อย เมื่อเพิ่มอัตราส่วนมากขึ้นอีกค่าการดูดกลืนแสงก็จะเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งอัตราส่วน 1:10 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดและเกิดเป็นทองขนาดนาโน จากนั้นค่าการดูดกลืนแสงก็จะลดลงเมื่อมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากปริมาณตัวรีดิวซ์ของไตรโซเดียมซิเตรดมีปริมาณมากเกินไปทองขนาดนาโนจึงลดลง



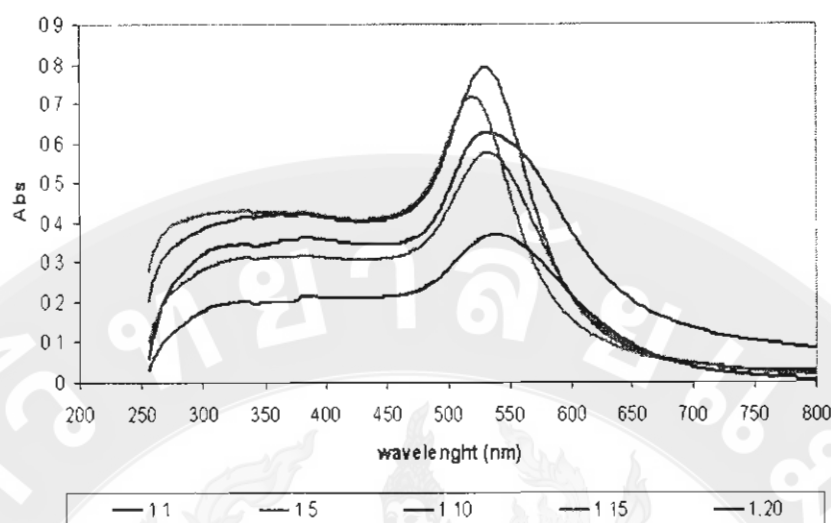
รูปที่ 12 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์:ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที

สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1 และ 1:20 ดังรูปที่ 13ก และ รูปที่ 13จ ตามลำดับ ให้สารละลายสีม่วงอ่อนเกิดเป็นทองคำนาโนยังไม่สมบูรณ์และไม่เสถียร ส่วนสารละลายทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:5, 1:10 และ 1:15 ดังรูปที่ 13ข, 13ค และรูปที่ 13ง ตามลำดับ มีสีแดงเชอร์รี่จะเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์เนื่องจากการเติมตัวรีดิวซ์ของไตรโซเดียมซิเตรดในปริมาณที่เหมาะสม



รูปที่ 13 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20

จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารละลายทองคำนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร และพบว่าการให้ความร้อนตอนสุดท้ายที่เวลา 4 นาที อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ($Abs=0.370$) และที่อัตราส่วน 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ($Abs=0.792$) ส่วนที่อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:15 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.627, 0.719 และ 0.578 ตามลำดับ ดังรูปที่ 14 ซึ่งพบว่าที่อัตราส่วนต่ำก็จะให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อย เมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้นอีกถึงค่าหนึ่งก็จะทำให้เกิดเป็นทองคำนาโนที่มีสีแดงเชอร์รี่ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนขึ้นอีกค่าการดูดกลืนแสงก็จะลดลงเนื่องจากมีปริมาณตัวรีดิวซ์ของไตรโซเดียมซิเตรดมีปริมาณมากเกินไปทองคำนาโนจึงลดลง



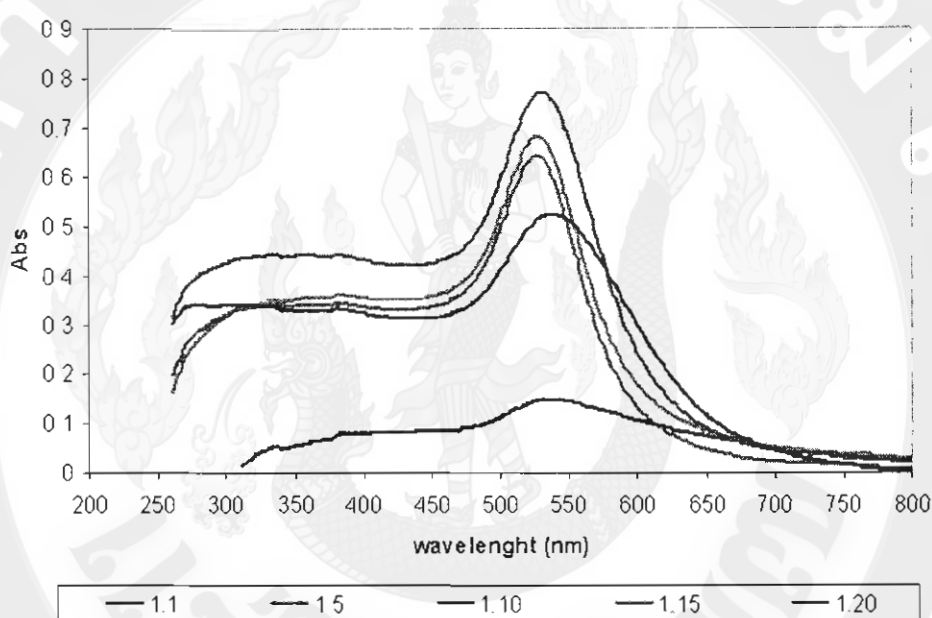
รูปที่ 14 ยูวิสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์:ไทรโซเดียมแอสคอร์เบตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 4 นาที

สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 6 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ :ไทรโซเดียมแอสคอร์เบตที่ 1:5, 1:10 และ 1:15 ดังรูปที่ 15ข, 15ค และ 15ง ตามลำดับ ให้สารละลายเป็นสีแดงเชอร์รี่ซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์ ส่วนสารละลายทองคำนาโนในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ :ไทรโซเดียมแอสคอร์เบตที่ 1:1 และ 1:20 ดังรูปที่ 15ก และ 15จ ตามลำดับ เป็นสารละลายสีม่วงซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนไม่สมบูรณ์ซึ่งให้ผลเหมือนกับสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 และ 4 นาที



รูปที่ 15 สารละลายของทองคำนาโนให้ความร้อนเป็นเวลา 6 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ :ไทรโซเดียมแอสคอร์เบตที่ (ก) 1:1 (ข) 1:5 (ค) 1:10 (ง) 1:15 และ (จ) 1:20

