

อิทธิพลของขนาดรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทองต่อประสิทธิภาพของกลูโคส
ไบโอเซนเซอร์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of pore sizes of mesocellular foam silica/gold nanoparticles on efficiency of
glucose biosensor

Mr. Yoottapong Klinthongchai



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

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

ยุทธพงศ์ กลิ่นธงชัย : อิทธิพลของขนาดรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทองต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ (Effects of pore sizes of mesocellular foam silica/gold nanoparticles on efficiency of glucose biosensor) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: รศ. ดร.สิริรุ่ง ปรีชานนท์, 80 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นศึกษาอิทธิพลขนาดรูพรุนของวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง (MCF/AuNPs) โดยใช้กลูโคสไบโอเซนเซอร์เป็นตัวทดสอบ โดยงานวิจัยนี้ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน ในส่วนที่ 1 เป็นการสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา 5 ชนิด ที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของ TMB/P123 เป็น 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีการเติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ แล้วทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุเหล่านี้ โดยผลที่ได้นั้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 แล้วจะทำให้ขนาดรูพรุนของวัสดุใหญ่ขึ้น อีกทั้งเมื่อเพิ่มสารเติมแต่ง (แอมโมเนียมฟลูออไรด์) จะทำให้ขนาดหน้าตาของ MCF ใหญ่ขึ้นเช่นกัน และเมื่อทำการสังเคราะห์ทองลงบนวัสดุ จากการส่อง TEM พบว่าอนุภาคนาโนทองมีการกระจายลงบนวัสดุได้ดี ในส่วนที่ 2 ได้นำวัสดุทั้ง 5 ชนิด มาทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx) ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า MCF/AuNPs ที่สังเคราะห์จากอัตราส่วนโดยน้ำหนักของ TMB/P123 ที่เพิ่มมากขึ้นจะสามารถตรึงเอนไซม์ได้ปริมาณที่สูงขึ้น เนื่องจากขนาดรูพรุนที่ใหญ่ทำให้เอนไซม์ที่มีขนาดเล็กกว่าเข้าไปได้ง่าย และเมื่อมีอนุภาคนาโนทองบนวัสดุจะยิ่งทำให้ตรึงเอนไซม์ได้มากขึ้น และในส่วนที่ 3 ทำการทดสอบทางไฟฟ้าเคมีโดยใช้กลไกของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ในการทดสอบด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี (CV) และแอมโพรอเมตรี ในระบบปราศจากออกซิเจนพบว่าการใช้ MCF/AuNP เป็นตัวรองรับ GOx ไม่ช่วยให้เกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 แต่ได้กลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1 โดยจากผลการทดสอบด้วย CV ในระบบอิมมิตัวด้วยอากาศที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสโดยใช้วัสดุที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดพบการลดลงของกระแสรีดักชันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสที่ศักย์ไฟฟ้า 0.064 โวลต์ และพบว่าขนาดรูพรุนที่ใหญ่ซึ่งบรรจุเอนไซม์ได้มากขึ้นทำให้ได้กระแสไฟฟ้าตอบสนองที่สูงขึ้น อีกทั้งเมื่ออัตราส่วนของ TMB/P123 มากขึ้นทำให้ได้ค่า LOD และ Km ที่ต่ำลงอีกด้วย

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5770453121 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: GLUCOSE BIOSENSOR / MESOCELLULAR SILICA FOAM

YOOTTAPONG KLINTHONGCHAI: Effects of pore sizes of mesocellular foam silica/gold nanoparticles on efficiency of glucose biosensor. ADVISOR: ASSOC. PROF. SEEROONG PRICHANONT, 80 pp.

This research focused on the effect of pore sizes of mesocellular foam silica/gold nanoparticle (MCF/AuNP) based on glucose biosensor. This research was separated into 3 parts. The first part was the synthesis of 5 different types of mesocellular foam silica by changing the TMB/P123 ratio (w/w) to 0.5 1 1.5 2.5 and 2.5 with ammonium fluoride. Then, the synthesized materials were characterized to examine physical properties. When TMB/P123 ratio (w/w) was increased, the pore sizes of MCFs were found to increase. Moreover, adding ammonium fluoride as an additive resulted in larger window sizes. Next, gold nanoparticles were synthesized on MCF. TEM images showed that gold nanoparticles were evenly distributed in MCF. The second part, GOx immobilization in MCFs were achieved. The results showed that increasing TMB/P123 ratio caused higher enzyme loadings. In addition, when the gold nanoparticles were synthesized on MCF, the enzyme loading was increased. The third part, electrochemistry of glucose biosensor was tested by cyclic voltammetry (CV) and amperometry in nitrogen saturated conditions. The results showed that the third generation of glucose biosensor was not achieved by using MCF/AuNPs as reaction matrices. Subsequently, the first generation of glucose biosensor was applied. The results of CV show the current responses on reduction peak with higher glucose concentration in air saturated the system at the potential of 0.064 V. After that, the modified electrodes (TMB/P123 0.5 to 2.5 with ammonium fluoride) was tested by varying glucose concentration at air saturation using amperometric method. The results showed that increasing TMB/P123 ratio resulted in the higher current responses. LOD and K_m were also lower when the TMB/P123 ratio was increased.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปรีชานนท์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ วิธีการทำงาน วิจัย ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ อาจารย์ ดร. ชัญชนา ธนชยานนท์ ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับความรู้ต่างๆเกี่ยวกับวัสดุ และ ดร.บราลี ชยสมบัติ ในเชิงวัสดุศาสตร์ และอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง งานวิจัยนี้จะสำเร็จลงไม่ได้ถ้าขาดบุคคลเหล่านี้ นางสาวอังคณา ผ่องผุด นาย นิธิ ธนานุกูล นางสาว พรพิชชา พิทักษ์ธำรง นางสาวเจกิตาน์ วิกรานต์วาณิชย์ และนาย ศิวกร ศอกจะบก สำหรับการให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว และเพื่อนพ้องที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้ การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 วัตถุประสงค์.....	2
1.2 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.3 ผลที่คาดหวัง.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎี.....	4
2.1 ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor).....	4
2.1.1 องค์ประกอบของไบโอสเซนเซอร์.....	4
2.1.2 การทดสอบทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical method).....	6
2.1.2.1 ไซคลิกโวลท์แอมเมตรี (cyclic voltammetry;CV).....	7
2.1.2.2. ไซคลิกโวลท์แอมโมแกรม (Cyclic Voltammogram).....	7
2.1.3 ปัจจัยที่แสดงต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี.....	8
2.1.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range).....	8
2.1.3.2 ขีดจำกัดการตรวจสอบ (limit of detection;LOD).....	8
2.2 กลูโคสไบโอสเซนเซอร์ (glucose biosensor).....	9
2.2.1. กลูโคสเซนเซอร์รุ่นแรก (the first generation glucose sensors).....	9
2.2.2 กลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 2 (the second generation glucose sensors).....	10

2.2.3	กลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 3 (the third generation glucose sensors).....	10
2.2.4	กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase;GOx).....	11
2.3	เมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica).....	11
2.3.1	ลักษณะของเมโซพอร์ซิลิกา.....	11
2.3.3	วัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่มีขนาดรูพรุนต่างๆ.....	12
2.3.4	การสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา.....	13
2.4	อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles;AuNPs).....	16
2.4.1	คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทอง.....	16
บทที่ 3	วารสารปริทรรศน์.....	18
3.1	อิทธิพลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวัสดุเมโซพอร์ซิลิกาสำหรับการตรึงเอนไซม์.....	18
3.1.1	ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง (enzyme loading).....	18
3.1.2	เสถียรภาพของเอนไซม์ (enzyme activity).....	18
3.2	อิทธิพลของอนุภาคนาโนทองต่อการตรึงเอนไซม์.....	20
3.3	การสังเคราะห์เมโซเซลลูลาร์โพรซิลิกา.....	20
3.3.1	อิทธิพลที่ส่งผลต่อลักษณะของเมโซเซลลูลาร์โพรซิลิกา.....	21
3.3.1.1	ตัวกำหนดโครงสร้าง (structure-directing agent) และตัวทำละลายร่วมที่เป็นสารอินทรีย์ (organic cosolvent).....	21
3.3.1.3	วิธีการกำจัดแม่แบบ (methods for template removal).....	24
3.3.1.4	การใส่สารเติมแต่ง (additives).....	25
3.4	กลูโคสไบโอเซนเซอร์.....	26
3.4.1	การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง (Direct electron transfer).....	26
3.4.1.1	กลไกการเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง.....	26
3.4.2	วัสดุที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์.....	27

3.4.2.2 วัสดุอนุภาคนาโน	28
3.4.2.3 วัสดุนาโน	28
บทที่ 4 วัสดุและวิธีการทดลอง	31
4.1 วัสดุและสารเคมี	31
4.2 วิธีการทดลอง	31
4.2.1 การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา	31
4.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา	32
4.2.3 การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง	32
4.2.3.3 การรีดิวซ์ทองไอออนที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกาให้ กลายเป็นอนุภาค	33
4.2.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติลักษณะทางกายภาพของวัสดุรองรับที่สังเคราะห์ได้ MCF MCF/AuNP ทั้ง 5 แบบ	33
4.2.5 การตรึงเอนไซม์ในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา	34
4.2.6 การเตรียมสารละลายโคโตซาน	34
4.2.7 การทำอิเล็กโทรดดัดแปลง	35
4.2.8 การทดลองเปรียบเทียบผลของชนิดอิเล็กโทรดใช้งานดัดแปลงต่อการตอบสนอง ทางไฟฟ้าเพื่อศึกษาการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงในระบบอิมมูโนแอสเซนเซอร์	35
4.2.9 การทดสอบอิทธิพลของวัสดุสังเคราะห์ต่อกลูโคสไบโอเซนเซอร์	35
4.2.10 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคส	36
บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	37
5.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต MCF/AuNPs ที่มี การเปลี่ยนแปลงขนาดรูพรุน	37
5.2 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์กลูโคออกซิเดสในวัสดุตรึง	46
5.3 อิทธิพลของ MCF/AuNPs ต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์	48

5.3.1 การศึกษาพฤติกรรมของอิเล็กโทรดในระบบปราศจากออกซิเจน (nitrogen saturation).....	49
5.3.2 อิทธิพลของออกซิเจนต่ออิเล็กโทรดดัดแปลง	50
5.3.3 อิทธิพลของชนิดอิเล็กโทรดดัดแปลงต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer ; DET).....	51
5.3.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการทำงานของไปโอเซนเซอร์ในระบบ ปราศจากออกซิเจนด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.....	54
5.3.5 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี แอมป์โรเมตรี.....	55
5.3.6 อิทธิพลของอิเล็กโทรดดัดแปลงต่อกลูโคสไปโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1	56
5.3.7 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกลูโคส.....	58
5.3.8 การทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา (storage stability)	63
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	65
6.1 สรุปผลการทดลอง	65
6.1.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต MCF /AuNPs ที่ มีการเปลี่ยนแปลงขนาดรูพรุน 5 ชนิด.....	65
6.1.2 การศึกษาผลของการตรึงกลูโคสออกซิเดสในวัสดุตรึง.....	65
6.1.3 อิทธิพลขนาดของรู MCF/AuNP ต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไปโอเซนเซอร์.....	65
รายการอ้างอิง.....	67
ภาคผนวก ก	75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	80

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์[30].....	4
รูปที่ 2.2 กลไกการส่งผ่านของอิเล็กตรอนของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ระหว่างเอนไซม์และอิเล็กตรอนที่เข้าไปลิ้นผิวอิเล็กโทรด [31]	6
รูปที่ 2.3 แบบของศักย์ไฟฟ้าที่ให้ในไซคลิกโวลแทมเมตรี [30].....	7
รูปที่ 2.4 ไซคลิกโวลแทมโมแกรม โดยที่ E_{pa} E_{pc} และ i_{pa} i_{pc} คือ ศักย์ไฟฟ้าสูงสุด และกระแสไฟฟ้าสูงสุด ของสัญญาณแบบแคโทดิกและแอนอดิก ตามลำดับ [30].....	8
รูปที่ 2.5 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase).....	11
รูปที่ 2.6 พันธะไฮโดรเจนระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวซิลิกา [39]	14
รูปที่ 2. 7 ไฮโดรโฟบิกระหว่างเอนไซม์และซิลิกา [39]	15
รูปที่ 2.8 แรงระหว่างกันทางไฟฟ้าสถิตย์ของเอนไซม์และพื้นผิวซิลิกา [40]	16
รูปที่ 2.9 กลไกการดูดซับของเอนไซม์บนอนุภาคขนาดนาโนทองโดยอาศัยแรง a) แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ b) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว และ c) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างพื้นผิวของ ทองกับอะตอมของซัลเฟอร์ (sulphur) หรือไนโตรเจน (nitrogen) ของเอนไซม์ [29].....	17
รูปที่ 5.1 ไอโซเทอมของการดูดซับ และการคายซับแก๊สไนโตรเจนบนพื้นผิวของ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นของแต่ละอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 โดย MCF124:TMB/P123=0.5 MCF224:TMB/P123=1.0 MCF324:TMB/P123=1.5 MCF524:TMB/P123=2.5 และ MCF524add:TMB/P123 =2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์	38
รูปที่ 5.2 ลักษณะรูพรุนของ MCF [50]	39
รูปที่ 5.3 โครงสร้างของรูพรุนมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อใส่แอมโมเนียมฟลูออไรด์	39
รูปที่ 5.4 ภาพถ่ายจาก TEM ของวัสดุ MCF ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ก) 0.5 ..	42
รูปที่ 5.5 ภาพถ่ายจาก SEM ของวัสดุ MCF ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ก) 0.5 ข) 1.0 ค) 1.5 ง) 2.5 จ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ เส้นสีขาวแสดงสเกลบาร์ขนาด 10 ไมโครเมตร.....	43

รูปที่ 5.6 ภาพถ่ายจาก TEM ของวัสดุ MCF/AuNP ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ก) 0.5 ข) 1.0 ค) 1.5 ง) 2.5 จ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ เส้นสีขาวแสดงสเกลบาร์ ขนาด 50 นาโนเมตร.....45

รูปที่ 5.7 ร้อยละของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก้า ต่างชนิดกัน 5 ชนิด คือ โดยมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของ TMB/P123=0.5,1,1.5,2.5 และ 2.5 กับสารเติมแต่งใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ..46

รูปที่ 5.8 เปรียบเทียบกลไกการเกิดของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ในแต่ละรุ่น จากรุ่นที่ (A) 1 (B) 2.....49

รูปที่ 5.9 ไซคลิกโวลแทมโกรมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่ระบบ อิมมูต้าวด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิ โวลต์ต่อวินาที50

รูปที่ 5.10 ไซคลิกโวลแทมโกรมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่ ระบบอิมมูต้าวด้วยก๊าซไนโตรเจน (เส้นสีแดง) และอากาศ (สีน้ำเงิน) โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที.....51

รูปที่ 5.11 ไซคลิกโวลแทมโกรมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่ ระบบอิมมูต้าวด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ก) การเปรียบเทียบ chitosan และ GOx/Chitosan และ ข-ฉ เป็นการ เปรียบเทียบวัสดุแบบมี GOx และไม่มี GOx ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ข) 0.5 ค) 1.0 ง) 1.5 จ) 2.5 ฉ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์53

รูปที่ 5.12 ไซคลิกโวลแทมโกรมในสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ใน ระบบอิมมูต้าวด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที54

รูปที่ 5.13 ผลการตรวจวัดสารละลายกลูโคสชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆในแต่ละวัสดุในระบบอิมมูต้าว ด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.259 โวลต์.....55

รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น ต่างๆ77

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางกายภาพของวัสดุเมโซพอร์รัสซิลิกา	22
ตารางที่ 3.2 ลักษณะโครงสร้างของเมโซพอร์รัสโฟมซิลิกา-ซิลิกา [26].....	23
ตารางที่ 3.3 คุณสมบัติเนื้อสารสำหรับวัสดุ MCF ก่อนและหลังการต่อหมู่เอมีน.....	25
ตารางที่ 5.1 คุณสมบัติทางกายภาพของ MCF ที่สังเคราะห์ ขึ้นของแต่ละ อัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่ได้จากการคำนวณจากวิธี BJH สำหรับ ขนาดรูพรุนและปริมาตรรูพรุน ส่วนพื้นผิวหาจากวิธี BET	40
ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบค่า Michaelis–Menten (M–M) constant (Km) ของแต่ละอิเล็กโทรดตัดแปลง	61
ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบอิเล็กโทรดตัดแปลงเพื่อวัดสารละลายกลูโคส	62
ตารางที่ 5.4 การเปรียบเทียบอิเล็กโทรดตัดแปลงในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ.....	63
ตารางที่ ก.1 ไอโซเทอมของการดูดซับและการคายซับก๊าซไนโตรเจน	75
ตารางที่ ก.2 การตรึงเอนไซม์ลงบน MCF	76
ตารางที่ ก.3 การตรึงเอนไซม์ลงบน MCF/AuNP	77
ตารางที่ ก.4 การคำนวณมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น ต่างๆ	78

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันไบโอเซนเซอร์คืออุปกรณ์ตรวจจับที่มีการบูรณาการองค์กระทางชีววิทยา (เอนไซม์ เซลล์ หรือแอนติบอดี) และตัวแปลงสัญญาณที่เหมาะสม (ทางกลหรือทางไฟฟ้า) [8] ซึ่งนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์มาอย่างต่อเนื่อง โดยหนึ่งในไบโอเซนเซอร์ที่น่าสนใจนั้นคือ กลูโคสไบโอเซนเซอร์เนื่องจากมีปฏิกิริยาที่ซับซ้อน [9-11] และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเช่นกัน โดยการพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1 ทำได้ไม่แม่นยำด้วยมีการใช้ออกซิเจนเป็นตัวกลางในการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไปยังอิเล็กโทรดซึ่งอาจจะเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ [3] ดังนั้นจึงมีการพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 2 คือ มีการใช้พอลิเมอร์ตัวกลางสังเคราะห์เช่น เฟอร์โรซีน (ferrocene) เป็นต้น มาทำหน้าที่เป็นตัวรับ-ส่งอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง โดยที่ พอลิเมอร์สังเคราะห์ต้องมีความว่องไวต่อการรับ-ส่งอิเล็กตรอนมากกว่าออกซิเจน เพราะมีฉะนั้นออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งยังคงทำให้เกิดความผันผวนต่อการตรวจวัดเช่นเดียวกับกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1 [8-9] จึงได้มีการพัฒนาเป็นกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 คือไม่มีการใช้ตัวกลางใดๆ ซึ่งจะทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาไปยังอิเล็กโทรดได้โดยตรงซึ่งทำให้เกิดความว่องไวและความจำเพาะต่อกกลูโคสที่มากขึ้น [8-9] งานวิจัยนี้ได้สนใจในการพัฒนากลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 เพื่อให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้โดยตรงจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเพราะในเอนไซม์นั้นมีหมู่ฟลาวินที่อยู่ในใจกลางของเอนไซม์ที่ถูกปกคลุมไปด้วยเปลือกโปรตีนซึ่งทำหน้าที่รับและจ่ายอิเล็กตรอนซึ่งยากต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอน [7-9] เพราะฉะนั้นเพื่อให้อิเล็กตรอนจากหมู่ฟลาวินที่อยู่ลึกในเอนไซม์ถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ง่ายขึ้นจึงมีการนำวัสดุรองรับ (enzyme carrier) มาช่วยเนื่องจากคาดว่าหน้าที่มีวัสดุรองรับมาช่วยลดระยะการเดินทางของอิเล็กตรอนทำให้อิเล็กตรอนเดินทางได้ง่ายขึ้น (electron hopping) มีงานวิจัยมากมายที่นำวัสดุนาโนมาเป็นตัวรองรับเอนไซม์ เช่น ท่อคาร์บอนนาโน (carbon nanotube) [4,6,8,69] อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles) [21] พอลิพีแนนโทรลีน (polyphenanthroline) [58] กราฟีน [53,66-67] เป็นต้น โดยวัสดุรองรับเหล่านี้ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแต่ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส โดยอีกวัสดุรองรับหนึ่งที่น่าสนใจ คือ เมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (mesocellular foam silica; MCF) เป็นวัสดุเมโซพอร์สชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อการนำมาตรึงเอนไซม์เป็นอย่างมาก เนื่องจากวัสดุชนิดนี้มีพื้นที่ผิวที่สูง 500-1000 ตารางเมตรต่อกรัม มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2-50 นาโนเมตร อีกทั้งยังมีปริมาตรของ รูพรุนสูง 1 ลูกบาศก์เมตรต่อกรัม ซึ่งคุณสมบัติที่ดีเหล่านี้สามารถที่จะช่วยรักษาคุณสมบัติของ

เอนไซม์ไว้ได้ [12-18] โดยสันนิษฐานว่าขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันของวัสดุอาจจะส่งผลต่อการรูปร่างของเอนไซม์ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

โดยการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนของ MCF ต้องเริ่มจากการสังเคราะห์เมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก้าประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ 1. การขึ้นไมเซลล์โดยทางเคมี (micelle chemistry) โดยใช้พลูโรนิค พี 123 (pluronic P123) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดโครงสร้าง (structure-directing agent) ของวัสดุและใช้ตัวทำละลาย (solvent) เช่น น้ำและ เอทานอล (ethanol) สารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนที่อยู่ภายในของโครงสร้างวัสดุ (swelling agent) [19] คือ 1,3,5 ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5- trimethylbenzene; TMB) และมีแหล่งซิลิกาเป็น เตตระเอทิลออร์โธซิลิเกต (tetraethyl orthosilicate; TEOS) อีกทั้งยังมีสารเติมแต่ง คือ แอมโมเนียมฟลูออไรด์ที่ทำให้ขนาดของรูพรุนเกิดการเปลี่ยนแปลง [20] 2. กระบวนการโซลเจล (sol-gel process) เพื่อทำให้เกิดเป็นโครงข่ายเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก้าและ 3. การกำจัดตัวกำหนดโครงสร้างโดยวิธีการสกัดตัวทำละลาย (solvent extraction) เพื่อกำจัดสารตั้งต้นที่เหลืออยู่บริเวณรูพรุนออกไป [59] โดยจากการสืบค้นงานวิจัยพบว่า การที่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนเชิงน้ำหนักของ TMB/P123 ทำให้เกิดการขยายตัวของรูพรุนที่อยู่ภายในโครงสร้าง โดยที่อัตราส่วนระหว่าง TMB/P123 มากขึ้น ทำให้ขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้นด้วยเช่นกัน [20-23]

แม้ว่าเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก้าจะมีคุณสมบัติที่ดีมากสำหรับการนำไปเป็นตัวรองรับเพื่อตรึงเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามข้อเสียหลักคือ มีคุณสมบัติของการนำไฟฟ้าที่ค่อนข้างต่ำมากทำให้ส่งผลเสียต่อการนำไปใช้ทางไบโอเซนเซอร์ เพราะฉะนั้นจึงต้องใช้วัสดุอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้ามาช่วยปรับเปลี่ยนให้สามารถนำไฟฟ้าได้ดียิ่งขึ้น อนุภาคนาโนทองเป็นหนึ่งในอนุภาคนาโนที่มีคุณสมบัติของการนำไฟฟ้าที่ดี มีความเสถียร และเข้ากับสารชีวโมเลกุลได้ดี ซึ่งงานวิจัยนี้จะนำอนุภาคนาโนทองมาตรึงเข้ากับ MCF เพื่อให้วัสดุรองรับมีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดีขึ้น [24-26] เพราะฉะนั้นงานวิจัยจะทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก้า/อนุภาคนาโนทองต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์

1.1 วัตถุประสงค์

ศึกษาอิทธิพลของรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก้า/อนุภาคนาโนทองต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์

1.2 ขอบเขตงานวิจัย

1.2.1 สังเคราะห์วัสดุรองรับเอนไซม์ชนิด MCF/AuNPs ที่มีขนาดรูพรุนของ MCF แตกต่างกัน 5 ขนาด โดยการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง TMB:P123 และคงอัตราส่วนเชิงมวลระหว่าง TEOS:P123 คงที่ที่ 2:1

1.2.2 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของวัสดุรองรับที่สังเคราะห์ได้ เช่น พื้นผิว ขนาดรูพรุน ปริมาตรรูพรุน เป็นต้น โดยใช้เทคนิค TEM SEM และ BET

1.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุรองรับในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ในด้านความสามารถในการบรรจุเอนไซม์ (enzyme loading) แอคทิวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึง และการรักษาโครงสร้างทางโมเลกุลของเอนไซม์

1.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของกลูโคสออกซิเดสไบโอเซนเซอร์ ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลต์แอมเมตรี (CV)

1.2.4.1 ความสามารถในการส่งถ่ายอิเล็กตรอนโดยตรงระหว่างเอนไซม์และอิเล็กโทรด

1.2.4.2 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)

1.2.4.3 ค่าการตรวจวัดต่ำที่สุด (limit of detection)

1.2.4.4 เสถียรภาพของการเก็บรักษา (storage stability)

1.3 ผลที่คาดหวัง

1.3.1 ได้รับความรู้ในการศึกษาผลประสิทธิภาพจากการพัฒนาอิเล็กโทรดจากการหาความเข้มข้นของกลูโคสโดยใช้กลูโคสออกซิเดส

1.3.2 สามารถเลือกปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ตัวรองรับสำหรับการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม

บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 ไบโอสเซนเซอร์ (biosensor)

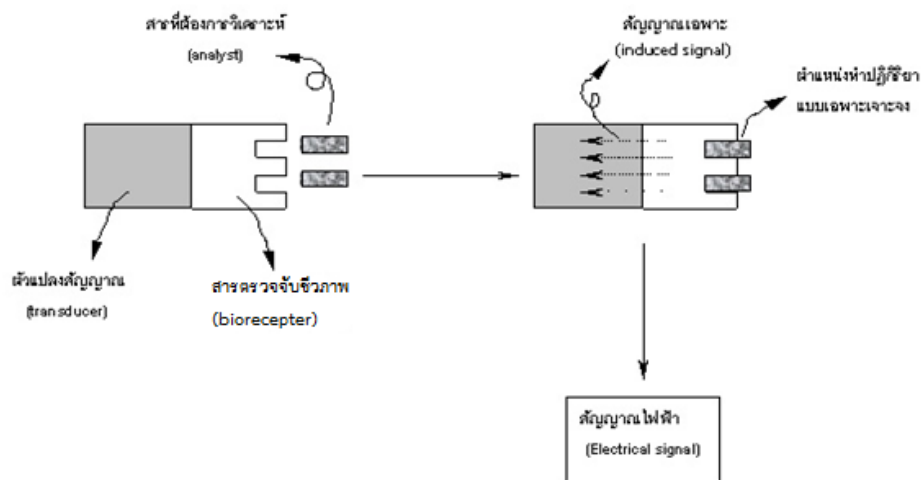
ไบโอสเซนเซอร์เป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารเป้าหมายหรือตัวแปรอื่นๆ โดยมีสารชีวโมเลกุลเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนของสารตรวจจับชีวภาพ (bioreceptor)

2.1.1 องค์ประกอบของไบโอสเซนเซอร์

ไบโอสเซนเซอร์ทั่วไปนั้นประกอบไปด้วย

1. สารตรวจจับชีวภาพ (bioreceptor)
2. ตัวแปลงสัญญาณ (transducer)

กลไกของไบโอสเซนเซอร์แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของไบโอสเซนเซอร์ [27]

สารตรวจจับชีวภาพ เช่น เอนไซม์ (enzyme) เซลล์ (cell) หรือ แอนติบอดี (antibody) และจุลินทรีย์ (microorganism) เป็นต้น โดยสารตรวจจับชีวภาพเหล่านี้มีความจำเพาะต่อสารเป้าหมายสูง เนื่องจากองค์ประกอบเหล่านี้สามารถสร้างสัญญาณขึ้นเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์ โดยที่สัญญาณที่เกิดขึ้นอาจจะมาอยู่ในรูปของไอออน อิเล็กตรอน ความร้อน แก๊สต่างๆ หรือ เกิดการเปลี่ยนแปลงของมวล ซึ่งสามารถถูกตรวจสอบได้โดยผ่านเครื่องแปลงสัญญาณ

โดยตัวแปลงสัญญาณหรือเครื่องตรวจวัดจะทำการแปลงสัญญาณเฉพาะต่างๆ เช่น อิเล็กตรอน แสง เป็นต้น ไปเป็นตัวเลขแสดงผล โดยการตอบสนองทั่วไปที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ ปริมาณสัญญาณทางไฟฟ้าที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น นั้นหมายความว่า ถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงอิเล็กตรอนขึ้นในระบบแล้วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้าด้วย และแสดงค่าเป็นตัวเลข

การตอบสนองทางไฟฟ้าที่ได้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสัญญาณดิจิทัล ซึ่งสัญญาณในการดำเนินการจะแสดงผลที่หน้าจอทำให้สามารถนำค่าเหล่านี้ไปคำนวณสารเคมีเป้าหมายโดยผู้ใช้

2.1.1.1 ส่วนประกอบของแอมป์โพโรมิทริกไบโอเซนเซอร์มี 3 อิเล็กโทรด ใน เซลล์ไฟฟ้าเคมีตัวเดียวกันซึ่งประกอบไปด้วย

ก.) อิเล็กโทรดใช้งาน (working electrode)

อิเล็กโทรดใช้งานเป็นตัวแปลงสัญญาณและตอบสนองสัญญาณกระตุ้นให้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเป้าหมาย โดยอิเล็กโทรดใช้งานควรมีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดี ทนต่อการกัดกร่อนในสารเคมี และรักษาประสิทธิภาพการทำงานของไบโอเซนเซอร์ ซึ่งสามารถทำจากสารประกอบของโลหะเฉื่อย เช่น ทองคำ เงิน หรือทองคำขาว เป็นต้น

ข.) อิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode)

อิเล็กโทรดอ้างอิงเป็นตัวที่ช่วยให้ศักย์ไฟฟ้าของครึ่งเซลล์ชนิดนี้มีค่าคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของสารใดๆในสารละลายที่ทำการวิเคราะห์ ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบค่าศักย์ไฟฟ้ากับศักย์ไฟฟ้าทำงานเพื่อควบคุมให้ศักย์ไฟฟ้าภายในเซลล์คงที่ วัสดุที่นิยมใช้ทำเป็นอิเล็กโทรดอ้างอิง คือ ซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl Reference Electrodes)

ค.) อิเล็กโทรดช่วย (counter electrode)

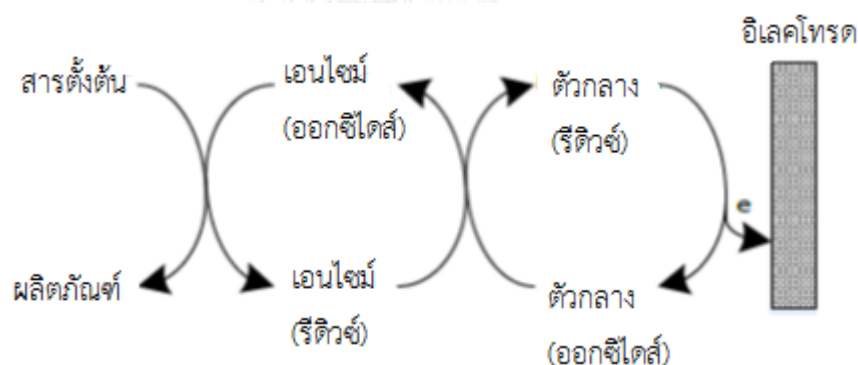
อิเล็กโทรดช่วยควรใช้วัสดุที่มีค่าการนำไฟฟ้าที่ดี ความเป็นรูพรุนสูง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา จะต้องเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดีด้วย วัสดุที่นิยมใช้ทำเป็นอิเล็กโทรดช่วยคือ โลหะแพลทินัม (Pt) แต่เนื่องจากโลหะแพลทินัมมีราคาแพงอาจใช้วัสดุอื่นแทนได้เช่น ผงคาร์บอน ท่อคาร์บอนนาโน เป็นต้น

2.1.2 หลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical biosensor)

ดังที่ได้กล่าวในหัวข้อ 2.1.1 ข้างต้น ไบโอเซนเซอร์ซึ่งประกอบด้วยสองส่วน คือ ส่วนการตรวจจับทางชีวภาพ และ ตัวแปลงสัญญาณ มีการทำงานร่วมกันเพื่อการตรวจวัดปริมาณสารเคมีเป้าหมาย ดังนี้สารเคมีเป้าหมายถูกตรวจจับด้วยตัวโมเลกุลทางชีวภาพที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ

สารเคมีนั้นๆ เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี หรือ จูลินทรีย์ เป็นต้น การจับกันของโมเลกุลของสารเคมี เป้าหมายกับโมเลกุลทางชีวภาพอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมี มีการปลดปล่อย หรือรับอิเล็กตรอน ไปยัง ตัวแปลงสัญญาณ รายงานผลออกมาเป็นค่าการตอบสนองทางไฟฟ้าเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งมีความ สอดคล้องกับความเข้มข้นของสารเคมีเป้าหมายในสารละลาย

ตัวอย่างหนึ่งของการทำงานของไบโอเซ็นเซอร์ชนิดไฟฟ้าเคมี แสดงได้ดังรูปที่ 2.2 สารตั้งต้น ซึ่งในที่นี้หมายถึง สารเคมีเป้าหมาย ถูกเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์ชนิดหนึ่งทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ และเอนไซม์ที่ถูกเปลี่ยนจากสภาวะออกซิไดซ์ (oxidized form) เป็นสภาวะรีดิวซ์ (reduced form) ซึ่งพร้อมที่จะถูกออกซิไดซ์ต่อด้วยตัวกลางนำอิเล็กตรอน (electron mediator) ใน ระบบ ในขั้นตอนต่อมาตัวกลางนำอิเล็กตรอนในสภาวะรีดิวซ์จะถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ผิวหน้าของ อิเล็กโทรด และทำให้เกิดการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าขึ้นจากการทำงานของตัวแปลงสัญญาณ จะ เห็นได้ว่าเอนไซม์ และตัวกลางนำอิเล็กตรอนมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะทางประจุอย่างต่อเนื่องเพราะ เป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ ดังนั้นปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการ เกิดปฏิกิริยา และความเข้มข้นของสารตั้งต้นในสารละลาย



รูปที่ 2.2 กลไกการส่งผ่านของอิเล็กตรอนของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ระหว่างเอนไซม์และ อิเล็กตรอนที่เข้าใกล้พื้นผิวอิเล็กโทรด [28]

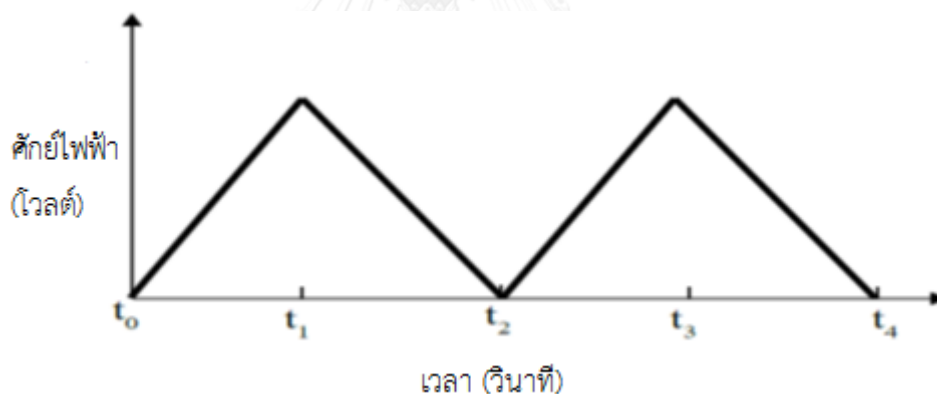
2.1.2 การทดสอบทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical method)

โวลแทมเมตรี (voltammetry) เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีที่เกี่ยวข้องกับการ ให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ระบบ ศักย์ไฟฟ้าที่ให้นี้ทำให้อิเล็กโทรดใช้งานมีค่าศักย์ไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งขึ้นอยู่กับผู้ใช้จะกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับอิเล็กโทรดใช้งาน โดยทำให้สารเคมีบางชนิดที่อยู่ใน สารละลายสามารถเกิดปฏิกิริยาบนผิวของขั้วไฟฟ้าได้ นั่นคือ มีการให้ หรือ รับอิเล็กตรอนที่ อิเล็กโทรดใช้งานทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านของอิเล็กโทรดใช้งาน กระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูก

ตรวจวัดโดยเครื่องอิเล็กทรอไนคส์ ซึ่งขนาดของกระแสมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่เกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

2.1.2.1 ไชคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry; CV)

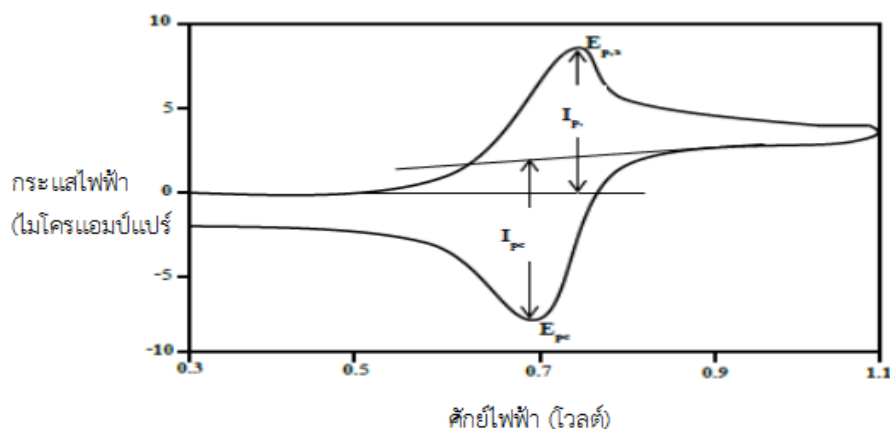
ไชคลิกโวลแทมเมตรี (CV) เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการศึกษากลไกของปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีเนื่องจากพีคที่เกิดขึ้นได้จากวิธีนี้สามารถบ่งบอกพฤติกรรมที่เกิดขึ้นภายในระบบของได้ โดย CV มีการให้ศักย์ไฟฟ้าเป็นรอบๆ ดังรูปที่ 2.3 ไปยังอิเล็กโทรดใช้งานที่จุ่มอยู่ในสารละลาย แล้ววัดกระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาในระบบ โดยศักย์ไฟฟ้าที่อิเล็กโทรดทำงานจะถูกเทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิงได้แก่ อิเล็กโทรดซิลเวอร์ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) เป็นต้น เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าไปในระบบด้วยอัตราการสแกนคงที่ (scan rate) ไปเรื่อยๆ เรียกว่า การสแกนไปข้างหน้า (forward scan) พอถึงจุดที่เรากำหนดไว้ ระบบจะกลับทิศทางการให้ศักย์ไฟฟ้าด้วยอัตราการสแกนที่ปริมาณไฟฟ้าเท่าเดิมเรียกว่า การสแกนย้อนกลับ (reverse scan) จนศักย์ไฟฟ้าเท่ากับศักย์เริ่มต้นจะได้เป็นหนึ่งรอบ ดังรูปที่ 2.3 โดยรอบที่สองก็จะเริ่มเหมือนกับศักย์ไฟฟ้าที่รอบแรก โดยขึ้นอยู่กับเราว่าจะต้องการที่จะสแกนกี่รอบเพื่อที่จะดูพฤติกรรมของระบบ



รูปที่ 2.3 แบบของศักย์ไฟฟ้าที่ให้ในไชคลิกโวลแทมเมตรี [27]

2.1.2.2. ไชคลิกโวลแทมโมแกรม (Cyclic Voltammogram)

CV ที่วัดได้จากกระแสที่อิเล็กโทรดทำงานในระหว่างการสแกนศักย์ไฟฟ้าเมื่อนำมาพลอตกราฟระหว่างกระแสกับศักย์ไฟฟ้า จะได้ดังรูปที่ 2.4 ศักย์ไฟฟ้าสูงสุดคือพีคแอโนดิก (anodic peak potential ; E_{pa}) ในทำนองเดียวกันพีคด้านล่างเป็นศักย์ไฟฟ้าต่ำสุดเป็นพีคแคโทดิก (cathodic peak potential ; E_{pc}) ส่วนความสูงของพีคทางด้านบนคือกระแสของพีคแอโนดิก (anodic peak current ; i_{pa}) และความสูงของพีคด้านล่างเป็นกระแสของพีคแคโทดิก (cathodic peak current ; i_{pc}) ซึ่งกระแสไฟฟ้าของพีคแคโทดิกและแอโนดิกจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ได้นำมาทดสอบ [23]



รูปที่ 2.4 ไชคลิกโวลแทมโมแกรม โดยที่ E_{pa} E_{pc} และ i_{pa} i_{pc} คือ ศักย์ไฟฟ้าสูงสุด และ กระแสไฟฟ้าสูงสุด ของสัญญาณแบบแคโทดิกและแอนอดิก ตามลำดับ [27]

โดยพารามิเตอร์ที่สำคัญในไชคลิกโวลแทมโมแกรมคือ ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงสุด (E_{pc} , E_{pa}) และ กระแสสูงสุด (i_{pc} , i_{pa}) ของสัญญาณแบบแคโทดิกและแอนอดิก [27] โดยค่าเหล่านี้สามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อพัฒนาอิเล็กทรอนิกส์ได้ เนื่องจากสามารถจะศึกษาพฤติกรรมที่เกิดขึ้นภายในระบบได้

2.1.3 ปัจจัยที่แสดงต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมี

ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพทางไฟฟ้าเคมีสามารถที่จะบ่งบอกถึงคุณสมบัติและความสามารถของเครื่องมือวัดนั้นๆ จากผลการทดลองโดยนำมาหาค่าต่างๆดังนี้

2.1.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range)

ช่วงความเป็นเส้นตรงจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของตัวอย่างที่อยู่ในช่วงที่สามารถวัดได้จากการทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยสามารถคำนวณได้จากการพลอตความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณและความเข้มข้นที่นำมาวิเคราะห์โดยใช้สมการเส้นตรง อีกทั้งยังแสดงถึงค่าความแม่นยำและเที่ยงตรงเพื่อชี้ให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าที่น่าเชื่อถือ

2.1.3.2 ขีดจำกัดการตรวจสอบ (limit of detection; LOD)

ขีดจำกัดของการตรวจสอบคือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้

2.1.3.3 ความไว (sensitivity)

ความไวคือปัจจัยที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของสัญญาณทางไฟฟ้าและการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเป้าหมาย ค่าความไวสามารถหาได้จากความชันของสมการเส้นตรงระหว่างค่าการตอบสนองของสัญญาณที่วัดได้กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการ

วัด ความชันสามารถที่จะอธิบายได้ถึงการแสดงของความไว้วางใจ ดังนั้นถ้าค่าความชันมีค่ามาก นั่นก็หมายถึงความไว้วางใจสำหรับเครื่องมือตรวจวัดมีความไว้วางใจที่สูง

2.1.3.4 ความจำเพาะ (selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงคือการแสดงของสารที่ต้องการตรวจสอบในสารเจือปน โดยทำการศึกษาเพื่อตรวจสอบการก่อให้เกิดของผลิตภัณฑ์ตัวอื่น ๆ ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อตรวจสอบ อย่างไรก็ตามเครื่องมือตรวจสอบนี้ต้องตรวจสอบช่วงของความเข้มข้นที่รู้ค่าเพราะถ้าตรวจสอบช่วงของความเข้มข้นอื่นอาจจะไม่ทราบว่าเกิดการเจือปน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเครื่องมือมีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการเป้าหมาย

2.1.3.5 การทดลองซ้ำ (Reproducibility)

การทดลองซ้ำคือ ระดับความใกล้เคียงของค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด (Instrument) ในการทดลองแบบเดียวกัน แต่ทำการทดลองอีกครั้งหนึ่ง โดยการวัดครั้งหนึ่งๆสามารถเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขดังต่อไปนี้ได้ เช่น วิธีการวัด ผู้วัด รวมถึงสภาพแวดล้อม

2.1.3.6 เวลาที่ทำการตอบสนอง (response time)

เวลาที่ทำการตอบสนองคือ เวลาที่ต้องการสำหรับระบบเพื่อที่จะเข้าไปสู่สมดุลหรือระบบที่คงที่ เวลาที่ตอบสนองนี้ของแต่ละไปโอเซนเซอร์ไม่เท่ากัน

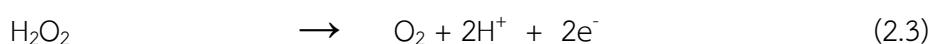
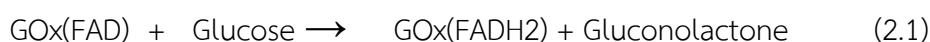
2.2 กลูโคสไบโอเซนเซอร์ (glucose biosensor)

กลูโคสไบโอเซนเซอร์มีการพัฒนาตั้งแต่ปี 1962 โดยคลาร์กและลีออน การศึกษากลูโคสไบโอเซนเซอร์มีความน่าสนใจสำหรับนักชีวเคมีและนักชีววิทยาเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสำคัญต่อชีวิตและสุขภาพของมนุษย์ เพราะว่านักวิทยาศาสตร์เหล่านี้สามารถนำความรู้ไปประยุกต์เพื่อสร้างอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลในเลือดโดยใช้หลักการของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ [1,5] ในปัจจุบันมีกลูโคสไบโอเซนเซอร์ 3 รุ่นด้วยกัน โดยขึ้นอยู่กับการพัฒนากระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนของแต่ละรุ่น

2.2.1. กลูโคสเซนเซอร์รุ่นแรก (the first generation glucose sensors)

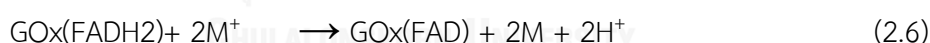
กลูโคสเซนเซอร์รุ่นแรก (the first generation glucose sensors) มีการใช้ออกซิเจน (oxygen) เป็นตัวกลางในการรับและให้อิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไปยังพื้นผิวอิเล็กโทรด โดยที่เอนไซม์ทำการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส จากนั้นเอนไซม์ที่รับอิเล็กตรอนกลายมาอยู่ในรูปโมเลกุลรีดิวซ์ ($FADH_2$) และกลูโคสถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นกลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) ดังสมการที่ 1 หลังจากนั้นเอนไซม์ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์จะให้อิเล็กตรอนแก่ออกซิเจน

ได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นไปตามสมการที่ 2 แล้วไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดส์ได้โมเลกุลของออกซิเจนกลับคืนมาและกระแสออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจึงเป็นส่วนต่อความเข้มข้นของกลูโคสซึ่งสามารถที่จะหาได้จากการวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือออกซิเจน ดังสมการที่ 2.3 และ 2.4 [29]



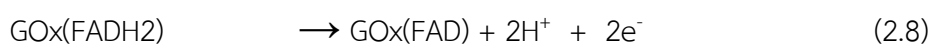
2.2.2 กลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 2 (the second generation glucose sensors)

กลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 2 (the second generation glucose sensors) ได้ปรับปรุงมาจากกลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 1 โดยมีการแทนที่ออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับและให้อิเลคตรอนในการทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ตัวกลางสังเคราะห์ (artificial mediator; M) เช่น เฟอร์โรซีน (ferrocene) เฟอร์ไรไซยาไนด์ (ferricyanide) เทธิลฟูวาเลน (tethielfuvalene) โดยทำหน้าที่เสมอเป็นตัวรับและส่งอิเลคตรอน (shuttle electron) ระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวอิเล็กโทรด โดยที่ตัวกลางสังเคราะห์ควรที่จะทำปฏิกิริยาอย่างทันทีทันใดกับรีดิวซ์เอนไซม์ เพื่อหลีกเลี่ยงออกซิเจนที่เป็นตัวกลางอีกตัวหนึ่งซึ่งอาจจะมาทำหน้าที่รับอิเลคตรอนแทนตัวกลางสังเคราะห์ได้ สมการที่ 1 5 และ 6 คือกลไกของกลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 2 [29]



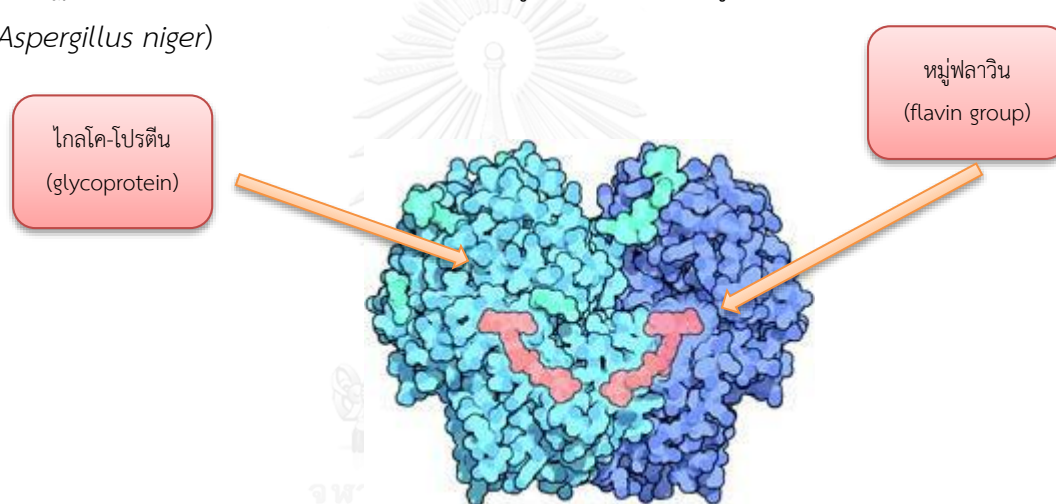
2.2.3 กลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 3 (the third generation glucose sensors)

กลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 3 (the third generation glucose sensors) ไม่มีการอาศัยตัวกลางในการแลกเปลี่ยนอิเลคตรอน อิเลคตรอนจะถูกถ่ายเทโดยตรงจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่เกิดขึ้นไปยังอิเล็กโทรด ดังสมการที่ 1 และ 7 ซึ่งการที่ไม่มีตัวกลางถือเป็นข้อดีสำหรับกลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 3 เนื่องจากมีความว่องไวที่สูงและไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง [29]



2.2.4 กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase;GOx)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นฟลาวินโปรตีน (flavinprotein) ที่ถูกรู้จักกันในชื่อ โนเตติน (notatin) (EC number 1.1.3.4) เป็นออกซิโด-รีดักเตส (oxido-reductase) ชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และดีกลูโคลโนเบต้าแลคโตน (D-glucono- δ -lactone) กลูโคสออกซิเดสประกอบไปด้วยไกลโค-โปรตีน (glycoprotein) ที่เปรียบเสมือนเป็นเปลือกคอยหุ้มโคแฟเตอร์ (cofactor) ที่อยู่ด้านในสุดของเอนไซม์อย่างหมู่ฟลาวิน (flavin group) สังเกตได้จากรูปที่ 2.5 ซึ่งทำหน้าที่ช่วยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันข้างต้น ปัจจุบันกลูโคสออกซิเดสถูกนำมาใช้เพื่อหาปริมาณของกลูโคสที่อยู่ในของเหลวของร่างกายสำหรับการวินิจฉัยโรคเบาหวานหรือนำมาเป็นต้นแบบในการศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมี [29] โดยทั่วไปแล้วกลูโคสออกซิเดสจะถูกสกัดจาก แอสเพอไรลัส ไนเกอร์ (*Aspergillus niger*)



รูปที่ 2.5 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase)

2.3 เมโซพอร์ซิลิกา (mesoporous silica)

2.3.1 ลักษณะของเมโซพอร์ซิลิกา

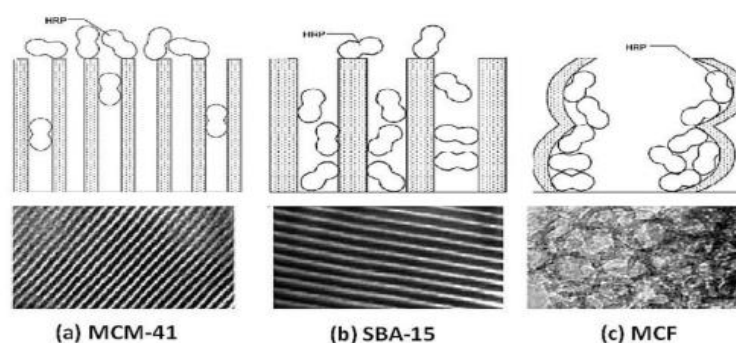
เมโซพอร์ซิลิกาเป็นวัสดุจำพวกอนินทรีย์ที่มีความพรุนค่อนข้างสูง พื้นที่ผิวที่ประมาณ 500-1000 ตารางเมตรต่อกรัม ปริมาตรรูพรุนประมาณ 1 ลูกบาศก์เมตรต่อกรัม [14] วัสดุเมโซพอร์ซิลิกามีหลายชนิดด้วยกัน โดยขึ้นอยู่กับความแตกต่างของขนาดรูพรุน เช่น MCM-41 SBA-15 และ MCF เป็นต้น วัสดุเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาอย่างแพร่หลายและนำมาใช้เป็นตัวรองรับในการทำงานที่แตกต่างกัน [15, 16] ปัจจุบันวัสดุรูพรุนสามารถถูกแบ่งได้เป็น 3 ชนิด 1.รูพรุนขนาดเล็ก (microporous) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 นาโนเมตร 2.รูพรุนขนาดกลาง (mesoporous) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-50 นาโนเมตร และ 3.รูพรุนใหญ่ (macroporous) มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 50 นาโนเมตร [30]

2.3.2 คุณสมบัติของเมโซพอร์ซิลิกา

เมโซพอร์ซิลิกามีขนาดรูพรุนที่สูงและพื้นที่ผิวที่สูงเช่นกันซึ่งเหมาะกับการตรึงเอนไซม์ในปริมาณมาก เมโซพอร์ซิลิกาเหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์เพราะว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน 2-50 นาโนเมตร ซึ่งพอเหมาะกับเอนไซม์ที่มีช่วงขนาดประมาณ 2-20 นาโนเมตร [17, 18] วัสดุเหล่านี้ส่งผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยเสมือนสิ่งกีดขวางที่หุ้มเอนไซม์อยู่ซึ่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ไม่ผิดไปจากเดิมและรักษาสภาวะแวดล้อมที่ดีต่อเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากอาจจะมีการปรับปัจจัยบางอย่าง เช่น พีเอช (pH) อุณหภูมิ หรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียรูปร่างทางธรรมชาติ แล้วทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

2.3.3 วัสดุเมโซพอร์ซิลิกาที่มีขนาดรูพรุนต่างๆ

โดยทั่วไปแล้วการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกาถูกนำไปใช้ในลักษณะงานที่ต่างกันไป เพราะโครงสร้างและขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน เช่น เอ็มซีเอ็ม 41 (MCM-41) เอ็มซีเอ็ม 48 (MCM-48) เอสบีเอ 15 (SBA-15) และเอ็มซีเอฟ (MCF) [16, 31] ความแตกต่างของวัสดุเหล่านี้คือโครงสร้างของรูพรุนและขนาดของรูพรุน โดย Chi และคณะ [32] ได้สังเคราะห์ MCM-41 MCM-48 SBA-15 ซึ่งได้ขนาดของรูพรุน 2.9 2.3 และ 5.5 นาโนเมตรตามลำดับ W.Chouyyok และคณะ [1] ได้ทำการสังเคราะห์ MCM-41 SBA-15 และ MCF โดยขนาดของรูพรุนที่ได้ คือ 3.2 5.4 และ 14.6 นาโนเมตร รูปที่ 2.6 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างรูพรุนของแต่ละวัสดุ คือ MCM-41 มีโครงสร้างเป็นหกเหลี่ยมและมีมิติของรูพรุนเป็นทรงกระบอก SBA-15 มีความคล้ายคลึงกับ MCM-41 แต่มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่า MCM-41 ประมาณ 6-15 นาโนเมตร โดยอันสุดท้ายคือ MCF ซึ่งมีรูปร่างเป็นลูกบาศก์และมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบ MCM หรือ SBA ซึ่งสามารถเรียงลำดับได้ตามนี้ MCF > SBA-15 > MCM-41 ตามรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แผนภาพของโครงสร้างรูพรุนและภาพ TEM ของ (a) MCM-41 , (b) SBA-15 และ (c) MCF [1]

2.3.4 การสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา

การสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกาประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ 1.การขึ้นโมเซลล์โดยทางเคมี (micelle chemistry) 2.กระบวนการโซลเจล (sol gel process) และ 3.การกำจัดแม่แบบ (template removal) โดยสารเคมีตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ (1).ตัวกำหนดโครงสร้าง (structure-directing agent) ที่ทำหน้าที่เหมือนเป็นแม่แบบ เพื่อจะทำให้เกิดโครงสร้างรูพรุนที่จำเพาะของเมโซพอร์ซิลิกา เช่น ซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromine;CTAB) โซเดียมโดดีซิลซัลโฟเนต (SDS) และ พลูโรนิค พี 123 (pluronic P123) (2).ตัวทำละลาย (solvent) เช่น น้ำและ เอทานอล (ethanol) (3).ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมหรือสารที่ทำให้รูพรุนเกิดการขยายตัว (organic cosolvent or swelling agent) เช่น 1,3,5 ไตรเมทิลเบนซีน เป็นต้น (4).สารอนินทรีย์ที่มีแหล่งซิลิกาเช่น โซเดียมซิลิเกต (sodium silicate) หรือ เตตระเอทิลออร์โธซิลิเกต (tetraethyl orthosilicate;TEOS) (5).ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) เช่น ไฮโดรคลอริก (HCl) หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นต้น

วิธีในการสังเคราะห์เริ่มจาก การขึ้นโมเซลล์ที่เป็นกำหนดโครงสร้างเช่น P123 จะถูกละลายอยู่ในตัวทำละลายอย่างเช่น น้ำหรือ เอทานอล ซึ่งเป็นโมเลกุลมีขั้ว โดยที่ตัวกำหนดโครงสร้างจะติดกันเป็นกลุ่มและจัดเรียงกันรอบๆโมเลกุลที่ไม่มีขั้วอย่างเป็นระเบียบ หลังจากนั้นเกิดโครงสร้างต่างๆ เช่น ทรงกลม วงรี และเป็นแท่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารกำหนดโครงสร้างในตัวทำละลาย สารอนินทรีย์ที่เป็นแหล่งซิลิกา เช่น เตตระเอทิลออร์โธซิลิเกต จะถูกใส่เข้าไปในสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งมีสารกำหนดโครงสร้างและตัวทำละลายอยู่ แหล่งซิลิกาจะติดบนพื้นผิวของตัวกำหนดโครงสร้าง ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการโซลเจล โดยเริ่มจากไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งเกิดกับอนุภาคของแข็ง เรียกว่า โซล (sol) อนุภาคของแข็งเหล่านี้จะไหลไปรวมกันเหมือนเป็นโครงข่ายและกลายมาเป็นเจล (gel) โดยกระบวนการพอลิเมอร์ควบแน่นซึ่งทำให้รูพรุนแต่ละรูชนกันโดยจุดที่เชื่อมกันนั้นเกิดเป็นหน้าต่าง (window) ภายในวัสดุ ในขั้นสุดท้ายเจลจะถูกทำให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียสเพื่อให้โครงสร้างเป็นระเบียบมากขึ้นและทำการกำจัดตัวกำหนดโครงสร้างแล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก็จะได้วัสดุเมโซพอร์ซิลิกา [20, 33]

2.3.4.1 การตรึงเอนไซม์ลงบนเมโซพอร์ซิลิกา

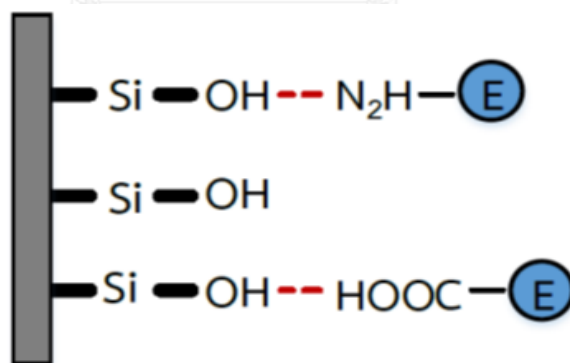
ตัวรองรับที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์มีความสำคัญอย่างมากสำหรับการรักษากิจกรรมของเอนไซม์ [30] โดยคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ เช่น พื้นผิว หมู่ฟังก์ชัน ประจุบนพื้นผิวในรู ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเสถียรภาพ เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญของตัวรองรับต่อประสิทธิภาพของการตรึงเอนไซม์

เมโซพอร์สซิลิกาที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูอยู่ในช่วง 2-50 นาโนเมตร มีคุณสมบัติที่ดีสำหรับการใช้เป็นตัวรองรับของชีวโมเลกุล เพราะว่าเมโซพอร์สซิลิกามีขนาดของรูพรุนใหญ่และเป็นระเบียบเหมือนกัน พื้นที่ผิวที่สูง มีความเสถียรภาพทางเคมีและทางกล อีกทั้งยังปกป้องเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์ที่เข้ามาในระบบ [30, 34, 35]

คุณสมบัติทางเคมีแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของพื้นผิว เช่น หมู่ฟังก์ชัน และ ประจุบนพื้นผิวดำรงรับ วัสดุตัวรองรับแตกต่างกันมีหมู่ฟังก์ชันและประจุบนพื้นผิวที่แตกต่างกัน แร่กระทำระหว่างกันของเอนไซม์และตัวรองรับขึ้นอยู่กับธรรมชาติของหมู่ฟังก์ชันบนผิวของตัวรองรับ [36] แร่กระทำระหว่างเอนไซม์และวัสดุรองรับอาจจะส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) การชะล้าง (leaching) และเสถียรภาพของเอนไซม์ (enzyme stability) ซึ่งแร่กระทำระหว่างเอนไซม์และพื้นผิวของเมโซพอร์สซิลิกาด้วยการดูดซับถูกอธิบายในย่อหน้าตามนี้

ก.) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

พันธะไฮโดรเจนคือแรงที่ยึดติดระหว่างอะตอมขั้วลบและพันธะไฮโดรเจนต่ออะตอมประจุลบอื่นๆ โดยให้ผลลัพธ์จากแรงที่มีขั้วด้วยพันธะอะตอมไฮโดรเจนต่อไนโตรเจน (nitrogen) ออกซิเจน (oxygen) หรือ ฟลูออรีน (fluorine) จึงเป็นที่มาของชื่อ ‘พันธะไฮโดรเจน’ ในกรณีของการตรึงเอนไซม์นั้นมีคุณสมบัติของหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวซิลิกาคือหมู่ซิลานอล ซึ่งมีเหมาะสมต่อการดูดซับทางกายภาพต่อโมเลกุลของเอนไซม์โดยพันธะไฮโดรเจน ตามรูปที่ 2.6