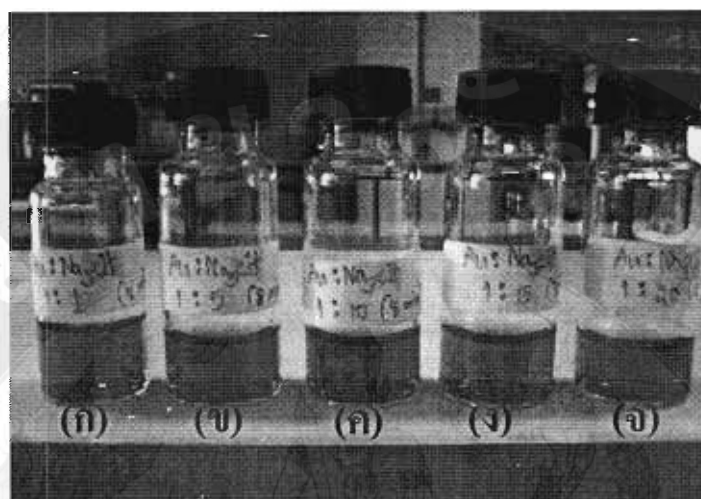
จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารละลายทองคำนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร และพบว่าการให้ความร้อนจนสุดท้ายที่เวลา 6 นาที อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ($Abs=0.148$) และที่อัตราส่วน 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ($Abs=0.770$) ส่วนที่อัตราส่วน 1:5, 1:15 และ 1:20 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.681, 0.642 และ 0.524 ตามลำดับ ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 6 นาที

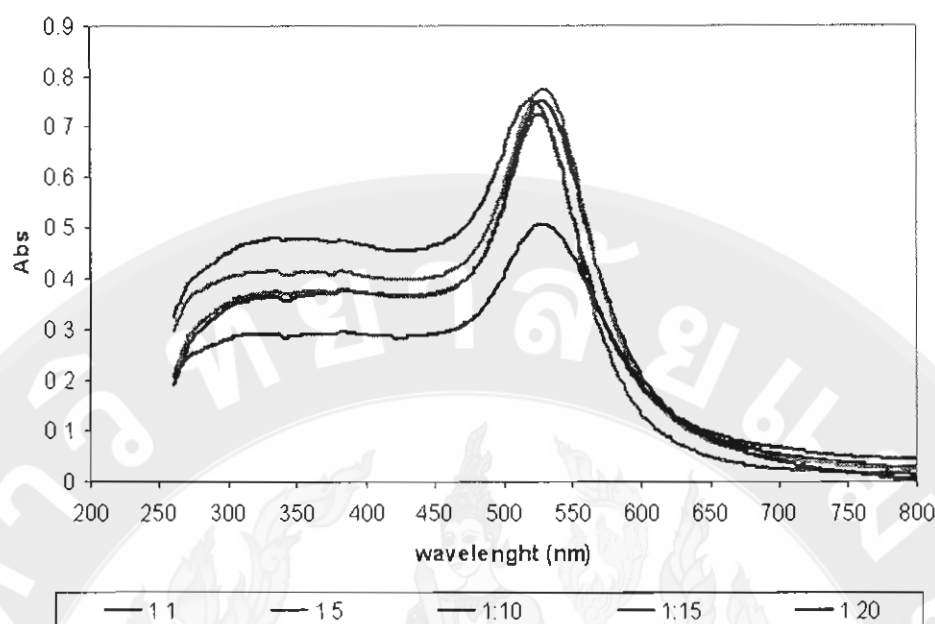
สารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 8 นาทีในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:1, 1:5, 1:10 และ 1:15 ดังรูปที่ 17ก, 17ข, 17ค และ 17ง ตามลำดับ ให้สารละลายเป็นสีแดงเชอร์รี่ซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนอย่างสมบูรณ์ ส่วนสารละลายทองคำนาโนในอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดที่ 1:20 ดังรูปที่ 17จ เป็นสารละลายสีม่วงเข้มซึ่งเกิดเป็นทองคำนาโนไม่สมบูรณ์ ซึ่งผลการทดลองนี้พบว่าสารละลายทองคำนาโนนี้มีสีใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 17 อาจเนื่องมาจากเวลาที่ให้ความร้อนมากขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ขึ้น โดยทองคำนาโนที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดเป็น 1:5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ดังนั้นเวลาจึงมีผลต่อการสังเคราะห์ทองคำนาโน ถ้าใช้เวลาในการให้ความร้อนนานอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรดในปริมาณน้อยก็สามารถทำให้เกิดเป็นทองคำนาโนได้แต่ถ้าใช้เวลาในการ

ให้ความร้อนเร็วก็ต้องเพิ่มปริมาณของอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตมากขึ้นจึงจะเกิดเป็นทองคำขนาดนาโน



รูปที่ 17 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 8 นาที

จากนั้นนำสารละลายทองคำนาโนที่ให้ความร้อนเป็นเวลา 8 นาทีในอัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตที่ 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าสารละลายทองคำขนาดนาโนมีพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง 520 ถึง 530 นาโนเมตร และพบว่าการให้ความร้อนจนสุดท้ายที่เวลา 2 นาที อัตราส่วนของทองคำไรด์ : ไตรโซเดียมซิติเรตที่ 1:20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ($Abs=0.508$) และที่อัตราส่วน 1:5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ($Abs=0.776$) ส่วนที่อัตราส่วน 1:1, 1:10 และ 1:15 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.752, 0.754 และ 0.723 ตามลำดับ ดังรูปที่ 18