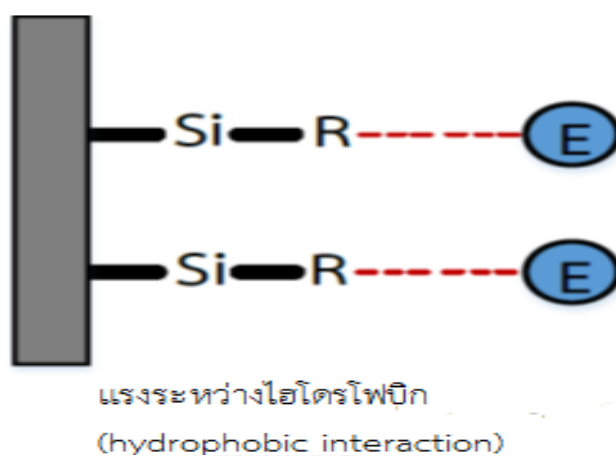
พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

รูปที่ 2.6 พันธะไฮโดรเจนระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวซิลิกา [37]

พันธะไฮโดรเจนถูกเกิดขึ้นโดยอะตอมของไฮโดรเจนต่อหมู่อะมิโนหรือหมู่คาร์บอกซิลิกของการผูกติดเอนไซม์ด้วยไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ซิลานอล แม้กระนั้นพันธะไฮโดรเจนค่อนข้างอ่อน ซึ่งเป็นผลให้การตรึงเอนไซม์ง่ายต่อการชะล้าง

ข.) ปฏิกริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic reaction)

แรงกระทำระหว่างไฮโดรโฟบิกคือแรงระหว่างโมเลกุลอินทรีย์ ตัวรองรับต้องมีคุณสมบัติของไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) โดยมีผลต่อการดูดซับของบางโปรตีนบนเมโซพอร์ลอสซิลิกาเป็นอย่างมาก ซึ่งมากกว่าแรงระหว่างไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic interaction) [38, 39] คุณสมบัติของไฮโดรฟิลิกของพื้นผิวซิลิกาสามารถที่จะเสริมโดยการใส่ฟังก์ชันด้วยออกาโนซิลเลน (organosilanes) หรือหมู่ไฮดรอกซิลเนื่องจากพื้นผิวซิลิกาเต็มไปด้วยออกาโนซิลเลนซึ่งเหมาะแก่การตรึงเอนไซม์หรือเสริมฟังก์ชันอื่นๆ แรงกระทำของไฮโดรโฟบิก ระหว่างเอนไซม์และพื้นผิวซิลิกาถูกแสดงให้เห็นในรูปที่ 2.7

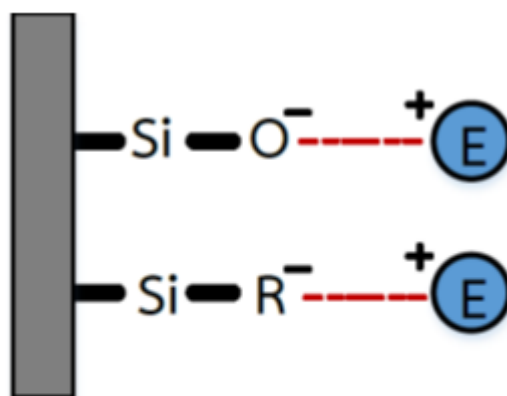


รูปที่ 2.7 ไฮโดรโฟบิกระหว่างเอนไซม์และซิลิกา [37]

พื้นผิวเอนไซม์ที่มีการพัฒนาแล้วสามารถที่จะเสริมแรงกระทำระหว่างเอนไซม์และพื้นผิวซิลิกา อีกทั้งยังเสริมประจุทางไฟฟ้าสถิตย์ของเอนไซม์และพื้นผิวซิลิกาด้วยเช่นกัน [37]

ค.) แรงกระทำระหว่างกันทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic interaction)

แรงกระทำระหว่างไฟฟ้าสถิตย์คือการกระทำที่ประจุของเอนไซม์และพื้นผิวซิลิกาเป็นไปตามรูปที่ 2.9 โดยขึ้นอยู่กับหลายๆปัจจัย เช่น (1).คุณสมบัติของประจุของเอนไซม์และตัวรองรับถูกพิจารณาจากไอโซอิเล็กทริกพอยท์ (isoelectric point;PI) พื้นผิวซิลิกามีค่าพีไอประมาณ 2 และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมีค่าพีไอประมาณ 4 ซึ่งส่งผลต่อการดูดซับบนพื้นผิว ถ้าค่าของพีไอทั้งสองต่างกันมากจะทำให้การจับกันทางกายภาพยากขึ้น (2).พื้นผิวที่ใส่หมู่ฟังก์ชันทางเคมีบนพื้นผิวซิลิกา [40] (3).ชนิดของแบบ (template) ที่ใช้ [41]



แรงระหว่างกันทางไฟฟ้าสถิตย์
(electrostatic interaction)

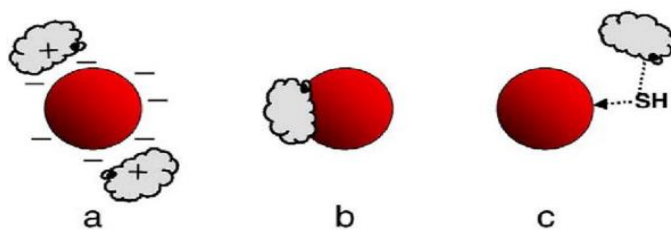
รูปที่ 2.8 แรงระหว่างกันทางไฟฟ้าสถิตย์ของเอนไซม์และพื้นผิวซิลิกา [38]

2.4 อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles; AuNPs)

2.4.1 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนทอง

อนุภาคนาโนทองนั้นมีคุณสมบัติที่เฉื่อย ไม่เป็นพิษและสามารถเข้ากับชีวภาพได้ดี ซึ่งทำให้มีความน่าสนใจสำหรับการสร้างตัวรองรับ อนุภาคนาโนทองมีขนาดช่วง 1-50 นาโนเมตร และง่ายต่อการขึ้นรูปด้วยการควบคุมการกระจายตัว อนุภาคทองสามารถที่จะทำการขึ้นรูปด้วยขนาดที่เป็นสัดส่วนกับชีวโมเลกุล เช่น เอนไซม์ และ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นต้น

การเชื่อมของชีวโมเลกุลกับอนุภาคนาโนทองคือ การสังเคราะห์จากประจุลบบนอนุภาคนาโนทองทอง (เกิดขึ้นจาก AuCl_2 บนพื้นผิวอนุภาค) ซึ่งมีค่าแอฟฟินิตี (affinity) ของโปรตีนที่เป็นประจุลบ โดยบางโปรตีน เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี และดีเอ็นเอ สามารถที่จะดูดซับได้ดีต่ออนุภาคนาโนทองที่เป็นคอลลอยด์ (colloidal) จึงทำให้เกิดรูปร่างของโปรตีนที่เสถียรและทำให้คุณสมบัติของเอนไซม์ทำงานได้สมบูรณ์แบบ การดูดซับของเอนไซม์ต่ออนุภาคทองนั้นคือเป็นกระบวนการที่ไม่มีพันธะโควาเลนต์ [26] ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.9 กลไกการดูดซับของเอนไซม์บนอนุภาคนาโนทองโดยอาศัยแรง

a) แรงยึดเหนี่ยวทางประจุ b) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว และ c) แรงยึดเหนี่ยวระหว่างพื้นผิวของ ทองกับอะตอมของซัลเฟอร์ (sulphur) หรือไนโตรเจน (nitrogen) ของเอนไซม์ [26]



บทที่ 3

วารสารปริทรรศน์

3.1 อิทธิพลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวัสดุเมโซพอร์ซซิลิกาสำหรับการตรึงเอนไซม์

3.1.1 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง (enzyme loading)

Anees Y.Khan และคณะ [42] ได้ทำการทดสอบการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนวัสดุพอร์ซซิลิกา 2 ชนิด คือ ไมโครพอร์ซซิลิกา ($\text{NH}_2 - \text{MS}$) และ เมโซพอร์ซซิลิกา ($\text{NH}_2 - \text{SBA} - 15$) จากผลการทดลองพบว่า กลูโคสออกซิเดสถูกตรึงทั้งภายนอกและภายในพื้นผิวของวัสดุพอร์ซซิลิกา โดยที่ไมโครพอร์ซซิลิกาสามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณ 512.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ขณะที่เมโซพอร์ซซิลิกาสามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณ 634 มิลลิกรัมต่อกรัม แสดงให้เห็นว่าเมโซพอร์ซซิลิกาที่มีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่กว่าสามารถที่จะตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากกว่า เนื่องจากเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสอาจมีขนาดที่ใหญ่กว่าไมโครพอร์ซซิลิกา ทำให้เอนไซม์อาจจะถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวภายนอกของวัสดุไมโครพอร์ซซิลิกานั้น แต่ในขณะเดียวกันเอนไซม์สามารถที่จะเข้าไปในพื้นผิวภายในของเมโซพอร์ซซิลิกา ทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากกว่าแบบไมโครพอร์ซซิลิกา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haruo Takahashi และคณะ[9] ที่ได้ทำการตรึงเอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอออกซิเดสบนวัสดุเมโซพอร์ซซิลิกาที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่แตกต่างกัน คือ FSM-16 และ MCM-41 จากผลการทดลองพบว่า ยิ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนมีขนาดใหญ่มากขึ้น ยิ่งทำให้สามารถที่จะตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่น้อยกว่า Jie Lei และคณะ [35] ได้ทำการทดสอบการตรึงเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ลงบนพื้นผิวของวัสดุเมโซพอร์ซซิลิกาที่มีการสังเคราะห์แตกต่างกัน คือ เมโซพอร์ซซิลิกาแบบแท่ง (rod-like SBA-15) และ เมโซพอร์ซซิลิกาแบบดั้งเดิม (Conventional SBA-15) พบว่า เมโซพอร์ซซิลิกาแบบแท่งสามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณ 482 มิลลิกรัมต่อกรัม และเมโซพอร์ซซิลิกาแบบดั้งเดิมตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณ 199 มิลลิกรัมต่อกรัม เนื่องจากเมโซพอร์ซซิลิกาแบบแท่งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่มากกว่าสามารถที่จะตรึงเอนไซม์ได้มากกว่าเมโซพอร์ซซิลิกาที่ใช้วิธีการสังเคราะห์แบบดั้งเดิม เพราะฉะนั้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนส่งผลต่อปริมาณของการตรึงเอนไซม์

3.1.2 เสถียรภาพของเอนไซม์ (enzyme activity)

ความแตกต่างของวัสดุรูพรุนถูกใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ ซึ่งส่งผลกระทบในแง่ของเสถียรภาพของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น ได้ทำการตรึงเอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอออกซิเดส (horseradish peroxidase) กับวัสดุเมโซพอร์ซซิลิกาที่ขนาดรูพรุนต่างๆกัน คือ MCM-14 SBA-15 และ MCF ซึ่งมีขนาดรูพรุน 3.2 5.4 และ 14.6 นาโนเมตร ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่าการตรึงเอนไซม์สามารถช่วยให้เก็บ

รักษาเอนไซม์แอกทิวิตีได้ถึง 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง MCF สามารถรักษาแอกทิวิตีของเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ 90 % ขณะที่ MCM-41 และ SBA-15 ได้แค่ 60 % [1] Haruo Takahashi และคณะ [9] ได้ทำการทดสอบการตรึงเอนไซม์ฮอสมเรติสเปอออกซิเดส (Horseradish peroxidase) บนเมโซพอร์สซิลิกาซึ่งในที่นี้คือ FSM-16 โดยมีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณตัวทำละลายร่วม (cosolvent) หรือสารที่ทำให้เกิดการพองตัว (swelling agent) เช่น 1,3,5 ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5-trimethylbenzene; TMB) จากผลการทดสอบเอนไซม์แอกทิวิตีในแง่ของเสถียรภาพทางความร้อน พบว่า เมื่อขนาดของรูพรุนกว้างมากขึ้นเท่าไร ยิ่งทำให้การรักษาแอกทิวิตีได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามถ้ารูพรุนมีขนาดกว้างมากเกินไป อาจทำให้สภาวะแวดล้อมในรูพรุนเหมือนสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ แต่ถ้าเล็กเกินไปจะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถถูกตรึงในรูพรุนและอาจเกิดการสูญเสียแอกทิวิตีได้เช่นกัน และเมื่อทำการทดสอบในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ผลที่ได้เป็นเช่นเดียวกับผลข้างต้น โดยที่ผลการทดสอบสอดคล้องกับ Jie Lei และคณะ [10] ซึ่งได้ทำการตรึงเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysosyme) บนวัสดุเมโซพอร์สชนิดเดียวกันแต่ลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันคือ SBA-15 โดยใช้วิธีสังเคราะห์แบบดั้งเดิม (conventional SBA-15; Con-SBA-15) และแบบแท่ง (rod-like SBA-15; rod-SBA-15) จากผลการทดลองพบว่า SBA-15 ลักษณะแบบแท่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูสูงกว่าทำให้สามารถจุเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงกว่า อีกทั้งเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังมีแอกทิวิตีที่สูงกว่าอีกด้วย

Priti H. Pandya และคณะ [11] ได้ทำการทดสอบเสถียรภาพทางความร้อนและค่า pH ของการตรึงเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) บนตัวรองรับเมโซพอร์สซิลิกาที่มีขนาดรูแตกต่างกันตามลำดับจากน้อยไปมากคือ MCM-41 SBA-15 MCF-153 และ MCF-335 ผลการทดลองพบว่า MCF-335 ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่ใหญ่ที่สุด มีเอนไซม์แอกทิวิตีสูงที่สุด ไม่ว่าจะทดสอบทางด้านเสถียรภาพทางความร้อน pH หรือการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของแป้งก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับ Tory Orita และคณะ [2] โดยใช้เอนไซม์ คอเลสทีลิวเอสเทอร์ไฮโดรเลส (cholesteryl ester hydrolase (EC 3.1.1.13)) ตรึงในเมโซพอร์สซิลิกา คือ MCM-41 SBA-15 MCF โดยมีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน 2.7 9.5 และ 22.5 ตามลำดับ ผลที่ได้คือ ขนาดของรูพรุนยิ่งใหญ่อิ่งสามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ไว้ได้ดี Haruo Takahashi และคณะ [9] ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของรูที่ส่งผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์โดยใช้วัสดุเมโซพอร์สซิลิกาต่างชนิดกัน คือ FSM-16 และ MCM-41 พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูส่งผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยที่ยังมีขนาดของรูพรุนมากก็จะทำให้รักษาเสถียรภาพได้ดี แต่ว่าถ้าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดใหญ่เกินไป อาจจะทำให้สูญเสียเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ เนื่องจากสภาวะภายนอกอาจจะส่งผลต่อสภาวะ

ภายในมากทำให้ไม่สามารถรักษารูปร่างสามมิติซึ่งอาจทำให้เสียคุณสมบัติของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้

3.2 อิทธิพลของอนุภาคนาโนต่อการตรึงเอนไซม์

Yonghai Song และคณะ [24] ได้ทำทดสอบการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงบนอนุภาคนาโนทอง ซึ่งจากการทดสอบพบว่า อนุภาคนาโนทองทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเกิดการเสีรูปร่างเนื่องจากแอลฟาเฮลิกซ์ (α -helix) และเบต้าชีท (β -sheet) ที่เป็นโครงสร้างทางเคมีเกิดการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้เต็มที่ ยิ่งอนุภาคนาโนทองเข้าใกล้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมากก็จะส่งผลให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเกิดการเสีรูปร่างมากขึ้น เพราะฉะนั้นระยะห่างระหว่างอนุภาคนาโนทองและกลูโคสออกซิเดสควรมีระยะห่างระหว่างกันที่เหมาะสม Ke-Hsuan Wang และคณะ [43] ได้ทำการทดสอบการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสบนอนุภาคนาโนทอง จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมาตรึงลงบนอนุภาคนาโนทองซึ่งเป็นชั้นที่สองและชั้นแรกเป็นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (AuNPs/GOx) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งเหมือนกับงานวิจัยข้างต้น แต่ถ้าทำการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงบนอนุภาคทอง แล้วทำการใส่อนุภาคทองอีกครั้งหนึ่ง (AuNPs/GOx-AuNPs) โดยการดูดซับร่วม (co-adsorption) ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสสามารถที่จะทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhenyu และคณะ [44]

3.3. การสังเคราะห์เมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

จากบทที่ 2 ที่ได้อธิบายวิธีการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกาประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ 1.การขึ้นไมเซลล์โดยทางเคมี (micelle chemistry) 2.กระบวนการโซลเจล (sol gel process) และ 3.การกำจัดแม่แบบ (template removal) โดยสารเคมีตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ (1).ตัวกำหนดโครงสร้าง (structure-directing agent) ที่ทำหน้าที่เหมือนเป็นแม่แบบ เพื่อจะทำให้เกิดโครงสร้างรูพรุนที่จำเพาะของเมโซพอร์ซิลิกา เช่น ซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบมาย (cetyltrimethyl ammonium bromine;CTAB) โซเดียมโดดีซิลซัลโฟเนต (SDS) และ พลูโรนิค พี 123 (pluronic P123) (2).ตัวทำละลาย (solvent) เช่น น้ำและ เอทานอล (ethanol) (3).ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมหรือสารที่ทำให้รูพรุนเกิดการขยายตัว (organic cosolvent or swelling agent) เช่น 1,3,5 ไตรเมทิลเบนซีน เป็นต้น (4).สารอนินทรีย์ที่มีแหล่งซิลิกาเช่น โซเดียมซิลิเคต (sodium silicate) หรือ เตตระเอทิลออร์โธซิลิเคต (tetraethyl orthosilicate;TEOS) (5).ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) เช่น ไฮโดรคลอริก (HCl) หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารอินทรีย์ที่เป็นตัวทำละลายร่วม เช่น TMB ซึ่งทำให้เกิดการขยายของรูพรุนโดยการซึมผ่านไปยังใจกลางของตัวกำหนดโครงสร้าง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุน

ซึ่งอาจจะส่งผลต่อเอนไซม์แอกทีวิตี้ ความเสถียร และปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง โดยความแตกต่างในการเลือกสารอินทรีย์ สารละลาย สภาวะ และอื่นๆสำหรับการสังเคราะห์เมโซพอร์ซิลิกา โดยส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพซึ่งแสดงให้เห็นในตารางที่ 3.1

3.3.1 อิทธิพลที่ส่งผลต่อลักษณะของเมโซเซลลูลาร์โพรซิซิลิกา

3.3.1.1 ตัวกำหนดโครงสร้าง (structure-directing agent) และตัวทำละลายร่วมที่เป็นสารอินทรีย์ (organic cosolvent)

ปัจจัยนี้เน้นไปในเรื่องของสารอินทรีย์ที่เป็นตัวทำละลายร่วม (organic cosolvent) หรือสารที่ทำให้โครงสร้างขยายตัว (swelling agents) และสารกำหนดโครงสร้างซึ่งส่งผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพและอนุภาคของเมโซพอร์ซิซิลิกา เช่น ปริมาตรรูพรุน เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน พื้นที่ผิว อีกทั้งยังมีเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ (cell) และ หน้าต่าง (window) เป็นต้น [49,66,67,68,69] Patrick Schmidt-Winkel และคณะ [21] ได้ทำการสังเคราะห์เมโซเซลลูลาร์โพรซิซิลิกาโดยใช้อัตราส่วนระหว่าง พลูโรนิค123 (Pluronic123) ที่เป็นตัวกำหนดโครงสร้าง และไตรเมทิลเบนซิน ที่เป็นสารที่ทำให้รูพรุนเกิดการขยาย โดยใช้อัตราส่วนระหว่างพลูโรนิค 123 คงที่แต่ทำการเปลี่ยนแปลงไตรเมทิลเบนซินที่ปริมาณต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของไตรเมทิลเบนซินจะทำให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูใหญ่ขึ้น อีกทั้งยังทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหน้าต่าง (window) มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yukito Oda และคณะ [20] ที่ได้ทำการสังเคราะห์เมโซเซลลูลาร์โพรซิซิลิกาโดยการเพิ่มปริมาณไตรเมทิลเบนซินและคงที่ P123 ที่อัตราส่วนจาก 0.5 ไปจนถึง 2.5 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณไตรเมทิลเบนซินเพิ่มขึ้นจะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของวัสดุรองรับนี้เพิ่มขึ้นเช่นกันตามตารางที่ 3.2 โดยที่ T.Sen และคณะ [23] ได้ผลการทดลองซึ่งสอดคล้องกับผลข้างต้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มปริมาณของไตรเมทิลเบนซินสามารถที่จะช่วยเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเมโซเซลลูลาร์โพรซิซิลิกาได้ โดยสามารถยืนยันด้วยภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ในรูปที่ 3.2 ที่ทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ TMB/P123 จากน้อยไปมาก ซึ่งเห็นได้ชัดว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงกลมแต่ละวงมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามถ้าใช้อัตราส่วนระหว่างไตรเมทิลเบนซินต่อพลูโรนิคมากเกินไปจะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหน้าต่างเล็กลงได้ เนื่องจากไตรเมทิลเบนซินสามารถไปละลายตัวกำหนดโครงสร้าง (structure-directing agent) ที่รวมตัวกันอยู่ภายใน แล้วส่งผลให้ขนาดของหน้าต่างเล็กลง [22] สังเกตได้จาก รูปที่ 3.1 (a)-(d) ที่เปลี่ยนแปลงปริมาณอัตราส่วนของ TMB/P123 จากน้อยไปมาก จะเห็นได้ว่า ภาพ (d) นั้นลักษณะความเป็นทรงกลมเริ่มสูญเสียทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางเส้นผ่านศูนย์กลางลดลงซึ่งเป็นไปตามเหตุผลข้างต้นที่ได้กล่าวไว้แล้ว

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางกายภาพของวัสดุเมโซพอร์ัสซิลิกา

ชนิด	ตัวกำหนดโครงสร้าง (Structure-directing agent)	แหล่งซิลิกา (Silica source)	ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst)	พื้นที่ผิว (surfaces area(ตารางเมตรต่อกรัม))	ขนาดรูพรุน (pore size) (นาโนเมตร)	ปริมาตรรูพรุน (pore volume) (ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม)	อ้างอิง (reference)
MCM-41	CTAB	TEOS	NaOH	888	3.2	0.84	[1]
	CTAB+P123	TMOS+TEOS	NH ₃	1174	2.7	1.1	[2]
	CTAB+	SiO ₂	TMAOH	1490	3.32	0.99	[3]
SBA-15	P123	TEOS	HCl	801	6.42	1.12	[4]
	CTAB+P123	TMOS+TEOS	NH ₃	656	9.5	1.3	[2]
	P123	TEOS	HCl	894	8.5	1.06	[5]
MCF	P123	TEOS	HCl	537	26	1.02	[6]
	CTAB+P123+TMB	TMOS+TEOS	NH ₃	618	22.5	2.3	[2]
	P123+TMB	TEOS	HCl	700	21.5	1.95	[7]

หมายเหตุ CTAB : Cetyltrimethyl ammonium bromine, P123 : Poly(ethylene glycol)-B-poly(propylene G)

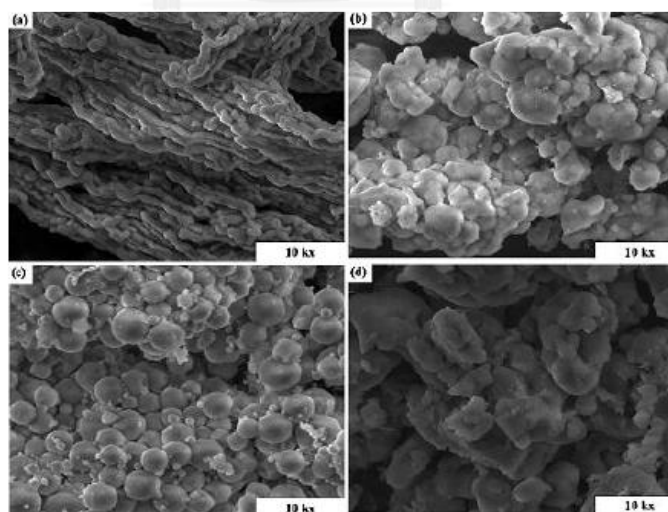
TMB : 1,3,5-trimethylbenzene, TEOS : (Tetramethyl orthosilicate), TMOS: Tetramethoxysilane

ตารางที่ 3.2 ลักษณะโครงสร้างของเมโซพอร์สโฟมซิลิกา-ซิลิกา [20]

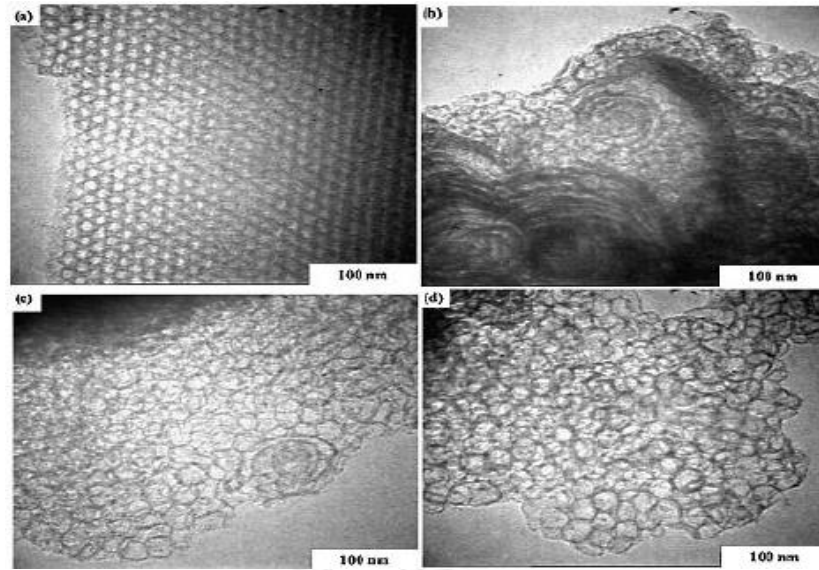
ซิลิกา	อัตราส่วน TMB/P123 (โดยมวล)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง ของรูพรุนจุด ซึบ (นาโนเมตร) [Cell]	เส้นผ่าน ศูนย์กลางรู พรุน(คายซึบ) (นาโนเมตร) [Window]	พื้นที่ผิว (BET) (ตารางเมตรต่อ กรัม)	ปริมาตรรูพรุน (ลูกบาศก์เมตร ต่อกรัม)
เอส1	0.5	16	9.8	649	3.3
เอส2	1	24	9.8	477	2.3
เอส3	1.5	24	10	769	3
เอส4	2.5	30	14	569	2.3

หมายเหตุ เอส : ตัวอย่างแต่ละชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ TMB/P123

นอกเหนือจากนั้น จากรูป TEM ที่แสดงดังรูปที่ 3.2 ซึ่ให้เห็นว่าการเพิ่ม TMB ที่ปริมาณใดๆเข้าไปในกระบวนการสังเคราะห์ จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างของเมโซพอร์สได้



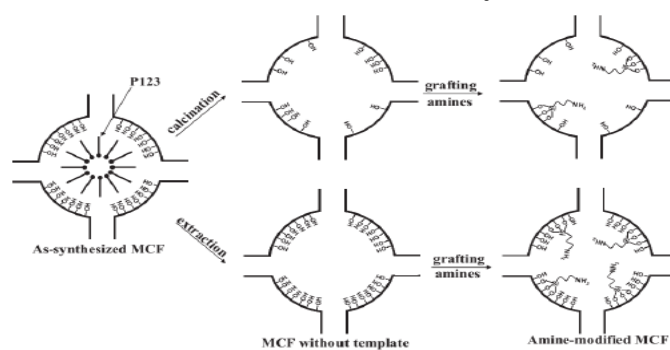
รูปที่ 3.1 ภาพ SEM ของ วัสดุเมโซพอร์สโดยการเตรียมปริมาณของ TMB ที่แตกต่างกัน (a) S0, (b) S1, (c) S2 แล (d) S3 โดยที่ S0, S1, S2 และ S3 เรียงปริมาณ TMB จากน้อยไปมากตามลำดับ [22]



รูปที่ 3. 2 ภาพ TEM ของตัวรองรับเมโซพอร์ซิลิกาซึ่งเตรียมโดยใช้ปริมาณของ TMB ที่ต่างกัน คือ (a) S0, (b) S1, (c) S2 และ (d) S3 โดยที่ S0, S1, S2 และ S3 เรียงปริมาณ TMB จากน้อยไปมากตามลำดับ[22]

3.3.1.3 วิธีการกำจัดแม่แบบ (methods for template removal)

หัวข้อนี้ทำการศึกษาการกำจัดแม่แบบโดยการเผา (calcination) หรือ การสกัดโดยใช้เอทานอล (ethanol extraction) ซึ่งส่งผลต่อลักษณะของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา Yao และคณะ [45] ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการเผาและการสกัดโดยเอทานอล ซึ่งจากผลการทดลองพิสูจน์ว่ามีความสามารถในการกำจัดแม่แบบ P123 จากการสังเคราะห์ MCF เพื่อที่จะเตรียม MCF เป็นตัวรองรับของตัวดูดซับที่มีการต่อของเอมีน (amine-grafted) ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3. 3 แผนภาพของการกำจัดแม่แบบจากการสังเคราะห์ MCF และ มีการใส่หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว MCF [45]

จากรูป 3.5 พบว่าการวิธีการกำจัดแม่แบบแต่ละวิธีมีผลกระทบของการต่อหมู่ซิลานอล (silyanol group) บนพื้นผิว MCF จากรูปจะเป็นวิธีการกำจัดตัวกำหนดโครงสร้างด้วยการสกัดตัวทำละลายที่เหลือหมู่ซิลานอลที่เยอะกว่า ซึ่งดีต่อการนำไปต่อหมู่ฟังก์ชันต่างๆได้ เช่น หมู่เอมีน หรือ หมู่คาบอกลิล นอกจากนี้ การเพิ่มหมู่ฟังก์ชันจะทำให้พื้นที่ผิวลดลง ซึ่งสามารถสังเกตได้จาก MCF-e APS-MCF-e (มีการต่อหมู่ฟังก์ชัน) คุณสมบัติทางเนื้อสัมผัส (textural properties) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของพื้นผิวรูพรุนหลังจากการต่อหมู่เอมีนเป็นไปตามตารางที่ 2.3

ตารางที่ 3. 3 คุณสมบัติเนื้อสารสำหรับวัสดุ MCF ก่อนและหลังการต่อหมู่เอมีน

ตัวอย่าง	พื้นที่ผิว BET (ตารางเมตรต่อ กรัม)	ปริมาตรรู พรุน (ลูกบาศก์ เมตรต่อกรัม)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง เซลล์ (นาโนเมตร)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง หน้าต่าง (นาโนเมตร)	ปริมาณเอมี นที่บรรจุได้ (มิลลิโมลต่อ กรัม)
MCF-e	573	1.85	21.4	13.4	ไม่ปรากฏ ข้อมูล
APS-MCF-e	381	1.34	21.4	11.1	2.47
APMS-MCF-e	338	1.26	21.4	11.1	3.23

หมายเหตุ e : Ethanol extraction process

3.3.1.4 การใส่สารเติมแต่ง (additives)

หัวข้อนี้กล่าวถึงความสำคัญของการใส่สารเติมแต่งเพื่อจะปรับปรุงรูปร่างของเซลล์ปกติของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (MCF) จากการรายงานที่มีอยู่พบว่า สารอนินทรีย์ที่มีแร่ธาตุ (inorganic mineralizing) เช่น แอมโมเนียมฟลูออไรด์ (ammonium fluoride) เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการขยายขนาดของรูพรุนและปรับปรุงรูปร่างเดิมที่เป็นปัญหาของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา [46-50] การสังเคราะห์ที่มีความคล้ายคลึงกับวิธีดั้งเดิม แต่ทำการเพิ่มแอมโมเนียมฟลูออไรด์ถูกใส่เข้าไปในสารละลายก่อนนำไปบ่มด้วยความร้อน Ping และคณะ [48] ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ตัวรองรับ MCF ซึ่งมีพื้นที่ผิวที่สูง 720 ตารางเมตรต่อกรัม และมีปริมาตรรูพรุนที่ใหญ่มาก 3.0 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม การวิเคราะห์ขนาดรูพรุนของ MCF แสดงถึงเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ของ

เซลล์ 36 นาโนเมตร และหน้าต่าที่เชื่อมต่อกัน 11 นาโนเมตร แต่หลังจากที่มีการเติมสารเติมแต่ง แอมโมเนียมฟลูออไรด์แล้ว เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มีขนาดแทบจะไม่เปลี่ยนเท่าไร แต่หน้าต่าที่ทำการเชื่อมกันนั้นมีขนาดที่กว้างขึ้นจาก 11 ไปเป็น 18 นาโนเมตร เพราะฉะนั้นการที่มีการเติมสารเติมแต่งลงไปจะทำให้หน้าต่าของ MCF มีขนาดที่กว้างขึ้น

3.4 กลูโคสไปโอเซนเซอร์

3.4.1 การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง (Direct electron transfer)

กระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงระหว่างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและพื้นผิวอิเล็กโทรดนั้น มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาอิเล็กโทรดที่ไม่ใช้ตัวกลางในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์และอิเล็กโทรด [51] เนื่องจากตัวกลางที่ใช้ช่วยในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนนั้น อาจจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่นำมาใช้หรืออาจเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นได้ [29] ดังนั้นการไม่มีตัวกลางจะทำให้มีความไวต่อการตรวจวัดสารเป้าหมายได้ดีขึ้น เนื่องจากกระบวนการนี้สามารถช่วยเพิ่มความแม่นยำของการตรวจวัดภายใต้ศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำได้ [44] อย่างไรก็ตามการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำได้ยาก เนื่องจากแอกทีฟโปรตีนหรือที่เรียกว่า ฟลาวินกัมป์ (flavin group) อยู่ลึกลงไปในโครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งมีเปลือกของโปรตีนหุ้มอยู่ ทำให้ทางการถ่ายเทอิเล็กตรอนค่อนข้างยากมาก จึงต้องมีการนำวัสดุนาโนมาช่วยทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้ดีขึ้น [52]

3.4.1.1 กลไกการเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง

กลไกการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงของกลูโคสออกซิเดสในปัจจุบันมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ 1. การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแบบไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส และ 2. การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแบบเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

ก.) การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแบบไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแบบไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสนั้นเป็นการถ่ายเทของอิเล็กตรอนและโปรตรอนที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ซึ่งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจะทำการส่งผ่าน ฟลาวินกัมป์ ซึ่งอยู่ภายในตัวเอนไซม์ จาก FAD^+ กลายเป็น $FADH_2$ แล้วทำการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปส่งขั้วอิเล็กโทรด โดยไม่เกิดปฏิกิริยา แคทาไลติกของเอนไซม์ ซึ่งสมการที่ 1 แสดงถึงกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีที่เกิดขึ้นในระบบ [53]



ข.) การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแบบเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงแบบเอนไซม์แคทาไลติกนั้นเป็นการเกิดการเร่งปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิเดสต่อกลูโคส ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคโนแลคโตนและ $\text{GOx(FADH}_2\text{)}$ จากนั้น $\text{GOx(FADH}_2\text{)}$ จะทำการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนไปที่ขั้วอิเล็กโทรดเลย ซึ่งเป็นไปตามสมการที่ 2 และ 3 [29]



3.4.2 วัสดุที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

ดังที่ได้ทราบโดยทั่วไปว่าการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงจากแอคทีฟเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไปยังพื้นผิวอิเล็กโทรดทำได้ยาก อันเนื่องมาจากการที่ฟลาวินกัมป์ของเอนไซม์อยู่ลึกลงไปภายในโครงสร้างเอนไซม์ [54] ดังนั้นจึงมีการนำวัสดุจำพวกอนุภาคนาโน (nanoparticle materials) [24, 25, 51, 53, 55] พอลิเมอร์นำไฟฟ้า (conductive polymer materials) [54, 56, 57] เมโซพอร์รัส (mesoporous materials) [12, 13] และวัสดุผสม (nanocomposites materials) [58-64] มามีส่วนร่วมในการทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ดีขึ้น เพราะว่าวัสดุเหล่านี้มีการนำไฟฟ้าดี พื้นผิวสูง อีกทั้งยังเข้ากันได้กับทางชีวภาพซึ่งเหมาะแก่การนำมาตรึงเอนไซม์ ดังข้างต้นที่กล่าวมาการพัฒนาพื้นผิวของอิเล็กโทรดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตอบสนองของกระแสไฟฟ้า

3.4.2.1 วัสดุพอลิเมอร์นำไฟฟ้า

ในปี 2011 Yasemin Oztekin และคณะ [58] ได้ทำการศึกษาการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีความสามารถในการนำไฟฟ้าคือ พอลิพีแนนโทรลีน (polyphenanthroline) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า พอลิพีแนนโทรลีนนั้นแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดีขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นผลจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงผ่านฟลาวินกัมป์ไปยังอิเล็กโทรดโดยผ่านพอลิพีแนนโทรลีน สามารถสังเกตได้จากการพบกระแสการตอบสนองมากขึ้นจากเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดแบบต่างๆ คือ อิเล็กโทรดเปล่า อิเล็กโทรดที่มีพอลิพีแนนโทรลีน และอิเล็กโทรดที่มีกลูโคสออกซิเดสอยู่บนแมทริกของพอลิพีแนนโทรลีน เพราะฉะนั้นพอลิพีแนนโทรลีนจึงเป็นหนึ่งในตัวเลือกสำหรับพอลิเมอร์นำไฟฟ้า เพื่อที่จะนำมาพัฒนาให้เกิดงานวิจัยสำหรับการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง งานวิจัยพอลิเมอร์ที่นำไฟฟ้าข้างต้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xiuli Xiao และคณะในปี 2012 [65] ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน คือ พบกระแสไฟฟ้าตอบสนองมากขึ้นเมื่อมีการใช้พอลิเมทิลีนบลู (polymethylene blue) โดยมีการ

ตรึงเอนไซม์บนพอลิเมอร์ที่อยู่บนอิเล็กโทรดซึ่งมีการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในสถานะไม่มีออกซิเจน อีกทั้งพอลิเมทิลีนบลูยังช่วยให้กลูโคสออกซิเดสมีความเสถียรต่อการถูกตรึงเมื่อมีการทดสอบทางไฟฟ้าเคมีหลายๆครั้ง ซึ่งจากการทดสอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แอคทีวิตีของเอนไซม์ที่อยู่ในพอลิเมทิลีนบลูยังคงเสถียรภาพในการเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงอยู่ นอกจากนี้พบว่าพอลิเมอร์ที่นำไฟฟ้าหลายชนิดที่ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงเมื่อมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสตรึงอยู่ไม่ว่าจะเป็น พิล์มพอลิไพร์โรล (polypyrrole) [59] พอลิเอทิลีนไดออกซิไทโอฟีนและพอลิสัลโฟนิค:ซัลโฟนิคเอไซด์ (poly(3,4-ethylenedioxythiophene):polystyrene sulfonic acid) [66] พอลิอินิ ลีน (polyaniline) [2] และ พอลิกลูตามิคเอไซด์ (poly(glutamic acid)) [56] เพราะฉะนั้นพอลิเมอร์เหล่านี้ล้วนทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงพร้อมกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสได้

3.4.2.2 วัสดุอนุภาคนาโน

Cuicui Qiu และคณะ (2012) [6] ได้ศึกษาว่าเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ถูกตรึงอยู่บนอนุภาคนาโนทองทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงจากแอคทีฟเอนไซม์ไปสู่อิเล็กโทรดหรือไม่ ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบทางไฟฟ้าเคมี พบว่าอนุภาคนาโนทองช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกลูโคส อันเนื่องมาจากฟลาวินกรุ๊ปที่อยู่ภายในเอนไซม์ส่งอิเล็กตรอนไปยังอนุภาคทองแล้วส่งต่อที่อิเล็กโทรดในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน เพราะเมื่อทำการทดสอบโดยการเพิ่มกลูโคสลงไป ในสถานะแวดล้อมที่มีแต่ไนโตรเจนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระแสตอบสนองใดๆเกิดขึ้น แสดงว่ามีการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงเฉพาะจากฟลาวินกรุ๊ปเท่านั้น อย่างไรก็ตามความเสถียรของเอนไซม์ยังมีประสิทธิภาพดีอยู่เพราะฉะนั้นทองจึงมีความสามารถที่จะช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง ซึ่งผลที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับงานของ Yonghai Song และคณะ (2015) [22] ซึ่งพบว่าอนุภาคนาโนทองช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้ อย่างไรก็ตามทองอาจจะช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ดี แต่ว่าอนุภาคนาโนทองนั้นไปลดเอนไซม์แอคทีวิตี อนุภาคทองทำให้เอนไซม์เกิดการเสียรูปร่างเนื่องจากแอลฟาเฮลิกซ์ (α -helix) และเบต้าชีท (β -sheet) ที่เป็นโครงสร้างของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้ไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสได้ เพราะปกติแล้วเอนไซม์จะทำงานได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในโครงสร้างที่สมบูรณ์แบบแต่โดยทั่วไปพบว่าอนุภาคนาโนทองมีผลต่อปฏิกิริยาในทางที่ดี

3.4.2.3 วัสดุนาโน

ก.) กราฟีน (graphene)

กราฟีนถูกนำเสนอโดยพบว่ามีความสามารถช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้โดยตรงจากแอคทีฟเอนไซม์ไปสู่อิเล็กโทรด จากผลการทดลองในสถานะแก๊สไนโตรเจนอิมมัตว์ พบว่า

เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกลูโคส เนื่องจากเกิดการเสีรูปของเอนไซม์เมื่อเอนไซม์ถูกตรึงอยู่บนกราฟีน ซึ่งสังเกตจากการที่กราฟีนกับกลูโคสออกซิเดสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทำให้เกิดการตอบสนองของกระแสเกิดขึ้นสูงที่สุดเมื่อทำกับอิเล็กโทรดที่มีกราฟีน แต่เมื่อใส่กลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆแล้ว ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของกระแสไฟฟ้า เพราะฉะนั้นการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงจึงเกิดขึ้นโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส [53, 67, 68] ซึ่งต่อมา Bo Liang และคณะ ในปี 2015 [4] ได้รายงานว่ากราฟีนที่มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสตรึงอยู่บนนั้น มีส่วนช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกลูโคสเช่นกัน แต่ในขณะเดียวกันก็ได้ทำการทดสอบโดยการใส่ตัวกลางเข้าไปคือ เฟอร์โรซีน (ferrocene) จากผลการทดสอบในสภาวะที่มีสารละลายอิมมัลชันด้วยแก๊สไนโตรเจนหรือออกซิเจน พบว่าการตอบสนองของกระแสไฟฟ้าสูงสุดที่ศักย์ไฟฟ้า -0.48 โวลต์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด แต่การตอบสนองของกระแสไฟฟ้าที่ศักย์ 0.3 โวลต์เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส จึงสันนิษฐานว่า เอนไซม์ที่ตรึงอยู่กับกราฟีนได้สูญเสียแอกทิวิตี้แล้ว แต่จะมีบางส่วนที่ไม่ได้เกาะที่พื้นผิวกราฟีนทำให้อาจเกิดกระแสแล้วส่งผ่านตัวกลางไปยังอิเล็กโทรดได้ เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่ากราฟีนมีส่วนช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงเช่นเดียวกับอนุภาคนาโนทอง แต่อาจจะทำให้บางส่วนของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนนั้นสูญเสียแอกทิวิตี้ได้

ข.) วัสดุเมโซพอร์รัส (mesoporous materials)

ในปี 2009 นั้น Kunqi Wang และคณะ [13] ได้ทดสอบวัสดุเมโซพอร์รัสคาร์บอนเอฟดียู 15 (mesoporous FDU-15) กับกลูโคสออกซิเดสว่าวัสดุดังกล่าวส่งผลต่อการเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงอย่างไร โดยทั่วไปแล้ววัสดุเมโซพอร์รัสคาร์บอนนั้นมีพื้นที่ผิวสูง อีกทั้งยังมีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดีเมื่อเทียบกับวัสดุเมโซพอร์รัสชนิดอื่นๆ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าเมโซพอร์รัสคาร์บอนเอฟดียู 15 ช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อีกทั้งเมโซพอร์รัสนั้นยังมีความสามารถที่จะรักษาแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ได้ดีด้วย ในปี 2013 เมโซพอสซิลิกา นาโนสเฟียร์ (mesoporous silica nanosphere; MSN) ถูกนำมาพัฒนาอิเล็กโทรดสำหรับการตรึงเอนไซม์ โดยใช้โมเดลของกลูโคสออกซิเดสในการทดสอบการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง คุณสมบัติของ เมโซพอสซิลิกา นาโนสเฟียร์ นั้นคือมีพื้นที่ผิวมากและชอบภาวะแวดล้อมจุลภาค เพื่อเอื้อต่อการเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงระหว่างอิเล็กโทรดกับแอกทิฟเอนไซม์ ซึ่งจากผลการทดสอบใช้เครื่องมือยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) นั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเอนไซม์ไปจากเดิม และการทดสอบทางไฟฟ้าเคมีนั้น มีโซพอสซิลิกา นาโนสเฟียร์ช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้ดี [12]

ค.) ท่อคาร์บอนนาโน (carbon nanotubes;CNTs)

ท่อคาร์บอนนาโนเป็นวัสดุนาโนชนิดหนึ่งซึ่งได้ถูกรายงานว่ามีความสามารถที่จะช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้เช่นกัน เนื่องจากท่อคาร์บอนนาโนนั้นเป็นหนึ่งในวัสดุที่มีคุณสมบัติการนำไฟฟ้าที่ดีเหมือนกับอนุภาคนาโนทองและกราฟีน แต่เป็นการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกลูโคส เนื่องจากการที่กลูโคสออกซิเดสถูกตรึงอยู่บนคาร์บอนนาโนทูปนั้นเกิดการเสียโครงสร้างของเอนไซม์เช่นเดียวกับการตรึงอยู่บนกราฟีนที่ได้กล่าวถึงในข้างต้น[4,6,68,69] จึงทำให้กระแสที่วัดได้ FAD^+ กระแสที่เกิดจากการถ่ายเทจากอิเล็กโทรด โดยไม่เกิดกลไกเอนไซม์แคทาไลติก [55, 69] เพราะฉะนั้นยังไม่มีอนุภาคนาโนชนิดใดที่ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงในแบบอิเล็กโทรแคทาไลติกและเอนไซม์แคทาไลติกไปพร้อมๆกันได้

ง.) วัสดุนาโนผสม

วัสดุนาโนผสมหลายชนิดถูกใช้เพื่อรักษาแอกทิวิตีของเอนไซม์และเพื่อที่จะปรับปรุงให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้ดีขึ้นระหว่างแอคทีฟเอนไซม์และอิเล็กโทรด เนื่องจากวัสดุที่นำมาผสมกันเกิดคุณสมบัติที่เสริมกันและกัน จึงทำให้มีคุณสมบัติของวัสดุที่ดีขึ้น [62] วัสดุนาโนผสมระหว่างซิงค์ออกไซด์ (ZnO) และท่อคาร์บอนนาโน (CNTs) ถูกนำเสนอในปี 2011 เพื่อทำการทดสอบการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงซึ่งใช้กลูโคสออกซิเดสเป็นโมเดลในการทดสอบ จากผลการทดสอบทางไฟฟ้าเคมีที่เกิดขึ้นพบว่า เป็นการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส เนื่องจากวัสดุนาโนผสมนี้อาจจะเข้าไปใกล้กับฟลาวินกรุ๊ปซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแล้วถ่ายเทไปสู่วัสดุนาโนผสม จึงทำให้ระยะทางระหว่างตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์กับพื้นผิวอิเล็กโทรดใกล้กันมากขึ้น [63] ซึ่งในปีถัดมาก็ยังคงมีการนำวัสดุนาโนผสมหลายๆชนิดมาทำการทดสอบเพื่อที่จะพัฒนาอิเล็กโทรดให้สามารถที่จะเอื้อต่อการเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง ไม่ว่าจะเป็นเป็นการผสมระหว่าง คาร์บอนนาโนทูปและอะลูมินาหุ้มกับซิลิกา (Alumina coated silica) (2012) [65] กราฟีนกับอนุภาคนาโนทอง (2013) [3] ฟิล์มไททาเนียมออกไซด์บนเมทอลโลพธาลอไซยาไนด์กับท่อคาร์บอนนาโน (Titania film on metallophthalocyanine and CNTs) (2013) [61] รีดิวซ์กราฟีนออกไซด์กับอนุภาคนาโนเงิน (reduced graphene oxide and silver nanoparticles) (2014) [64] อนุภาคนาโนทองกับท่อนาโนไททาเนต (AuNPs and titanate nanotube) (2015) [62] และกราฟีนกับท่อคาร์บอนนาโน(2015) [60] ซึ่งวัสดุนาโนผสมนี้ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันคือช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส อันเนื่องมาจากคุณสมบัติที่มีการเสริมกันของวัสดุนาโนทั้งสองเพราะฉะนั้นวัสดุเหล่านี้จึงเป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการพัฒนาอิเล็กโทรดเพื่อให้เกิดการตอบสนองที่ดีของกระแสและความเสถียรภาพอีกด้วย แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

บทที่ 4

วัสดุและวิธีการทดลอง

4.1 วัสดุและสารเคมี

1. กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) จาก *Aspergillus niger* (E.C. 1.13.4)
บริษัท Sigma-Aldrich
2. ไคโตซาน (Deacetylation degree 85 % , MW 2000 kDa)
บริษัท Seafresh chitosan ประเทศไทย
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Fisher Scientific
4. ไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรเรต (hydrogen tetrachloroaurate, $(\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$
หรือเรียกอีกชื่อว่า กรดคลอโรอริก ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Sigma-Aldrich
5. พลูโรนิค พี123 (pluronic P123) บริษัท BASF corporation ประเทศ USA
6. เตตระเอทอกซีไซเลน (tetraethoxysilane, TEOS) ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์
บริษัท Sigma-Aldrich
7. 1,2,3-ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5-trimethylbenzene, TMB) ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์
บริษัท SigmaAldrich
8. 3-อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTS) ความ
บริสุทธิ์ 97 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Fluka
9. กรดอะซิติก (acetic acid) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Ajax Chemical
11. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

4.2 วิธีการทดลอง

4.2.1 การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (mesocellular foam silica, MCF) ทำได้โดยนำสารกำหนดโครงสร้างพลูโรนิค พี 123 (pluronic P123) จำนวน 2 กรัม ลงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีน้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 1.6 โมลาร์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร แล้วปั่นกวนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงให้ความร้อนด้วยเครื่อง hotplate ควบคุมอุณหภูมิคงที่ 40 องศา พร้อมกับปั่นกวนต่อเนื่อง จากนั้นเติมสาร 1,3,5-ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5 trimethylbenzene, TMB) โดยมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารในแต่ละการทดลองเป็น

ปริมาณ 1,2,3,5 และ 5 กรัม ที่มีการเติมสารเติมแต่งตามลงไป ทำการปั่นกวนจนสารละลายผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารเตตระเอททอกซีไฮดรอกซิล (tetraethoxysilane, TEOS) ซึ่งเป็นแหล่งของซิลิกาออกไป 4 กรัม ทำการผสมปั่นกวนอย่างรวดเร็วเพื่อให้ซิลิกากระจายตัวลงบนพื้นผิวของตัวกำหนดโครงสร้างได้ดี ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปใส่ในขวดเทฟลอนและปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปใส่ไว้ในตู้อบความร้อน (SNOL 58/350) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนลักษณะสีขาวขึ้นในสารละลาย ซึ่งจะต้องนำมาผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน (whatman) เบอร์ 5 ที่มีความละเอียดของรูของกระดาษกรองสูง เนื่องจากต้องแยกเอาเฉพาะตะกอนที่เกิดขึ้นเท่านั้น โดยใช้ น้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร ช่วยล้างผลิตภัณฑ์ก่อนในการกรองครั้งแรก สำหรับการกรองครั้งที่สองใช้เอทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อกรองเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงปล่อยกระดาษกรองพร้อมอนุภาคซิลิกาบนกระดาษกรองทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาผ่านกระบวนการสุดท้ายคือ การกำจัดแม่แบบโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องมือสกัดแบบซ็อกเก็ต (soxhlet extractor) เพื่อกำจัดน้ำ สารอินทรีย์ และไอออนบวกหรือลบต่างๆที่ปนเปื้อนอยู่ในโครงสร้างซิลิกาออกไป ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกาที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว แล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และเก็บในภาชนะปิดในโถดูดความชื้น (desiccator)

4.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (MCF) ที่สังเคราะห์ขึ้น สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ สำหรับ MCF คุณสมบัติแรกที่เมื่อทำการสังเคราะห์วัสดุนี้แล้วจะต้องนำมาตรวจวัดคือ พื้นที่ผิว (surface area) ปริมาตรรูพรุน (pore volume) และขนาดรูพรุน (pore diameter) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ เครื่องวิเคราะห์พื้นที่ผิว (quantachrome corporation ,USA) ซึ่งจะใช้เทคนิคของการดูดซับก๊าซไนโตรเจน (nitrogen adsorption isotherm) ของวัสดุที่ต้องการวิเคราะห์

4.2.3 การสังเคราะห์วัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง

สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา (MCF/AuNP) จะแบ่งการดำเนินงานออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ 1. ขั้นตอนการใส่ตัวเชื่อม (linker) ระหว่าง AuNP และ MCF 2. ขั้นตอนการดูดซับทองไอออนบนพื้นผิวของวัสดุ MCF และ 3. ขั้นตอนการรีดิวซ์ทองไอออนที่ดูดซับอยู่ในรูพรุนของวัสดุ MCF ให้กลายเป็นอนุภาคอนุภาคของทองยึดเกาะพื้นที่ผิววัสดุ

4.2.3.1 ขั้นตอนการใส่ตัวเชื่อม (linker) ของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา ด้วยสารก่อกำเนิดฟอง

การใส่ตัวเชื่อมสำหรับการปรับปรุงพื้นที่ผิวของ MCF โดยเริ่มจากการเตรียม APTS ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ในเอทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนต่อมา นำ MCF ปริมาณ 1.2 กรัม มาใส่ลงสารละลายที่ปั่นกวนไว้ในขั้นต้นและทำการปั่นกวนต่อเพิ่มอีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสารแขวนลอยมาใส่ขวด เทฟลอนแล้วไล่ก๊าซภายในขวดด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้นปิดฝาให้สนิทนำไปอบที่ 85 องศาเซลเซียส (SNOL 58/350) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 5 อีกทั้งยังต้องล้างด้วยเอทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จึงจะได้ MCF/APTS ใช้สำหรับตรึงอนุภาคนาโนทองในขั้นตอนต่อไป

4.2.3.2 การดูดซับทองไอออนในพื้นที่ผิวของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

การดูดซับทองไอออนบนพื้นที่ผิวของวัสดุ MCF นั้นไอออนของทองที่ถูกดูดซับจะอยู่ในรูปของทองคลอไรด์ไอออน ($AuCl_4^-$) โดยเริ่มจากนำทองคลอไรด์ไอออน 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับ MCF/APTS ปริมาณ 1.0 กรัม และนำไปใส่ในเครื่องล้างความถี่สูง (sonicator bath) ที่ 40 กิโลเฮิร์ต เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วย whatman เบอร์ 5 แล้วล้างออกด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมนำไปรีดิวซ์ทองในครั้งต่อไป

4.2.3.3 การรีดิวซ์ทองไอออนที่ดูดซับอยู่บนพื้นที่ผิวของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกาให้กลายเป็นอนุภาค

การรีดิวซ์ทองจะเริ่มจากการที่เติมโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับกับวัสดุที่ยังไม่ได้ถูกรีดิวซ์ปริมาณ 0.5 กรัม ในสารละลายเอทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปั่นกวนเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปกรองด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ลิตร และนำวัสดุที่อยู่บนกระดาษกรองไปทำให้แห้งโดยการตากที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายก็จะได้วัสดุ MCF/AuNP ที่พร้อมใช้งาน

4.2.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติลักษณะทางกายภาพของวัสดุรองรับที่สังเคราะห์ได้ MCF/AuNP ทั้ง 5 แบบ

การคำนวณพื้นที่ผิว ขนาดของรูพรุนและปริมาตรของรูพรุนของวัสดุที่สังเคราะห์ได้ นำไปทดสอบด้วยการดูดซับและการคายซับของไนโตรเจนโดยการคำนวณจากวิธีของ Brunauer-

Emmett-Teller (BET) กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope ; TEM, ยี่ห้อ Jeol รุ่น JEM 2010) และกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope ; SEM, ยี่ห้อ Jeol รุ่น JSM 7800F) ถูกใช้เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างระดับนาโนของวัสดุที่สังเคราะห์ได้

4.2.5 การตรึงเอนไซม์ในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา

ขั้นตอนต่อมาเป็นการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase ; GOx) ลงในรูพรุนของวัสดุ MCF ทั้ง 5 ชนิด คือ วัสดุ MCF ที่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ P123/TMB จะใช้วิธีในการตรึงเดียวกัน โดยเริ่มจากการทำการละลายเอนไซม์ปริมาณ 0.01 กรัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่า pH 7.0 ปริมาณ 1 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมวัสดุที่จะใช้สำหรับตรึงปริมาณ 0.1 กรัม ลงในสารละลายเอนไซม์นั้นแล้วปั่นกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกส่วนของเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปออกจากเอนไซม์ที่ยังเหลืออยู่ในสารละลายโดยใช้วิธีการกรอง แล้วล้างเพื่อแยกเอาเอนไซม์ที่อยู่ในภาชนะออกวัสดุตรึงออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำวัสดุที่ใช้ตรึงเอนไซม์ซึ่งมีเอนไซม์ตรึงรูปที่ค้างอยู่บนกระดาษกรอง นำกลับไปละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ด้วยปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการดัดแปลงอิเล็กโทรดในขั้นตอนถัดไป การคำนวณปริมาณของเอนไซม์ที่ยังมีเหลืออยู่โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านกระดาษกรองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Ultraviolet-visible spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ก็จะทราบปริมาณของเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง

4.2.6 การเตรียมสารละลายโคโตซาน

โคโตซานจะใช้เป็นสารเชื่อมประสานให้วัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเอนไซม์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของอิเล็กโทรดได้ดี โดยจะใช้โคโตซานที่มีความเข้มข้นที่ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยเตรียมจากการละลายโคโตซานจำนวน 0.5 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ที่มีน้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะได้สารละลายโคโตซานเนื้อเดียวที่มีลักษณะใส หลังจากนั้นทำการปรับค่า pH ให้เหมาะสมกับเอนไซม์คือ pH 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร เป็นสารปรับค่า pH (ซึ่งค่า pH ของ โคโตซานที่สามารถปรับค่าได้สูงสุดคือ pH 7 เพราะถ้าค่า pH มากกว่านี้จะทำให้โคโตซานเปลี่ยน จากลักษณะที่ใสเป็นขุ่น) ซึ่งสารละลายโคโตซานที่เตรียม 1 ครั้ง จะเก็บไว้ใช้ได้นาน 3 วัน โดยเก็บที่อุณหภูมิห้องด้วยการกวนผสมที่ความเร็วรอบช้าๆ ตลอดเวลา

4.2.7 การทำอิเล็กโทรดดัดแปลง

เอนไซม์ GOx ที่ถูกตรึงในวัสดุ MCF/AuNPs จะถูกนำมาประกอบเข้ากับส่วนของอิเล็กโทรดขั้วทำงาน (working electrode) แบบฟิล์มทองบนปริ้นท์เซอติบอร์ด (Au-PCB) ซึ่งพื้นผิวใช้งานมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3 มิลลิเมตร โดยจะใช้สารละลายโคโดซานที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 4.2.6 เป็นตัวช่วยในการยึดประสานระหว่าง MCF/AuNPs/GOx กับพื้นผิวของอิเล็กโทรดขั้วทำงาน ขั้นตอนนี้สามารถทำได้โดยการหยดสารแขวนลอย MCF/AuNPs/GOx ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของ Au-PCB แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการหยดทับอีกชั้นด้วยสารละลายโคโดซานปริมาตร 3 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งใช้เวลา 20 นาที หลังจากนั้นอิเล็กโทรดที่ถูกดัดแปลงพร้อมใช้งาน โดยมีลักษณะชั้นของอิเล็กโทรดเป็น Au-PCB/MCF/APTS/AuNPs/GOx/chitosan ซึ่งสามารถนำไปใช้งานได้ทันที ส่วนวิธีการเก็บรักษาจะเก็บไว้ภาชนะปิดมิดชิดในสภาวะแห้ง แล้วแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2.8 การทดลองเปรียบเทียบผลของชนิดอิเล็กโทรดใช้งานดัดแปลงต่อการตอบสนองทางไฟฟ้าเพื่อศึกษาการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงในระบบอิมมูโนตัวด้วยไนโตรเจน

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบความสามารถในการตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลง คือ โคโดซาน GOx/chitosan, MCF/GOx/Chitosan, MCF/AuNP/GOx/Chitosan ดังนั้นจึงเป็นอิเล็กโทรดของไบโอเซนเซอร์ เมื่อเตรียมอิเล็กโทรดเสร็จสิ้นแล้ววิธีการวัดค่าจะใช้เทคนิคของไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยใช้เครื่อง Potentiostat PST103 ที่เป็นระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า คือ 1.อิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) 2.อิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) ซึ่งใช้เป็น (Ag/AgCl) และ 3.อิเล็กโทรดเคาน์เตอร์ (counter electrode) ใช้เป็นโลหะแพลตทินัม (Pt) ซึ่งเป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าแบบสแกนระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ในระบบวัดที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร โดยจะทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในระบบที่อิมมูโนตัวด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 15 นาที

4.2.9 การทดสอบอิทธิพลของวัสดุสังเคราะห์ต่อกลูโคสไบโอเซนเซอร์

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบความสามารถในการตอบสนองทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดัดแปลงโดยการนำวัสดุที่สังเคราะห์ได้แต่ละแบบนั้นมาทำตามข้อ 4.2.7 โดยทำอิเล็กโทรดดัดแปลงดังนี้

1. MCF124/AuNP/GOx/Chitosan
2. MCF224/AuNP/GOx/Chitosan
3. MCF324/AuNP/GOx/Chitosan
4. MCF524/AuNP/GOx/Chitosan
5. MCF524+add/AuNP/GOx/Chitosan

ซึ่งทดสอบตามข้อ 4.2.8 แต่เปลี่ยนจากสารละลายบัฟเฟอร์เป็นสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในระบบอิมมัลชันด้วยอากาศ เพื่อสังเกตพฤติกรรมและเปรียบเทียบของแต่ละอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงว่าอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงชนิดใดให้กระแสไฟฟ้าตอบสนองที่สูงที่สุด

4.2.10 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคส

สำหรับการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์นั้นจะใช้หลักการของแอมเพอร์โรเมตริก ซึ่งเป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ค่าคงที่ค่าหนึ่งในระบบที่ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส 0.2 0.4 0.6 และ 0.9 มิลลิโมลาร์ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะทำ หน้าที่รักษาค่า pH โดยศักย์ไฟฟ้าที่ใส่เข้าไปนี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการส่งถ่ายอิเล็กตรอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารตั้งต้นให้ถ่ายเทมายังอิเล็กโทรด ซึ่งอิเล็กตรอนนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นค่ากระแสไฟฟ้าด้วยวงจรอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งการทดลองในส่วนนี้จะเป็นการหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวัดนั้นคือ ค่าความไว (sensitivity) ค่าการตรวจวัดต่ำสุด (lower of detection limitation) เป็นต้น