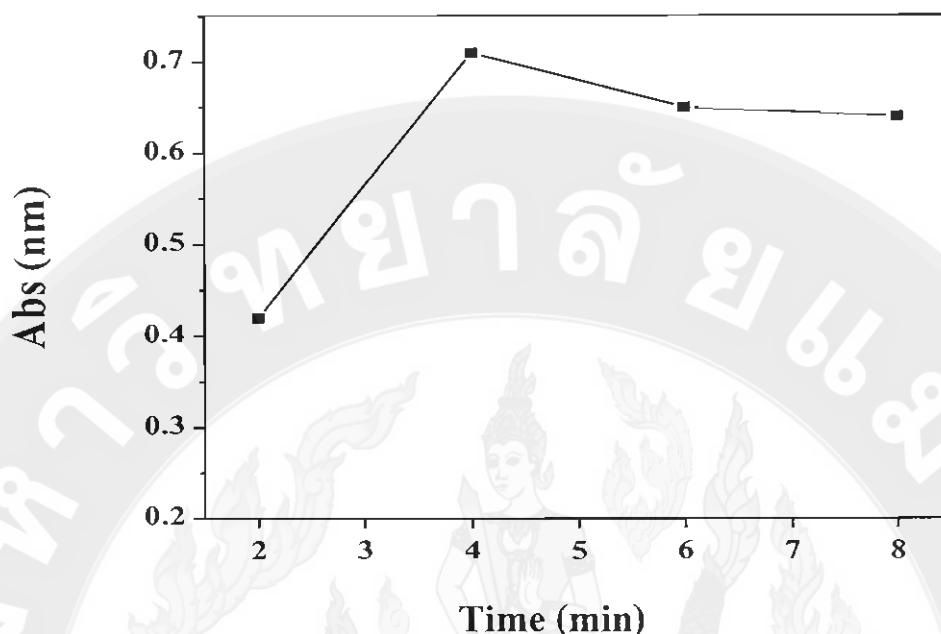


รูปที่ 18 ยูวีสเปกตรัมของทองคำนาโนที่สังเคราะห์ด้วยอัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตเป็น 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 8 นาที

การดูดกลืนแสง (Abs) กับเวลาในการสังเคราะห์ทองคำนาโนโดยใช้ทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตในอัตราส่วนโมล 1:10

การสังเคราะห์ทองที่ใช้อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่อัตราส่วนโมลเป็น 1:10 ที่ให้ความร้อนในตอนสุดท้ายเป็นเวลา 4 นาที ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วน 1:1, 1:5, 1:15 และ 1:20 ในการทดลองต่อมาจึงได้นำทองคำนาโนที่ได้ในอัตราส่วน 1:10 มาทดลองต่อโดยเพิ่มเวลาของการให้ความร้อนจาก 2 นาที ถึง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นหาความสูงของพีคแล้วนำไปพลอตกราฟระหว่างเวลากับค่าความสูงของพีคที่ได้จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 19

จากการทดลองพบว่าเวลาต่ำสุดที่ 2 นาที ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่สมบูรณ์ (Abs=0.433) ส่วนที่เวลา 4 นาที ให้ค่าความสูงของพีคมากที่สุด (Abs=0.702) เนื่องจากที่เวลา 4 นาทีทำให้เกิดเป็นทองคำนาโนและมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดรวมทั้งเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ และที่เวลา 6 นาที และ 8 นาที มีค่าความสูงของพีคเริ่มลดลงเล็กน้อย เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้วที่ 4 นาที ทำให้การเพิ่มเวลาให้ความร้อนมากขึ้นไม่ได้ทำให้จำนวนอนุภาคของทองคำนาโนมากขึ้น

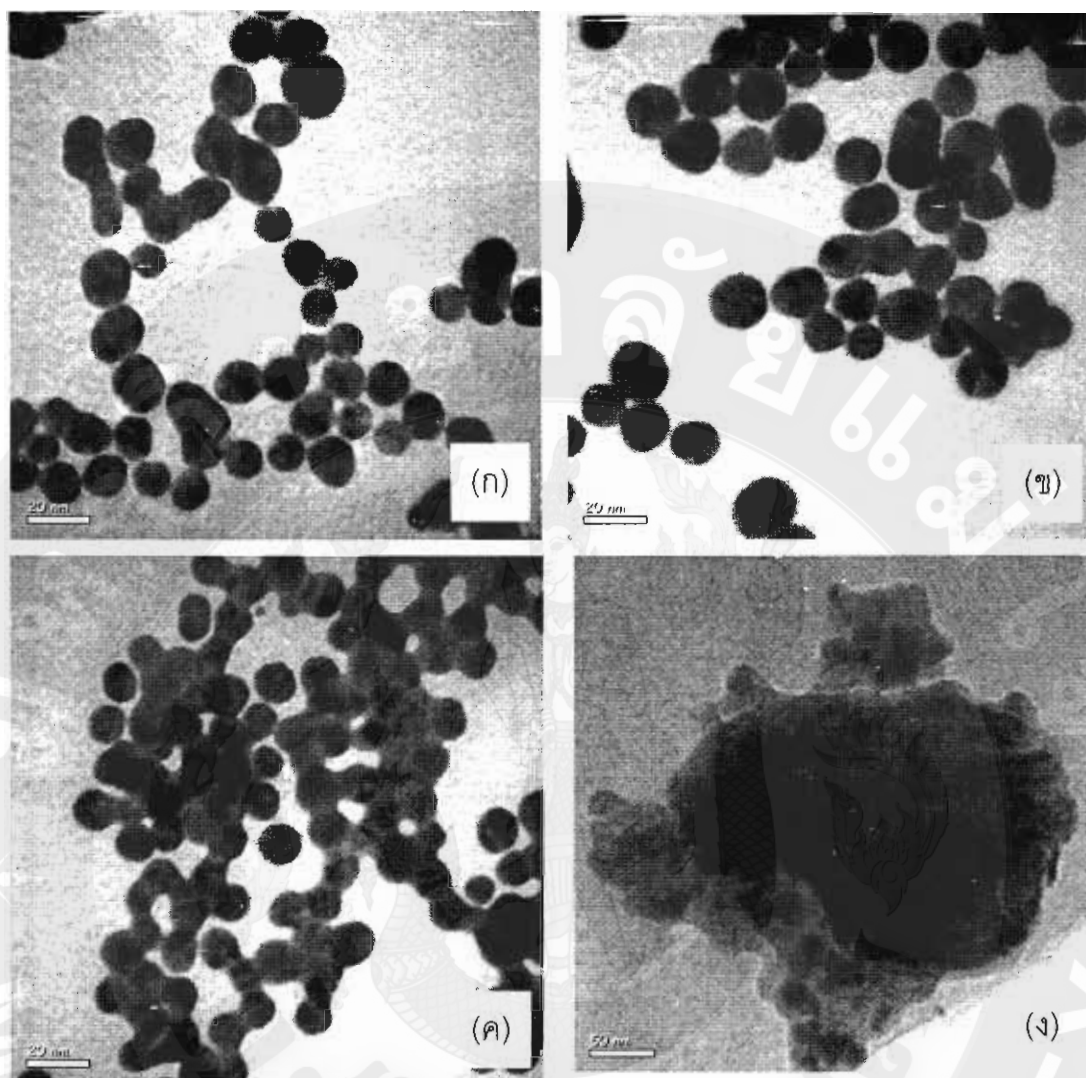


รูปที่ 19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคกับเวลาในการสังเคราะห์ทองคำนาโนโดยใช้ทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตในอัตราส่วน โมล 1:10