บทที่ 5

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

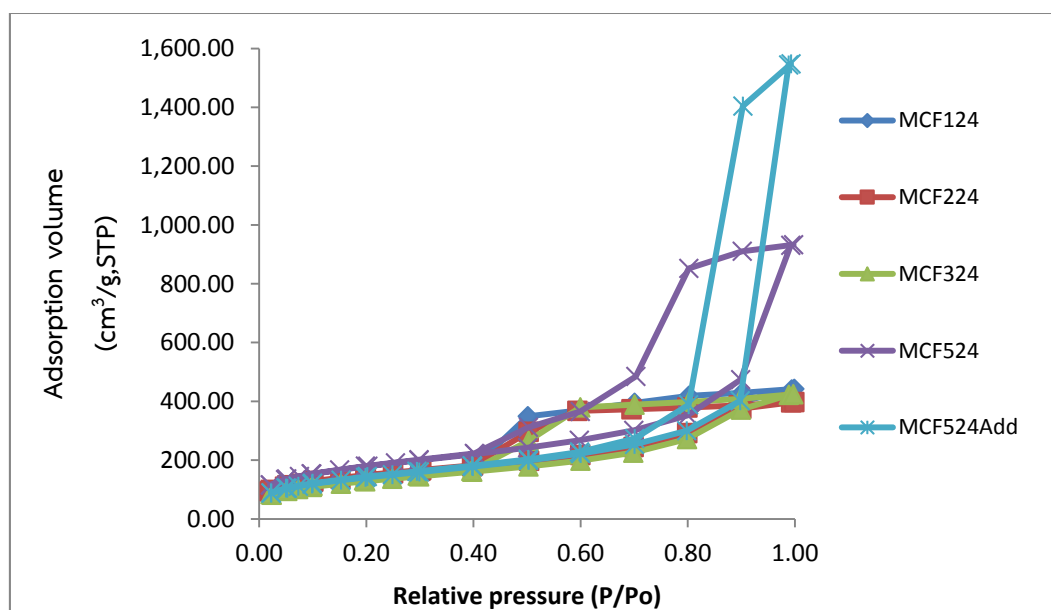
โครงการวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดของรูพรุนของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา/อนุภาคนาโนทอง (MCF/AuNP) ต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ โดยแบ่งการศึกษาทั้งหมดออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งเป็นการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางกายภาพของวัสดุที่ได้สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ ขนาดพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุนด้วยวิธีดูดซับและคายซับก๊าซไนโตรเจน โครงสร้างของวัสดุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy: TEM) และลักษณะพื้นผิวภายนอกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM) ส่วนที่สองเป็นการศึกษาการตรึงเอนไซม์ในวัสดุที่สังเคราะห์ได้ เพื่อศึกษาอิทธิพลของวัสดุรองรับต่อการบรรจุเอนไซม์ และส่วนที่สามเป็นการนำเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx) ที่ถูกตรึงใน MCF/AuNP ไปประกอบกับอิเล็กทรอนิกส์薄膜ทองบนปริ้นท์เซอิตบอร์ด (Print circuit board; Au-PCB) เพื่อสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนของวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้กระบวนการทางไฟฟ้าเคมี

5.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต MCF/AuNPs ที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดรูพรุน

วัสดุที่ใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ GOx เพื่อศึกษาอิทธิพลของขนาดของรูพรุนเป็นวัสดุชนิดเมโซพอร์ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 2 ถึง 50 นาโนเมตร [49] โดยวัสดุชนิดนี้มีคุณสมบัติที่ดีเหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์เนื่องจากมีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ GOx ซึ่งมีขนาด $6 \times 5.2 \times 7.7$ นาโนเมตร [52] อีกทั้งยังมีข้อดีที่ช่วยให้เอนไซม์สามารถรักษาเสถียรภาพไว้ได้ [53,54] อย่างไรก็ตามวัสดุเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกานำไฟฟ้าได้ไม่ดีจึงต้องมีการปรับปรุงโดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองลงบนพื้นผิวของเมโซเซลลูลาร์โฟมซิลิกา ในเริ่มแรกได้ทำการสังเคราะห์วัสดุรองรับขึ้นจากสารกำหนดโครงสร้าง พลูโรนิค พี123 (pluronic P123) และสารที่ทำให้ขนาดของรูพรุนเกิดการเปลี่ยนแปลง คือ 1,3,5 ไตรเมทิลเบนซีน (1,3,5-trimethylbenzene, TMB) ซึ่งทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 จำนวน 5 ค่า ตั้งแต่ 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่ได้ใส่สารเติมแต่งเข้าไป (additive) โดยสารเติมแต่งในที่นี้คือ แอมโมเนียมฟลูออไรด์ (ammonium fluoride) ทั้งนี้การสังเคราะห์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 จะได้วัสดุ MCF ที่มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน โดยการที่มีอัตราส่วนโดยมวลที่มากขึ้นจะทำ

ให้ขนาดของรูพรุนวัสดุใหญ่ขึ้น [18-21] ซึ่งอาจจะส่งผลต่อความสามารถในการบรรจุเอนไซม์และรูปร่างของเอนไซม์ อีกทั้งอาจจะส่งผลต่อการแพร่ของสารตั้งต้นได้

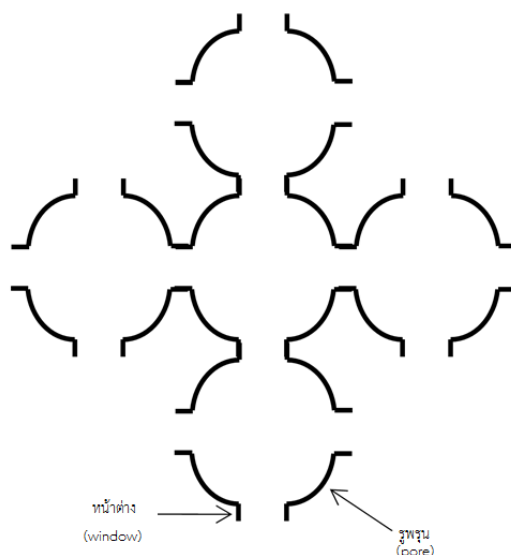
ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เริ่มจากการสังเคราะห์วัสดุทั้ง 5 ชนิด ที่มีอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เป็น 0.5 1 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีการเติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ โดยเริ่มจากการนำมาวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างรูพรุน โดยใช้วิธีการดูดซับและการคายซับด้วยก๊าซไนโตรเจน แสดงดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 ไอโซเทอมของการดูดซับ และการคายซับแก๊สไนโตรเจนบนพื้นผิวของ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นของแต่ละอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 โดย MCF124:TMB/P123=0.5 MCF224:TMB/P123=1.0 MCF324:TMB/P123=1.5 MCF524:TMB/P123=2.5 และ MCF524add:TMB/P123 =2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์

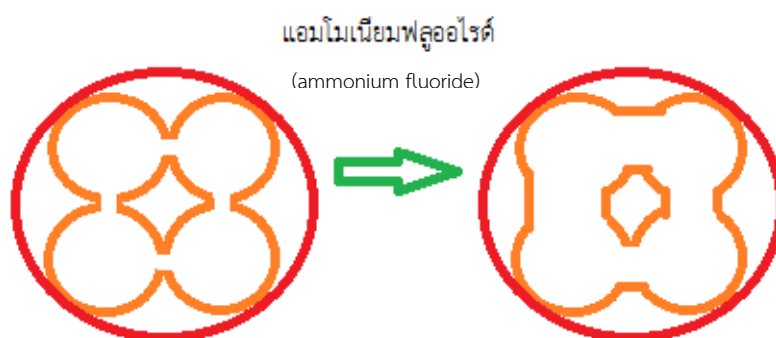
จากรูปที่ 5.1 ไอโซเทอมของการดูดซับและการคายซับซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความดันย่อย (relative pressure, P/P_0) กับปริมาณการดูดซับที่สภาวะสมดุล (adsorption volume) จากผลการทดสอบพบว่า มีลักษณะของกราฟของแต่ละอัตราส่วนโดยมวลที่ได้ทำการเปลี่ยนแปลง 5 ชนิด ซึ่งลักษณะของไอโซเทอมการดูดซับของวัสดุรองรับเหล่านี้เป็นแบบฮิสเทอรีซิสลูป (hysteresis loop) ซึ่งตรงกับชนิดที่ 4 (type IV) แสดงลักษณะของวัสดุที่มีรูพรุนแบบเมโซพอร์ (mesoporous) มีขนาดระหว่าง 2 ถึง 50 นาโนเมตร [15,16] โดยลักษณะรูพรุนแบบเมโซพอร์ที่พบของ MCF124 MCF224 MCF324 และ MCF524 ซึ่งมีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123

เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 และ 2.5 เป็นแบบ H2 โดยลักษณะแบบ H2 ของรูพรุนนี้เป็นมีลักษณะคล้ายขวดหมึก (ink bottle) และเป็นโครงข่ายเชื่อมต่อกันผ่านหน้าต่าง (window) [50] ดังรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 ลักษณะรูพรุนของ MCF [50]

ส่วน MCF524add ที่มีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 เท่ากับ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ มีลักษณะของรูพรุนเมโซพอร์แบบ H1 ซึ่งแสดงรูปร่างของรูพรุนคล้ายทรงกระบอก ซึ่งเป็นผลมาจากการที่มีสารเติมแต่งจำพวกแอมโมเนียมฟลูออไรด์ที่ทำให้เกิดการผันกลับ (reversible) ของปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของ ซิลิกาบริเวณหน้าต่าง ซึ่งทำให้เกิดการสลายตัวของซิลิกาบริเวณนั้น [19, 70] โดยทำให้บริเวณที่รูพรุนเชื่อมกันขยายขนาดใหญ่ขึ้นจากวงกลมที่ชัดเจนติดกัน จนกลายมาเป็นวงกลมที่ติดกันที่มีลักษณะเกือบจะเป็นทรงกระบอกดังรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 โครงสร้างของรูพรุนมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อใส่แอมโมเนียมฟลูออไรด์

ข้อมูลไอโซเทอมของการดูดซับและการคายซับแก๊สไนโตรเจนนี้สามารถนำไปคำนวณพื้นที่ผิวของวัสดุด้วยวิธี BET ส่วนขนาดของรูพรุนและปริมาตรของรูพรุนหาได้โดยวิธี BJH ดังตารางที่ 5.1

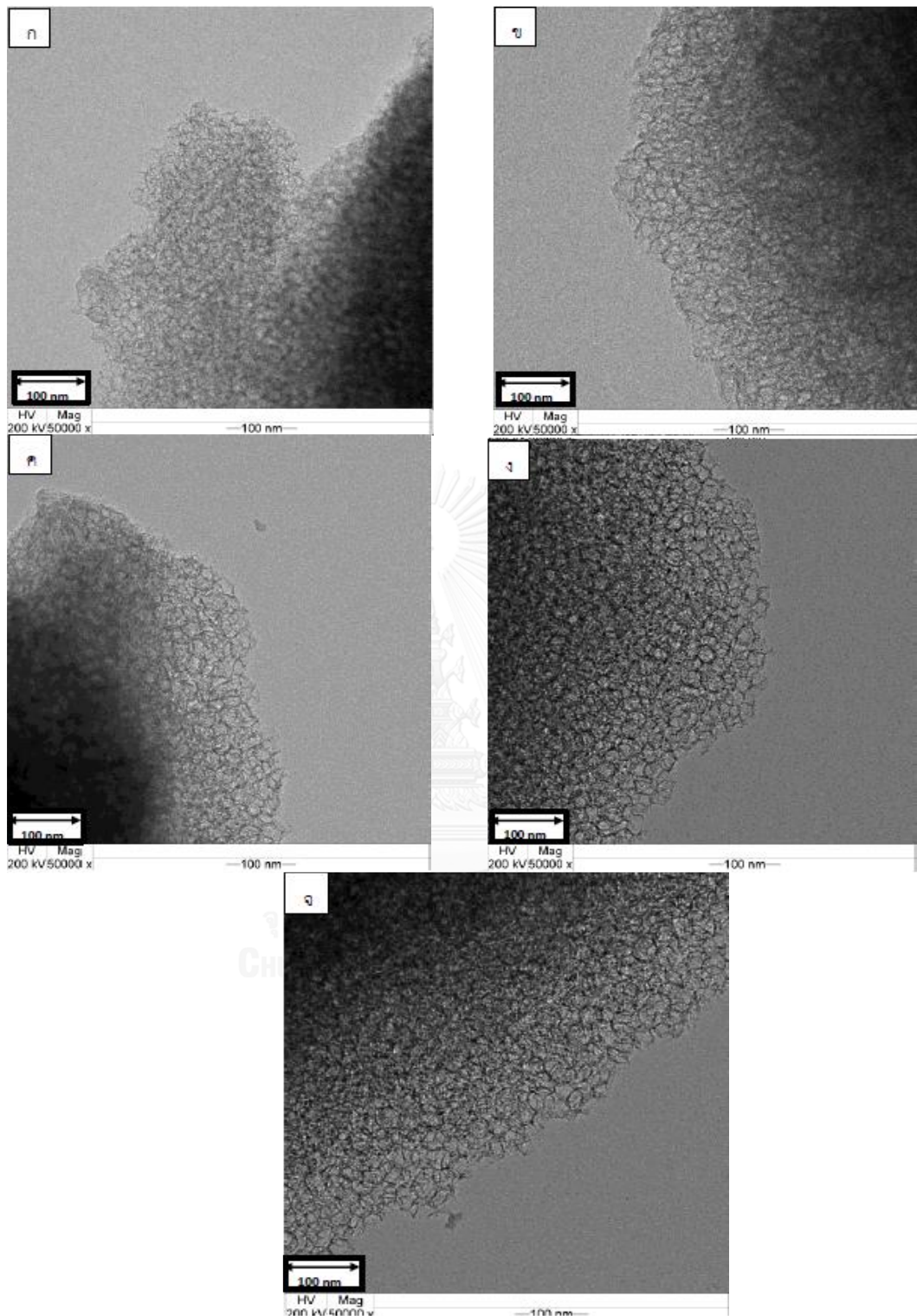
ตารางที่ 5.1 คุณสมบัติทางกายภาพของ MCF ที่สังเคราะห์ขึ้นของแต่ละอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่ได้จากการคำนวณจากวิธี BJH (Barrett-Joyner-Halenda) สำหรับขนาดรูพรุนและปริมาตรรูพรุน ส่วนพื้นที่ผิวหาจากวิธี BET (Brunauer-Emmett) [

ตัวอย่างวัสดุ	อัตราส่วน TMB/P123	เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนจากการดูดซับ (นาโนเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางหน้าตาจากการคายซับ (นาโนเมตร)	พื้นที่ผิว (ม. ² /กรัม)	ปริมาตรรูพรุน (ซม. ³ /กรัม)
MCF 124	0.5	14.52±4.27	5.91±0.07	446.84±16.78	0.66±0.02
MCF 224	1	16.14±6.01	4.88±0.05	505.58±5.88	0.62±0.01
MCF 324	1.5	19.21±4.88	5.85±0.11	449.05±12.55	0.60±0.09
MCF 524	2.5	22.21±5.57	9.27±0.06	638.77±15.99	1.48±0.04
ใส่สารเติมแต่ง (แอมโมเนียมฟลูออไรด์)					
MCF 524 add	2.5	22.23±5.66	19.13±0.08	488.81±14.63	2.34±0.06

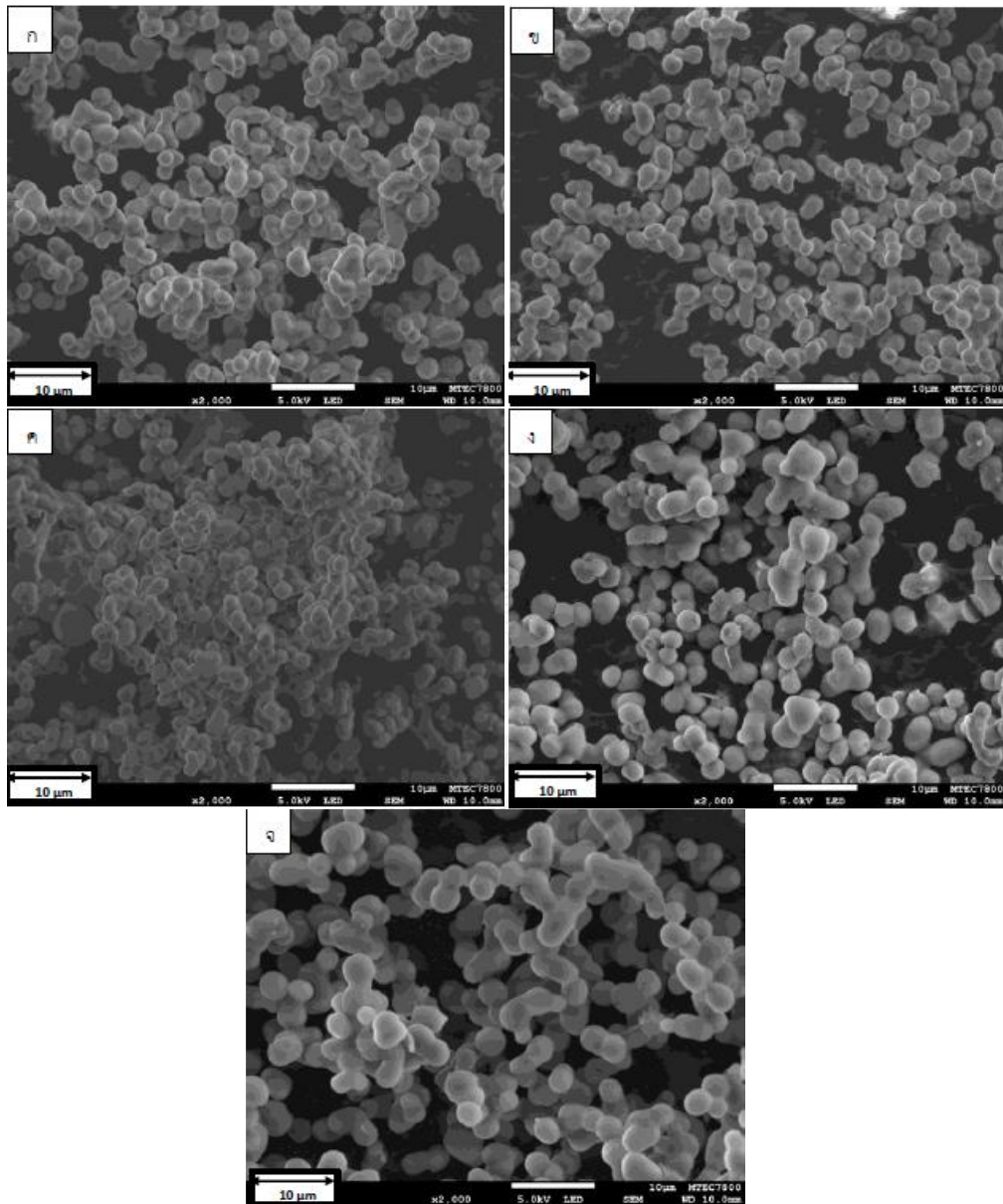
จากตารางที่ 5.1 วัสดุ MCF ที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 มีขนาดของหน้าตาที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Patrick Schmidt และคณะ [19] แต่อย่างไรก็ตามขนาดของรูพรุนยังไม่ค่อยใกล้เคียง จากการสังเกตพบว่าการที่มีอัตราส่วนโดยมวลเพิ่มมากขึ้นจาก 0.5 ถึง 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ ขนาดของรูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจาก TMB ได้ซึมผ่านเข้าไปยังใจกลางแม่แบบ (P123) มากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของ TMB/P123 เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาตรช่องว่างของรูพรุนเกิดการขยายเนื่องจากปริมาตรในใจกลางของแม่แบบมีปริมาตรของ TMB ที่เพิ่มเข้าไปจากปริมาตรเดิม จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูพรุนที่ใหญ่มากขึ้น ซึ่งจะพบว่าอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่ 2.5 ให้ขนาดของรูพรุนที่ใหญ่ที่สุดและเมื่อมีการเพิ่มสารเติมแต่ง คือ แอมโมเนียมฟลูออไรด์ ผลปรากฏว่าแอมโมเนียมฟลูออไรด์ไม่มีผลต่อขนาดของรูพรุนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ W. Na และคณะ [70] โดยปกติแล้วหน้าตาเกิดจากขอบของรูพรุนมีการสัมผัสกันระหว่างรูพรุนบริเวณใกล้เคียงกัน ซึ่งจากผลการทดลองตามตารางที่ 5.1 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวล

ในช่วง 0.5-1.5 ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดหน้าต่างที่มากขึ้น แต่เมื่อมีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 เท่ากับ 2.5 จะเห็นการเปลี่ยนแปลงขนาดของหน้าต่างอย่างชัดเจนจาก 5.86 เป็น 9.27 นาโนเมตร อีกทั้งการที่แอมโมเนียมฟลูออไรด์เพิ่มเข้าไปในอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่ 2.5 ยิ่งทำให้ขนาดของหน้าต่างใหญ่ขึ้นจาก 9.27 นาโนเมตร เป็น 19.13 นาโนเมตร เนื่องจากการที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ไปทำให้เกิดการสลายตัวของซิลิกาบริเวณหน้าต่างทำให้หน้าต่างมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น [70] ปริมาตรของรูเพิ่มมากขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 จาก 0.5 ถึง 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์เนื่องจากขนาดของรูพรุนและหน้าต่างใหญ่มากขึ้น ซึ่งการที่มีขนาดรูพรุน ขนาดของหน้าต่างและปริมาตรของรูพรุนที่เพิ่มมากขึ้นอาจจะเป็นผลดีต่อการบรรจุ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่มีขนาด $6 \times 5.2 \times 7.7$ นาโนเมตร เพราะอาจจะทำให้เอนไซม์เข้าไปในวัสดุได้ง่าย

ในส่วนถัดมานั้น ได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างภายในโดยใช้ TMB โดยจากรูปที่ 5.4 แสดงภาพถ่ายโครงสร้างของวัสดุ MCF จาก TEM โดยรูป ก-จ เป็นรูปที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ TMB/P123 ตั้งแต่ 0.5-2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ จากการวัดขนาดของรูพรุนโดยใช้โปรแกรม Image J พบว่าการที่มีปริมาณของอัตราส่วน TMB/P123 เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลให้ขนาดของรูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้นจาก 14.52 ไปเป็น 22.23 นาโนเมตร แต่อย่างไรก็ตาม ภาพที่ ก-ค ไม่แสดงโครงสร้างของรูพรุนที่ชัดเจนสม่ำเสมอ กล่าวคือรูพรุนมีการทับซ้อนกันจนไม่เป็นระเบียบ เมื่อเทียบกับภาพ ง และ จ



รูปที่ 5.4 ภาพถ่ายจาก TEM ของวัสดุ MCF ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ก) 0.5
 ข) 1.0 ค) 1.5 ง) 2.5 จ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ เส้นสีขาวแสดงสเกลบาร์
 ขนาด 100 นาโนเมตร



รูปที่ 5.5 ภาพถ่ายจาก SEM ของวัสดุ MCF ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ก) 0.5 ข) 1.0 ค) 1.5 ง) 2.5 จ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ เส้นสีขาวแสดงสเกลบาร์ขนาด 10 ไมโครเมตร

หลังจากที่ได้เห็นโครงสร้างภายในจาก TEM แล้ว ในส่วนถัดมาจึงได้ทำการศึกษาโครงสร้างภายนอกรูปที่ 5.5 แสดงภาพถ่ายพื้นผิวภายนอกของวัสดุ MCF จาก SEM โดยรูป ก-จ เป็นรูปที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ TMB/P123 ตั้งแต่ 0.5-2.5 จากการทดสอบพบว่า การที่มีปริมาณของอัตราส่วน TMB/P123 เพิ่มมากขึ้น ได้ขนาดของอนุภาคจากโปรแกรม Image J เท่ากับ 2.11 2.15 2.17 2.14 และ 2.25 ไมโครเมตร การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างของอนุภาคของเมโซเซลลูลาร์โฟม

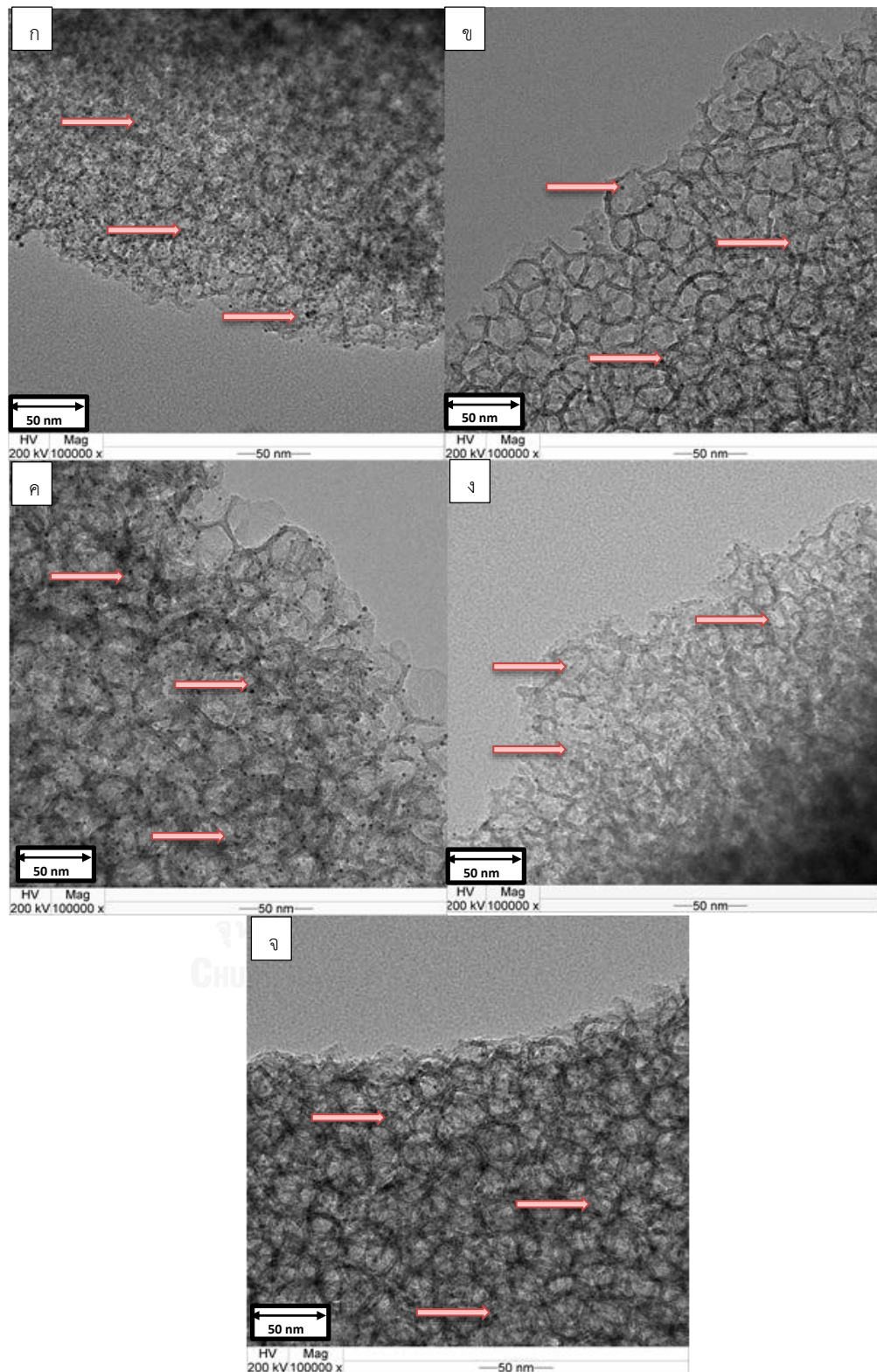
ซิลิกาไม่ต่างกันมากนัก อีกทั้งแต่ละอนุภาคนั้นยังมีลักษณะที่มีการเชื่อมต่อซึ่งกันและกัน และเมื่อได้ทราบถึงลักษณะโครงสร้างของ MCF แล้ว

ในส่วนถัดไปจะมีการนำไปตรึงอนุภาคนาโนทองและวิเคราะห์พื้นที่ผิวเพื่อสังเกตว่า ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ผิวนั้นอาจจะหมายถึงอนุภาคนาโนทองถูกตรึงอยู่บน MCF ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวลดลง

ตารางที่ 5. 2 เปรียบเทียบพื้นที่ผิว MCF และ MCF/AuNP ที่สังเคราะห์ขึ้นของแต่ละอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่คำนวณพื้นที่ผิวจากวิธี BET (Brunauer-Emmett) [

วัสดุ	อัตราส่วนโดยมวล TMB/P123	พื้นที่ผิว (ม. ² /กรัม) ก่อนตรึงทอง	พื้นที่ผิว (ม. ² /กรัม) หลังตรึงทอง
MCF 124	0.5	446.84	305.73
MCF 224	1	505.58	286.85
MCF 324	1.5	449.05	230.69
MCF 524	2.5	638.77	324.41
ใส่สารเติมแต่ง (แอมโมเนียมฟลูออไรด์)			
MCF 524add	2.5	488.81	257.49

จากตารางที่ 5.2 เมื่อ MCF ถูกนำมาตรึงอนุภาคนาโนทองลงบนพื้นที่ผิวแล้วจะสังเกตได้ว่าพื้นที่ผิวของทุกวัสดุลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งผลดังกล่าวที่ได้ อาจจะหมายถึงการที่มีอนุภาคนาโนทองมาเกาะบนพื้นที่ผิวของ MCF ภายนอกซึ่งทำพื้นที่ผิวมีค่าลดลง แต่อย่างไรก็ตามต้องทำการส่องกล้อง TEM เพื่อให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองอยู่บนวัสดุ โดยส่วนถัดมาเป็นการศึกษาอนุภาคนาโนทองที่ถูกสังเคราะห์ลงบน MCF เพื่อสังเกตการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองบน MCF จากภาพ TEM

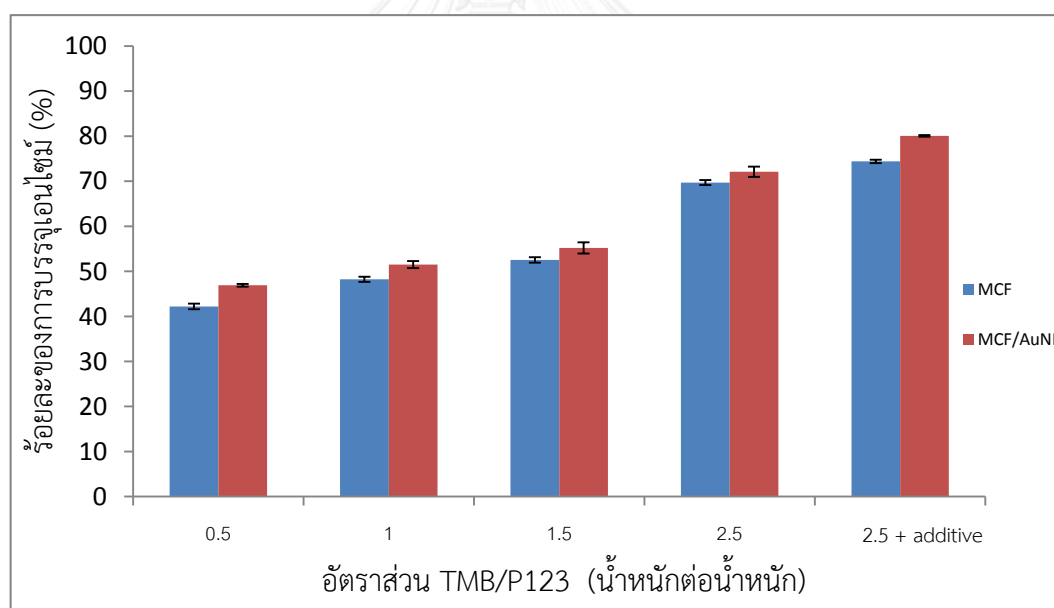


รูปที่ 5.6 ภาพถ่ายจาก TEM ของวัสดุ MCF/AuNP ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ก) 0.5 ข) 1.0 ค) 1.5 ง) 2.5 จ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์ เส้นสีขาวแสดงสเกลบาร์ขนาด 50 นาโนเมตร