จากผลการทดลองทองคำนาโนทั้งหมดพบว่าทองคำนาโนที่ให้ความร้อนครั้งสุดท้ายที่เวลา 4 นาที ที่อัตราส่วนของทองคำคลอไรด์ : ไตรโซเดียมซิเตรตที่ 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด และการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ 520 นาโนเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของทองคำนาโนและสอดคล้องกับผลของ Tangkuaram [(Tangkuaram *et al.*, 2007)] และสารละลายทองคำนาโนที่ได้ก็เป็นสีแดงเชอร์รี่ ดังนั้นจึงเลือกมาปรับปรุงอิเล็กทรอนิกส์

ผลการวัดขนาดอนุภาคนาโนทองคำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การนำทองคำนาโนที่สังเคราะห์ไปศึกษาขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน โดยนำอนุภาคนาโนทองคำที่สังเคราะห์ที่อัตราส่วน 1 : 10 ของทองคำคลอไรด์ต่อไตรโซเดียมซิเตรต โดยใช้เวลาการสังเคราะห์ตั้งแต่ 2 – 10 นาที พบว่าได้ผลจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ดังรูปที่ 20 ก-ง โดยพบว่า อนุภาคนาโนทองคำมีขนาดเป็นทรงกลม (รูปที่ 20 ก-ค) ส่วนที่เวลา 10 นาที ไม่สามารถหาขนาดได้ (รูปที่ 20 ง) ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนมีขนาด 16 นาโนเมตร (รูปที่ 20 ข)

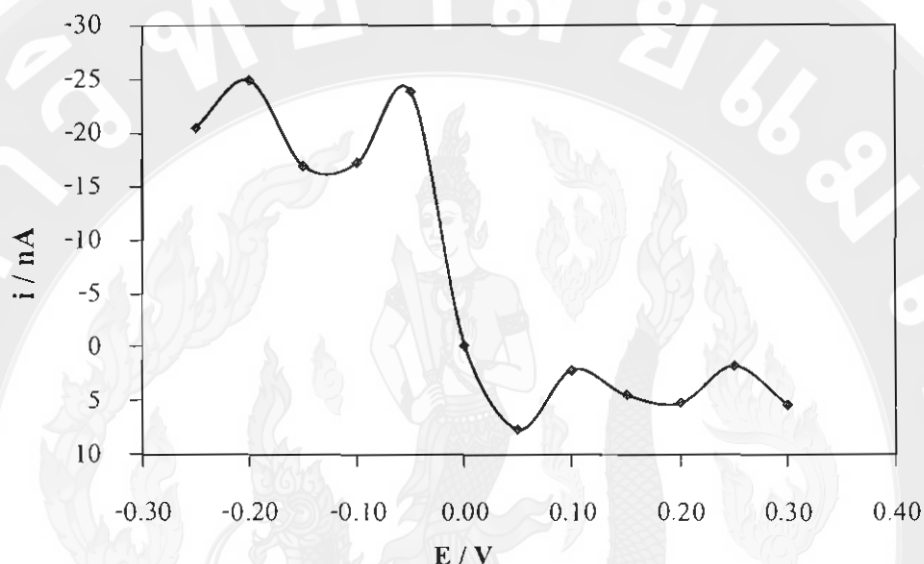


รูปที่ 20 อนุภาคนาโนท่อนำจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ที่อัตราส่วนการสังเคราะห์ของคลอไรด์ต่อไตรโซเดียมไซเตรต 1 : 10 โดย ทำที่สภาวะการให้ความร้อน (ก) 2 นาที (ข) 4 นาที (ค) 6 นาที และ (ง) 10 นาที กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านใช้กำลังไฟฟ้า 75 kV และกำลังขยาย 200,000 เท่า

ผลของศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมาประกอบตั้งบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ที่ตรึงด้วยสารตัวกลาง (mediator) คือ ปรัสเซียนบลู (prussian blue) และใช้โคโคซานทำหน้าที่เป็นสารที่กักขังไว้ไม่ให้เอนไซม์หลุดออกไป และทำการศึกษาตัวแปรที่ส่งผลต่อสัญญาณที่ได้คือผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในเกิดปฏิกิริยา (Operation applied potential) โดยทดสอบในสารละลายของกลูโคสเข้มข้น 10 mM ได้ผลดังรูปที่ 21 ซึ่งพบว่าศักย์ไฟฟ้าที่ -0.25 V จนกระทั่งถึงศักย์ไฟฟ้าที่ -0.05 V ให้กระแสไฟฟ้า

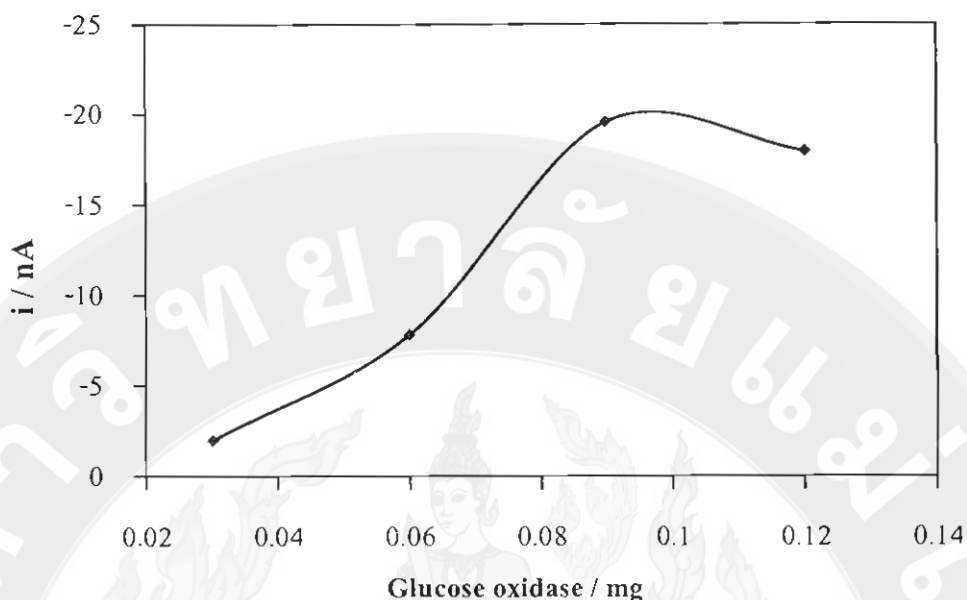
คงที่ ที่ประมาณ -23 nA หลังจากนั้นเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็น 0.0 V พบว่ากระแสลดลงอย่างรวดเร็วจนคงที่ (คิดเฉพาะ amplitude) ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.05 V ได้กระแสไฟฟ้า $+8 \text{ nA}$ และกระแสคงที่ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มศักย์ไฟฟ้าขึ้นอีกก็ไม่ทำให้ได้กระแสที่สูงขึ้นเนื่องจากถึงสภาวะคงที่ (steady state) ของการเร่งปฏิกิริยาของปรัสเซียนบนสุดต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Karyakin [2] ดังนั้นจึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ -0.05 V เป็นศักย์ไฟฟ้าที่ใช้งานต่อไป



รูปที่ 21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสไบโอเซนเซอร์กับปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

หาศึกษาตัวแปรปริมาณของกลูโคสออกซิเดส

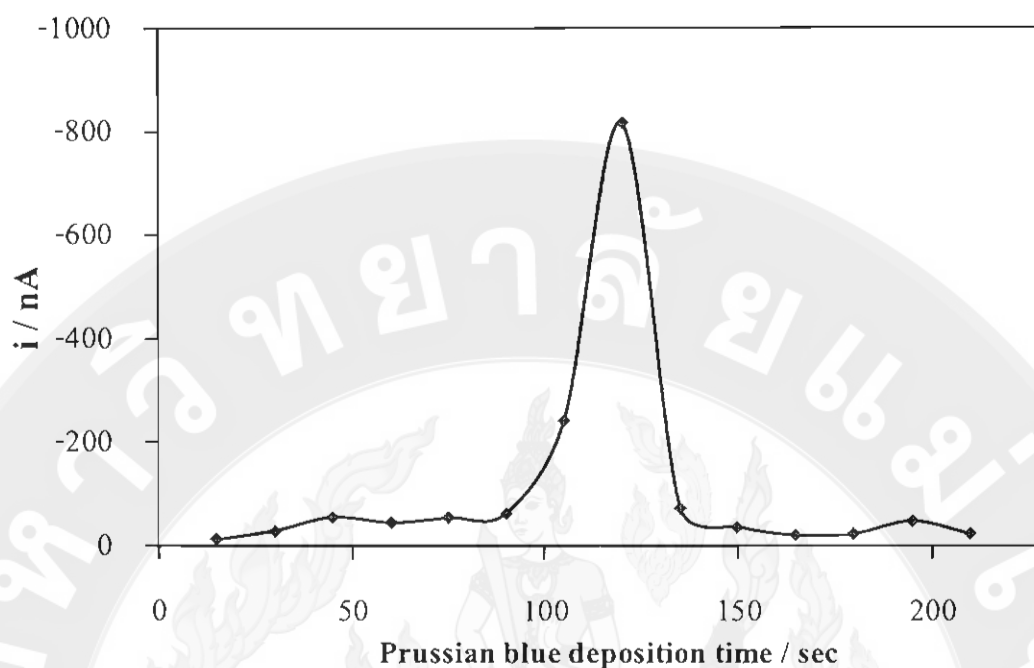
ทำการศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยนำเอนไซม์ดังกล่าวไปตรึงบนกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่ปริมาณต่างๆ กันคือ 0.03 mg , 0.06 mg , 0.09 mg และ 0.12 mg และนำไปวัดปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 mM หลังจากนั้นจึงนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับความเข้มข้น ได้ผลดังรูปที่ 22 ซึ่งพบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.03 mg พบว่า ให้กระแสเพียง 2 nA หลังจากเพิ่มปริมาณของกลูโคสออกซิเดสมากขึ้น จะได้กระแสมากขึ้น จนกระทั่งได้กระแสสูงที่สุดเมื่อใช้เอนไซม์ 0.09 mg หลังจากนั้นกระแสเริ่มคงที่ ในการเลือกใช้เอนไซม์ จึงเลือกใช้ 0.09 mg ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V

ศึกษาผลของเวลาในการตรึงปรสเชียนบลู

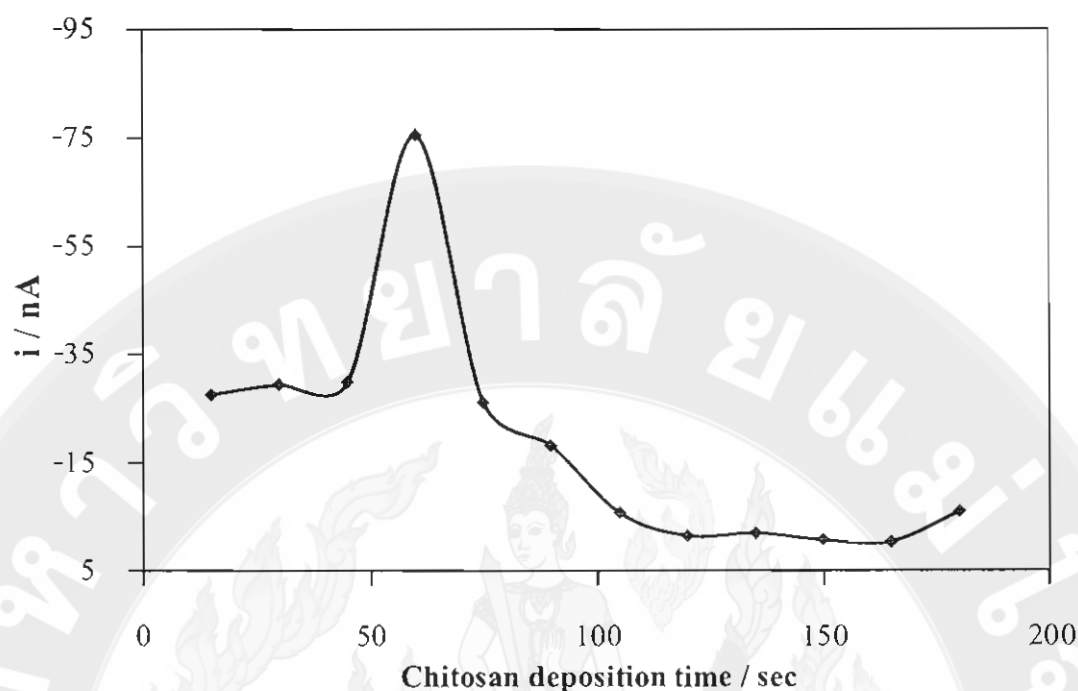
การนำปรสเชียนบลู (Prussian blue) เพื่อตรึงร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยทำการตรึงด้วยวิธีการเกาะติดด้วยไฟฟ้า โดยใช้เวลาของการเกาะติดต่างๆ กัน ตั้งแต่ 10 ถึง 210 วินาที เมื่อนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับเวลาที่ใช้ในการเกาะติด ได้ผลดังรูปที่ 23 จากรูปพบว่าที่เวลาของการเกาะติด 10 ถึง 100 วินาที ได้กระแสเพียง 10-50 nA แต่เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 115 วินาที ได้กระแสสูงขึ้นเป็น 200 nA หลังจากนั้นกระแสจะค่อยๆ ลดลง สำหรับสาเหตุที่ทำให้กระแสลดลงเป็นเพราะฟิล์มปรสเชียนบลูเมื่อมีความหนาแน่นขึ้นความต้านทานไฟฟ้าจะมากขึ้น ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนจากขั้วไฟฟ้าไปยังสารละลายทำได้ยากขึ้น กระแสไฟฟ้าจึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาของการตรึงฟิล์มปรสเชียนบลูเป็น 115 วินาที