โดยจากรูปที่ 5.6 แสดงภาพถ่าย TEM ของโครงสร้างของวัสดุ MCF/AuNP โดยรูป ก-จ เป็นรูปที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ TMB/P123 ตั้งแต่ 0.5-2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ โดยปริมาณอนุภาคนาโนทองที่ใช้สังเคราะห์ลงบน MCF เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ต่อ MCF 1 กรัม จากการทดสอบพบว่าอนุภาคนาโนทองนั้นกระจายตัวได้ดีในทุกๆวัสดุรองรับที่สังเคราะห์ได้สังเกตได้จากลูกศรสีแดง ซึ่งจะสามารถทำให้ MCF นั้นมีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดียิ่งขึ้น เนื่องจากทุกขนาดของวัสดุทั้ง 5 ชนิดที่นำมาปรับปรุงด้วยอนุภาคนาโนทองมีการกระจายตัวของอนุภาคนาโนทองที่ดี [23]

5.2 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในวัสดุตรึง

ในหัวข้อนี้ศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิกที่แตกต่างกัน 5 ชนิด โดยมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งมีขนาด $6 \times 5.2 \times 7.7$ นาโนเมตร ในแง่ของปริมาณที่ถูกตรึงได้ในแต่ละวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5.7



รูปที่ 5.7 ร้อยละของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิก ต่างชนิดกัน 5 ชนิด คือ โดยมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของ TMB/P123=0.5,1,1.5,2.5 และ 2.5 กับสารเติมแต่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

รูปที่ 5.7 แสดงปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ถูกตรึงเข้าไปในวัสดุเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิกที่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบจากสถานะเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ใช้ตรึงปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงใน MCF แต่ละชนิดที่มี

การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 จาก 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ผสมอยู่ด้วยนั้น มีปริมาณร้อยละ 42.2 48.2 52.5 69.7 และ 74.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลาย เมื่อพิจารณาความสามารถในการตรึงเอนไซม์ของวัสดุที่ทั้ง 5 ชนิด เปรียบเทียบกันแล้วพบว่า MCF ที่มีอัตราส่วนของ TMB/P123 สูงสุดคือ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์จะให้ปริมาณของการตรึงเอนไซม์ที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอื่นๆ โดยสันนิษฐานว่าขนาดของรูพรุนที่ใหญ่ที่สุดจะทำให้เอนไซม์ที่มีขนาด $6 \times 5.2 \times 7.7$ นาโนเมตร สามารถที่จะเข้าไปถูกตรึงอยู่ในวัสดุได้มากกว่าเมื่อเทียบกับวัสดุที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าซึ่งสามารถสังเกตได้จากตารางที่ 5.1 ดังที่เคยกล่าวมา เนื่องจากการที่มีปริมาตรของรูพรุนเพิ่มมากขึ้นจะสามารถทำให้ตรึงเอนไซม์ได้มากกว่า อีกทั้งการที่ขนาดของหน้าต่งใหญ่ขึ้นจนถึงใหญ่กว่าขนาดของเอนไซม์นั้นอาจจะไม่ได้ช่วยเพิ่มการตรึงเอนไซม์มากนักโดยสามารถสังเกตได้จากอัตราส่วนเชิงน้ำหนัก TMB/P123 ที่ 2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ จากรูป 5.8 ซึ่งมีขนาดของหน้าต่งระหว่างรูพรุนของวัสดุ 2 ชนิด คือ 9.27 และ 19.13 นาโนเมตร ซึ่งใหญ่กว่าเอนไซม์ $6 \times 5.2 \times 7.7$ นาโนเมตร จากข้อมูลตารางที่ 5.1 โดยปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกตรึงลงบนวัสดุนั้นเพิ่มขึ้นจากการที่ไม่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์เพียงร้อยละ 11.04 เท่านั้น เพราะฉะนั้นการที่มีขนาดของหน้าต่งใหญ่กว่าขนาดของเอนไซม์แล้วนั้น ช่วยให้เกิดการตรึงเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น

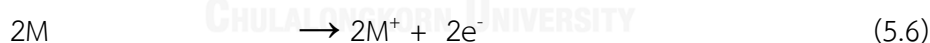
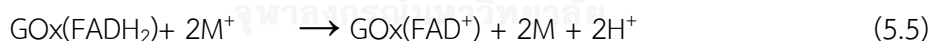
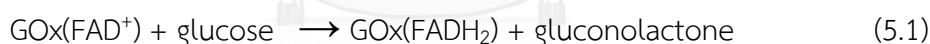
เมื่อมีการนำมาสังเคราะห์ทองเพิ่มเพื่อให้เกิดการนำไฟฟ้าที่ดีขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนวัสดุเมโซเซลลูลาร์โพรพิลิกามากขึ้นด้วยเช่นกัน โดยสามารถสังเกตได้จากรูปที่ 5.8 ที่มีอัตราส่วนของ TMB/P123 จาก 0.5 ไปจนถึง 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ โดยมีการนำอนุภาคนาโนทองมาสังเคราะห์ในปริมาณ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะทำให้ปริมาณการตรึงเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นจากเดิมขณะที่ยังไม่มีอนุภาคทองเป็นร้อยละ 11.4 8.5 5.14 3.4 และ 7.62 ตามลำดับ โดยจากผล BET ดังตารางที่ 5.2 จะเห็นได้ถึงถึงการลดลงพื้นที่ผิวของกรณีที่อนุภาคนาโนทองแต่ทำให้การตรึงเอนไซม์กลับตรึงได้มากขึ้นนั้นอาจจะหมายความว่าพื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนทองมีความสามารถในการดูดซับเอนไซม์ได้ดีกว่าพื้นที่ผิวของ MCF เพราะฉะนั้นการที่มีทองอาจจะช่วยให้เกิดการดูดซับของเอนไซม์ลงบนพื้นผิวของวัสดุได้ดีมากยิ่งขึ้น เนื่องจากอนุภาคนาโนทองสามารถเข้ากับสารจำพวกชีวโมเลกุลได้ดี [23,59]

5.3 อิทธิพลของ MCF/AuNPs ต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไบโอเซนเซอร์

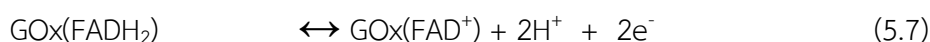
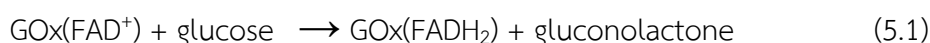
หัวข้อนี้ศึกษาอิทธิพลของอิเล็กโทรดดัดแปลงชนิด MCF/AuNP ต่อประสิทธิภาพการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ โดยกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1 มีการใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับและส่งอิเล็กตรอน (natural mediator) โดยกระแสออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของกลูโคสซึ่งสามารถวัดได้จากการวัดปริมาณออกซิเจนหรือปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นไปตามสมการ 5.1-5.4 [5] แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของออกซิเจนมีความผันผวนในกระแสเลือด จึงทำให้อาจเกิดความไม่แม่นยำในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาล [5]

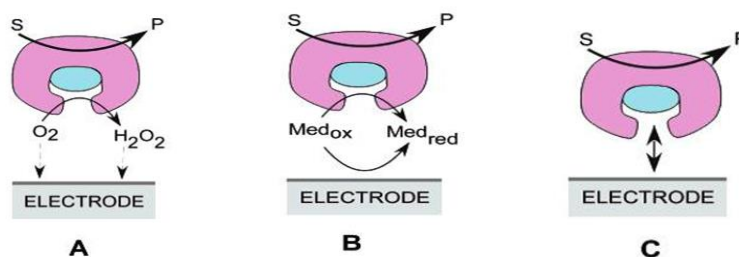


จึงมีการพัฒนามาเป็นกลูโคสเซนเซอร์รุ่นที่ 2 ซึ่งใช้ตัวกลางรับและส่งอิเล็กตรอนชนิดสังเคราะห์ (artificial electron mediator) อย่างเช่น เฟอร์โรซีน (ferrocene) [5] เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามตัวกลางสังเคราะห์จะต้องมีประสิทธิภาพในการรับและส่งถ่ายอิเล็กตรอนที่ว่องไวกว่าออกซิเจนที่อยู่ในระบบเดียวกัน เพื่อที่จะลดการแข่งขันของออกซิเจนที่พร้อมรับอิเล็กตรอนจาก GOx(FAD) เช่นกัน ดังนั้นการตรวจวัดน้ำตาลยังคงขาดความแม่นยำ ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 2 แสดงได้ดังสมการที่ 5.1 5.5 และ 5.6 [5]



โดยในงานวิจัยนี้จึงได้พยายามสร้างกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 คือ การถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงจากเอนไซม์ไปยังอิเล็กโทรดเพื่อนำไปสู่ความว่องไวและความแม่นยำต่อการตรวจวัดกลูโคสตามสมการที่ 5.1 และ 5.7 [5]



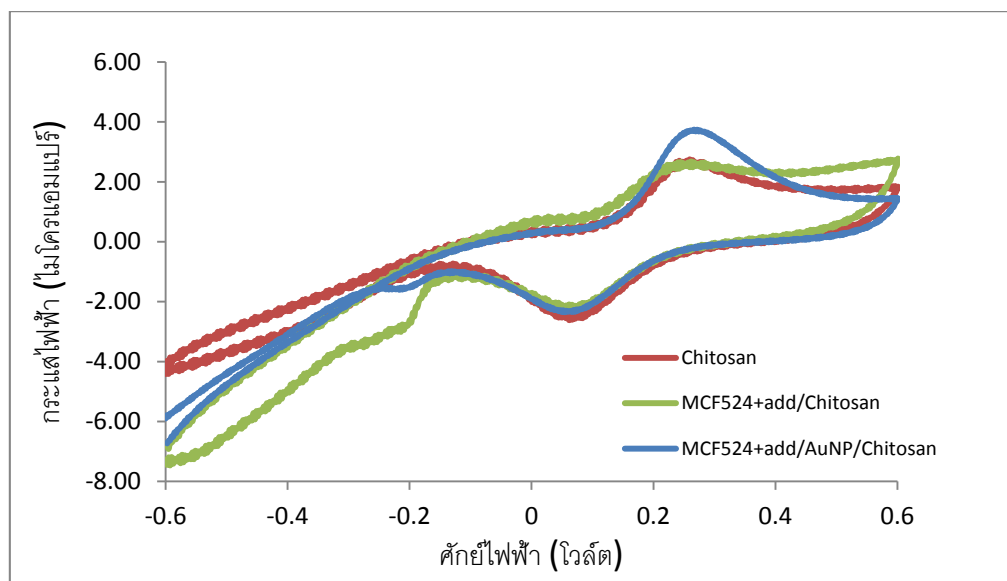


รูปที่ 5.8 เปรียบเทียบกลไกการเกิดของกลูโคสไบโอเซนเซอร์ในแต่ละรุ่น จากรุ่นที่ (A) 1 (B) 2 และ (C) 3 [5]

รูปที่ 5.8 แสดงให้เห็นว่ากลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง โดยงานวิจัยนี้คาดว่า การเปลี่ยนแปลงของขนาดของรูพรุนของวัสดุรองรับ 5 ชนิด อาจทำให้เกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 เพราะจากที่ได้วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของวัสดุที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 5 ชนิด มีลักษณะที่แตกต่างกันในแง่ของขนาดของรูพรุนซึ่งมีอิทธิพลต่อการบรรจุเอนไซม์ อีกทั้งอาจจะส่งผลในแง่ของการแพร่ของสารตั้งต้นเนื่องจากมีขนาดรูพรุนและขนาดของหน้าตัดที่แตกต่างกัน หรืออาจทำให้เกิดการปิดตัวของเอนไซม์ในทิศทางที่ทำให้ $FAD^+/FADH_2$ ถูกแยกออกและอาจจะทำให้ระยะทางการส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์และอิเล็กโทรดสั้นลง

5.3.1 การศึกษาพฤติกรรมของอิเล็กโทรดในระบบปราศจากออกซิเจน (nitrogen saturation)

สำหรับในหัวข้อนี้จะศึกษาพฤติกรรมของแต่ละอิเล็กโทรดในการนำไฟฟ้า เพื่อทดสอบความแตกต่างที่เกิดขึ้น โดยสังเกตจากการตอบสนองของแต่ละอิเล็กโทรดที่ดัดแปลง ในรูปของสัญญาณไฟฟ้าด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี เมื่อทำการดัดแปลงอิเล็กโทรดต่างชนิดกัน 3 ชนิด คือ 1.chitosan 2.MCF524+add/chitosan 3.MCF524+add/AuNP/Chitosan ตามรูปที่ 5.9 ในสถานะที่ปราศจากออกซิเจนและไม่มีกลูโคส โดยสันนิษฐานว่าการที่มีอนุภาคนาโนทองมาช่วยอาจจะทำให้เกิดการนำไฟฟ้าได้ดียิ่งขึ้น

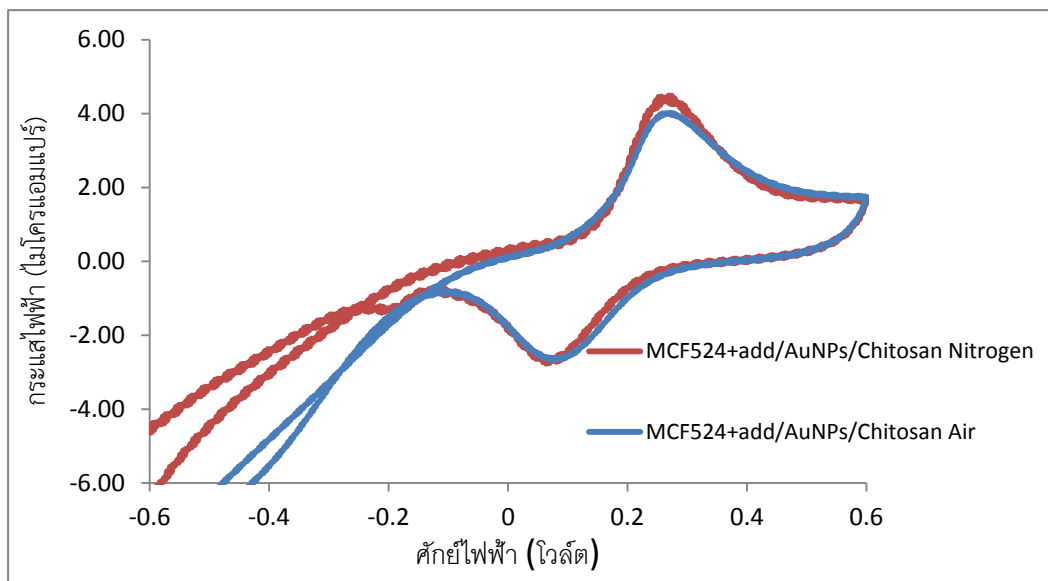


รูปที่ 5.9 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่ระบบอิมมูตด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

จากรูปที่ 5.9 แสดงผลการทดลองด้วยเทคนิค CV ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ระบบปราศจากออกซิเจนและไม่มีกลูโคส พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงทั้ง 3 ชนิด เกิดรีดอกซ์และออกซิเดชันพีคต่างๆที่ไม่มีเอนไซม์ในระบบ แสดงว่าในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ทำการศึกษาคือ -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ ที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดมีปฏิกิริยารีดอกซ์เกิดขึ้น แต่พีคออกซิเดชันที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโทรดทั้ง 3 แบบ คือ MCF/524+add/AuNP/Chitosan แต่อย่างไรก็ตามพีคที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากผลของฟิล์มทองที่อยู่บนอิเล็กโทรดแบบปรินต์เซอร์คิตบอร์ด (Au-PCB) ที่ค่อนข้างว่องไวต่อกระแสไฟฟ้า เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าการที่มีอนุภาคนาโนทองช่วยนำไฟฟ้าได้ดีขึ้นในส่วนของพีคออกซิเดชัน

5.3.2 อิทธิพลของออกซิเจนต่ออิเล็กโทรดดัดแปลง

ในหัวข้อนี้ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนต่อพฤติกรรมทางไฟฟ้าเคมีในระบบที่ปราศจากออกซิเจน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นและเปรียบเทียบกับระบบที่ปราศจากออกซิเจน เพื่อศึกษาผลของออกซิเจนที่มีต่ออิเล็กโทรดดัดแปลง โดยการทดลองนี้จะเลือกใช้อิเล็กโทรด MCF524+add/AuNP/Chitosan เป็นตัวแทน



รูปที่ 5.10 ไชคคลิกโวลแทมโมแกรมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่ระบบอิมมูตด้วยก๊าซไนโตรเจน (เส้นสีแดง) และอากาศ (สีน้ำเงิน) โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

จากรูปที่ 5.10 พบว่าอิเล็กโทรดดัดแปลงที่ใช้ในระบบอิมมูตด้วยออกซิเจนให้พีคของออกซิเดชันที่ต่ำกว่าไม่มากนักและในส่วนของพีครีดักชันแทบจะไม่เปลี่ยนแปลง เพราะฉะนั้นการที่เราจะใช้ MCF/AuNP/Chitosan ในทั้งสอระบบไม่มีผลต่อการตรวจวัดในพีค reversible redox เนื่องจากต่างกันน้อยมาก แต่เมื่อสังเกตศักย์ไฟฟ้า -0.2 โวลต์ ระบบอิมมูตด้วยก๊าซไนโตรเจนกลับเกิดพีครีดักชันอีกพีคขึ้นมา โดยที่พีคที่พบเพิ่มเติมเป็นพีคอะไรยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งอาจจะเป็นสัญญาณรบกวนที่เกิดขึ้นในระบบ เพราะฉะนั้นการใช้ระบบที่มีออกซิเจนไม่ส่งผลต่อกระแสไฟฟ้าเมื่อมีการใช้อิเล็กโทรดดัดแปลงชนิด MCF/AuNP/Chitosan ซึ่งแสดงว่าในช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนไม่ได้ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนในระบบ

5.3.3 อิทธิพลของชนิดอิเล็กโทรดดัดแปลงต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง (direct electron transfer ; DET)

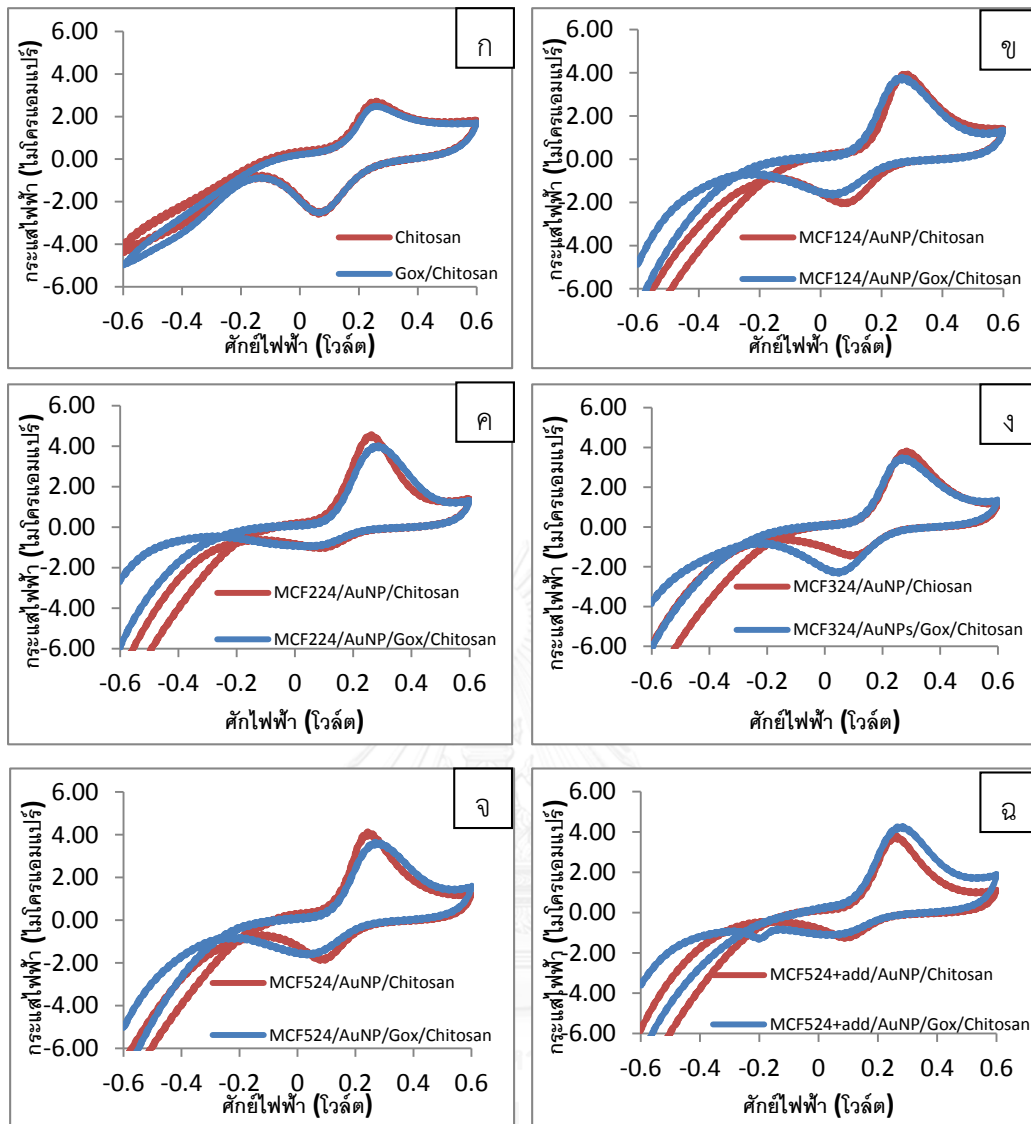
สำหรับในหัวข้อนี้จะทำการแสดงผลของการศึกษาพฤติกรรมการถ่ายเทอิเล็กตรอนของแต่ละอิเล็กโทรดเมื่อมีการตรึง GOx ลงบนวัสดุที่สังเคราะห์ได้ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและกลูโคส โดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงหมายถึงมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ไปยังพื้นผิวอิเล็กโทรดโดยไม่มีการผ่านตัวกลาง ซึ่งถ้ามีโอกาสที่จะเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้นั้นแสดง

ว่ามีโอกาสที่จะพัฒนาไกลโคสไปโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 เพื่อให้เกิดความไวและความจำเพาะต่อการตรวจวัดไกลโคสที่มากขึ้น โดยในการทดลองนี้จะสังเกตจากการตอบสนองของแต่ละอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงในรูปของสัญญาณไฟฟ้าด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรีของแต่ละอิเล็กโทรดเพื่อเปรียบเทียบวัสดุที่มีการตรึงเอนไซม์และไม่ตรึงเอนไซม์ และถ้าหากเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้นั้นวัสดุที่มีการตรึงเอนไซม์ควรมีกระแสไฟฟ้าทั้งออกซิเดชันและรีดักชันพีคที่มากขึ้น ซึ่งเป็นไปตามสมการที่ 5.7 เพราะฉะนั้นอิเล็กโทรดแต่ละชนิดที่มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันเช่น ขนาดรูพรุนหรือหน้าตาต่าง เป็นต้น อาจส่งผลต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้ ดังรูปที่ 5.11

จากผลการทดสอบอิเล็กโทรดดัดแปลงในรูปที่ 5.11ก แสดงให้เห็นว่าการทดสอบของอิเล็กโทรดที่มี chitosan และ GOx/Chitosan ในสภาวะสารละลายบัฟเฟอร์ระบบปราศจากออกซิเจนไม่ทำให้พีคออกซิเดชันและรีดักชันเกิดความต่างกัน เพราะฉะนั้น GOx ที่อยู่บนอิเล็กโทรดไม่สามารถที่จะถ่ายเทอิเล็กตรอนได้โดยตรง เนื่องจากเมื่อเอนไซม์ถูกตรึงลงบนผิวหน้าอิเล็กโทรดโดยตรงอาจจะทำให้เอนไซม์เกิดการเสียเสถียรภาพได้ซึ่งอาจทำให้ FAD ที่เป็นตัวรับและส่งอิเล็กตรอนไม่สามารถที่จะทำงานได้ [51]

ดังนั้นจึงทำการดัดแปลงอิเล็กโทรดแบบต่างชนิดกัน 5 ชนิด เพื่อศึกษาความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงเมื่อมีการนำวัสดุที่สังเคราะห์ได้ (MCF/AuNP) มาใช้ตรึงเอนไซม์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นกับวัสดุที่ไม่มีการตรึงเอนไซม์ โดยรูปที่ 5.11ข-ฉ เป็นการเปรียบเทียบกันระหว่างวัสดุที่ตรึงและไม่ตรึงเอนไซม์ ซึ่งจากผลที่ได้พีคออกซิเดชันและรีดักชันไม่ต่างกันมากนัก เพราะฉะนั้นพีคที่เกิดขึ้นอาจจะไม่ได้มาจาก GOx แต่อาจจะเป็นผลของปฏิกิริยาหนึ่งที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรดที่ทำให้มีพีคออกซิเดชันและรีดักชันเกิดขึ้น

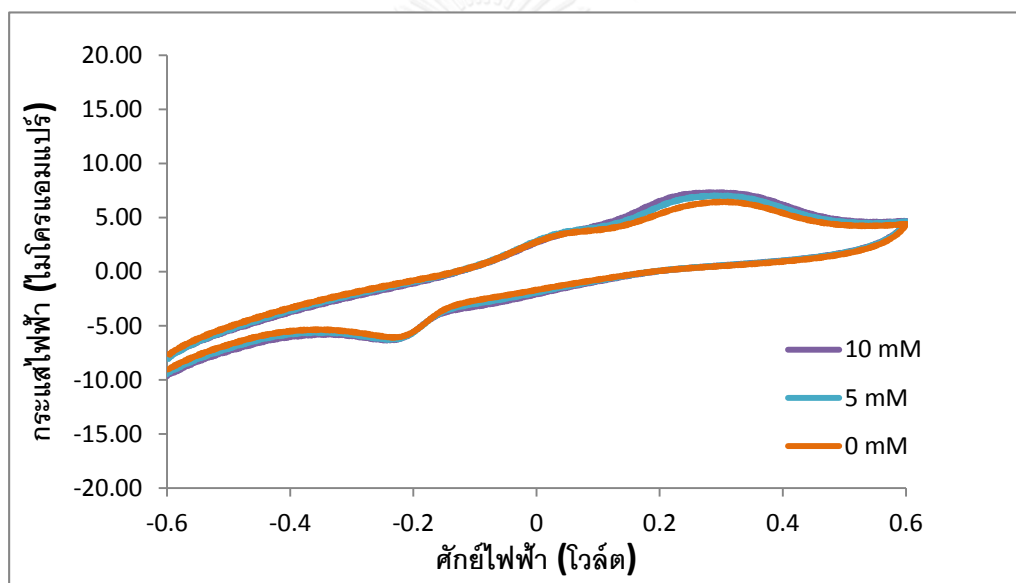
จากการทดลองข้างต้นจึงสรุปได้ว่าการที่มีวัสดุ MCF/AuNP นำมาใช้เป็นตัวรองรับของ GOx ไม่ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง (Direct electron transfer) เพราะแท้จริงแล้วถ้าเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงได้จะทำให้พีคออกซิเดชันและรีดักชันควรจะสูงขึ้นเนื่องจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ไปยังอิเล็กโทรดได้ ดังสมการที่ 5.7 [51] อีกทั้งการที่มีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของพีครีดักชันและออกซิเดชันเช่นกัน เพราะฉะนั้นการที่มีขนาดรูพรุนและหน้าตาที่ใหญ่ขึ้นไม่ผลต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง



รูปที่ 5.11 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่ระบบอิมิตัวด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ก) การเปรียบเทียบ chitosan และ GOx/Chitosan และ ข-ฉ เป็นการเปรียบเทียบวัสดุแบบมี GOx และไม่มี GOx ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ข) 0.5 ค) 1.0 ง) 1.5 จ) 2.5 ฉ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์

5.3.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการทำงานของไบโอเซนเซอร์ในระบบปราศจากออกซิเจนด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี

จากหัวข้อที่แล้วเป็นการทดสอบการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงซึ่งผลที่ได้นั้นไม่พบการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงจากเอนไซม์มายังอิเล็กโทรด ในการทดลองนี้จึงเป็นการทดสอบกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าแท้จริงแล้วมีหรือไม่มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรง เพราะถ้าหากสามารถที่จะเกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 ได้ นั่น กระแสไฟฟ้าส่วนของออกซิเดชันต้องเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในระบบที่ปราศจากออกซิเจนดังสมการที่ 5.6 และ 5.7 โดยการทดลองนี้ใช้อิเล็กโทรดดัดแปลงชนิด MCF524+add/AuNP/GOx/Chitosan ด้วยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี ในสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะปราศจากออกซิเจน ดังรูปที่ 5.12



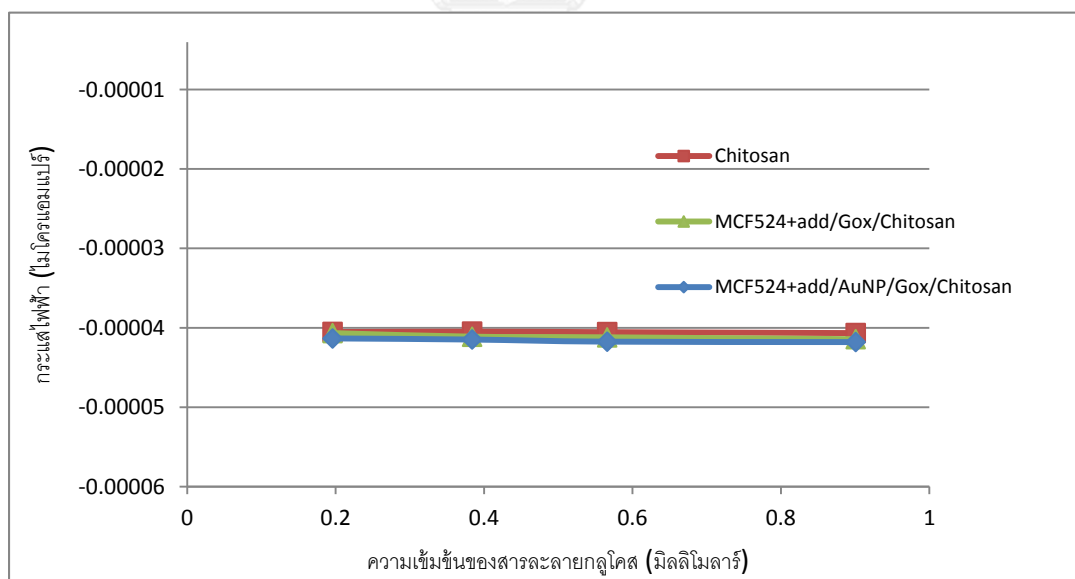
รูปที่ 5.12 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมในสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในระบบอิมมูโนด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที

จากรูปที่ 5.12 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเกิดของกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 ผลปรากฏว่าเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสแล้วพีครีดักชันและพีคออกซิเดชันไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน ซึ่งในความเป็นจริงแล้วหากมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงระหว่างเอนไซม์และอิเล็กโทรด กระแสไฟฟ้าในส่วนของ พีคออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ $GOx(FADH_2)$ เมื่อปริมาณของกลูโคสเพิ่มขึ้น (สมการที่ 5.6 และ 5.7) [51] แต่ไม่เป็นเช่นนั้น เพราะฉะนั้นวัสดุ