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสร้างฟิล์มปรัสเซียนบลูกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม

ศึกษาผลของเวลาในการสร้างไคโตซาน

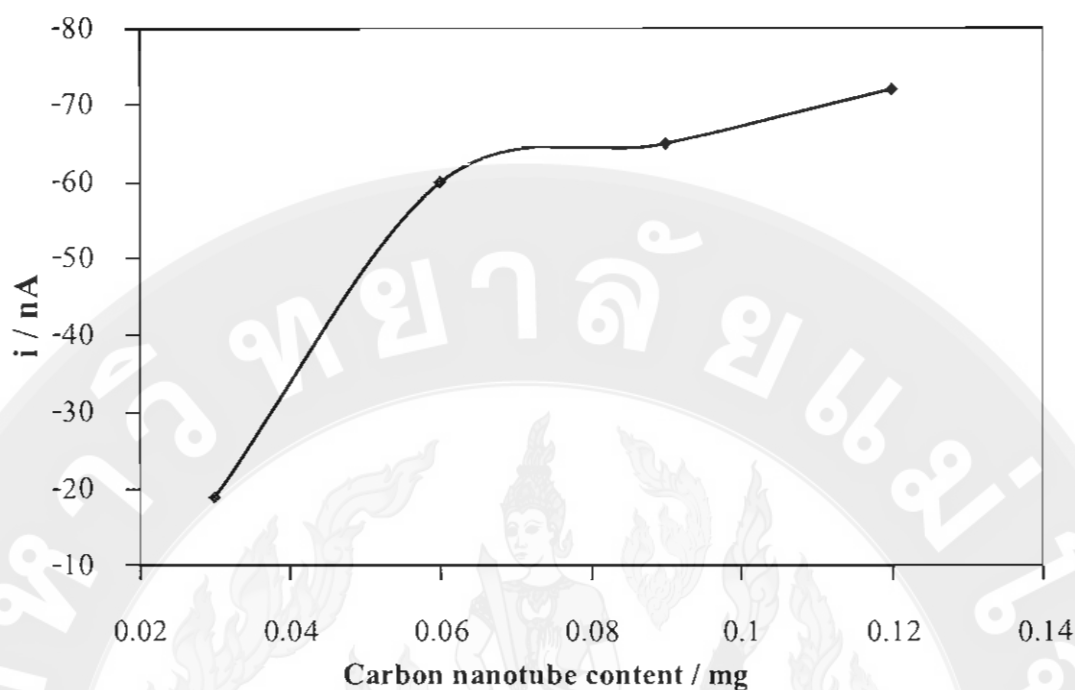
การใช้ไคโตซาน (Chitosan) เพื่อสร้างร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและปรัสเซียนบลู โดยทำการสร้างไคโตซานด้วยวิธีการเกาะติดด้วยไฟฟ้า โดยกำหนดเวลาตั้งแต่ 15 ถึง 180 วินาที โดยกำหนดช่วงห่าง 15 วินาที นำขั้วไปทดสอบในสารละลายกลูโคสแล้วนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับเวลาที่ใช้ในการเกาะติด ได้ผลดังรูปที่ 24 จากรูปพบว่าที่เวลาที่ใช้ในการเกาะติดตั้ง 15 ถึง 45 วินาที ได้กระแสเพียงเล็กน้อยเพียงประมาณ 30 nA แต่เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 วินาที ได้กระแสสูงขึ้นเป็น 75 nA หลังจากนั้นเมื่อเวลาของการเกาะติดไคโตซานมากขึ้น กลับได้กระแสดำลง กระแสที่ต่ำลงเป็นเพราะฟิล์มไคโตซานมีสภาพไม่นำไฟฟ้าและการที่ฟิล์มหนาขึ้นทำให้เอนไซม์อยู่ห่างจากผิวหน้าขั้วไฟฟ้ามากขึ้น กระแสจึงต่ำลง ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาของการสร้างไคโตซานที่ 60 วินาที



รูปที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการตรึงฟิล์มไคโตซานกับปริมาณไฟฟ้าที่วัดได้ โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงปรีสเซ็นบลู 115 วินาที

ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์

การใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotube) เพื่อตรึงร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส/ปรีสเซ็นบลู/ไคโตซาน โดยใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ปริมาณ 0.03, 0.06, 0.09 และ 0.12 mg นำเข้าไปทดสอบในสารละลายกลูโคส แล้วนำกระแสที่ได้มาวาดกราฟกับเวลาที่ใช้ในการเกาะติด ได้ผลดังรูปที่ 25



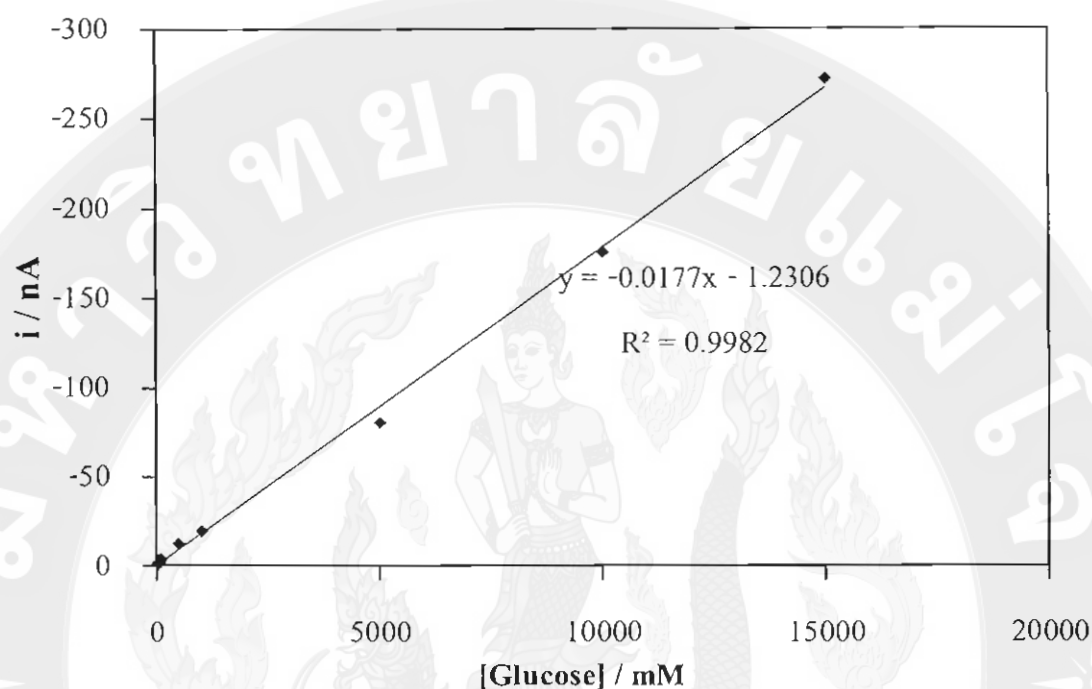
รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวกับกระแสไฟฟ้าที่ได้โดยใช้สภาวะการทดลองเป็น 5 mM glucose, 0.1 M phosphate pH 7.4, ศักย์ไฟฟ้า -0.10 V, ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงโปรตีนบนขั้ว 115 วินาที เวลาของการตรึงไคโตซาน 60 วินาที

จากรูปพบว่าปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวที่ 0.03 มิลลิกรัมได้กระแสเพียง 18 nA เมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวขึ้นเป็น 0.06 มิลลิกรัมได้กระแสสูงขึ้นเป็น 60 มิลลิแอมแปร์ หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวอีกเป็น 0.09 และ 0.12 มิลลิกรัม กระแสที่ได้สูงขึ้นอีกเพียง 5 – 11 มิลลิแอมแปร์ ซึ่งแสดงถึงจุดอิ่มตัวของการใช้คาร์บอนนาโนทิวที่เมื่อใช้คาร์บอนนาโนทิวมากขึ้น ค่าการนำไฟฟ้าจะต่ำลง ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนยากขึ้น จึงได้กระแสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้คาร์บอนนาโนทิวที่ 0.09 มิลลิกรัม ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การหาช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดการตรวจวัดและค่าการทำซ้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ -0.05 V พบว่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ฉีดลงไป การหาลักษณะเฉพาะของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น คือช่วงที่เป็นเส้นตรงได้ผลดังรูปที่ 26 ซึ่งพบว่ามีช่วงที่เป็นเส้นตรงในช่วง 20 ไมโครโมลาร์ ถึง 15 มิลลิโมลาร์

($y = -0.0177 \text{ nA mM}^{-1} - 1.2309$, $R^2 = 0.9973$) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดกลูโคสอยู่ที่ 15.56 ไมโครโมลาร์ ($S/N = 3$) เซนเซอร์นี้มีค่าการทำซ้ำที่ 3.5% RSD



รูปที่ 26 กราฟเทียบมาตรฐานระหว่างกระแสไฟฟ้ากับความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx โดยใช้สภาวะของเครื่องมือดังนี้ $E_{\text{applied}} = -0.05$ โวลต์, 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.4, CNT = 0.009 มิลลิกรัม, เวลาของการตรึงโคโดซาน 60 วินาที, เวลาของการตรึงโปรตีนบลู 105 วินาที, และปริมาณของกลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม

การทดสอบหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้ง

นำกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) ไปทดสอบในตัวอย่างน้ำผึ้ง 6 ชนิด ตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 6 ชนิดดังกล่าวไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่าง และแต่ละยี่ห้อใช้น้ำผึ้งปริมาณน้อยเพียงยี่ห้อละ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละตัวอย่างใช้เวลาในการทดสอบตัวอย่างละ 1 นาที ผลการทดสอบพบว่ามีกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้งอยู่ในช่วง $54 - 4053$ ไมโครเมตร ดังตารางที่ 6 จากตารางแสดงให้เห็นว่า SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปทดสอบกลูโคสในน้ำผึ้งได้จริง

ตารางที่ 6 ตัวอย่างน้ำผึ้งยี่ห้อต่างๆ และความเข้มข้นที่ตรวจพบโดยใช้กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น

ยี่ห้อ	ความเข้มข้นของกลูโคสที่ตรวจวัดโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ / ไมโครโมลาร์
Vejpong	54.47
Ambrosia	467.37
Songpung	295.43
Erawan	769.33
Chula	273.32
Sabsau	4053.33

สรุปผลการวิจัย

การสร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์ ด้วยกลูโคสออกซิเดส-คาร์บอนนาโนทิวบ์คอมโพสิตกับปรีสเซียนบลู-ไคโตซาน-ทองนาโน บนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน (SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx) นาโนทิวบ์ เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี พบว่ากลูโคสไบโอเซนเซอร์ SPCE/CHIT-CNT/PB/AuNP/GOx ให้สัญญาณสูงที่สุดในกาตรวจวัดกลูโคสเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (E_{applied}) ที่ -0.05 V ใช้ปริมาณของกลูโคสออกซิเดส 0.09 มิลลิกรัม เวลาของการตรึงไคโตซาน 60 วินาที เวลาของการตรึงปรีสเซียนบลู 105 วินาที กลูโคสไบโอเซนเซอร์นี้มีช่วงเป็นเส้นตรงในช่วง 20 ไมโครโมลาร์ ถึง 15 มิลลิโมลาร์ มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดกลูโคสที่ $15.56 \text{ ไมโครโมลาร์}$ ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจวัดปริมาณกลูโคสในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ โดยพบว่าในตัวอย่างน้ำผึ้งที่สุ่มมาจากท้องตลาด 6 ชนิด มีปริมาณกลูโคสอยู่ในช่วง $54 - 4053 \text{ ไมโครโมลาร์}$