MCF/AuNP/GOx/Chitosan ไม่สามารถทำให้เกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีการทำทดสอบทางไฟฟ้าเคมีด้วยวิธีแอมโพรอเมตรีด้วยศักย์ไฟฟ้าที่คงที่เพื่อยืนยันให้แน่ชัดว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสในระบบที่ปราศจากออกซิเจน

5.3.5 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการตอบสนองทางกระแสไฟฟ้าด้วยวิธีแอมโพรอเมตรี

ในการทดลองนี้เป็นการทดสอบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสด้วยวิธีแอมโพรอเมตรีเนื่องจากวิธีแอมโพรอเมตรีเป็นการวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีที่มีการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ค่าหนึ่งโดยใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.259 โวลต์ ค่าศักย์ไฟฟ้าง่าวนำมาจากไซคลิกโวลแอมเมตรีที่พีคออกซิเดชันในระบบก๊าซไนโตรเจนที่ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลจาก รูปที่ 5.12 ซึ่งจะวัดออกมาในรูปของสัญญาณของค่ากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเวลาในขณะที่เกิดปฏิกิริยา โดยถ้าเกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 นั้น จะต้องมีการกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกันในระบบที่ปราศจากออกซิเจน โดยการใช้อิเล็กโทรดดัดแปลง 3 ชนิด คือ 1.Chitosan 2 .MCF524+add/AuNP/GOx/Chitosan และ 3.MCF524+add/GOx/Chitosan (TMB/P123 = 2.5 ที่มีแอมโมเนียมพลูออไรด์) ในสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 และ 0.9 มิลลิโมลาร์ ในสถานะอิ่มตัวด้วยก๊าซไนโตรเจน ดังรูปที่ 5.13



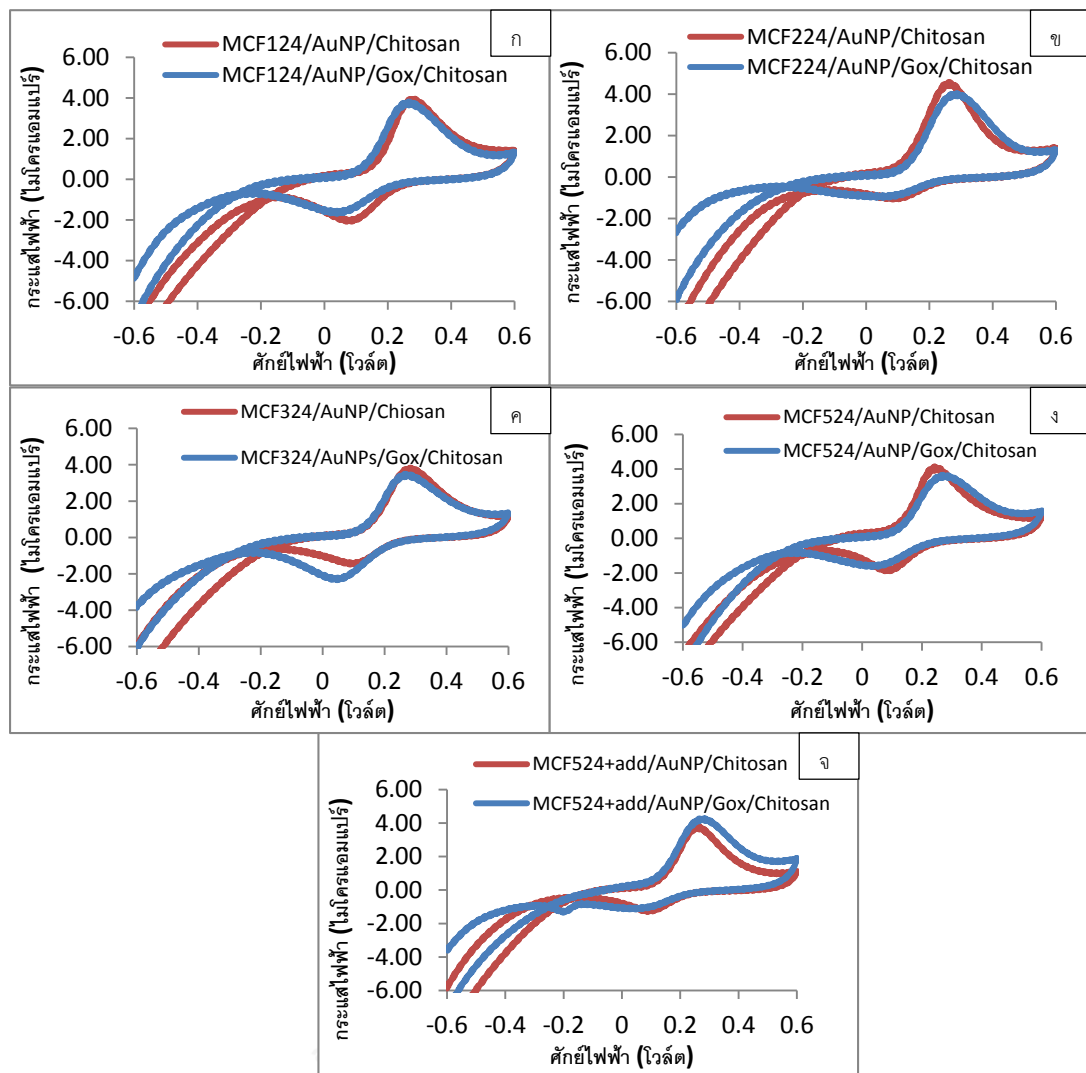
รูปที่ 5.13 ผลการตรวจวัดสารละลายกลูโคสชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆในแต่ละวัสดุในระบบอิ่มตัวด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.259 โวลต์

จากรูปที่ 5.13 ได้ทำการทดสอบในระบบที่อิมมัลด้วยก๊าซไนโตรเจนกับวัสดุที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดแบบมีอนุภาคนาโนทองและไม่มีอนุภาคนาโนทองเพื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคส พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสแล้ว ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในอิเล็กโทรดทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากอาจจะไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสในระบบที่อิมมัลด้วยก๊าซไนโตรเจนจึงทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้า เพราะฉะนั้นอาจจะไม่เกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 จาก อิเล็กโทรดที่ได้ทำการดัดแปลง เนื่องจากการเกิดกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 3 กระแสไฟฟ้าจะเกิดมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของกลูโคสและต้องเกิดในสภาวะที่ไม่มีตัวกลางในการรับและส่งอิเล็กตรอนซึ่งเป็นไปตามสมการที่ 5.7 [51]

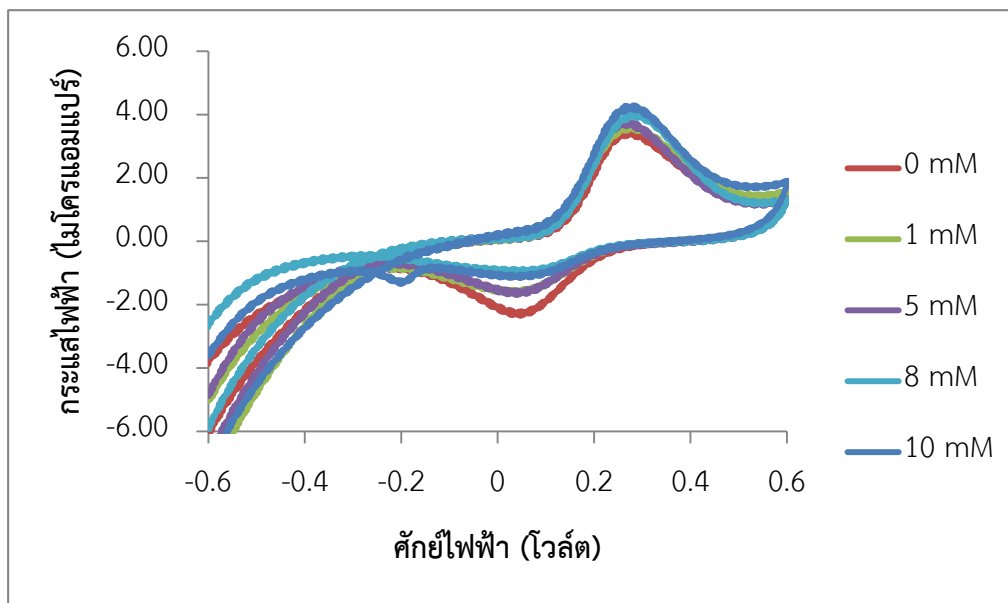
5.3.6 อิทธิพลของอิเล็กโทรดดัดแปลงต่อกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1

ในหัวข้อที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถสร้างกลูโคสเซ็นเซอร์รุ่นที่ 3 โดยการดัดแปลงอิเล็กโทรดด้วย MCF/AuNP ได้ ดังนั้นในหัวข้อนี้จึงจะทดสอบการทำงานของกลูโคสไบโอเซนเซอร์รุ่นที่ 1 ซึ่งมีออกซิเจนเป็นตัวกลางในการรับและส่งอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ไปยังอิเล็กโทรด เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเมื่อมีการตรึงเอนไซม์ลงบนวัสดุในสารละลายกลูโคสและอิมมัลด้วยอากาศ ซึ่งถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในส่วนของพีครีดักชันอาจจะหมายถึงมีการใช้ออกซิเจนในระบบ แสดงว่าเกิดการทำให้ปฏิกิริยาของกลูโคสเกิดขึ้น ซึ่งเป็นไปตามสมการที่ 5.1-5.4 โดยในการทดสอบผลของขนาดของรูพรุนได้ทำการเปรียบเทียบอิเล็กโทรด 5 ชนิดที่มีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน โดยการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 ที่ 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ ในสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในระบบอิมมัลด้วยอากาศ แสดงดังรูปที่ 5.14

โดยจากรูปที่ 5.14 ผลปรากฏว่าเกิดพีคของออกซิเดชันและรีดักชันที่ไม่ต่างกันมากระหว่างวัสดุที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ เพราะฉะนั้นปฏิกิริยาของกลูโคสอาจจะไม่สามารถที่จะเกิดขึ้นในระบบแบบอากาศโดยใช้ MCF/AuNP เป็นวัสดุรองรับ เพราะถ้าปฏิกิริยาสามารถที่จะเกิดขึ้นได้นั้นต้องเห็นการเปลี่ยนแปลงในวัสดุที่มีการตรึงเอนไซม์อยู่ ดังนั้นจึงได้ทำการนำวัสดุที่มีอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ 2.5 แบบมีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ซึ่งมีปริมาณการบรรจุเอนไซม์สูงสุดนำมาทำการทดสอบโดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส 5 ค่า คือ 0 1 5 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ ดังรูปที่ 5.15



รูปที่ 5.14 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมในสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ระบบอิมมูโนตัวด้วยอากาศ โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง -0.6 ถึง 0.6 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที โดยรูป 5.14ก-จ เป็นการเปรียบเทียบวัสดุแบบมี GOx และไม่มี GOx ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ ข) 0.5 ค) 1.0 ง) 1.5 จ) 2.5 ฉ) 2.5 ที่เติมแอมโมเนียมฟลูออไรด์

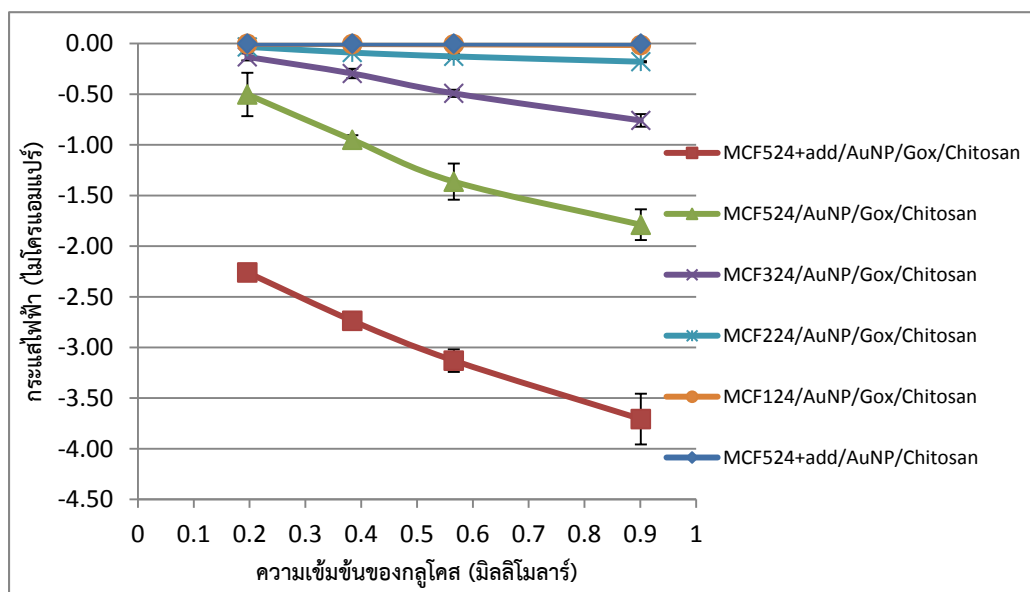


รูปที่ 5. 15 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของวัสดุ MCF524+add/AuNP/GOx/Chitosan ซึ่งมีอัตราส่วน โดยมวลของ TMB/P123 เท่ากับ 2.5 แบบมีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ โดยมีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0 1 5 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในระบบอิมมูต้าวด้วยอากาศ ด้วยอัตราการสแกนที่ 50 มิลลิโวลต์ ต่อวินาที ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้า -0.6 ถึง 0.6 โวลต์

จากรูปที่ 5.15 ผลปรากฏว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสจาก 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ พีคของออกซิเดชันสูงขึ้นเล็กน้อยและพีคของรีดักชันลดลงเรื่อยๆ โดยการลดลงของพีค รีดักชันที่ลดลงเรื่อยๆนั้นเนื่องจากการใช้ของออกซิเจนที่มีปริมาณลดลงเมื่อเกิดปฏิกิริยาของ กลูโคสกับ GOx ดังสมการที่ 5.1-5.4 เพราะฉะนั้นการใช้ MCF/AuNP มาเป็นตัวรองรับ GOx เมื่อมี การใส่สารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพีครีดักชันที่ชัดเจนที่ ศักย์ไฟฟ้า 0.064 โวลต์ ดังนั้นในขั้นตอนถัดไปจึงจะทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ กลูโคสเพื่อดูความแตกต่างกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในแต่ละวัสดุและนำไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ แต่ละวัสดุที่มีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน

5.3.7 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกลูโคส

ในขั้นตอนนี้ได้ทำทดสอบความไวของของอิลคโตรดดัดแปลงแต่ละ ชนิดต่อกลูโคสและค่าการตรวจวัดที่ต่ำที่สุดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุที่มีขนาดของรูพรุน ที่แตกต่างกัน โดยจะทำการเปรียบเทียบอิลคโตรดดัดแปลง 5 ชนิด ที่มีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีแอมโพรเมตรีใช้ศักย์ไฟฟ้าขนาด 0.064 โวลต์ ศักย์ไฟฟ้างกล่าวมาจากศักย์ไฟฟ้าที่เกิด พีครีดักชันของรูปที่ 5.15 ในระบบที่อิมมูต้าวด้วยอากาศ



รูปที่ 5. 16 ผลการตรวจวัดสารละลายกลูโคสชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆในแต่ละวัสดุในระบบอิมมูโนตัวด้วยอากาศ โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.064 โวลต์

จากรูปที่ 5.16 ได้ทำการทดสอบการตรวจวัดสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 และ 0.9 มิลลิโมลาร์ กับวัสดุที่สังเคราะห์ได้ชนิดต่างๆพบว่า MCF524+add/AuNP/GOX/Chitosan นั้นให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองมากที่สุดเมื่อเทียบกับอิเล็กโทรดชนิดอื่นๆ เพราะว่าอาจจะเกิดจากการที่มีขนาดรูพรุนและหน้าตัดที่ใหญ่ขึ้นทำให้เกิดการแพร่ของสารละลายกลูโคสเข้าไปหาตัวเอนไซม์ได้ง่ายกว่าวัสดุชนิดอื่นๆที่มีขนาดรูพรุนและหน้าตัดที่เล็กกว่า และอาจจะเกิดจากการที่มีปริมาณเอนไซม์ที่สูงทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าอิเล็กโทรดชนิดอื่นๆ อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกรณีมีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ของ MCF524+add/AuNP แล้วผลปรากฏว่าอิเล็กโทรดที่ดัดแปลงกรณีที่ไม่มีเอนไซม์นั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆของกระแส ซึ่งทำให้มั่นใจว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมาจากการทำปฏิกิริยาของกลูโคสและเอนไซม์โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับและส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังอิเล็กโทรด

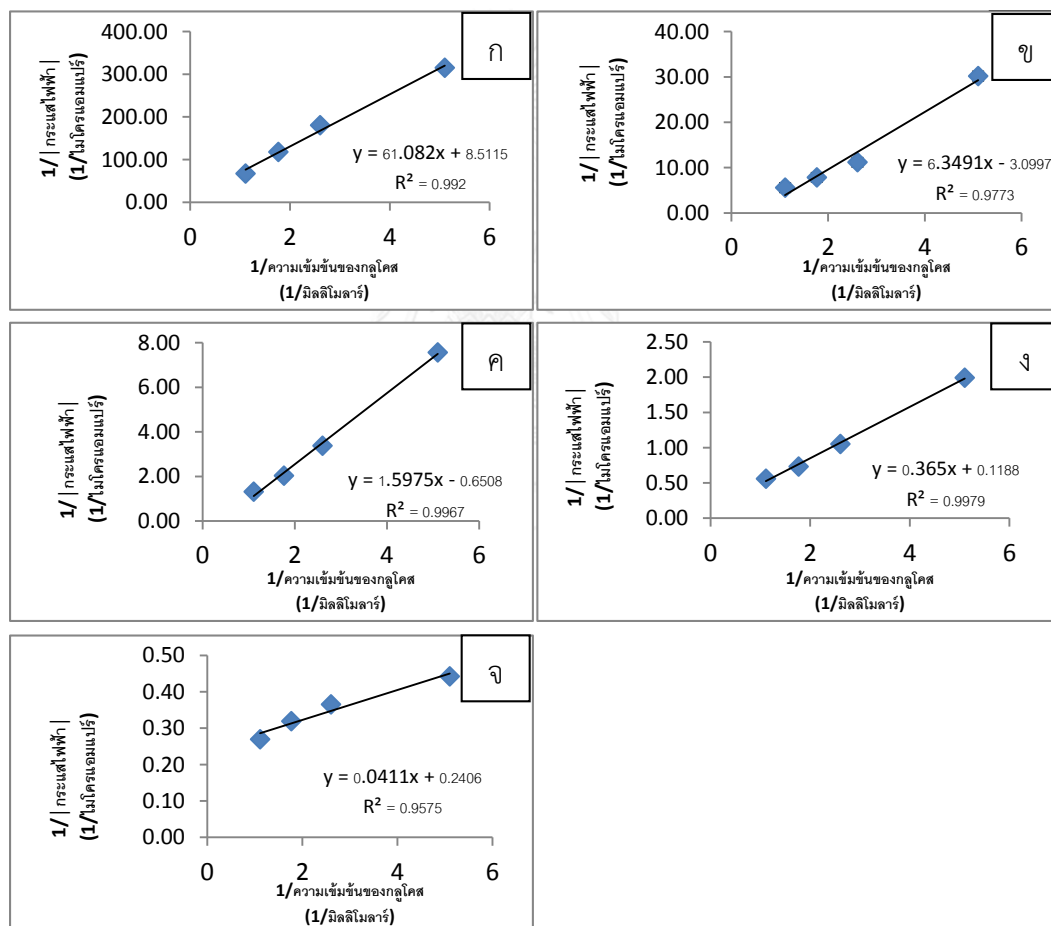
ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นกับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่สอดคล้องกับ Michaelis-Menten kinetics เมื่อใช้หลักการของ Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่าค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) ดังสมการที่ 5.8

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (5.8)$$

เมื่อ V คือ กระแสไฟฟ้า หน่วย ไมโครแอมแปร์

S คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น หน่วยมิลลิโมลาร์

ซึ่งจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ และ $1/[S]$ จะได้ค่า V_m และ K_m จะได้ดังรูปที่ 5.17



รูปที่ 5. 17 Lineweaver-Burk plot เพื่อหาค่าคงที่ของ การเกิดปฏิกิริยา (K_m) โดยมีวัสดุที่มีอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 คือ ก.) 0.5 ข.) 1.0 ค.) 1.5 ง.) 2.5 และ จ.) 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์

ตารางที่ 5. 3 การเปรียบเทียบค่า Michaelis–Menten (M–M) constant (Km) และ Vm ของแต่ละอิเล็กโทรดดัดแปลง

วัสดุ	Km (มิลลิโมลาร์)	Vm (ไมโครแอมแปร์)
MCF124/AuNP/Gox/Chitosan	7.17	0.12
MCF224/AuNP/Gox/Chitosan	2.05	0.32
MCF324/AuNP/Gox/Chitosan	2.45	1.54
MCF524/AuNP/Gox/Chitosan	3.07	8.42
MCF524+add/AuNP/Gox/Chitosan	0.17	4.16

ตารางที่ 5.3 นั้นมาจากการพลอตกราฟข้างต้นซึ่งจะหาค่า Km และ Vm ได้ แสดงให้เห็นว่า MCF524+add/AuNP/GOX/Chitosan (TMB/P123 = 2.5 ที่มีแอมโมเนียมพลูออไรด์) ให้ค่า Km ที่ต่ำที่สุด คือ 0.17 มิลลิโมลาร์ โดยค่า Km สามารถหาได้จากการพลอตสมการ Lineweaver–Burk (1/กระแสไฟฟ้า กับ 1/ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส) โดยยิ่งค่า Km น้อยยิ่งดี เพราะบ่งบอกการจำกัดของการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer limitation) ที่ต่ำซึ่งทำให้สารตั้งต้นแพร่เข้าไปได้ดียิ่งขึ้น [66] โดยสังเกตว่า MCF124/AuNP/GOX/Chitosan (TMB/P123 = 0.5) ที่มีรูพรุนขนาดเล็กที่สุดได้ค่า Km ที่มากที่สุดแต่เมื่อขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จนถึง MCF524/AuNP/GOX/Chitosan (TMB/P123 = 2.5) จะเห็นว่าค่าไม่ต่างกันมาก เพราะฉะนั้นการที่มีรูพรุนขนาดใหญ่จนถึงระดับหนึ่งอาจจะไม่ส่งผลให้มีความสามารถในการถ่ายเทมวลสารที่ดีขึ้นมาก แต่เมื่อขนาดของหน้าตาของวัสดุเพิ่มขึ้น (MCF524+add/AuNP/GOX/Chitosan) นั้นทำให้ Km ต่ำที่สุด เพราะฉะนั้นการที่มีขนาดของหน้าตาใหญ่ขึ้นจะทำให้สารตั้งต้นแพร่เข้าไปได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตจากค่า Vm ของวัสดุที่มีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่ 0.5 ถึง 2.5 เห็นได้ชัดเลยว่าเมื่ออัตราส่วนโดยมวลมากขึ้นทำให้ขนาดของรูพรุนกว้างมากขึ้นและทำให้มีปริมาณเอนไซม์ถูกบรรจุในวัสดุตรงได้มากขึ้นจะส่งผลให้มีกระแสไฟฟ้าที่สูงขึ้นเช่นกัน นั่นหมายความว่ายังมีปริมาณเอนไซม์มากยิ่งขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาได้มาก ณ เวลานั้นๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่เมื่อวัสดุที่มีปริมาณเอนไซม์ที่สูงที่สุดของอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 เท่ากับ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมพลูออไรด์ นั้นกลับให้ค่า Vm ที่ต่ำกว่าวัสดุ TMB/P123 = 2.5 นั่นหมายความว่าการที่มีเอนไซม์ที่มากอาจจะไม่ได้ดีที่สุดเพราะอาจจะเกิดจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงนั้นไปบดบังกันและกัน ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ที่อยู่ในวัสดุนั้นไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของเอนไซม์ที่ถูกบรรจุอยู่ภายในกึ่งกลางของรูพรุน ดังนั้นการที่มีขนาดหน้าตาที่ใหญ่มากขึ้นจะส่งผลต่อการถ่ายเทมวลสารที่อยู่ภายในวัสดุรับรองที่ได้สังเคราะห์ดีแต่อาจจะไม่ได้ทำให้เกิดอัตราการปฏิกิริยาสูงที่สุด เพราะฉะนั้นการเลือกใช้วัสดุขึ้นอยู่กับงานที่จะนำไปใช้

ว่าต้องการปริมาณเอนไซม์สูงสุด หรือต้องการให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุด และเมื่อเทียบค่า Km ของงานวิจัยนี้ เท่ากับ 0.17 มิลลิโมลาร์ กับงานวิจัยของ Yu-Chen Tsai และคณะ ใช้ ท่อนาโนคาร์บอน-อะลูมินาที่ไปอยู่บนซิลิกา (MWCNT-alumina-coated silica [64] มาตรึงเอนไซม์ ซึ่งได้ค่า Km เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งค่า Km ของงานวิจัยนี้น้อยกว่า และงานวิจัยของ Ruo Yuan และคณะ [62] ที่ใช้ อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์และท่อนาโนคาร์บอน (ZnO nanoparticle and MWCNT) มาตรึงเอนไซม์ มีค่า Km เท่ากับ 2.48 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่างานวิจัยนี้เช่นกัน

ตารางที่ 5. 4 เปรียบเทียบอิลคโทรดดัดแปลงเพื่อวัดสารละลายกลูโคส

วัสดุที่สังเคราะห์ได้	ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (lower of detection limit), (ไมโครโมลาร์)
MCF124/AuNP/Gox/Chitosan	0.257
MCF224/AuNP/Gox/Chitosan	0.091
MCF324/AuNP/Gox/Chitosan	0.021
MCF524/AuNP/Gox/Chitosan	0.01
MCF524+add/AuNP/Gox/Chitosan	0.009

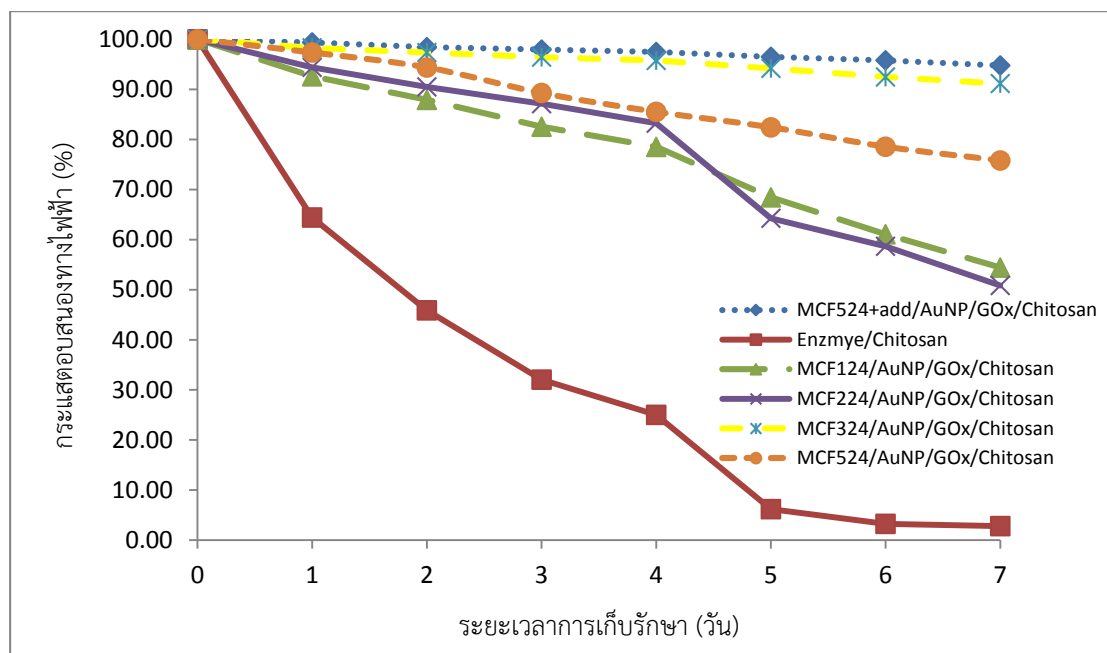
จากตารางที่ 5.4 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection) ซึ่งคำนวณจากสูตร $3(S.D.)/sensitivity$ เมื่อ S.D. คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลการวัดที่ค่าความเข้มข้นกลูโคส 0.2 มิลลิโมลาร์ (n=3) โดยค่าที่ได้เป็นไปตามตารางที่ 5.4 จะเห็นได้ว่ายังมีขนาดของรูพรุนและหน้าต่ามากขึ้นจะให้ผลของความไวในการตรวจวัดที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพราะฉะนั้นขนาดของรูพรุนและหน้าต่ามากเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การตรวจวัดดีขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบจากวัสดุทั้ง 5 ชนิด วัสดุที่มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่มีค่า LOD ที่ต่ำที่สุด ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้นของกลูโคสต่ำๆได้ดีเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ดังตารางที่ 5.5 จะเห็นว่างานวิจัยนี้สามารถวัดน้ำตาลในช่วงต่ำๆได้ดีเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น เพราะสามารถที่จะได้ถึงขนาด 0.009 ไมโครโมลาร์ โดยปกติระดับน้ำตาลในเลือดของคนที่เป็นเบาหวานจะอยู่ในช่วง 4.4-6.6 มิลลิโมลาร์ ซึ่งงานวิจัยนี้นั้นยังคงต้องมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นไปในแง่ของช่วงคนที่เป็นน้ำตาลเบาหวานเพราะงานวิจัยนี้ทำในช่วงที่ค่อนข้างต่ำคือ 0.196-0.901 มิลลิโมลาร์ ซึ่งยังไม่ใช่ค่าที่แท้จริงเพราะที่ทำการทดลองยังไม่พบช่วงที่เบี่ยงเบนจากเส้นตรง แต่ยังคงสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาต่อไปได้ในอนาคต

ตารางที่ 5. 5 การเปรียบเทียบอิเล็กโทรดดัดแปลงในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

อิเล็กโทรดดัดแปลง	ช่วงของความเข้มข้นที่สามารถวัดได้ (linear range) (มิลลิโมลาร์)	ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (lower of detection limit) (มิลลิโมลาร์)	อ้างอิง (reference)
Au-PCB/MCF/AuNP/Gox	0.196-0.9	0.000009	งานวิจัยนี้
GCE/PGA/Gox	0.5-5.5	0.12	[54]
GCE/GR-MWNTs/AuNP/Gox	0.001-2	0.0041	[58]
GCE/Nafion/MGF/Gox	1.0-12	0.25	[71]
GCE/Gox/Gr/Chitosan	0.08-12	0.02	[53]
GCE/Nafion/MSN/Gox	0.04-2.0	0.02	[12]

5.3.8 การทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา (storage stability)

ในหัวข้อนี้ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาอิเล็กโทรดดัดแปลงที่บรรจุด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในระบบอิมิตัวด้วยอากาศ เพื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพของเอนไซม์ในอิเล็กโทรดดัดแปลงที่แตกต่างกัน โดยปกติแล้วถ้าวัสดุที่มีความสามารถในการรักษาเสถียรภาพที่ดีเมื่อเวลาผ่านไปกระแสไฟฟ้าควรจะลดลงในปริมาณที่ไม่มากนัก แต่ถ้ากระแสไฟฟ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงมากแสดงว่าวัสดุที่มีความสามารถที่จะเก็บรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ต่ำ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในสารละลายกลูโคส 0.9 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธีแอมโพรอเมตรี โดยเปรียบเทียบอิเล็กโทรดที่มีแต่เอนไซม์และอิเล็กโทรดดัดแปลงด้วย MCF/AuNP ที่อัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 5 ค่า คือ 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ ดังรูปที่ 5.18



รูปที่ 5. 18 ผลของการตรวจวัดสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.9 มิลลิโมลาร์ ที่ระบบอิมมูโนตัวด้วยอากาศโดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 0.064 โวลต์ อัตราการสแกน 50 มิลลิโวลต์ต่อวินาที ใน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5.18 ผลปรากฏว่ากระแสไฟฟ้าของอิเล็กโทรดที่มีแต่เอนไซม์ GOx โดยไม่มีตัวรองรับ (GOx/Chitosan) ให้ผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน กระแสไฟฟ้าในวันที่ 7 เหลือร้อยละ 3 จากวันแรก แต่เมื่อเทียบกับวัสดุที่ใช้เป็นตัวรองรับมาทำการตรึงด้วยแล้ว เห็นได้ชัดเจน กระแสไฟฟ้าน้อยกว่าแบบไม่มีวัสดุรองรับที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน TMB/P123 เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ คือ ร้อยละ 54.23 50.83 91.18 75.08 และ 94.77 ตามลำดับ เพราะฉะนั้นการที่มีตัวรองรับ (MCF/AuNP) ทำให้สามารถรักษาเสถียรภาพได้ดีขึ้นและเมื่อเทียบกับวัสดุที่มีขนาดของอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 ต่างกัน พบว่าอัตราส่วนโดยมวลของ TMB/P123 ที่มากที่สุดที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ให้ประสิทธิภาพในการเก็บรักษาได้สูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน คือ ร้อยละ 94.77 เพราะฉะนั้นการที่มีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่และขนาดของหน้าตาที่ใหญ่สามารถที่จะช่วยให้การเก็บรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ดี

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพวัสดุสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต MCF /AuNPs ที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดรูพรุน 5 ชนิด

ซิลิกาที่สังเคราะห์ได้เป็นชนิดเมโซพอร์ัส (mesoporous) โดยมีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ H2 และ H1 (กรณี อัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 และ 2.5) จากภาพถ่ายโครงสร้างของวัสดุ MCF จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า การที่มีปริมาณของอัตราส่วน TMB/P123 เพิ่มขึ้นส่งผลให้ขนาดของรูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีอัตราส่วนของ TMB/P123 น้อยนั้นการกระจายตัวของรูพรุนยังไม่ค่อยดีนักเมื่อเทียบกับแบบอัตราส่วน TMB/P123 มาก อีกทั้งภาพถ่ายโครงสร้างของวัสดุ MCF จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ TMB/P123 ไม่ส่งผลต่อลักษณะของอนุภาคเมโซเซลลูลาร์แต่ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพภายในอนุภาคนั้นๆ เช่น พื้นที่ผิว ขนาดรูพรุนและปริมาตรรูพรุน เป็นต้น และเมื่อมีการใส่อนุภาคนาโนทองจะทำให้พื้นที่ผิวลดลงเนื่องจากอนุภาคนาโนทองนั้นไปถูกสังเคราะห์ลงบนพื้นผิวของ MCF

6.1.2 การศึกษาผลของการตรึงกลูโคสออกซิเดสในวัสดุตรึง

พบว่าวัสดุที่มีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 มากขึ้น ทำให้บรรจุเอนไซม์ได้ปริมาณสูงขึ้น เนื่องจากขนาดของรูพรุนและหน้าต่างที่กว้างกว่าซึ่งสามารถทำให้เอนไซม์เข้าไปได้ง่ายกว่า และเมื่อมีการใส่อนุภาคนาโนทองยิ่งทำให้การตรึงเอนไซม์ได้มากขึ้นเนื่องจากอนุภาคนาโนทองมีความเข้ากันกับสารชีวโมเลกุลได้ดีกว่า MCF

6.1.3 อิทธิพลขนาดของรู MCF/AuNP ต่อประสิทธิภาพของกลูโคสไปโอเซนเซอร์

ในส่วนที่หนึ่งผลการทดสอบวัสดุที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 5 ชนิด ที่มีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 ที่แตกต่างกันเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมฟลูออไรด์ ด้วยวิธี CV ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ในระบบ อิมิตัวด้วยก๊าซไนโตรเจนพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆของกระแสไฟฟ้าเมื่อเทียบระหว่างวัสดุที่ตรึงและไม่ตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส อีกทั้งเมื่อทำการเปลี่ยนความเข้มข้นด้วยวิธีแอมโพรอเมตรีแล้วไม่เห็นความแตกต่างของพีคออกซิเดชันและรีดักชัน เพราะฉะนั้นการที่มี MCF/AuNP มาใช้เป็นตัวรองรับ

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสนั้นไม่ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนโดยตรงจากเอนไซม์ไปยังพื้นผิวหน้าอิเล็กโทรดได้

ในส่วนที่สองทำการทดสอบด้วยไซคลิกโวลต์แอมเพอเมตริกกับความเข้มข้นที่ 10 มิลลิโมลาร์ ในระบบอิมิตัวด้วยอากาศ โดยนำอิเล็กโทรดดัดแปลง MCF/AuNP/Chitosan ในแบบต่างๆ 5 ชนิด คือ วัสดุที่มีอัตราส่วนโดยมวล TMB/P123 จาก 0.5 1.0 1.5 2.5 และ 2.5 แบบมีแอมโมเนียมพลูออไรด์ ที่มีและไม่มีเอนไซม์ จากการทดลองพบว่าฟิสิกออกซิเดชันและรีดักชันไม่มีความแตกต่างกันมาก และเมื่อนำวัสดุที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุดคือ TMB/P123 เท่ากับ 2.5 ที่มีแอมโมเนียมพลูออไรด์ มาทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส พบว่าเมื่อมีปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นจะทำให้พีครีดักชันต่ำลง เนื่องจากเกิดการใช้ของออกซิเจนที่มีปริมาณลดลงเช่นกันที่พีครีดักชันของศักย์ไฟฟ้า 0.064 โวลต์ เมื่อนำวัสดุทั้ง 5 แบบ มาทดสอบด้วยวิธีแอมโพรอเมตริกที่ศักย์ไฟฟ้า 0.064 โวลต์ ซึ่งเป็นพีครีดักชันที่มีการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงขนาดของวัสดุที่มีอัตราส่วนของ TMB/P123 ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.5 ที่มีสารเติมแต่ง โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส ซึ่งพบว่าตัวที่ว่องไวต่อการวัดมากที่สุดคือคือ อัตราส่วน TMB/P123 เท่ากับ 2.5 ที่มีสารเติมแต่ง อีกทั้งค่าการตรวจวัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ของวัสดุที่มีอัตราส่วน TMB/P123 เท่ากับ 2.5 ที่มีสารเติมแต่งนั้นยังให้ค่าการตรวจวัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ต่ำสุดที่ 0.009 ไมโครโมลาร์ เพราะฉะนั้นจึงสรุปว่ายังมีขนาดรูพรุนและหน้าต่าที่ใหญ่จะให้ผลของความว่องไวและค่าการตรวจวัดที่ต่ำที่สุดได้ดีที่สุด

รายการอ้างอิง

- [1] W. Chouyyok, "The Immobilization Of Horseradish Peroxidase On Ag/Mesoporous Silica Nanocomposite," 2008.
- [2] T. Orita, M. Tomita, T. Saito, N. Nishida, and K. Kato, "Immobilization of cholesterol esterase in mesoporous silica materials and its hydrolytic activity toward diethyl phthalate," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, pp. 718-724, 2012.
- [3] Y. Belmabkhout, Serna-Guerrero, R., and Sayari, A. , "Adsorption of from dry gases on MCM-41 silica at ambient temperature and high pressure," *Chemical Engineering Science* pp. 3721-3728, 2009.
- [4] P. H. Pandya, Jasra, R.V., Newalkar, B.L., and Bhatt, P.N. , "Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas.," pp. 67-77, 2005.
- [5] X. Yan, Zhang, L., Zhang, Y., Yang, G., and Yan, Z. , "Amine-Modified SBA-15: Effect of Pore Structure on the Performance for CO₂Capture," *Industrial & Engineering Chemistry Research* pp. 3220-3226, 2011.
- [6] N. Surathin, "Acetylcholinesterase Biosensors Based On Gold Nanoparticles/Mesocellular Foam Silica Nanocomposites For Detection Of Pesticides.," 2012.
- [7] P. Ngammark, "Fabrication Of Silica-Chitosan Nanocomposite Based On Acetylcholinesterase Biosensor For Pesticide Detection," 2011.
- [8] B. Haghighi and M. A. Tabrizi, "Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on a nano-porous glassy carbon electrode," *Electrochimica Acta*, vol. 56, pp. 10101-10106, 2011.
- [9] B. L. Haruo Takahashi, Toshiya Sasaki, Chie Miyazaki, Tsutomu Kajino, Shinji Inagaki, "Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent," *ELSEVIER*, pp. 755-762, 25 may 2000 2001.

- [10] J. Lei, J. Fan, C. Yu, L. Zhang, S. Jiang, B. Tu, *et al.*, "Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 73, pp. 121-128, 2004.
- [11] P. H. Pandya, R. V. Jasra, B. L. Newalkar, and P. N. Bhatt, "Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 77, pp. 67-77, 2005.
- [12] J. Li, X. Qin, Z. Yang, H. Qi, Q. Xu, and G. Diao, "A novel mesoporous silica nanosphere matrix for the immobilization of proteins and their applications as electrochemical biosensor," *Talanta*, vol. 104, pp. 116-21, Jan 30 2013.
- [13] K. Wang, H. Yang, L. Zhu, Z. Ma, S. Xing, Q. Lv, *et al.*, "Direct electron transfer and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified with Nafion and mesoporous carbon FDU-15," *Electrochimica Acta*, vol. 54, pp. 4626-4630, 2009.
- [14] L. Hermida, Abdullah, A.Z., and Mohamed A.R. , "Synthesis and Characterization of Mesostructured Cellular Foam (MCF) Silica Loaded with Nickel Nanoparticles as a Novel Catalyst," *Materials Sciences and Applications*, pp. 52-62, 2013.
- [15] V. Degirmenci, Yilmaz, A., and Uner, D. , "Selective methane bromination over sulfated zirconia in SBA-15 catalysts," *Catalysis Today*, pp. 30-33, 2009.
- [16] F. Hoffmann, Cornelius, M., Morell, J., and Froba, M. , "Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials," *Angew Chem Int Ed Engl* 2006.
- [17] J. Kim, Desch, R.J., Thiel, S.W., Gulians, V.V., and Pinto, N.G. , "Adsorption of biomolecules on mesostructured cellular foam silica: Effect of acid concentration and aging time in synthesis," pp. 60-68, 2012.
- [18] H. Takahashi, Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., and Inagaki, S. , "Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. ," *Chemistry of Materials* pp. 3301-3305, 2000.

- [19] W. W. L. Patrick Schmidt-Winkel, Jr., Dongyuan Zhao, Peidong Yang, Bradley F. Chmelka and Galen D. Stucky, "Mesocellular Siliceous Foams with Uniformly Sized Cells and Windows " *J. Am. Chem. Soc.* , pp. 245-255, 1999.
- [20] K. F. Yukito Oda, Keiko Nishikawa, Seitaro Namba, Hideaki Yoshitake and Takashi Tatsumi, "Mesocellular Foam Carbons: Aggregates of Hollow Carbon Spheres with Open and Closed Wall Structures," *Chemistry of Materials*, pp. 3860-3866, 2004.
- [21] W. W. L. Patrick Schmidt-Winkel, Jr., Dongyuan Zhao, Peidong Yang, Bradley F. Chmelka and Galen D. Stucky, "Mesocellular Siliceous Foams with Uniformly Sized Cells and Windows," pp. 254-255, 1999.
- [22] N. A. Jamalluddin and A. Z. Abdullah, "Effect of 1,3,5-trimethylbenzene dosage on the characteristics and activity of Fe(III) loaded mesocellular foam catalyst in the degradation of acid red B dye in aqueous solution," *Applied Catalysis A: General*, vol. 483, pp. 1-9, 2014.
- [23] T. Sen, G. J. T. Tiddy, J. L. Casci, and M. W. Anderson, "Meso-cellular silica foams, macro-cellular silica foams and mesoporous solids: a study of emulsion-mediated synthesis," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 78, pp. 255-263, 2005.
- [24] Y. Song, J. Chen, H. Liu, Y. Song, F. Xu, H. Tan, *et al.*, "Conformation, Bioactivity and Electrochemical Performance of Glucose Oxidase Immobilized on Surface of Gold Nanoparticles," *Electrochimica Acta*, vol. 158, pp. 56-63, 2015.
- [25] C. Qiu, X. Wang, X. Liu, S. Hou, and H. Ma, "Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nanostructured gold thin films and its application to bioelectrochemical glucose sensor," *Electrochimica Acta*, vol. 67, pp. 140-146, 2012.
- [26] S. Thobhani, *et al.*, "Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins," 2010.
- [27] D. Pletcher, "The first course in electrode process 2nd edition," *The Royal Society of chemistry*, 2009.

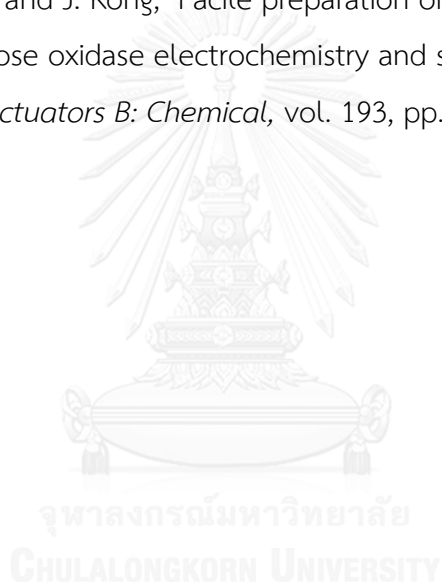
- [28] C. Hruanun, Kirtikara, K., and Tanticharoen, M. , "Use of Sucrose Biosensors for food Industry : Minimization of Interference. ," 1994.
- [29] J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors," pp. 814-825, 2008 2008.
- [30] G. Q. Lu, Zhao, X.S., and Wei, T.K., "Nanoporous materials: science and engineering.," vol. 4, 2004.
- [31] J. S. Lettow, et al., "Hexagonal to mesocellular foam phase transition in polymer-templated mesoporous silicas. ," pp. 8291-8295, 2000.
- [32] Y.-S. Chi, Lin, H.-P., and Mou, C.-Y. , "CO oxidation over gold nanocatalyst confined in mesoporous silica," *Applied Catalysis* pp. 199-206, 2005.
- [33] O. Jullaphan, Witoon, T., and Chareonpanich, M. , "Production Of Mesoporous Silica Adsorbent From Natural Solid Wastes," 2011.
- [34] D. Goradia, Cooney, J., Hodnett, B.K., and Magner, E. , "The adsorption characteristics, activity and stability of trypsin onto mesoporous silicates.," *Molecular Catalysis*, pp. 231-239, 2005.
- [35] J. Lei, et al., "Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace," p. Microporous and Mesoporous Materials, 2004.
- [36] H. H. Yiu, Wright, P.A., and Botting, N.P., "Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves," *Catalysis Today* pp. 293-299, 2004.
- [37] A. S. M. a. Z. Chong, X.S. , "Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst," pp. 293-299, 2004.
- [38] J. Deere, Magner, E., Wall, J.G., and Hodnett, B.K., "Mechanistic and structural features of protein adsorption onto mesoporous silicates," *Physical Chemistry* pp. 7340-7347, 2002.
- [39] M. E. Gimon-Kinsel, Groothuis, K., and Balkus, K.J. , "Photoluminescent properties of MCM-41 molecular sieves," pp. 67-76, 1998.
- [40] Y.-J. Han, Stucky, G.D., and Butler, A. , "Mesoporous silicate sequestration and release of proteins," *American Chemical Society*, pp. 9897-9898, 1999.
- [41] H. Takahashi, Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., and Inagaki, S. , "Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent," pp. 755-762, 2001.

- [42] A. Y. Khan, S. B. Noronha, and R. Bandyopadhyaya, "Glucose oxidase enzyme immobilized porous silica for improved performance of a glucose biosensor," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 91, pp. 78-85, 2014.
- [43] K.-H. Wang, J.-Y. Wu, L.-H. Chen, and Y.-L. Lee, "Architecture effects of glucose oxidase/Au nanoparticle composite Langmuir-Blodgett films on glucose sensing performance," *Applied Surface Science*, vol. 366, pp. 202-209, 2016.
- [44] Z. Chu, Y. Liu, Y. Xu, L. Shi, J. Peng, and W. Jin, "In-situ fabrication of well-distributed gold nanocubes on thiol graphene as a third-generation biosensor for ultrasensitive glucose detection," *Electrochimica Acta*, vol. 176, pp. 162-171, 2015.
- [45] M. Yao, et al. , "The effect of post-processing conditions on aminosilane functionalization of mesocellular silica foam for post-combustion CO₂ capture," *Fuel*, pp. 66-72, 2014.
- [46] Y. Han, Lee, S.S., and Ying, J.Y. , "Spherical siliceous mesocellular foam particles for high-speed size exclusion chromatography," *Chemistry of Materials* pp. 2292-2298, 2007.
- [47] W. Li, Bollini, P., Didas, S.A., Choi, S., Drese, J.H., and Jones, C.W., "Structural changes of silica mesocellular foam supported amine-functionalized CO₂ adsorbents upon exposure to steam," *ACS Appl Mater Interfaces*, 2010.
- [48] E. W. Ping, Venkatasubbaiah, K., Fuller, T.F., and Jones, C.W. , "Oxidative Heck Coupling Using Pd(II) Supported on Organosilane-Functionalized Silica Mesocellular Foam.," *Catalysis Today*, pp. 1048-1054, 2010.
- [49] Y. Han, Lee, S.S., and Ying, J.Y., "Siliceous mesocellular foam for high-performance liquid chromatography: Effect of morphology and pore structure," 2010.
- [50] M. a. K. Shakeri, K. , "Enhancement of *Rhizopus oryzae* lipase activity immobilized on alkyl-functionalized spherical mesocellular foam: Influence of alkyl chain length," pp. 115-120, 2009.
- [51] B. Liang, X. Guo, L. Fang, Y. Hu, G. Yang, Q. Zhu, *et al.*, "Study of direct electron transfer and enzyme activity of glucose oxidase on graphene surface," *Electrochemistry Communications*, vol. 50, pp. 1-5, 2015.

- [52] J. T. Holland, C. Lau, S. Brozik, P. Atanassov, and S. Banta, "Engineering of glucose oxidase for direct electron transfer via site-specific gold nanoparticle conjugation," *J Am Chem Soc*, vol. 133, pp. 19262-5, Dec 7 2011.
- [53] X. Kang, J. Wang, H. Wu, I. A. Aksay, J. Liu, and Y. Lin, "Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing," *Biosens Bioelectron*, vol. 25, pp. 901-5, Dec 15 2009.
- [54] X. Zhou, B. Tan, X. Zheng, D. Kong, and Q. Li, "Interfacial electron transfer of glucose oxidase on poly(glutamic acid)-modified glassy carbon electrode and glucose sensing," *Anal Biochem*, vol. 489, pp. 9-16, Nov 15 2015.
- [55] H.-Z. Zhao, J.-J. Sun, J. Song, and Q.-Z. Yang, "Direct electron transfer and conformational change of glucose oxidase on carbon nanotube-based electrodes," *Carbon*, vol. 48, pp. 1508-1514, 2010.
- [56] Y. Oztekin, A. Ramanaviciene, Z. Yazicigil, A. O. Solak, and A. Ramanavicius, "Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode," *Biosens Bioelectron*, vol. 26, pp. 2541-6, Jan 15 2011.
- [57] B. Haghighi and M. A. Tabrizi, "Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on an overoxidized polypyrrole film decorated with Au nanoparticles," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 103, pp. 566-71, Mar 1 2013.
- [58] R. Devasenathipathy, V. Mani, S. M. Chen, S. T. Huang, T. T. Huang, C. M. Lin, *et al.*, "Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes," *Enzyme Microb Technol*, vol. 78, pp. 40-5, Oct 2015.
- [59] H. F. Cui, K. Zhang, Y. F. Zhang, Y. L. Sun, J. Wang, W. D. Zhang, *et al.*, "Immobilization of glucose oxidase into a nanoporous TiO₂ film layered on metallophthalocyanine modified vertically-aligned carbon nanotubes for efficient direct electron transfer," *Biosens Bioelectron*, vol. 46, pp. 113-8, Aug 15 2013.
- [60] R. Zhao, X. Liu, J. Zhang, J. Zhu, and D. K. Y. Wong, "Enhancing Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase Using a Gold Nanoparticle |Titanate Nanotube

- Nanocomposite on a Biosensor," *Electrochimica Acta*, vol. 163, pp. 64-70, 2015.
- [61] X. Cao, Y. Ye, Y. Li, X. Xu, J. Yu, and S. Liu, "Self-assembled glucose oxidase/graphene/gold ternary nanocomposites for direct electrochemistry and electrocatalysis," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 697, pp. 10-14, 2013.
- [62] F. Hu, S. Chen, C. Wang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Xiang, *et al.*, "ZnO nanoparticle and multiwalled carbon nanotubes for glucose oxidase direct electron transfer and electrocatalytic activity investigation," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 72, pp. 298-304, 2011.
- [63] S. Palanisamy, C. Karuppiyah, and S. M. Chen, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite modified electrode," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 114, pp. 164-9, Feb 1 2014.
- [64] W.-C. Wu, J.-L. Huang, and Y.-C. Tsai, "Direct electron transfer and biosensing of glucose oxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica modified electrode," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, pp. 983-987, 2012.
- [65] X. Xiao, B. Zhou, L. Zhu, L. Xu, L. Tan, H. Tang, *et al.*, "An reagentless glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on poly(methylene blue) doped silica nanocomposites," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 165, pp. 126-132, 2012.
- [66] A. Wisitsoraat, S. Pakapongpan, C. Sriprachuabwong, D. Phokharatkul, P. Sritongkham, T. Lomas, *et al.*, "Graphene-PEDOT:PSS on screen printed carbon electrode for enzymatic biosensing," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 704, pp. 208-213, 2013.
- [67] X. Zhang, Q. Liao, M. Chu, S. Liu, and Y. Zhang, "Structure effect on graphene-modified enzyme electrode glucose sensors," *Biosens Bioelectron*, vol. 52, pp. 281-7, Feb 15 2014.
- [68] M. Shamsipur and M. A. Tabrizi, "Achieving direct electrochemistry of glucose oxidase by one step electrochemical reduction of graphene oxide and its use

- in glucose sensing," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 45, pp. 103-8, Dec 2014.
- [69] K. Hyun, S. W. Han, W.-G. Koh, and Y. Kwon, "Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on carbon nanotube for improving glucose sensing," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 40, pp. 2199-2206, 2015.
- [70] W. Na, Q. Wei, H. Sun, and Z.-R. Nie, "Catalase immobilized on siliceous mesocellular foam with controlled window size," *Journal of Porous Materials*, vol. 20, pp. 75-79, 2012.
- [71] Y. Wang, H. Li, and J. Kong, "Facile preparation of mesocellular graphene foam for direct glucose oxidase electrochemistry and sensitive glucose sensing," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 193, pp. 708-714, 2014.



ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ไอโซเทอมของการดูดซับและการคายซับก๊าซไนโตรเจน

MCF124		MCF224		MCF324		MCF524		MCF524+Add	
P/P ₀	ปริมาตร STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาตร STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาตร STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาตร STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาตร STP(cc/g)
0.02	82.94	0.02	93.45	0.02	82.02	0.02	114.55	0.02	87.43
0.05	99.17	0.05	109.46	0.05	95.57	0.05	133.29	0.05	103.84
0.07	106.01	0.08	119.32	0.07	102.06	0.08	144.45	0.07	111.33
0.10	112.79	0.10	125.82	0.10	108.70	0.10	152.32	0.10	118.94
0.15	124.47	0.15	137.19	0.15	119.98	0.15	166.79	0.15	131.78
0.20	132.90	0.20	146.24	0.20	128.18	0.20	179.14	0.20	141.13
0.25	141.11	0.25	155.10	0.25	136.58	0.25	190.31	0.25	150.47
0.30	149.11	0.30	163.51	0.30	144.58	0.30	199.39	0.30	159.68
0.40	164.82	0.40	179.39	0.40	160.50	0.40	220.74	0.40	177.82
0.50	181.36	0.50	197.80	0.50	178.54	0.50	242.50	0.50	198.76
0.60	201.98	0.60	217.26	0.60	198.39	0.60	267.08	0.60	221.96
0.70	229.27	0.70	244.37	0.70	225.55	0.70	300.91	0.70	253.29
0.80	282.25	0.80	292.09	0.80	271.93	0.80	352.47	0.80	300.18
0.90	398.33	0.90	375.00	0.90	371.71	0.90	473.42	0.90	401.97
0.99	440.15	0.99	396.36	0.99	422.13	0.99	930.37	0.99	1544.09
1.00	441.84	1.00	397.38	1.00	424.10	1.00	932.55	0.99	1548.08
0.90	429.13	0.90	386.09	0.90	408.45	0.90	910.55	0.90	1403.89
0.80	418.87	0.80	379.06	0.80	397.96	0.80	851.90	0.80	387.98
0.70	394.54	0.69	373.10	0.70	388.58	0.70	484.70	0.70	273.37
0.60	369.20	0.59	367.61	0.60	379.52	0.60	365.38	0.60	227.58
0.50	348.85	0.50	296.31	0.50	265.85	0.50	311.24	0.50	202.82
0.39	165.65	0.40	182.60	0.40	163.61	0.40	222.75	0.40	180.66

ตารางที่ ก.2(ต่อ) ไอโซเทอมของการดูดซับและการคายซับก๊าซไนโตรเจน

MCF124		MCF224		MCF324		MCF524		MCF524+Add	
P/P ₀	ปริมาณ STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาณ STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาณ STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาณ STP(cc/g)	P/P ₀	ปริมาณ STP(cc/g)
0.30	151.05	0.30	166.69	0.30	147.58	0.30	201.28	0.29	161.63
0.19	133.75	0.20	148.95	0.20	131.24	0.20	179.90	0.20	144.31
0.10	114.32	0.10	128.94	0.10	112.57	0.10	153.63	0.10	121.46
0.05	99.44	0.05	114.42	0.05	98.56	0.05	136.04	0.05	104.96
0.02	85.81	0.02	98.53	0.02	84.27	0.02	116.01	0.02	88.88
0.30	151.05	0.30	166.69	0.30	147.58	0.30	201.28	0.29	161.63

ตารางที่ ก.3 การตรึงเอนไซม์ลงบน MCF

MCF	อัตราส่วน TMB/P123	การบรรจุ เอนไซม์ ครั้งที่ 1	การบรรจุ เอนไซม์ ครั้งที่ 2	การบรรจุ เอนไซม์ ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน	เปอร์เซ็นต์ การบรรจุ เอนไซม์
MCF124	0.50	41.50	42.60	42.50	4.22	0.61	42.20
MCF224	1.00	47.60	48.35	48.70	4.82	0.561	48.22
MCF324	1.50	51.90	52.60	53.10	5.25	0.60	52.532
MCF524	2.50	70.20	69.10	69.80	6.97	0.56	69.70
MCF524 +additive	2.50	74.30	74.10	74.80	7.44	0.36	74.40

ตารางที่ ก.4 การตรึงเอนไซม์ลงบน MCF/AuNP

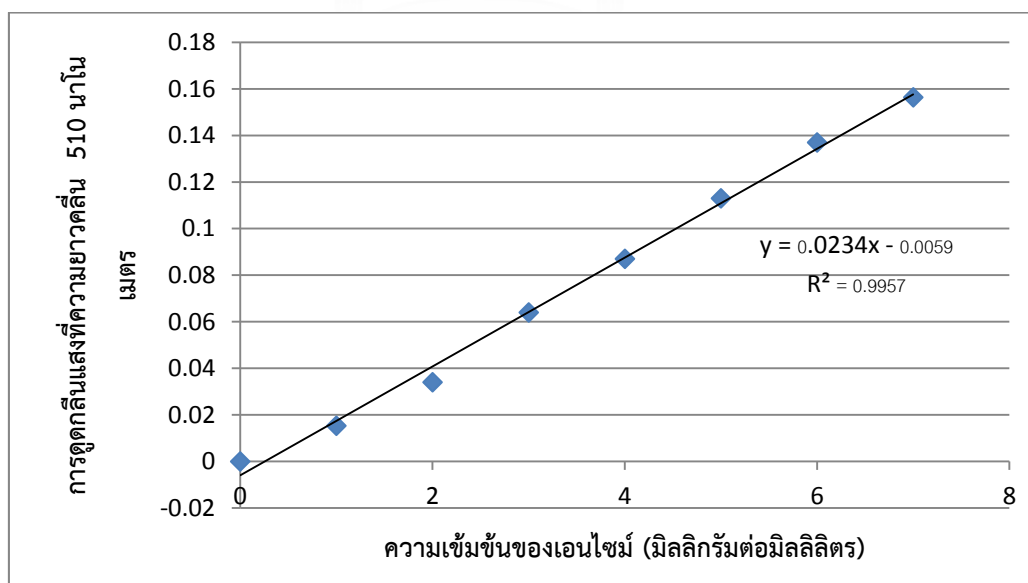
MCF /AuNP	อัตราส่วน TMB/P123	การบรรจุ เอนไซม์ ครั้งที่ 1	การบรรจุ เอนไซม์ ครั้งที่ 2	การบรรจุ เอนไซม์ ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน	เปอร์เซ็นต์ การบรรจุ เอนไซม์
MCF124	0.50	46.60	46.90	47.20	4.69	0.30	46.90
MCF224	1.00	50.60	51.80	52.10	5.15	0.79	51.50
MCF324	1.50	54.20	54.80	56.60	5.52	1.25	55.20
MCF524	2.50	70.80	72.90	72.60	7.21	1.14	72.10
MCF524 +additive	2.50	79.85	80.20	80.10	8.01	0.18	80.05

การหาปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงในวัสดุตรึง

สูตรคำนวณ :

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง} = \text{ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น} - \text{ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึง}$$

โดยปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึงสามารถเทียบหาได้จากกราฟมาตรฐาน (โดยเอนไซม์จะมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร



รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น ต่างๆ

ตารางที่ ก.5 การคำนวณมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น ต่างๆ

ความเข้มข้น เอนไซม์ (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	การดูดกลืน ครั้งที่ 1	การดูดกลืน ครั้งที่ 2	การดูดกลืน ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
10	0.189	0.188	0.188	0.188	0.00057735
9	0.178	0.179	0.179	0.1787	0.00057735
8	0.17	0.171	0.171	0.171	0.00057735
7	0.157	0.156	0.156	0.156	0.00057735
6	0.137	0.137	0.137	0.137	0
5	0.113	0.113	0.113	0.113	0
4	0.087	0.087	0.087	0.087	1.69967E-17
3	0.064	0.064	0.064	0.064	0
2	0.034	0.034	0.034	0.034	0
1	0.016	0.015	0.015	0.015	0.00057735

ตัวอย่างการคำนวณการหาปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง

สูตรคำนวณ :

ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง = ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลาย - ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึง

โดยที่ ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลายเตรียมมีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึงในวัสดุ MCF เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง
ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

มีค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ครั้งที่ 1: 0.095

ครั้งที่ 2: 0.096

ครั้งที่ 3: 0.098

มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0963

เทียบจากกราฟมาตรฐานที่ค่าการดูดกลืนแสง 0.0963

จะมีความเข้มข้นของเอนไซม์: 4.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น

ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง = ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นในสารละลาย - ปริมาณเอนไซม์อิสระที่ไม่ถูกตรึง
= 10-4.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
= 5.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 56.30 %)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ยุทธพงศ์ กลิ่นธงชัย เกิดเมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2535 ในจังหวัด นครราชสีมา สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นมัธยมปลาย จากโรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2553 หลังจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2557 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตร มหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะ วิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2557