เอกสารอ้างอิง

- Cavia, M. M., M. A. Fernández-Muiño, E. Gómez-Alonso, M. J. Montes-Pérez, J. F. Huidobro and M. T. Sancho. 2002. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. **Food Chem.** 78 (2): 157-161.
- Chen, X., J. Chen, C. Deng, C. Xiao, Y. Yang, Z. Nie and S. Yao. 2008. Amperometric glucose biosensor based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode. **Talanta.** 76 (4): 763-767.
- Crespilho, F. N., M. E. Ghica, C. Gouveia-Caridade, O. N. Oliveira Jr and C. M. A. Brett. 2008. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): Optimised architectures for biosensing. **Talanta.** 76 (4): 922-928.
- Gogotsi, Y. 2006. **Nanotubes and nanofibers.** Taylor and Francis Group, LLC.: Boca Raton (FL). 1-107.
- Han, H., Y. Li, H. Yue, Z. Zhou, D. Xiao and M. M. F. Choi. 2008. Clinical determination of glucose in human serum by a tomato skin biosensor. **Clin. Chim. Acta.** 395 (1-2): 155-158.
- Huang, J., Y. Yang, H. Shi, Z. Song, Z. Zhao, J.-i. Anzai, T. Osa and Q. Chen. 2006. Multi-walled carbon nanotubes-based glucose biosensor prepared by a layer-by-layer technique. **Mater. Sci. Eng., C.** 26 (1): 113-117.
- Ioannidou, M. D., G. A. Zachariadis, A. N. Anthemidis and J. A. Stratis. 2005. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta.** 65 (1): 92-97.
- Kang, X., Z. Mai, X. Zou, P. Cai and J. Mo. 2008. Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol-gel chitosan/silica hybrid. **Talanta.** 74 (4): 879-886.
- Kissinger, P. T. 2005. Biosensors--a perspective. **Biosens. Bioelectron.** 20 (12): 2512-2516.
- Lacourse, W. R. 1997. **Pulsed electrochemical detection in high-performance liquid chromatography.** John Wiley & Sons, Inc.: New York (NY). 60-61.

- Lim, S. H., J. Wei, J. Lin, Q. Li and J. KuaYou. 2005. A glucose biosensor based on electrodeposition of palladium nanoparticles and glucose oxidase onto Nafion-solubilized carbon nanotube electrode. **Biosens. Bioelectron.** 20 (11): 2341-2346.
- Liu, G. and Y. Lin. 2006. Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes. **Electrochem. Commun.** 8 (2): 251-256.
- Liu, Y., M. Wang, F. Zhao, Z. Xu and S. Dong. 2005. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. **Biosens. Bioelectron.** 21 (6): 984-988.
- Luong, J. H. T., K. B. Male and J. D. Glennon. 2008. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnol. Adv.** 26 (5): 492-500.
- Musameh, M. M., R. T. Kachoosangi, L. Xiao, A. Russell and R. G. Compton. 2008. Ionic liquid-carbon composite glucose biosensor. **Biosens. Bioelectron.** 24 (1): 87-92.
- Olea, D., O. Viratelle and C. Faure. 2008. Polypyrrole-glucose oxidase biosensor: Effect of enzyme encapsulation in multilamellar vesicles on analytical properties. **Biosens. Bioelectron.** 23 (6): 788-794.
- Rao, C. N. R., A. Govindaraj, G. Gundiah and S. R. C. Vivekchand. 2004. Nanotubes and nanowires. **Chem. Eng. Sci.** 59 (22-23): 4665-4671.
- Rivas, G. A., S. A. Miscoria, J. Desbrieres and G. D. Barrera. 2007. New biosensing platforms based on the layer-by-layer self-assembling of polyelectrolytes on Nafion/carbon nanotubes-coated glassy carbon electrodes. **Talanta.** 71 (1): 270-275.
- Rubianes, M. D. and G. A. Rivas. 2003. Carbon nanotubes paste electrode. **Electrochem. Commun.** 5 (8): 689-694.
- Salimi, A., R. G. Compton and R. Hallaj. 2004. Glucose biosensor prepared by glucose oxidase encapsulated sol-gel and carbon-nanotube-modified basal plane pyrolytic graphite electrode. **Anal. Biochem.** 333 (1): 49-56.
- Settle, F. 1997. **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry.** Prentice Hall PTR: Upper Saddle River (NJ). 685-690.
- Sun, Y., H. Wang and C. Sun. 2008. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer covalent attachment of MMWNTs and IO_4^- -oxidized GOx. **Biosens. Bioelectron.** 24 (1): 22-28.

- Tang, H., J. Chen, S. Yao, L. Nie, G. Deng and Y. Kuang. 2004. Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode. **Anal. Biochem.** 331 (1): 89-97.
- Tangkuaram, T., C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong and W. Veerasai. 2007. Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan. **Biosens. Bioelectron.** 22 (9-10): 2071-2078.
- Wang, J. 2006. **Analytical electrochemistry**. John Wiley & Sons: Hoboken (NJ). 80-82.
- Wang, J. and M. Musameh. 2003. Carbon Nanotube/Teflon Composite Electrochemical Sensors and Biosensors. **Anal. Chem.** 75 (9): 2075-2079.
- Wang, J. and M. Musameh. 2005. Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor. **Anal. Chim. Acta.** 539 (1-2): 209-213.
- Wang, S. G., Q. Zhang, R. Wang, S. F. Yoon, J. Ahn, D. J. Yang, J. Z. Tian, J. Q. Li and Q. Zhou. 2003. Multi-walled carbon nanotubes for the immobilization of enzyme in glucose biosensors. **Electrochem. Commun.** 5 (9): 800-803.
- Wikipedia. (2012). น้ำผึ้ง. Retrieved 15 มีนาคม 2554, from <http://th.wikipedia.org/wiki/น้ำผึ้ง>.
- Yang, M., Y. Yang, Y. Liu, G. Shen and R. Yu. 2006. Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors. **Biosens. Bioelectron.** 21 (7): 1125-1131.
- Yu, J., D. Yu, T. Zhao and B. Zeng. 2008. Development of amperometric glucose biosensor through immobilizing enzyme in a Pt nanoparticles/mesoporous carbon matrix. **Talanta.** 74 (5): 1586-1591.
- Zuo, S., Y. Teng, H. Yuan and M. Lan. 2008. Direct electrochemistry of glucose oxidase on screen-printed electrodes through one-step enzyme immobilization process with silica sol-gel/polyvinyl alcohol hybrid film. **Sensors and Actuators B: Chemical.** 133 (2): 555-560.